

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

PAR  
SARAH-AMÉLIE MERCURE, B. Sc (BIOLOGIE)

POTENTIEL DE DÉTECTION PAR FLUORESCENCES INDUITES PAR UV ET  
EFFETS SUR LA PHOTOSYNTÈSE DES ACIDES JASMONIQUE,  
SALICYLIQUE ET BENZOTHIADIAZOLE

DÉCEMBRE 2004

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

## RÉSUMÉ

*But* : Évaluer les effets physiologiques précoces de l'induction de résistance chez le tournesol par l'analyse de ses émissions de fluorescence et de sa fonction photosynthétique.

*Méthode* : Des plants de tournesol nain (*Helianthus annuus* cultivar 'Sunspot') ont été cultivés en chambre de croissance et traités par l'application foliaire d'une pâte de lanoline contenant du méthanol (témoin) ou 100 µg d'acide jasmonique (AJ), d'acide salicylique (AS) ou de benzothiadiazole (Actigard®, Acti). Dans un premier temps, les fluorescences chlorophylliennes (induites par lumière bleue et rayonnement UV) et bleu-vert (induite par UV) et les contenus en pigments et composés phénoliques solubles ont été mesurés au niveau d'une feuille traitée et d'une feuille distale en pleine croissance (mesures de fluorescence uniquement) 48 heures après l'application chez 188 plants (au cours de 4 répétitions de l'expérience). Dans un second temps, les paramètres de photosynthèse et d'expansion foliaire ont été déterminés chez 48 plants ( $n=7$ ) pendant 7 jours à partir du jour des traitements. Des courbes du taux net d'assimilation du CO<sub>2</sub> en fonction de la concentration externe en CO<sub>2</sub> ( $A/C_e$ ), des mesures du taux de transport photosynthétique d'électrons (taux de dégagement d'oxygène de suspensions de thylakoïdes) et des déterminations du gradient de pH trans-thylakoïde (*quenching* de la fluorescence du 9-aminoacridine) ont finalement été effectuées chez des plants traités à l'AS et des témoins ( $n=4$ ).

*Résultats* : Les émissions de fluorescences induites par UV n'étaient pas affectées par les traitements. Au cours de l'une ou l'autre des quatre répétitions de l'expérience, les mesures de fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue des feuilles distales du point d'application et les contenus en chlorophylle *a*, caroténoïdes et composés phénoliques solubles différaient d'un traitement à l'autre. Les mesures parallèles du taux net d'assimilation (*A*) et de l'expansion foliaire ont montré que l'*A* des plants AS était diminué au lendemain des traitements et que leur expansion foliaire, au même titre que celle des plants Acti, l'était également au 6<sup>e</sup> jour suivant. Les courbes  $A/C_e$  établies chez les plants AS ont permis de mesurer une baisse de 23 % dans l'efficacité de

carboxylation. Leur taux de transport d'électrons n'était pas affecté et leur gradient de pH était diminué de 26 %. Un modèle de l'effet de l'AS sur la photosynthèse a pu être établi.

*Conclusions* : L'absence d'effet des traitements sur les émissions de fluorescence induite par UV concorde avec l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits voulant que les changements physiologiques détectés par cette méthode soient le reflet d'une disparité entre les processus à l'origine de la production d'énergie et ceux à son issue. Pour sa part, l'effet physiologique adverse de l'inducteur AS mis en évidence ici aurait avantage à être étudié en conditions non contrôlées, de manière à en évaluer l'impact réel sur le rendement des plantes. La réduction de l'expansion foliaire que ce dernier ainsi que son analogue chimique, le BTH, provoquaient devrait également faire l'objet de travaux futurs visant à évaluer le coût métabolique de la résistance qu'elle pourrait imputer. La résistance conférée par l'AJ ne se traduisant apparemment par aucune altération métabolique, son intérêt pratique en tant qu'inducteur s'en trouve renforcé.

*Mots-clés* : stress biotiques, résistance induite, coût métabolique de la résistance, acide jasmonique, acide salicylique, benzothiadiazole, *Helianthus annuus*, fluorescences induites par UV, photosynthèse.

## AVANT-PROPOS

Avant de débiter mes études de maîtrise, ma formation en biologie ainsi que mes travaux auprès du Professeur Guy Samson et de son équipe du laboratoire de physiologie végétale de l'UQTR m'avaient préparée à utiliser les fluorescences induites par UV et à en comprendre les fondements physiologiques. Le vaste champ de savoir gravitant autour de la résistance des plantes, pour sa part, m'était inconnu.

Lors de l'élaboration du présent projet, je me proposais de m'initier aux outils d'investigation privilégiés par les chercheurs oeuvrant dans ce domaine que je découvrais. Ces méthodes, qui m'étaient pour la plupart étrangères, requerraient que je fasse appel à l'expertise de collaborateurs plus férus en biologie moléculaire. En ce sens, la Professeure Hélène Glémet et les membres de son laboratoire m'ont été d'un grand secours. Ils m'ont appris les techniques de quantification des protéines et celle du dosage des activités enzymatiques.

Cependant, à la lumière des résultats alors obtenus, force m'était de constater que les protéines présentes initialement dans les échantillons avaient dû être dégradées au cours de la période séparant leur prélèvement et leur mesure. Ainsi, bien que le protocole initial prévoyait la présentation de résultats concernant les contenus protéiques, l'activité des peroxydases pariétales et celle de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzymes-clé induites en réaction à l'élicitation de résistance, de telles réponses n'ont pu être documentées. Pour pallier à certaines des lacunes ainsi créées et pour faciliter l'interprétation des autres données colligées, les composés phénoliques solubles, produits issus de la réaction catalysée par la PAL, ont été mesurés sur les échantillons originalement destinés aux dosages enzymatiques. Mises à part ces digressions, le protocole d'abord soumis, puis approuvé par les membres du Comité d'orientation, a été rigoureusement respecté. Le document qui suit en relate les résultats et conclusions.

N'eût été de l'aide inestimable de mon directeur et des autres experts qui m'ont épaulée dans mon travail et de la contribution essentielle que m'a accordée le Nateq tout au long de mon cheminement, il ne m'aurait été possible de réaliser ce projet. Toute ma reconnaissance...

À ma Famille.

*« Nous appelons science un tâtonnement sombre.  
L'abîme, autour de nous, lugubre tremblement,  
S'ouvre et se ferme ; et l'œil s'effraie également  
De ce qui s'engloutit et de ce qui surnage.  
Sans cesse, le progrès, roue au double engrenage,  
Fait marcher quelque chose en écrasant quelqu'un. »*

Voyage de nuit, Victor Hugo

## TABLE DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>i</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES</b> .....	<b>xii</b>
<b>CHAPITRE I INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 Problématique .....	1
1.2 Objectifs.....	4
<b>CHAPITRE II REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>5</b>
2.1 Résumé.....	5
2.2 Induction de réactions de défense .....	6
2.2.1 Effets physiologiques des inducteurs.....	6
2.2.1.1 Principaux effets rapportés.....	8
A. Réponse aux insectes herbivores .....	8
a) Réparation des tissus.....	10
b) Production de défenses directes.....	11
c) Signalisation (acide jasmonique) .....	13
d) Altérations du métabolisme normal.....	15
B. Réponse aux agents pathogènes.....	18
a) Mise en place de barrières structurales.....	19
b) Synthèse et accumulation de composés défensifs .....	21
c) Signalisation (acide salicylique).....	23
d) Développement d'une réaction hypersensible (RH).....	25
e) Altérations du métabolisme normal.....	26

C.	Réponse aux agents chimiques de résistance induite.....	28
a)	Le benzothiadiazole .....	29
2.2.1.2	Théories de la défense des plantes.....	32
A.	La Défense Optimale.....	33
B.	La Photoinhibition.....	35
C.	La Balance Carbone:Nutriment.....	35
D.	La Disponibilité des Ressources .....	37
E.	La Balance Croissance-Différenciation .....	38
2.2.2	Fluorodétection des effets physiologiques de l'induction de résistance biotique.....	41
2.2.2.1	Principaux usages de la fluorodétection.....	42
A.	Fluorescence chlorophyllienne.....	42
a)	Approche structurale : Analyse des spectres d'émission.....	43
b)	Détection de stress abiotiques et biotiques.....	46
B.	Fluorescence bleu-vert induite par UV .....	47
a)	Particularités de la fluorescence bleu-vert.....	48
b)	Détection de stress .....	48
2.2.2.2	Interprétation théorique des changements de fluorescence .....	51
A.	L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits.....	52
a)	Changements de fluorescence en réponse au stress : le cas de l'azote revisité.....	53
b)	Changements de fluorescence en réponse à l'induction de résistance .....	53
2.3	Appareil photosynthétique.....	54
2.3.1	Photosynthèse .....	55
2.3.1.1	Les réactions photochimiques et le transport d'électrons .....	56
A.	De l'eau au NADPH : génération du pouvoir réducteur.....	56
B.	Photophosphorylation : production chimiosmotique d'ATP.....	57
2.3.1.2	Les réactions biochimiques d'assimilation du carbone .....	58
A.	Le CO <sub>2</sub> : de l'atmosphère au chloroplaste.....	58
B.	Du CO <sub>2</sub> aux sucres.....	59
2.3.2	Outils de mesure dans l'étude de la photosynthèse .....	61
2.3.2.1	Mesures d'échanges gazeux .....	61



2.3.2.2	Mesure du taux de transport photosynthétique d'électrons .....	65
2.3.2.3	Mesure du gradient de pH .....	66
<b>CHAPITRE III DÉTECTION DES ÉTATS DE RÉSISTANCE PAR L'ANALYSE DES ÉMISSIONS DE FLUORESCENCE .....</b>		<b>68</b>
3.1	Résumé.....	68
3.2	Introduction.....	68
3.3	Matériel et méthode .....	71
3.3.1	Matériel végétal et conditions de croissance .....	71
3.3.2	Traitements.....	72
3.3.3	Échantillonnage.....	72
3.3.4	Mesure des contenus en pigments photosynthétiques.....	73
3.3.5	Mesure des composés phénoliques solubles totaux.....	74
3.3.6	Mesure des émissions de fluorescence.....	75
3.3.7	Analyses statistiques.....	76
3.4	Résultats.....	76
3.5	Discussion.....	81
<b>CHAPITRE IV COÛT MÉTABOLIQUE DE LA RÉSISTANCE .....</b>		<b>88</b>
4.1	Résumé.....	89
4.2	Introduction.....	90
4.3	Matériel et méthode .....	93
4.3.1	Matériel végétal et conditions de croissance .....	93
4.3.2	Traitements.....	93
4.3.3	Mesures morphologiques .....	94
	A. Échantillon et mesures.....	94
	B. Analyse des données morphologiques .....	95
4.3.4	Échanges gazeux.....	95
4.3.4.1	Taux net d'assimilation du CO <sub>2</sub> (A) .....	95
	A. Échantillon et mesures.....	95
	B. Analyse des données d'A .....	96
4.3.4.2	Courbes A/C <sub>e</sub> .....	96

A.	Échantillon et mesures .....	97
B.	Analyse des données des courbes $A/C_e$ .....	97
4.3.5	Taux de transport d'électrons et gradient de pH.....	98
4.3.5.1	Échantillons .....	98
4.3.5.2	Isolation des thylakoïdes.....	98
4.3.5.3	Mesures.....	99
A.	Taux de consommation d'oxygène .....	100
B.	Gradient de pH ( $q9AA$ ).....	100
4.3.5.4	Analyse des données de taux de consommation d' $O_2$ et de $q9AA$ .....	101
4.3.6	Produits chimiques.....	101
4.3.7	Analyses statistiques.....	101
4.4	Résultats.....	101
4.4.1	Effets des inducteurs sur les taux d'assimilation photosynthétique du $CO_2$ et l'expansion foliaire .....	101
4.4.2	Effets de l'acide salicylique sur la photosynthèse.....	102
4.4.2.1	Échanges gazeux et courbes $A/C_e$ .....	102
A.	Taux d'assimilation ( $A$ ) et conductance stomatique ( $g_s$ ) en réponse au traitement .....	103
B.	Taux d'assimilation maximal ( $A_{max}$ ).....	103
C.	Efficacité de carboxylation (EC) .....	103
D.	Point de compensation en $CO_2$ ( $\Gamma$ ).....	105
4.4.2.2	Taux de transport d'électrons et gradient de pH trans- thylakoïde.....	106
4.5	Discussion.....	107
 <b>CHAPITRE V INTERPRÉTATION PHYSIOLOGIQUE DES</b>		
<b>ÉMISSIONS DE FLUORESCENCES INDUITES PAR</b>		
<b>UV : MÉTA-ANALYSE DE L'HYPOTHÈSE DU</b>		
<b>DÉSÉQUILIBRE SOURCE:PUITS.....</b>		
5.1	Résumé.....	117
5.2	Introduction.....	117
5.3	Méthode .....	120
5.3.1	Échantillonnage et critères d'inclusion .....	120

5.3.2	Variables .....	121
5.3.2.1	Choix des variables .....	121
5.3.2.2	Calcul de la variable explicative S:P .....	122
5.3.3	Analyses .....	122
5.4	Résultats.....	123
5.4.1	Description de l'échantillon .....	123
5.4.2	Effets des stress sur les émissions de fluorescences induites par UV.....	124
5.4.3	Méta-analyse.....	124
5.5	Discussion.....	126
<b>CHAPITRE VI CONCLUSION.....</b>		<b>128</b>
6.1	Rappel des objectifs et conclusions spécifiques .....	128
6.2	Conclusion générale.....	129
<b>REMERCIEMENTS.....</b>		<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>136</b>

**LISTE DES TABLEAUX**

3-1. Effets des trois inducteurs sur différents paramètres physiologiques du tournesol .....	78
3-2. Réponses induites de façon différentielle selon la catégorie d'inducteurs. ....	80
4-1. Effet de l'application foliaire d'acide salicylique sur le transport photosynthétique d'électrons chez des thylakoïdes de tournesol. ....	106
5-1. Données utilisées dans la méta-analyse des effets d'altérations du métabolisme source:puits sur la transmittance de l'épiderme aux UV (TEUV) .....	124

## LISTE DES FIGURES

2-1. Spectre d'émission de fluorescence typique.....	44
2-2. Chevauchement entre les spectres d'absorption de la lumière et d'émission de fluorescence chlorophyllienne .....	44
2-3. Courbe $A/C_i$ idéalisée .....	64
3-1. Démarche séquentielle de discrimination des stress provoqués par divers types d'inducteur de résistance .....	87
4-1. Changements dans le taux net d'assimilation du $CO_2$ et la surface de la feuille traitée suivant l'application foliaire des inducteurs de résistance .....	104
4-2. Réponse du taux net d'assimilation du $CO_2$ à la diminution de la concentration externe en $CO_2$ suivant l'application foliaire d'acide salicylique .....	105
4-3. Effet de l'application foliaire d'acide salicylique sur le gradient de pH trans- thylakoïde.....	107
4-4. Modèle de l'effet à court terme de l'acide salicylique sur l'activité photosynthétique.....	111
5-1. L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits et son lien avec la transmittance de l'épiderme aux UV .....	125
6-1. Schéma récapitulatif de diverses conditions de stress étudiées et des altérations au métabolisme Source:Puits et à la transmittance de l'épiderme qu'elles causent.....	134

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

$\Gamma$	point de compensation en CO <sub>2</sub>
9AA	9-aminoacridine
$A$	taux net d'assimilation du CO <sub>2</sub>
$A_{760}$	quantification des composés phénoliques selon la méthode de Folin-Ciocalteu
Acti	Actigard®
AJ	acide jasmonique
$A_{max}$	taux maximal d'assimilation nette du CO <sub>2</sub>
$A_{phén}$ , $A_{325}$ et $A_{337}$	absorbances attribuables aux composés phénoliques solubles dans le méthanol, mesurées à 325 nm et 337 nm
AS	acide salicylique
ATP, ADP	adenosine triphosphate, adenosine diphosphate
BGF	fluorescence bleu-vert induite par UV
BTH	benzothiadiazole (acide benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioïque S-méthyl ester)
$C_a$	concentration ambiante en CO <sub>2</sub> (actuellement, c. 350 ppm)
$C_c$	concentration de CO <sub>2</sub> au site de carboxylation
$C_e$	concentration externe en CO <sub>2</sub>
ChlF, ChlF <sub>BLEUE</sub> , ChlF <sub>UV</sub>	fluorescences chlorophylliennes, induites par lumière bleue, par UV
ChlF <sub>UV</sub> /ChlF <sub>BLEUE</sub>	transmittance de l'épiderme aux UV (ou TEUV)
$C_i$	concentration interne en CO <sub>2</sub> (concentration molaire intercellulaire)
Cyt <i>b<sub>f</sub></i>	cytochrome <i>b<sub>f</sub></i>
$E$	taux de transpiration
EC	efficacité de carboxylation
$F_{690}$ , $F_{740}$ , $F_{750}$	fluorescences chlorophylliennes mesurées à 690, 740, 750 nm
$g_s$	conductance stomatique
HPS (lampes)	<i>high pressure sodium</i> (à vapeur de sodium à haute pression)

<b>IRGA</b>	<i>infra-red gas analyser</i> (système infrarouge d'analyse des gaz)
<b>ISR</b>	<i>induced systemic resistance</i> (résistance systémique induite)
<b>LAR</b>	<i>localised acquired resistance</i> (résistance locale acquise)
<b>LHCPs, LHCPI et LHCPII</b>	complexes d'absorption de la lumière, associés aux PSI et II
<b>MV</b>	méthyl viologène
<b>NADP<sup>+</sup>, NADPH</b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé, réduit
<b>P680 et P700</b>	centres réactionnels des photosystèmes II et I
<b>PAL</b>	phénylalanine ammonia-lyase
<b>PAR</b>	<i>photosynthetically active radiation</i> (radiation photosynthétique active)
<b>PC</b>	plastocyanine
<b>Phéo</b>	phéophytine
<b>P<sub>i</sub></b>	phosphate inorganique
<b>POX</b>	peroxydases pariétales
<b>PQ, PQH<sub>2</sub></b>	plastoquinones, plastoquinones réduites (ou plastohydroquinone)
<b>protéines PR</b>	protéines reliées à la pathogénèse
<b>PSI et PSII</b>	photosystèmes I et II
<b>q9AA</b>	<i>quenching</i> de la fluorescence du 9-aminoacridine
<b>Q<sub>B</sub></b>	site de liaison des plastoquinones
<b>r</b>	résistance stomatique
<b>Rubisco</b>	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase
<b>RuBP</b>	ribulose-1,5-biphosphate
<b>SAR</b>	<i>systemic acquired resistance</i> (résistance systémique acquise)
<b>TEUV</b>	ChI <sub>F<sub>UV</sub></sub> /ChI <sub>F<sub>BLEUE</sub></sub> (transmittance de l'épiderme aux UV)

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

Cette première section introduit la problématique dans laquelle s'insère le présent travail et pose les objectifs poursuivis.

#### 1.1 PROBLEMATIQUE

Pour se protéger des assauts continuels auxquels elles font face, les plantes disposent d'un arsenal de défenses directes et indirectes. Dans les systèmes naturels, ces mécanismes ne sont pas toujours exprimés à leur niveau maximal. Plutôt, les végétaux se sont dotés, au cours de l'évolution, de systèmes sophistiqués de perception et de signalisation des stimuli associés à diverses attaques, afin de faire usage des ressources disponibles de manière optimale (Stout et al., 2002). Ainsi, typiquement, différents facteurs exogènes ou endogènes affecteront substantiellement la physiologie de la plante-hôte, induisant des changements rapides et coordonnés dans la régulation de nombreux gènes (Benhamou et Belanger, 1998). Les réponses biochimiques et morphologiques qui s'ensuivront seront fonction de l'agent les ayant élicitées.

*In planta*, cette induction de réactions défensives s'effectuerait par l'entremise de messagers secondaires, c'est-à-dire des molécules qui transmettront le signal de l'attaque au noyau des cellules assaillies. Bien qu'une telle fonction ait pu être attribuée à de nombreuses molécules, les travaux des dernières années ont mis l'accent sur les rôles critiques des acides jasmonique et salicylique (Reymond et Farmer, 1998). Ainsi, l'acide jasmonique est reconnu comme une composante centrale du sentier signalétique impliqué dans la perception et la réponse subséquente des plantes aux attaques par des insectes herbivores (Farmer et Ryan, 1992). Pour sa part, l'acide salicylique aurait un rôle équivalent en ce qui concerne la signalisation d'attaques pathogéniques (Malamy et al., 1990). L'induction d'une résistance systémique procurée par ces molécules chez les plantes les produisant a inspiré la mise au point d'analogues chimiques destinés à l'usage au champ. Parmi ceux-ci, le benzothiadiazole (BTH), analogue de l'acide salicylique, est un nouvel agent de contrôle des maladies. Ce produit, récemment commercialisé, est promu par ses concepteurs comme fiable, sûr et non phytotoxique (Benhamou et Belanger, 1998).



Suite à l'application de tels inducteurs de résistance ou après l'attaque d'une plante par un agresseur, on démontrera classiquement qu'il y a eu activation de mécanismes de défense en mesurant des marqueurs moléculaires, tels les inhibiteurs de protéases (Li et al., 2003) et les protéines reliées à la pathogenèse (protéines PR) (Ward et al., 1991). Une stricte corrélation entre l'accumulation de ces protéines et les réponses de résistance n'est cependant pas toujours observée (van Loon et al., 1998; Kohler et al., 2002). Or, des réponses de défense additionnelles telles que la rigidification des parois cellulaires et la production de composés phénoliques sont également des événements précoces strictement régulés qui sont généralement observés suite à des attaques d'insectes et pathogènes (Dixon et Paiva, 1995; Vom et al., 2002). Ces manifestations pourraient devenir d'intéressants marqueurs si de nouveaux outils permettaient leur détection rapide et efficace.

De récents travaux montrent justement que les émissions de fluorescence des plantes seraient altérées de façon caractéristique par des changements dans les contenus foliaires en composés phénoliques (Morales et al., 1996; Lichtenthaler et Schweiger, 1998; Burchard et al., 2000; Markstädter et al., 2001; Mercure et al., 2004). En outre, l'analyse de ces émissions s'avère une méthode pratique de détermination du statut physiologique général des plantes (Ning et al., 1995). Cette analyse repose sur la détection et la quantification des émissions de fluorescence induites chez les plantes par l'application d'une lumière UV. En effet, lorsque excitée dans cette région du spectre, une feuille verte émettra deux types distincts de fluorescence, soit 1) la fluorescence chlorophyllienne et 2) la fluorescence bleu-vert. La fluorescence chlorophyllienne est étudiée depuis de nombreuses années et son utilisation en tant que sonde intrinsèque de l'efficacité photosynthétique est désormais démontrée (Krause et Weis, 1991). Par contre, la fluorescence bleu-vert n'a été introduite que plus récemment dans la littérature concernant la détection des stress (Stober et Lichtenthaler, 1993). L'analyse de cette émission caractéristique ne possède donc pas encore les fortes bases physiologiques dont jouit la fluorescence chlorophyllienne, mais les travaux menés à ce jour rapportent des résultats encourageants (Heisel et al., 1996; Langsdorf et al., 2000).

À la lumière de ces informations, il est justifié de proposer que les réponses physiologiques induites chez les plantes suite à l'élicitation de résistance pourront être

détectées par l'examen des variations dans leurs émissions de fluorescence. Cependant, la spécificité de ces changements demeure incertaine et un cadre théorique favorisant le postulat d'hypothèses vérifiables tarde toujours à se développer. C'est pourquoi, dans l'état actuel des connaissances, les altérations de fluorescence observées empiriquement chez des plants soumis à des stress distincts doivent être étudiées en profondeur, soutenues par des bases physiologiques mieux définies et colligées en un schème synthétique.

Une seconde problématique soulevant un vif intérêt dans la littérature récente concerne le coût métabolique de la résistance (Heil, 2001; Heil et Baldwin, 2002). En effet, il appert qu'en parallèle à l'augmentation de la dépense énergétique inhérente à la fabrication de composés défensifs et structuraux, une baisse de la photosynthèse est l'une des manifestations les plus communément rapportées en réponse à l'attaque (Huang, 2001). Or, une certaine controverse règne toujours en ce qui a trait à la mise en évidence des causes de cette réaction paradoxale. En effet, le domaine de la physiologie végétale, pourtant concerné par ce type de réactions fondamentalement physiologiques, n'a jusqu'à présent joué qu'un rôle secondaire dans le développement de Théories de la défense des plantes (Karban et Baldwin, 1997). De telles informations sont cependant primordiales dans le contexte actuel. Effectivement, comprendre ce qui limite la photosynthèse en réponse à différentes conditions sous-optimales s'avère d'une importance primordiale tant en recherche environnementale qu'en agriculture (Long et al., 1996). En ce sens, malgré qu'on ait d'abord misé sur les aspects positifs liés au phénomène de la résistance induite dans un contexte agricole, il devient maintenant clair qu'un coût métabolique est associé à ce genre de pratiques. Ainsi, par exemple, les inducteurs chimiques comme le BTH ne semblent pas toujours posséder les qualités non phytotoxiques que leur ont d'abord attribuées leurs concepteurs (Tosi et al., 1999; Wurms et al., 1999). Des analyses détaillées des conséquences de l'induction telles que mesurées en considérant le « point de vue de la plante » sont donc prestement requises.

Dans un effort visant à éclaircir ces aspects concernant la détection précoce et le coût métabolique de la résistance, le présent projet a misé sur l'usage d'inducteurs aux modes d'action distincts (acide jasmonique, acide salicylique, BTH) et l'exploitation d'approches expérimentales encore peu employées dans ce domaine (fluorescences

induites par UV). L'espèce-modèle étudiée, le tournesol, a été choisie parce qu'elle se prête bien à ce genre de mesures, qu'elle montre une grande plasticité en réponse aux stress environnementaux (Ciompi et al., 1996) et qu'elle exhibe une importante sensibilité à de nombreux insectes et pathogènes (Gutierrez et al., 1995).

## 1.2 OBJECTIFS

**Objectif 1 :** Analyser les signatures spectrales des états de résistance tels qu'induits chez le tournesol par l'application d'acide jasmonique, d'acide salicylique et de BTH.

### *Sous-objectifs*

1. Évaluer la possibilité d'utiliser les émissions de fluorescence chlorophyllienne et bleu-vert induites par UV comme outils précoces et efficaces de détection spécifiques aux changements métaboliques opérés chez le tournesol réagissant à l'application d'inducteurs de résistance aux modes d'action distincts.
2. Relier les variations des émissions de fluorescence de plants de tournesol réagissant à l'application d'inducteurs de résistance à des modifications de certains processus physiologiques.

**Objectif 2 :** Examiner chez le tournesol les effets qu'ont sur la photosynthèse les inducteurs de résistance acide jasmonique, acide salicylique et BTH.

### *Sous-objectif*

Mettre en évidence la présence d'inhibitions de la photosynthèse en réponse à l'application d'inducteurs de résistance et déterminer les sites de ces inhibitions.

Avant de vérifier l'atteinte de ces objectifs (présentée aux Chapitres III et IV), il convient d'abord d'examiner, dans ses grandes lignes, la littérature portant sur les concepts de base inhérents au présent projet : 1) l'induction de réactions de défense et 2) la machinerie photosynthétique.

## CHAPITRE II

### REVUE DE LA LITTÉRATURE

#### 2.1 RESUME

L'induction de résistance chez les plantes par leur contact avec des agents biotiques et chimiques représente un champ d'intérêt nouveau, pluridisciplinaire et fertile en découvertes. Explorées tant par les écologistes, en quête d'une compréhension des interactions entre les vivants, que par les agronomes, qui y voient une façon judicieuse de préserver la santé des plantes cultivées, les réactions de résistance des végétaux se sont taillées une place importante dans la littérature spécialisée de domaines variés de la biologie (Theis et Lerda, 2003). En ce sens, plusieurs approches ont été mises de l'avant pour en étudier les manifestations. Deux d'entre elles ont été exploitées dans le cadre du présent projet. La revue de littérature qui suit est divisée en deux grandes sections qui correspondent à ces deux volets de l'expérimentation menée : 1) l'induction de réactions de défense et 2) la machinerie photosynthétique.

La première section, portant sur l'induction de réactions de défense, présente deux grands thèmes : les effets physiologiques des inducteurs et la fluorodétection de ces effets. Chacune de ces sous-sections est elle-même subdivisée de manière à couvrir un ensemble d'aspects pratiques et théoriques inhérents à ces thèmes tels qu'ils ont été abordés lors de l'élaboration, puis de l'interprétation du présent projet de recherche. Les résultats obtenus, en faisant appel à ces aspects qui étaient au cœur du premier volet du projet, seront pour leur part présentés au Chapitre III.

La seconde section de la revue de littérature concerne la machinerie photosynthétique. Sous l'angle des altérations photosynthétiques causées par l'induction de résistance, le second volet de l'expérimentation s'intéressait au coût métabolique de la résistance induite. C'est pourquoi, dans cette seconde section, les notions de base inhérentes à ce thème seront abordées. Divisée en trois sous-sections, elle vise essentiellement à présenter un portrait d'ensemble de la photosynthèse, de la capture de l'énergie radiante par les pigments jusqu'à la production d'hydrates de carbone, puis à introduire les bases théoriques des méthodes de mesure sélectionnées pour la conduite

des expérimentations. Les résultats obtenus en rapport avec ce second volet seront présentés au Chapitre IV.

## **2.2 INDUCTION DE REACTIONS DE DEFENSE**

La section portant sur l'induction de réactions de défense est divisée en deux grandes sous-sections : les effets physiologiques des inducteurs et la fluorodétection de ces effets. Dans la sous-section des effets physiologiques, subdivisée en deux parties, nous présenterons d'abord les principaux effets connus de trois types d'inducteurs, pour ensuite faire un bref survol de certaines Théories de la défense des plantes invoquées pour expliquer ces réactions défensives.

La sous-section présentant la fluorodétection des effets physiologiques de l'induction, pour sa part, est également subdivisée en deux parties. Il s'agira d'abord, dans un premier temps, les principaux usages de la fluorodétection, puis d'en présenter une interprétation théorique.

### **2.2.1 Effets physiologiques des inducteurs**

Les plantes sont constamment soumises à l'action d'agents extérieurs constituant autant de menaces potentielles à leur intégrité. Face à ces assauts continuels, elles ont développé de multiples systèmes de transduction des signaux extérieurs leur permettant de reconnaître spécifiquement, puis de réagir adéquatement aux stress environnementaux par l'activation différentielle d'ensembles de gènes ou de produits génétiques distincts (Schittko et al., 2001). Ainsi, bien que l'élicitation et la signalisation se déroulent selon un processus généralisable à l'ensemble des interactions pouvant survenir entre une plante et son parasite, qu'il s'agisse d'interactions compatibles ou non (Moran et al., 2002), l'induction de réactions défensives qui s'ensuit ne s'apparente nullement à une réponse généralisée au stress. En effet, ces réponses sont plutôt constituées par la mise en place d'un ensemble de processus métaboliques dont le rôle sera de contrer efficacement et spécifiquement l'organisme ennemi (Gatehouse, 2002). Elles visent essentiellement à minimiser les dommages présents et futurs de manière à préserver la croissance végétative et le succès reproducteur de la plante soumise à l'attaque (Walling, 2000).

En ce sens, pour se protéger contre les insectes herbivores et les agents pathogènes, les plantes utilisent une panoplie de défenses constitutives et induites. Parmi ces systèmes de défense complexes, toute une série de réponses interreliées sont induites et activées spécifiquement de façon locale ou systémique en réaction aux blessures mécaniques causées par l'agent externe (Walling, 2000) ou à la présence d'éliciteurs provenant de microorganismes pathogènes (Hutcheson, 1998). Bien qu'il soit toutefois impossible de séparer complètement les mécanismes de résistance induits par la blessure causée par un insecte herbivore de ceux dus à l'attaque pathogénique (Stout et al., 1999), il demeure pertinent de considérer ces deux sentiers comme agissant séparément. En effet, les produits finaux résultant de leur activation ne sont pas nécessairement les mêmes et les gènes régulés par l'un ou l'autre sentier diffèrent suffisamment pour justifier une telle approche (Gatehouse, 2002).

Le tournesol (*Helianthus annuus*), l'espèce-modèle choisie dans le cadre du présent projet, représente une culture majeure qui est justement en proie à l'attaque de nombreux insectes et pathogènes fongiques, lesquels sont susceptibles de causer des dommages sévères chez cet hôte (Gutierrez et al., 1995). Cette espèce contient de nombreux métabolites secondaires dont des terpènes, flavonoïdes et composés phénoliques simples qui seraient impliqués dans sa résistance aux envahisseurs. Bien que la plupart de ces produits soient présents de manière constitutive chez les plants sains, l'accumulation de certains composés spécifiques sera induite de manière caractéristique en réponse au broutage ou à l'infection (Gutierrez et al., 1995; Edwards et al., 1997).

Dans la prochaine section, nous explorerons la réponse des plantes face 1) aux insectes herbivores, 2) aux microorganismes pathogènes et 3) à des agents chimiques de résistance induite<sup>1</sup>. Lorsque possible, une attention particulière sera portée à l'exposition des données disponibles dans la littérature en ce qui concerne le tournesol. Suite à cette présentation des principaux effets des inducteurs, nous nous pencherons sur l'examen de

---

<sup>1</sup> La résistance induite est une nouvelle stratégie de défense susceptible de gagner en popularité dans le cadre de programmes de lutte intégrée contre diverses attaques de plantes cultivées.

Théories de la défense des plantes. Ces théories seront abordées pour comprendre, dans une perspective écologique et évolutive, le développement de réactions de défense chez les plantes.

#### *2.2.1.1 Principaux effets rapportés*

Cette section est dédiée à la présentation détaillée d'éléments associés à la réponse des plantes aux insectes herbivores, agents pathogènes et agents chimiques de résistance induite. Les deux premières réponses seront d'abord présentées selon un schème commun, soit l'exploration des événements précoces particuliers de réorganisation structurale, de production de métabolites de défense et de signalisation, puis de processus généraux concernant des altérations du métabolisme normal. La réponse aux agents chimiques, moins bien connue, sera ensuite revue dans les limites imposées par les données disponibles à ce jour.

##### A. Réponse aux insectes herbivores

Les plantes et les insectes coexistent depuis près de 350 millions d'années (Gatehouse, 2002). Cette coexistence a mené au développement de toute une série de relations (Stotz et al., 1999) dont l'une des plus communes consiste en l'interaction impliquant un insecte herbivore et sa plante-hôte. Or, les plantes terrestres, en tant qu'organismes sessiles, n'ont pas la capacité de fuir afin d'échapper aux broutages (Leon et al., 2001). Ainsi, pour se défendre contre de potentielles blessures infligées par des herbivores, les végétaux ont dû développer d'autres types de stratégies protectrices. En ce sens, comme première ligne de défense, des barrières structurales préexistantes telles que la cuticule, les tissus ligneux et les épines ou autres organes spécialisés seront en mesure de restreindre l'accès des pestes aux tissus nutritifs de la plante (Leon et al., 2001). Cependant, il arrive que ces barrières soient insuffisantes pour prévenir de telles attaques et que surviennent des dommages. Les plantes ne peuvent alors compter sur la mobilisation de cellules spécialisées destinées à la guérison des blessures, comme tel est le cas chez les mammifères. En raison des contraintes imposées par l'immobilisation des cellules dans une paroi rigide, les végétaux ont plutôt évolué la capacité de conférer à chacune de leurs cellules les compétences requises pour le déclenchement de réponses de défense. Ces réponses, qui reposent majoritairement sur l'activation transcriptionnelle

de gènes spécifiques, se dérouleront au cours des minutes et heures qui suivront une attaque (Leon et al., 2001). Ainsi, bien que les interactions plantes-insectes herbivores aient conduit à la mise en place par les végétaux d'une importante variété de mécanismes de protection contre la prédation, il apparaît que le processus actif de défense qui les régit en soit un commun et généralisable à toutes les plantes (Gatehouse, 2002). Il implique la génération et l'émission de signaux spécifiques, leur perception puis leur transduction, laquelle mènera à l'activation subséquente de gènes de défense associés au stress perçu.

Ce mécanisme est grandement lié à la réponse des plantes engendrée par la blessure provoquée suite à l'activité d'alimentation des insectes brouteurs (Gatehouse, 2002). La réponse globale observée suivant l'attaque proviendrait de ce que plusieurs aspects de la reconnaissance des pestes et de la transduction des signaux seraient hautement conservés chez une vaste gamme d'espèces végétales (Stotz et al., 1999). Par exemple, les molécules utilisées pour la signalisation sont communes à l'ensemble des plantes. Ainsi, contrairement aux défenses constitutives, lesquelles ne requièrent aucune induction et sont propres à chaque espèce dans des conditions environnementales données, les plantes sous attaque déploieront un arsenal de défenses actives, tant au niveau local que systémique. Ces réponses différeront souvent en termes de composition qualitative et quantitative et de cinétique de production. Elles se partageront en défenses directes et indirectes. Les défenses directes sont celles qui confèrent la résistance aux plantes qui les déploient en affectant directement la physiologie et le comportement des herbivores qui les attaquent. La résistance indirecte repose plutôt sur la médiation, par la plante, des activités des prédateurs naturels et parasitoïdes de l'insecte peste (Stout et al., 2002).

Dans le cas d'une blessure mécanique causée par un insecte, les protéines encodées par les gènes induits auront donc pour fonctions a) la réparation des tissus endommagés; b) la production de défenses directes, soit des substances inhibant la croissance d'insectes prédateurs (e.g., toxines ou produits réduisant la digestibilité des tissus végétaux); c) la signalisation interne et externe de l'attaque (e.g., production de composés volatiles utilisés comme défenses indirectes); et d) l'ajustement métabolique de la plante aux nouvelles contraintes induites (Leon et al., 2001).



### a) Réparation des tissus

Suite à l'endommagement mécanique des tissus d'une plante, plusieurs populations distinctes de cellules à proximité et distantes du site blessé seront sollicitées (de Bruxelles et Roberts, 2001). En ce sens, certaines des réponses induites seront déployées à la fois localement et systématiquement, alors que d'autres, comme l'activation de mécanismes de réparation des tissus, ne le seront qu'au site blessé. Ces tissus, situés dans l'entourage immédiat de la région atteinte, sont d'ailleurs les seuls qui subiront de sévères désorganisations de leurs structures cellulaires, lesquelles seront associées à des dommages irréparables impliquant une perte hydrique importante et la décompartmentalisation, puis la libération de matériel stocké (e.g., des composés phénoliques) (Leon et al., 2001). Cette couche de cellules ne sera pas en mesure de participer à la mise en place de réponses de défense actives, mais sera la source de signaux de détresse moléculaires diffusibles qui atteindront les cellules voisines, un ensemble de cellules saines plus distantes du site blessé ainsi que les tissus aériens éloignés de la feuille blessée. Chez leurs cibles, ces signaux agiront en tant qu'éliciteur de réponses défensives.

En bordure de cette première couche se trouveront des cellules qui, bien que toujours intactes, expérimenteront un haut degré de stress. Ces cellules relâcheront également différentes molécules-signal. Cependant, l'un de leurs principaux rôles consistera plutôt à former une barrière physique visant à empêcher la pénétration de pathogènes opportunistes (Reymond et al., 2000) et à minimiser les pertes hydriques (de Bruxelles et Roberts, 2001). Parmi les processus impliqués dans la mise en place de cette barrière, l'un des premiers à prendre place sera le renforcement de l'architecture pariétale et l'isolation des cellules. Une synthèse rapide de callose résultant de l'activation de la callose synthase au détriment de la cellulose synthase est l'un des mécanismes le plus précocement observé. La rapidité de cette réponse serait attribuable à ce qu'elle n'est pas sous contrôle génétique, mais bien déclenchée par le flux intracytoplasmique d'ions calciques provoqué par la blessure mécanique (Kohler et al., 2002). Ce dépôt de callose sera surtout localisé aux pores des plasmodesmes dont il réduira ainsi l'ouverture, ce qui engendrera une diminution des mouvements de macromolécules et autres particules entre les cellules.

Les premières étapes de la rigidification des parois cellulaires se poursuivront dans les minutes suivant la blessure *via* la rapide liaison oxydative de protéines pariétales par le biais de peroxydases pariétales (POX). Par ailleurs, notons que la force ainsi conférée aux parois cellulaires opposera une résistance à la croissance, de telle sorte que l'activité des peroxydases a souvent été corrélée à l'inhibition de croissance des tissus foliaires survenant suite à divers stress dont le broutage par des insectes herbivores (Moore et al., 2003). Plus tardivement, de nouvelles protéines riches en hydroxyproline (HRGPs) seront synthétisées pour parachever la consolidation de la paroi et des polymères phénoliques tels que la lignine et la subérine seront produits pour sceller la blessure (de Bruxelles et Roberts, 2001).

#### **b) Production de défenses directes**

En plus de cette création d'une barrière physique localisée, la plante blessée mettra en place tout un système de défenses chimiques ciblées contre les herbivores et les pathogènes. Ainsi seront produites des protéines à potentiel défensif et des métabolites secondaires. Les protéines à potentiel défensif direct induites en réponse à la blessure sont une série de protéines aux propriétés antinutritives dirigées contre les insectes. Il s'agira, entre autres, de polyphenol oxidase, de lectines, d'inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase et d'inhibiteurs de protéases (Ryan, 1990). Certaines formes basiques de protéines reliées à la pathogénèse (protéines PR) seraient également induites lors de la réponse à la blessure (de Bruxelles et Roberts, 2001).

Les métabolites secondaires, pour leur part, seront synthétisés *via* le sentier des phénylpropanoïdes, lequel est suractivé suite à une blessure par l'induction coordonnée de plusieurs enzymes-clés dont la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la chalcone synthase (CHS). À l'issue de ce sentier métabolique seront produits des terpénoïdes, alcaloïdes et composés phénoliques que l'on désigne sous le terme générique de phytoalexines. Les phytoalexines ayant été principalement caractérisées dans le cadre d'études portant sur la pathogénèse, leur description plus détaillée sera abordée dans la section Réponse aux agents pathogènes.

Chez le tournesol et plusieurs autres membres du genre *Helianthus*, la synthèse de composés phénoliques de type coumarines (i.e. scopolétine et ayapine) est induite en

réponse à plusieurs stress biotiques et abiotiques dont la blessure (Olson et Roseland, 1991), l'exposition au  $\text{CuCl}_2$  (Cabello et al., 1998) et la présence de saccharose (Cabello et al., 1998). Les stress occasionnés par des carences minérales en azote, soufre ou potassium n'ont, pour leur part, aucun effet sur le niveau de scopolétine, mais une déficience en potassium résulterait en une augmentation des concentrations de scopoline, la forme glycolysée de la scopolétine (Lehman et Rice, 1972). Ces coumarines ne sont généralement pas trouvées chez les plants sains et, lorsqu'un stress en induit la synthèse, elles s'accumuleront selon différentes proportions dans les parties aériennes du tournesol en fonction de la nature du stress appliqué. Cabello et ses collaborateurs (1998) rapportent, par exemple, que le  $\text{CuCl}_2$  est le plus puissant inducteur testé et que la blessure, pour sa part, induit la réponse la plus rapide (dès 12 heures suivant le traitement chez *H. tuberosum*, une espèce apparentée au tournesol). En ce qui concerne l'induction par des agents biotiques, les hausses des concentrations foliaires en scopolétine et ayapine de plants entiers suite à la blessure telle qu'infligée par le coléoptère spécialiste *Zygoramma exclamatoris*, les thrips ou l'altération mécanique faite à l'aide d'un poinçon pouvaient être détectées après neuf heures dans le cas de la scopolétine et 16 heures pour l'ayapine. Parmi ces trois traitements, les dommages causés par *Z. exclamatoris* sont ceux ayant mené à l'observation des plus fortes concentrations de scopolétine et ayapine, ces niveaux étant respectivement atteints aux 22<sup>e</sup> et 25<sup>e</sup> jours suivant l'attaque. En ce sens, il apparaît que les changements dans les concentrations de coumarines des plants sujets aux divers traitements reflètent des différences dans les types de dommages causés. Il est possible que ces variations soient associées au nombre de cellules endommagées au site de blessure. Mentionnons finalement que l'accumulation de coumarines se faisait en halo autour du site endommagé et que les concentrations les plus élevées étaient observées à l'intérieur d'un diamètre d'un à deux centimètres de la blessure (Olson et Roseland, 1991).

La signification biologique de l'accumulation de ces composés *in planta* provient de ce qu'elle serait corrélée avec la résistance aux pathogènes microbiens (Goy et al., 1993), agirait en tant qu'élément dissuasif à l'alimentation des herbivores (Olson et Roseland, 1991) et serait impliquée dans des interactions allélopathiques (Cabello et al., 1998). Bien que, dans la littérature concernant les réactions de défense chez le tournesol,

une certaine emphase ait été mise sur la présence de scopolétine et d'ayapine chez le tournesol élicité, mentionnons tout de même que leur concentration n'excède jamais 0,5% des composés phénoliques solubles totaux dans la plante. Ainsi, bien que les concentrations de scopolétine mesurées chez des tournesols élicités soient de deux à trois fois plus élevées que les concentrations minimales requises pour agir en tant qu'antiappétant chez certaines espèces d'insectes, les lignines et flavonoïdes contribueraient également à la protection des plants contre le broutage (Olson et Roseland, 1991).

**c) Signalisation (acide jasmonique)**

De nombreux gènes sans rôles directs dans la défense sont également induits suite à une série d'événements précoces survenant lors d'une blessure mécanique. Ces événements précoces (e.g., dépolarisation membranaire, flux d'ions, changements dans les concentrations intracytoplasmiques de calcium, génération de formes actives de l'oxygène, phosphorylation/déphosphorylation de protéines, etc.), conservés chez toutes les plantes testées à ce jour, partagent des similarités avec des systèmes animaux de génération de signaux intracellulaires. Des événements semblables se déroulent également en réponse à l'attaque d'une plante par un pathogène, ce qui suggère fortement que ces changements ne sont pas responsables de l'induction des réponses spécifiques observée suite à la blessure mécanique causée par un herbivore. Ainsi, bien que, dans la plupart des interactions connues, l'on ignore toujours comment la plante différencie les herbivores des pathogènes, il est désormais bien documenté que les molécules-signal produites en aval de ces événements précoces sont distinctes (Xu et al., 1994). Mentionnons toutefois que, dans le cas de certains systèmes plante-insecte particulièrement étudiés, des éliciteurs présents dans les sécrétions orales des insectes herbivores seraient en amont de la cascade signalétique et impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'herbivore par la plante (Halitschke et al., 2001; Schittko et al., 2001). Ainsi, en réponse à certains de ces événements précoces, des gènes spécifiques codant pour des molécules impliquées dans la génération et la perception d'autres signaux à l'origine de la régulation des réponses à la blessure seront activés.

En ce sens, l'expression génétique des réponses locales et systémiques survenant suite à la blessure serait sous la médiation de l'acide jasmonique, un acide gras dérivé de la membrane des chloroplastes (Weber, 2002) et dont la synthèse est induite entre 30 et 60 minutes suivant une blessure (Reymond et al., 2000; de Bruxelles et Roberts, 2001). Cette phytohormone, omniprésente dans le règne végétal, agirait selon un sentier signalétique apparemment unifié au sein de l'ensemble des plantes (Creelman et Mullet, 1995; Leon et al., 2001). Il est désormais démontré que l'acide jasmonique est essentiel à la défense contre les insectes et cette molécule est acceptée comme constituant un signal intracellulaire clé en ce qui concerne les réponses à la blessure, à l'attaque par un insecte et à certains éliciteurs (Conconi et al., 1996; de Bruxelles et Roberts, 2001; Weber, 2002). Il est à noter que plusieurs gènes, dont ceux encodant la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et certaines protéines PR à potentiel antifongique, sont induits de manière différentielle selon que l'induction provient d'une simple blessure mécanique ou plutôt d'une brèche causée par un herbivore (Reymond et al., 2000; Schittko et al., 2001; Moran et al., 2002; Cipollini et al., 2003). Bien plus, les habitudes alimentaires associées à certains herbivores mèneraient elles aussi à l'expression de réponses de défense spécifiques par la plante (e.g., le broutage par des mammifères : Cipollini et Sipe, 2001).

En application exogène, l'acide jasmonique et certains de ses précurseurs et dérivés (Avidiushko et al., 1997) élicitent des réponses locales et systémiques semblables à celles induites par des herbivores (Stout et al., 2002; Moore et al., 2003), telle que l'induction de la biosynthèse de nombreux métabolites secondaires (Vom et al., 2002). À ce titre, il s'agit d'ailleurs de l'éliciteur de résistance aux arthropodes le plus étudié à ce jour. Par exemple, il a été directement impliqué dans le système signalétique menant à la synthèse de phytoalexines chez le persil, où l'application de l'un de ses précurseurs y élicite l'accumulation de flavonoïdes (Smith, 1996). Sa capacité à mimer une attaque par un herbivore a également été notée chez des espèces monocotylédones dont *Rumex obtusifolius*, chez qui il induit notamment une diminution de l'expansion foliaire, une augmentation de l'activité de peroxydases pariétales et une hausse de la résistance (Moore et al., 2003). Chez le blé, l'exposition au méthyl jasmonate, un composé volatile provenant de la dégradation de l'acide jasmonique (Mueller, 1997), mènerait, entre

autres, à une augmentation du contenu en protéines inhibitrices de trypsine. L'accumulation de ces macromolécules toxiques serait corrélée avec une réponse d'évitement de la part des aphides (Slesak et al., 2001).

Par ailleurs, la blessure infligée par un insecte herbivore provoquerait finalement la synthèse, puis l'émission de mélanges volatiles complexes qui agiraient dans la communication intra- et interplants (Farmer et Ryan, 1990) ainsi que dans la signalisation plante-insecte (Farmer, 2001). Ces composés gazeux joueraient ainsi un rôle central dans tout le système de défenses indirectes déployé en réponse à l'herbivorie. Grâce à leur émission, les plantes se trouvent impliquées dans des interactions tritrophiques bénéfiques qui leur permettent d'attirer les prédateurs ou parasitoïdes des insectes brouteurs (Pare et Tumlinson, 1999). Il est à noter que l'application d'acide jasmonique exogène à une plante résulte en l'émission de mélanges de volatiles d'une composition se rapprochant beaucoup plus de celle induite en réponse à l'herbivorie que de celle observée suite à une simple blessure mécanique (de Bruxelles et Roberts, 2001). Mentionnons également que le coût de production de ces émissions phytochimiques peut être très élevé. La synthèse de terpénoïdes, par exemple, est plus énergivore que la production de la plupart des métabolites primaires et secondaires de la plante (Pare et Tumlinson, 1999).

#### **d) Altérations du métabolisme normal**

Bien que l'on ait d'abord mis l'emphase sur les aspects bénéfiques de la résistance systématiquement induite, on constate aujourd'hui qu'elle implique également un coût métabolique dont l'ampleur n'est pas encore bien définie (Heil, 2001). Aussi, les molécules-signal comme l'acide jasmonique, en plus de leur activité d'induction de l'expression génétique de réponses défensives, montrent d'importants effets pléiotropiques (Stotz et al., 1999; Heil et Baldwin, 2002). Ainsi, au cours de la réaction de défense, la croissance et le métabolisme normal des plantes se trouveront modifiés. L'inhibition de croissance pourrait être expliquée par la diversion d'une part importante de l'énergie vers la synthèse de composés défensifs, la rigidification des parois cellulaires menant à l'inhibition des mécanismes d'expansion cellulaires, l'inhibition de la photosynthèse et la production de radicaux libres. Mentionnons à ce sujet que l'acide

jasmonique exerce généralement une répression sélective de nombreuses protéines présentes dans la plante avant un stress (Reinbothe et al., 1994). Entre autres, il réprimerait rapidement les gènes encodant des protéines impliquées dans l'assimilation photosynthétique du carbone (Schittko et al., 2001; Wasternack et Hause, 2002), dont ceux des deux sous-unités de la Rubisco, des protéines de liaison du complexe d'absorption de la lumière et de certaines protéines du PSII (en moins de 36 heures chez l'orge : Reinbothe et al., 1997). Il conduirait éventuellement à une perte de chlorophylle (Avidiushko et al., 1997).

Une telle inhibition de la photosynthèse à l'orée du déclenchement de réactions de défense constitue une réponse qui semble pourtant paradoxale. En effet, dans des circonstances où un apport accru en énergie est nécessaire à la fabrication de composés défensifs, on explique mal les raisons d'une inhibition du processus répondant à cette demande en énergie. À ce propos, plusieurs pistes d'explications sont envisageables. Ainsi, la diminution du taux photosynthétique suivant le processus d'élicitation pourrait, d'une part, n'être qu'un effet indirect des mécanismes alors mis en place. En effet, lors de stress au cours desquels la croissance est inhibée avant la photosynthèse (e.g., stress menant à la rigidification des parois, acclimatation des plantes au fort CO<sub>2</sub>, carences azotées : Stitt et Krapp, 1999), des sucres solubles s'accumuleront. Or, pour fonctionner de manière optimale, les cellules végétales doivent conserver un équilibre entre les processus à l'origine de la production de sucres solubles (e.g., photosynthèse, dégradation de l'amidon, etc.) et ceux qui les consomment (e.g., croissance, respiration, etc.) (Oswald et al., 2001; Rolland et al., 2002). Une rétroinhibition de la photosynthèse sera alors déclenchée. D'autre part, un effet direct des éliciteurs sur la chaîne de transport photosynthétique d'électrons est envisageable. Ainsi, les éliciteurs pourraient agir en bloquant le transport d'électrons au niveau du photosystème II (PSII) ou en dissipant le gradient de pH transmembranaire nécessaire au bon fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons dans les thylakoïdes<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> Ces étapes du processus de la photosynthèse seront exposées plus en détails dans la section portant sur la Machinerie photosynthétique.

En ce qui concerne l'acide jasmonique, les résultats rapportés par Rakwal et Komatsu (2001) suggèrent que cet acide gras pourrait avoir un effet direct sur la chaîne de transport d'électrons. Cependant, ces auteurs ne proposent aucun mode d'action précis pour l'acide jasmonique. En ce sens, il est possible de faire un rapprochement avec le phénomène depuis longtemps étudié de l'inhibition du PSII telle que causée par la présence d'acides gras libres (McCarty et Jagendorf, 1965). Plus particulièrement, Warden et Csatorday (1987) mentionnent d'intéressants résultats concernant l'action de l'acide linoléique, un précurseur de l'acide jasmonique libéré de la membrane des chloroplastes en réponse à la blessure. Ainsi, l'acide linoléique inhiberait directement le transport d'électrons dans le PSII en compétitionnant avec les quinones, les délogeant de leurs sites de liaisons. Cet acide gras, au même titre que certains autres acides gras insaturés, serait également impliqué dans le découplage de la photophosphorylation et l'altération de la charge membranaire (Warden et Csatorday, 1987).

Dans un contexte plus large, malgré qu'il soit plausible de postuler une certaine implication de l'acide jasmonique dans la diminution de l'activité photosynthétique observée chez les plantes attaquées par des insectes, il demeure que les mécanismes par lesquels s'exercerait cette action sont toujours inconnus. Bien qu'il semble que la génération de formes actives de l'oxygène puisse être mise en cause (Rakwal et Komatsu, 2001), il importe de mentionner qu'un tel mode d'action serait en opposition avec les résultats de certains travaux. En effet, chez la plante-modèle *Arabidopsis thaliana*, l'application d'acide jasmonique mène plutôt à l'observation d'une atténuation de la production de formes actives de l'oxygène telle que normalement observée en réponse à l'exposition à l'ozone (Rao et al., 2000).

Ainsi se termine la rétrospective des réponses des plantes aux insectes herbivores. Nous y avons exploré les processus de réparation des tissus, de production de défenses directes, de signalisation et d'altérations du métabolisme normal. Parsemant cette discussion, étaient exposés certains rapprochements avec la réponse aux agents pathogènes. Dans la présentation qui suit, nous serons à même d'en juger plus adéquatement. Cette discussion adopte un parcours semblable à celui suivi jusqu'ici afin de mieux cerner ces réponses.



## B. Réponse aux agents pathogènes

Malgré la présence constante dans leur environnement d'une vaste gamme d'agents pathogènes potentiels, la majorité des plantes passent la plus grande part de leur existence libres de toute attaque microbienne (Smith, 1996; Dangl et Jones, 2001). En effet, bien que les agents pathogènes aient à leur disposition une impressionnante collection d'armes offensives, les végétaux ne sont pas en reste. Ils ont effectivement su développer un arsenal défensif pour prévenir la croissance de leurs ennemis. Ainsi, bien qu'il existe des cas où toute résistance est futile, la résistance aux pathogènes est un phénomène largement répandu à travers le règne végétal.

Cette résistance repose sur la reconnaissance rapide de l'attaquant par la plante-hôte, puis son rejet par la mise en place de réponses défensives induites (Jackson et Taylor, 1996; Hutcheson, 1998). Ces défenses, contrairement aux barrières physiques et chimiques constitutives (Nicholson et Hammerschmidt, 1992; Maher et al., 1994; Dangl et Jones, 2001), se déploieront sous la forme de toute une série de produits métaboliques normalement absents ou trouvés en très faibles quantités chez des plants sains. Le contraste alors observé entre des individus non élicités et des plants exprimant une réponse de résistance a fourni un modèle robuste pour l'étude détaillée des événements impliqués dans la transmission du message de détresse, laquelle mène à l'acquisition d'une résistance locale (*localised acquired resistance*, LAR) et systémique (*systemic acquired resistance*, SAR) (Costet et al., 1999; Métraux, 2002).

Tel que mentionné précédemment, les événements suivant la reconnaissance initiale d'éliciteurs libérés par l'agent pathogène constituent une cascade signalétique semblable à celle observée en réponse aux herbivores (e.g. modification des flux ioniques transmembranaires, phosphorylation/déphosphorylation de protéines-signal, production de formes actives de l'oxygène, etc.). Cependant, les facteurs de transcription et les gènes de défense qui seront alors activés dans les heures subséquentes ne seront pas les mêmes. Ainsi, dans le cas d'une interaction plante-pathogène, les gènes ciblés auront pour fonction a) la mise en place de barrières structurales; b) la production de métabolites antibiotiques; c) la synthèses de signaux régulateurs dont l'acide salicylique; et/ou d) le développement d'une réaction hypersensible dans de nombreux cas

d'interactions incompatibles (Klarzynski et al., 2003); la relation donnera également lieu à e) des altérations du métabolisme primaire (Huang, 2001).

**a) Mise en place de barrières structurales**

La réponse de résistance aux pathogènes la plus communément rapportée consiste en une série d'altérations hautement coordonnées de la paroi des cellules de la plante attaquée (Kshirsagar et al., 2001). Ces changements localisés aux sites de contact avec le pathogène sont associés à (1) la formation de papilles et (2) la rigidification de la paroi cellulaire.

*Papilles.* Les papilles sont des masses hémisphériques déposées par des vésicules entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire de la cellule épidermique située directement sous le point de pénétration d'un pathogène fongique (Carver et al., 1998). Cette structure, formée d'une matrice de callose, s'imprènera de composés phénoliques, protéines et enzymes hydrolytiques et fournirait à la plante une barrière à l'infection. La composition chimique des papilles varie selon les espèces (Huang, 2001) et la nature exacte des composés phénoliques qui s'accumulent à leur niveau demeure inconnue (Carver et al., 1998). D'après leurs caractéristiques connues d'absorption de la lumière UV et d'émission de fluorescence bleue, il semblerait qu'il s'agisse de produits reliés à la biosynthèse de la lignine. À cet égard, dans certaines interactions comme celle impliquant l'orge et une souche incompatible de mildiou<sup>3</sup> (i.e. incapacité du pathogène à infecter la plante), l'intense fluorescence de ces appositions pariétales est la seule réponse cellulaire visible microscopiquement (von Ropenack et al., 1998). Le dépôt de composés phénoliques au niveau des papilles tel qu'observé au site de contact entre le pathogène fongique et l'épiderme de la plante-hôte, en plus d'être un symptôme précoce de l'attaque, constituerait en lui-même un mécanisme essentiel à l'empêchement de la pénétration du champignon dans la feuille (Huang, 2001). En effet, lorsque cette accumulation de phénols est contrecarrée par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, une

---

<sup>3</sup> Dans ce type d'interactions, le parasite est spécifiquement reconnu par la plante *via* une interaction gène pour gène, ce qui lui confère son caractère incompatible. À l'opposé, lorsqu'il s'agit de pathogènes compatibles, la plante-hôte est sensible à l'infection.

plus grande proportion d'attaques se soldera par un succès de la pénétration, puis par la formation subséquente d'haustoria (Carver et al., 1998). L'accumulation localisée de composés phénoliques fluorescents au niveau des cellules épidermiques contribue donc significativement à la résistance d'une plante contre les pathogènes fongiques (Carver et al., 1998; Huang, 2001).

*Rigidification des parois cellulaires.* Le phénomène de rigidification des parois cellulaires au site de la tentative de pénétration du pathogène, pour sa part, implique les rapides incorporation et liaison oxydative de protéines et de sous unités phénoliques variées sous l'action induite des peroxydases pariétales (Graham et Graham, 1991). Par exemple, cette réponse est observée sous la forme d'une accumulation de feruloylmethoxytyramine et autres amides reliés au niveau de l'épiderme d'oignons inoculés avec *Botrytis allii*, et serait corrélée avec la résistance chez cette espèce (Grant et Mansfield, 1999). Une réponse des plantes plus communément rapportée suite à l'attaque pathogénique consiste en l'accumulation rapide d'acide férulique, puis son estérification subséquente au niveau de la paroi des cellules-hôtes (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). Ce phénomène serait en partie responsable de la décoloration et de la fluorescence observées chez les tissus-hôtes au niveau du site d'infection. Cette étape précoce<sup>4</sup> n'impliquerait pas la synthèse *de novo* de substances toxiques ni la traduction de gènes. Plutôt, il a été suggéré que la vitesse de l'accumulation des dérivés d'acides hydroxycinnamiques proviendrait de l'activation d'une hydrolase non usuelle en réponse à la diminution du pH intracytoplasmique provoquée par le processus d'élicitation (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). Ce non-recours à des étapes de transcription et de traduction de gènes codant pour les enzymes requises pour la synthèse des phénylpropanoïdes constituerait un moyen utilisé par la plante pour rapidement retarder la croissance du pathogène, fournissant ainsi le délai nécessaire à une production de composés toxiques spécifiques telles les phytoalexines (*cf.* § Synthèse et accumulation de composés défensifs).

---

<sup>4</sup> La précocité de cette étape est telle que l'accumulation d'acide férulique survient en moins de trois heures dans le cas de l'interaction incompatible *Datura-Phytophthora megasperma* (Nicholson et Hammerschmidt, 1992).

Par ailleurs, la liaison oxydative ultérieure des esters d'acide férulique mènerait à la formation de polymères de type lignine, lesquels constitueraient une barrière physique à la progression du pathogène. La lignification des parois cellulaires est vue comme un facteur important dans la résistance des plantes à l'infection (Huang, 2001). La lignine, un polymère aromatique tridimensionnel composé de monomères de phénylpropanoïdes, est en effet extrêmement résistante à la dégradation microbienne. Ainsi, suite à son infiltration entre les microfibrilles de la paroi cellulaire, la force mécanique de celle-ci est augmentée, et sa perméabilité et sa dégradabilité s'en trouvent réduites. En plus de son rôle indirect issu de l'augmentation de la force mécanique des parois, la synthèse *de novo* de lignine survenant lors d'attaques pathogéniques aurait une fonction plus directe dans la résistance. Plusieurs intermédiaires du sentier biosynthétique menant à la lignine sont effectivement des phytoalexines aux propriétés antifongiques (Huang, 2001).

#### **b) Synthèse et accumulation de composés défensifs**

En réponse à l'infection, de nombreuses plantes peuvent produire de nouvelles protéines normalement absentes chez des plants sains. Pour cette raison, on réfère à ces macromolécules sous le vocable de protéines reliées à la pathogenèse (protéines PR). Cinq familles majeures de protéines PR sont reconnues à ce jour. Certaines n'ont pas encore de rôles physiologiques bien définis (e.g., PR-1 et 4), tandis que d'autres sont bien connues pour leurs activités hydrolytiques (e.g.,  $\beta$ -1-3-glucanases et chitinases). Différents produits chimiques et biochimiques, dont l'acide salicylique et l'éthylène, peuvent aussi déclencher leur synthèse (Klessig et Malamy, 1994). Par exemple, chez le tournesol traité à l'aspirine, la forme acétylée de l'acide salicylique, quatre classes de protéines PR (PR-1, 2, 3 et 5) apparaissent entre deux et cinq jours suivant le contact avec le produit (Jung et al., 1993). Elles atteignent leur concentration maximale vers six à sept jours après le traitement et elles comptent alors pour près de 80 % des protéines totales trouvées dans le fluide intercellulaire. Jung et ses collaborateurs (1993) soulignent par ailleurs que le niveau de protéines PR de tournesols non traités est fortement dépendant des conditions de croissance et qu'il existe également une variabilité certaine entre les plants individuels traités similairement (Jung et al., 1993). D'autres protéines PR dont la cinétique d'accumulation coïncide avec la résistance ont

été mises en évidence chez le tournesol réagissant à l'attaque fongique, mais aucun rôle défini n'a encore pu leur être attribué (Mazeyrat et al., 1998).

Par ailleurs, il est depuis longtemps reconnu que les réponses des plantes aux attaques pathogéniques sont caractérisées par une accumulation rapide de composés phénoliques au site de l'infection. Nicholson et Hammerschmidt (1992) notaient à ce sujet que des phénols antibiotiques ont été trouvés chez toutes les espèces végétales jusqu'alors investiguées. Depuis, il est apparu qu'en réponse à l'élicitation, en plus du sentier des phénylpropanoïdes, divers sentiers du métabolisme secondaire seront suractivés et mèneront à la synthèse de phytoalexines (Dixon, 2001). Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire qui sont synthétisés et accumulés par les cellules végétales vivantes suite à leur exposition à des microorganismes (Smith, 1996). Avec la progression de la maladie, ces composés s'accumuleront dans les cellules mortes ou moribondes (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). L'activité antimicrobienne des phytoalexines s'exercerait tant contre les virus, bactéries et champignons, qu'envers les cellules animales et végétales. Ces différentes cibles varient énormément dans leur sensibilité à une phytoalexine donnée. Le mode d'action présumé de ces composés défensifs proviendrait principalement de leur caractère lipophile, propriété leur conférant la possibilité d'agir comme toxiques multisites causant des dysfonctions de plusieurs processus liés à la membrane dont ils compromettent l'intégrité.

Plus de 300 phytoalexines ont été caractérisées à ce jour et toutes peuvent être classifiées comme étant des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ces composés appartiennent à une vaste étendue de classes de produits chimiques reliés entre eux (Smith, 1996). Règle générale, on rapporte que les espèces apparentées auront tendance à produire des phytoalexines d'un même type (Dixon, 2001). Aussi, dans le cas d'une interaction donnée, il n'est pas rare que plus d'une phytoalexine soit synthétisée, les composés alors produits étant généralement issus de voies biosynthétiques connexes (Smith, 1996). D'un point de vue expérimental, il a été noté que la quantité, la nature et la proportion des phytoalexines produites et accumulées par une espèce particulière dépendront du type d'éliciteur employé pour induire la réponse (Dixon et al., 1995) et du type de tissu investigué (Smith, 1996; Vom et al., 2002). De plus, bien que les

concentrations relatives de phytoalexines synthétisées soient principalement tributaires du génotype de la plante, les conditions environnementales et expérimentales auraient également une influence non négligeable (Smith, 1996).

En ce qui concerne le tournesol, en réponse à l'inoculation par des champignons compatibles et incompatibles, aux moins deux phytoalexines seraient produites et s'accumuleraient en concentration importante et de façon marquée dans les jours suivant le contact initial (Tal et Robeson, 1986). L'analyse d'extraits de tissus inoculés a permis de détecter que ces deux composés exhibaient une intense fluorescence bleue et bleu-vert lorsque excitée par une radiation UV-A (Tal et Robeson, 1986). Ces produits, présents à l'état de trace chez des plants sains, ont été identifiés comme étant les coumarines scopolétine et ayapine, des métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes connues et impliqués dans la résistance aux pathogènes chez le tabac (Goy et al., 1993; Costet et al., 2002). Il est intéressant de noter que chacune ne présentait pas la même induction et que des patrons temporels d'accumulation différents ont été observés selon la nature de l'agent éliciteur utilisé (Tal et Robeson, 1986).

#### **c) Signalisation (acide salicylique)**

Des composantes de surface libérées des cellules du microbe ou de l'hôte lors de l'attaque pathogénique jouent un rôle important en tant que molécules-signal impliquées dans la perception par la plante de l'assaut dont elle est la cible. Ces indices moléculaires se sont vus conféré l'appellation d'éliciteurs en raison de leur capacité à induire certaines des réponses de défense associées à la réaction des plantes aux pathogènes. Qu'ils soient d'origine exogène (issus du pathogène) ou endogène (dérivés de la plante), ces éliciteurs auraient une structure précise leur permettant de se lier de façon ultra-spécifique à des récepteurs membranaires non identifiés des cellules-hôtes. Plusieurs éliciteurs sont des fragments poly- ou oligosaccharidiques de paroi cellulaire (e.g.,  $\beta$ -glucans et oligomères de chitine microbiens ou fragments pectiques oligogalacturonides végétaux) (Klarzynski et al., 2003), des protéines et des glycoprotéines fongiques (Baillieul et al., 1995). Une emphase a été mise sur l'isolation et l'utilisation subséquente d'éliciteurs comme outils d'induction de réponses de défense chez les plantes (Baillieul et al., 1995). Leur usage a l'avantage de grandement

simplifier la complexité associée au système plante-pathogène et permet une application précise au niveau de zones prédéterminées des tissus foliaires. Les éliciteurs se sont ainsi avérés d'un grand secours en ce qui concerne la dissection des cascades signalétiques impliquées dans l'activation des réactions des plantes face aux pathogènes ainsi que lors d'études visant l'analyse spatio-temporelle précise des réponses de défense déployées par la plante, de la réponse locale à l'acquisition d'une résistance systémique (Baillieux et al., 1995).

Ainsi, la suractivation du sentier des phénylpropanoïdes survenant suite à la perception du pathogène et aux processus précoces de signalisation, en plus de mener à la production de phytoalexines, se soldera souvent par la synthèse *de novo* d'un composé phénolique crucial dans la signalisation ultérieure de l'attaque : l'acide salicylique (Malamy et al., 1990). L'acide salicylique a été trouvé dans les feuilles et organes reproducteurs de 34 espèces d'importance agronomique (Pancheva et al., 1996). Or, ce composé phénolique n'a pas d'effet antifongique direct (Spletzer et Enyedi, 1999). Plutôt, en tant que messenger secondaire, il relayerait le signal de détresse occasionné par la présence d'éliciteurs jusqu'au noyau de la cellule attaquée pour y induire les réponses de défense spécifiques à l'attaque pathogénique. L'acide salicylique serait également synthétisé par les cellules voisines, puis de façon systémique. Ce processus a valu à cette molécule d'être considérée comme la plaque tournante menant à l'expression de la résistance systémique acquise (SAR) chez de nombreuses plantes du groupe des dicotylédones, dont le tabac (Gaffney et al., 1993), le concombre (Meuwly et al., 1995) et la plante-modèle *Arabidopsis thaliana* (Delaney et al., 1994). Bien plus, même en l'absence de tout pathogène, l'acide salicylique serait suffisant pour induire la SAR (Jelitto et al., 1999). Par exemple, en application exogène directement sur les tissus foliaires intacts (Ward et al., 1991; Walters et al., 1993) ou additionné au milieu de croissance de plants en culture hydroponique (Spletzer et Enyedi, 1999), l'acide salicylique confère à de nombreuses plantes une résistance accrue à des microorganismes variés tel le virus de la mosaïque du tabac, le mildiou et divers agents infectieux (Walters et al., 1993). Ward et ses collaborateurs (1991) rapportent que la SAR induite par l'acide salicylique exogène est comparable à celle résultant d'une interaction avec un pathogène, tant par la nature des gènes qu'elle active que par leur

niveau d'induction. Notons cependant que son implication dans la réaction de défense des plantes monocotylédones, pour sa part, est beaucoup moins certaine (Vallélian-Bindschedler et al., 1998).

En ce qui concerne le tournesol, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de l'effet de l'acide salicylique chez cette espèce. Gutierrez et ses collaborateurs (1995) rapportent qu'il n'induisait pas l'accumulation de scopolétine ni d'ayapine en quantités détectables lorsque mis en contact avec des sections de feuilles détachées de plants (Gutierrez et al., 1995). Par ailleurs, au niveau de plants intacts, son application menait à une augmentation systémique de l'activité de la scopolétine-peroxydase, une enzyme dégradant la scopolétine et n'ayant aucune activité envers l'ayapine (Edwards et al., 1997). Cette peroxydase jouerait un rôle direct dans la défense en augmentant l'activité peroxydative. Alternativement, elle constituerait un moyen de protection utilisé par la plante pour détoxifier la scopolétine (Edwards et al., 1997).

#### **d) Développement d'une réaction hypersensible (RH)**

Dans des cas où le pathogène et l'hôte ne sont pas compatibles, une réaction hypersensible (RH) sera rapidement déclenchée et accompagnera souvent les réponses de défense nommées précédemment (Lam et al., 2001). Cette réaction se caractérise par une rapide dépolarisation du potentiel membranaire des cellules au site de l'infection, une importante fuite d'électrolytes et une perte de la perméabilité sélective de la membrane assortie d'un influx massif de calcium extracellulaire (Doke et al., 1996), événements menant à la génération de formes actives de l'oxygène puis à la mort programmée des cellules au site de l'attaque microbienne (Baillieul et al., 1995; Klarzynski et al., 2003). L'apparition de lésions nécrotiques ainsi causées est précédée par l'activation de nombreux gènes de défense dont les premiers à être induits, en moins d'une heure suivant l'inoculation, sont ceux encodant la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Doke et al., 1996). D'autres enzymes du sentier des phénylpropanoïdes seront ensuite activées. En pratique, l'activation de ces enzymes peut être inférée à partir de l'observation d'une fluorescence bleue induite par UV entourant les lésions formées (Baillieul et al., 1995; Dorey et al., 1997; Costet et al., 1999; Costet et al., 2002).



La RH repose sur la reconnaissance rapide du pathogène par la plante et, bien qu'un rôle exact n'ait pu lui être attribué avec certitude sur la base des informations actuelles (Smart et al., 2003), elle viserait à confiner l'agent microbien à son site de pénétration. Ainsi, dans plusieurs interactions, il apparaît que l'importante contribution de la réaction hypersensible à la résistance de la plante-hôte soit directement reliée à la rapidité avec laquelle elle se déploie. En effet, des expériences impliquant la tomate réagissant à différents isolats de *Phytophthora infestans* variant dans leur degré de compatibilité ont montré que le délai observé dans la mise en place de la réaction hypersensible dans le cas d'interactions compatibles était corrélé avec un taux accru de développement de la maladie (Smart et al., 2003).

**e) Altérations du métabolisme normal**

Au niveau des lésions nécrotiques causées par un contact avec un pathogène, une perte de chlorophylle sera encourue, perte qui, selon Huang (2001), mènera globalement à l'observation d'une baisse de la photosynthèse. En ce qui concerne la manière dont les pathogènes altèrent spécifiquement la photosynthèse, peu est connu. Qui plus est, l'identification des mécanismes sous-jacents à la réduction du taux photosynthétique, généralement observée en réponse à l'infection, demeure un sujet controversé (Scholes et Rolfe, 1996). Il semble qu'il puisse s'agir de mécanismes physiques et physiologiques. Par exemple, le pathogène bien développé pourrait simplement agir comme barrière mécanique à la diffusion du CO<sub>2</sub>. Il pourrait également causer la dégénérescence des chloroplastes en changeant la composition, déstabilisant la membrane des thylakoïdes, diminuant la synthèse ou accélérant la dégradation de la chlorophylle. Le pathogène pourrait également altérer des processus photochimiques et biochimiques en inhibant les réactions associées à la phase lumineuse de la photosynthèse, diminuant certaines composantes de la chaîne de transport d'électrons, provoquant une perte accélérée de transporteurs d'électrons, nuisant à l'assimilation de carbone, diminuant l'activité de la Rubisco et autres enzymes essentielles (dont il déclencherait la dégradation ou la répression de leur synthèse), perturbant le métabolisme carboné et la translocation des photoassimilats, etc. (Benhamou et al., 1991; Wright et al., 1995, 1995; Scholes et Rolfe, 1996; Huang, 2001).

À ce propos, il est intéressant de noter qu'une augmentation de l'activité pariétale de l'invertase, l'enzyme responsable de la conversion du saccharose en glucose et fructose, a souvent été rapportée comme l'une des réponses des plantes à l'infection (Benhamou et al., 1991; Wright et al., 1995). Or, il a été démontré que la surexpression de cette enzyme au niveau de l'apoplaste et de la vacuole chez le tabac menait à une perte marquée de chlorophylle, à une diminution des niveaux de protéines et de Rubisco, à une baisse de la transcription des gènes *Cab* (codant pour des protéines de liaison des chlorophylles *a* et *b*) ainsi qu'à l'induction de protéines reliées à la blessure (Stitt et Krapp, 1999) et à la SAR (Rolland et al., 2002). Certains de ces événements, qui ne sont pas sans rappeler les mécanismes de répression de la photosynthèse due au sucre exposés dans la section concernant la réponse des plantes aux insectes herbivores (*cf.* § Altérations du métabolisme normal), pourraient être mis en cause dans la diminution des taux photosynthétiques observée en réponse à l'infection. Sans égard aux causes exactes de la baisse de ce processus essentiel accompagnant l'infection, il demeure que des altérations de la photosynthèse sont parmi les changements les plus couramment rapportés en réponse à l'attaque. Cette diminution de l'apport d'énergie est d'autant plus dommageable que la réaction de résistance elle-même, mécanisme requérant de l'énergie, se fait au détriment de la croissance (Agrawal et al., 1999; Redman et al., 2001; Cipollini et al., 2003; Moore et al., 2003).

La littérature portant sur les différents processus physiologiques modulés spécifiquement par l'acide salicylique en tant qu'inducteur de réactions de défense rapporte des effets sur l'expansion et la mort cellulaire (Vanacker et al., 2001), la croissance, la photosynthèse, l'ouverture des stomates et la transpiration (Pancheva et al., 1996; Zhou et al., 1999). Ces résultats sont souvent en opposition les uns avec les autres et il apparaît difficile de brosser un portrait d'ensemble de ces effets secondaires de l'acide salicylique. Ainsi, chez le soya, il semble que la vaporisation d'une solution aqueuse d'acide salicylique sur le feuillage ait stimulé la croissance des tiges et racines sans affecter la photosynthèse (Gutierrez et al., 1998). Par ailleurs, son injection directement dans la tige du maïs y augmenterait à la fois la photosynthèse et le rendement en grains (Zhou et al., 1999). Au contraire, chez l'orge, l'acide salicylique diminuerait l'accumulation de biomasse, ralentirait l'expansion foliaire, conduirait à une

baisse du taux de photosynthèse, de l'activité du PSII et de l'activité carboxylase de la Rubisco, réduirait la transpiration et amoindrirait l'épaisseur du limbe et la taille des cellules épidermiques (Janda et al., 1999; Uzunova et Popova, 2000). Chez le tournesol, ce type d'altérations métaboliques ne semble pas avoir été bien étudié.

Cette présentation des altérations du métabolisme normal complétant la discussion sur la réponse des plantes aux agents pathogènes, nous dirigerons maintenant notre attention sur leur réponse à des agents chimiques de résistance induite. Le lecteur pourra trouver dans cette section une présentation sommaire du concept de résistance induite, puis une délimitation des modes d'action présumés et effets rapportés du benzothiadiazole, l'un de ces agents chimiques.

### C. Réponse aux agents chimiques de résistance induite

La résistance systémique induite (*induced systemic resistance*, ISR) est un phénomène par lequel la résistance à des maladies infectieuses est systématiquement induite chez une plante par un traitement préventif (Kuc, 2000). Il pourra s'agir, par exemple, d'une inoculation par des rhizobactéries non pathogènes (Pieterse et al., 1998; van Loon et al., 1998), d'une infection localisée et contrôlée (Kuc, 2001), de l'application de composantes ou produits microbiens (Costet et al., 2002) ou de traitements par divers composés organiques (Klarzynski et al., 2003) ou inorganiques (Gorlach et al., 1996). L'originalité de telles méthodes provient de ce que les agents utilisés n'exercent pas leur activité en exhibant de quelconques propriétés antimicrobiennes, mais bien en induisant la résistance chez les plants traités. De plus, elles présentent l'intéressante caractéristique d'offrir une protection non spécifique qui sera souvent maintenue tout au long de l'existence de la plante traitée et ce, sans nécessiter la présence constante de l'agent inducteur dans l'environnement du végétal (van Loon et al., 1998).

Les réponses inductibles des plantes cultivées demeurent cependant une ressource sous-utilisée dans le cadre de programmes de protection des cultures (Stout et al., 2002). L'induction représente pourtant une alternative d'intérêt à l'application de fongicides (van Loon et al., 1998; Spletzer et Enyedi, 1999), bien que soulevant le problème

d'intérêt agronomique du coût métabolique de la résistance induite (Heil et Baldwin, 2002; Cipollini et al., 2003). Ce coût, provenant de compromis métaboliques dans l'allocation des ressources, se concrétiserait par la réduction du *fitness* des plantes élicitées en absence d'herbivores ou de pathogènes telle que causée par la production de niveaux inutilement élevés de réponses de défense (Heil et Bostock, 2002). La discussion qui suit mettra l'accent sur un agent chimique de résistance particulièrement bien étudié : le benzothiadiazole.

#### a) Le benzothiadiazole

L'acide benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioïque S-méthyle ester (BTH) est un puissant éliciteur de résistance induite contre plusieurs pathogènes viraux, bactériens et fongiques (Gorlach et al., 1996; Sauerborn et al., 2002; Agostini et al., 2003), tout en n'ayant qu'un très faible pouvoir d'induction en ce qui concerne la résistance contre les divers arthropodes testés à ce jour (Inbar et al., 2001; Stout et al., 2002). Cet activateur chimique de résistance n'a aucun effet antifongique (Gorlach et al., 1996; Wurms et al., 1999) ou herbicide (Sauerborn et al., 2002) connu. Son action de protection des plantes dicotylédones (Benhamou et Belanger, 1998; Sauerborn et al., 2002) et monocotylédones (Gorlach et al., 1996) contre l'infection serait plutôt attribuable à sa capacité à induire une résistance similaire à celle médiée par l'acide salicylique (Wurms et al., 1999). La façon dont il déclencherait l'activation de la SAR serait analogue à celle de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique, c'est-à-dire qu'il agirait en tant que messenger secondaire en déclenchant le sentier signalétique menant à la SAR (Benhamou et Belanger, 1998). Cette action se ferait indépendamment de l'accumulation d'autres molécules-signal (Benhamou et Belanger, 1998).

De manière générale, on rapporte que l'ensemble de gènes activé par le BTH n'est pas le même selon l'espèce en cause (qu'il s'agisse d'*A. thaliana*, du blé ou du tabac) (Gorlach et al., 1996), ce qui suggère que la manière exacte dont le BTH fournit aux végétaux une protection contre les pathogènes du sol est sélective (Benhamou et Belanger, 1998). Par exemple, chez le blé, les gènes induits par le BTH incluraient à la fois des gènes reliés à la résistance et des gènes reliés à la réponse aux pathogènes, une distinction claire entre ces deux catégories de gènes n'étant cependant pas aisée

(Gorlach et al., 1996). En fait, de manière générale, il apparaît que les inducteurs de la SAR, tel le BTH, auraient un double rôle dans l'activation de la résistance. Ainsi, une série de gènes répondrait directement aux inducteurs (e.g., les gènes encodant les protéines PR-1), tandis que d'autres gènes et processus (e.g., dépôt de callose) ne verraient que leur potentiel d'induction augmenté (Kohler et al., 2002). Ainsi, la résistance conférée par le BTH est-elle souvent associée à la synthèse de protéines PR. Bien que rapporté moins fréquemment, elle a aussi été liée à la synthèse de métabolites secondaires (Benhamou et Belanger, 1998). Typiquement, l'accumulation de composés phénoliques en réponse à l'induction de la résistance par le BTH est localisée, et non systémique comme tel est le cas de nombreux autres mécanismes de défense (Wurms et al., 1999).

Ainsi, en vaporisation foliaire chez le concombre, le traitement au BTH mène à l'observation d'épaississements pariétaux sporadiques. Il n'est cependant pas efficace pour réduire l'infection causée par le mildiou et, dans ce système, son usage prolongé à concentration élevée (2,8 mM pendant trois semaines) mène à l'apparition de symptômes dus à sa phytotoxicité (jaunissement du limbe entre les nervures) (Wurms et al., 1999). Bien que Tosi et ses collaborateurs (1999) aient également observé de tels effets phytotoxiques chez le tournesol, aucune analyse des impacts du BTH sur la photosynthèse ne semble avoir été faite. Cette phytotoxicité n'est cependant pas couramment rapportée et des concentrations de 1,4 à 3,2 mM ont déjà été utilisées pour induire efficacement la résistance sans qu'il y ait apparition de tels symptômes chez le blé et la tomate (Wurms et al., 1999). Chez cette dernière plante, la vaporisation foliaire de BTH (1,5 mM) quatre jours avant son inoculation avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* a mené à l'observation d'un délai dans l'apparition de symptômes de l'infection et d'une réduction de la sévérité de ceux-ci et des lésions racinaires normalement causées par ce pathogène (Benhamou et Belanger, 1998). Les plants non inoculés traités au BTH ne montraient aucun symptôme cellulaire apparent et leur système racinaire semblait sain. Il apparaît effectivement que le pré-traitement n'empêcherait pas la pénétration du pathogène (Gorlach et al., 1996; Benhamou et Belanger, 1998), mais en restreindrait plutôt la colonisation aux tissus les plus externes, restriction d'ailleurs corrélée avec l'occlusion des espaces intercellulaires de l'hôte par

du matériel amorphe chez la tomate (Benhamou et Belanger, 1998). En ce sens, le dépôt de lignine et de tannins dans ces zones ainsi que l'épaississement des parois cellulaires aux sites de pénétration potentielle observés en réponse au BTH suggèrent que la résistance qu'il confère chez la tomate serait essentiellement liée à l'accumulation massive de barrières structurales. Pareillement, chez *A. thaliana*, un prétraitement au BTH augmente la réponse de dépôt de callose suite à l'infection par un pathogène (Moran et al., 2002). Chez d'autres espèces, il agirait principalement par l'augmentation de l'accumulation de composés phénoliques en réponse à l'élicitation. Ainsi, chez le blé, le traitement de plants avec du BTH mène à l'observation d'une hausse de la formation de papilles (Gorlach et al., 1996) et d'une augmentation de l'intensité de la fluorescence localisée sous l'appressorium suite à l'inoculation par un pathogène fongique (Huang, 2001). Or, il est bien documenté que l'occurrence et l'intensité de cette fluorescence d'origine phénolique provenant des cellules épidermiques au site de pénétration sont corrélées avec le degré de résistance chez cette espèce, les cultivars résistants exhibant de telles manifestations microscopiques de manière plus marquée que les cultivars sensibles (Huang, 2001).

Chez le tournesol, l'augmentation de la résistance induite par le prétraitement de grains par trempage dans une solution aqueuse de BTH (60 ppm) était suffisante pour réduire de 84 % à 95 % le nombre d'infections des racines par la plante parasite *Orobranche aegyptiaca* Pers. à un stade précoce de l'interaction (Sauerborn et al., 2002). Bien que l'on ne connaisse pas la séquence d'événements que déclenche le BTH et qui mène chez cette espèce à une résistance accrue à l'infection, l'augmentation des concentrations racinaires en scopolétine,  $H_2O_2$  et chitinase mesurées chez les plants traités y jouerait probablement un rôle. Notons par ailleurs qu'aucune hausse des contenus racinaires en lignine n'a été observée en réponse au BTH chez le tournesol. Son effet sur la croissance, pour sa part, semble plus ambigu. Ainsi, dans une première série d'expériences menées en chambre racinaire, le traitement avec 30 ppm de BTH avait conduit à l'observation d'une diminution de 40 % à 50 % de l'accumulation de biomasse racinaire en poids sec, des résultats qui trouvaient écho dans la littérature (Heil, 2001). Cet auteur expliquait le phénomène en termes d'allocation différentielle des ressources (Heil, 2001). Cependant, dans une seconde série d'expériences menées

par Sauerborn et ses collaborateurs (2002), des plants cultivés en pots ne montraient pas cette diminution des biomasses racinaire et aérienne en réponse au BTH.

Avec l'achèvement de la présentation de la réponse des plantes aux agents chimiques de résistance, l'ensemble des considérations pratiques inhérentes au thème des principaux effets rapportés des inducteurs biotiques et chimiques ont été couvertes. Ces réponses seront maintenant abordées sous un angle plus théorique. La discussion qui suit s'orientera sur les bases évolutives et écologiques du développement de réactions de défense chez les plantes.

#### *2.2.1.2 Théories de la défense des plantes*

Tel que vu précédemment, les plantes, au cours de l'évolution, ont développé un large éventail de défenses chimiques et physiques. Dans des contextes abiotiques divers, ces mécanismes ont été construits en présence d'ennemis biotiques variés. Ces constats fondent les assises des Théories de la défense des plantes élaborées au cours des dernières années. Ces bases conceptuelles visent à comprendre et à expliquer les variations dans les niveaux et dans les types spécifiques de défenses exhibées par les plantes. Leur formulation et usage s'inscrivent à point nommé dans le courant actuel en écologie. Elles répondent à ce besoin de cadres de référence sollicité par les écologistes modernes (cf. *Ecology* 83(6), juin 2002, Special feature – Paradigms in ecology).

Toutefois, à ce jour, force est de constater qu'une véritable théorie regroupant l'ensemble des manifestations rapportées reste à produire. D'ailleurs, d'aucuns ont suggéré que l'absence d'une telle théorie unificatrice ne serait que le reflet du caractère irréaliste d'une telle conception (Berenbaum, 1995). D'autres invoquent plutôt le manque de maturité de ce champ de connaissance et anticipent une évolution favorable à l'apparition d'une Théorie de la défense des plantes (Stamp, 2003). Certains suggèrent finalement la formulation de plusieurs Théories, chacune prenant en compte séparément des plantes appartenant à divers groupes fonctionnels (i.e. monocotylédones / herbacées dicotylédones / plantes ligneuses) (Hawkes et Sullivan, 2001).

Néanmoins, certaines approches permettant d'ores et déjà la formulation d'hypothèses réfutables ont su se démarquer par l'intérêt expérimental et fondamental

qu'elles ont stimulé. Parmi celles-ci, les hypothèses de la Défense Optimale, de la Photoinhibition, de la Balance Carbone:Nutriments, du Taux de Croissance, et de la Balance Croissance-Différenciation, hypothèses actuellement en usage, seront brièvement présentées dans la présente section. Ces approches théoriques, qui ne sont mutuellement exclusives ni en ce qui concerne les postulats sur lesquels elles se basent ni en ce qui touche aux prédictions qu'elles envisagent, se sont surtout attardées au problème de la réponse des plantes aux herbivores. Pour sa part, la discussion qui suit les envisage plus largement comme prenant compte des mécanismes de défense aux ennemis biotiques en général. D'autres hypothèses, telles l'hypothèse de l'Apparence (Feeny, 1976)<sup>5</sup> et autres approches s'attardant à des patrons défensifs à l'échelle du paysage (e.g., hypothèse de la Rareté-Disponibilité; Grubb, 1992), bien que d'un intérêt théorique certain, sont plus étroitement applicables à l'herbivorie et ne forment, somme toute, aucune inférence pertinente au présent projet. Elles ne seront donc pas abordées ici.

Dans la discussion qui suit, les théories retenues seront successivement traitées selon un même patron. D'abord, un court résumé sera proposé. Par la suite, les postulats de base seront présentés, puis certaines forces et limites de chacune seront évoquées.

#### A. La Défense Optimale

L'hypothèse de la Défense Optimale (McKey, 1974) s'intéresse, selon une approche coût:benefice, à la manière dont les besoins défensifs d'une plante ont contribué à l'évolution de métabolites secondaires. Envisagée sous cet angle, la plante investit dans la maximisation de son *fitness* un montant que l'on pourrait désigner comme « le coût métabolique de la résistance », une somme qui couvrira les frais des défenses qu'elle déploiera. Cette dépense se limite à un « coût d'allocation », soit celui qui résulte de la diversion, parfois irréversible (e.g., synthèse de grosses molécules non recyclables telle la lignine), d'une part de l'énergie et des nutriments vers la défense

---

<sup>5</sup> Cette hypothèse stipule que la végétation dominante dans l'espace ou le temps ayant une probabilité plus grande d'être attaquée par des herbivores, elle sera mieux protégée que la végétation moins apparente (Feeny, 1976).



plutôt que vers les besoins métaboliques primaires de la plante. Aucune restriction dans les patrons défensifs n'est prévue, en autant que ces patrons soient adaptatifs, c'est-à-dire que les bénéfices qu'ils apportent en dépassent les coûts. Ainsi, les défenses seraient produites en quantité inversement proportionnelle à leur coût de revient, et en proportion directe avec le risque de prédation auquel est exposée une plante ou l'un de ses organes. En raison du compromis métabolique qu'elles impliquent (i.e. allocation préférentielle d'une ressource finie vers la croissance, la reproduction ou la défense), ces défenses sont inductibles et souvent accompagnées d'une baisse dans la production de fruits et graines.

Pour être à même d'expliquer les variations observées dans les patrons de défense des plantes, cette hypothèse postule qu'il existe une variation génétique dans le métabolisme secondaire, que l'attaque biotique en constitue la principale force sélective et que le déploiement de réponses de défense est à même de réduire significativement l'attaque. Ces postulats de base jouissent actuellement de bons appuis empiriques issus de nombreuses données colligées à ce jour (Stamp, 2003).

La difficulté inhérente à la démonstration du bien-fondé de cette hypothèse (et des sous-hypothèses qui en découlent) tient au fait qu'il peut s'avérer difficile de détecter les coûts de la défense tels qu'envisagés selon cette approche. En effet, non seulement les coûts d'allocation croissance-reproduction vs défense peuvent-ils parfois passer inaperçus, mais le phénomène de la tolérance, où la plante attaquée possède des traits qui minimisent les impacts néfastes des dommages causés, peut également constituer un aspect non négligeable de la réponse des plantes. Ainsi, à la dichotomie croissance-reproduction vs défense, laquelle pourrait s'avérer trop simpliste, l'allocation vers la tolérance, une troisième voie, devrait être ajoutée. Or, détecter la tolérance est, en pratique, sujet à de nombreuses complications. En conséquence, lors d'études au cours desquelles aucun coût n'est trouvé, il demeure prudent de considérer que ce coût n'a peut-être qu'échappé à la détection, rendant cette hypothèse difficilement falsifiable. Ce cadre conceptuel conserve cependant un grand intérêt lors d'investigations portant sur la compréhension des mécanismes et implications des coûts détectés (Stamp, 2003).

## B. La Photoinhibition

L'hypothèse de la Photoinhibition (Close et McArthur, 2002; Close et al., 2003) se place diamétralement à l'opposé de l'hypothèse de la Défense Optimale. Pour expliquer la production de métabolites secondaires carbonés, elle n'accorde aucune importance aux interactions biotiques en tant que forces sélectives. Elle suggère plutôt que ces défenses seraient apparues pour contrer les effets néfastes d'excès de lumière. En ce sens, le rôle des composés phénoliques se ferait ici par le biais de leurs propriétés antioxydantes et concernerait principalement la protection contre les photodommages. Toute protection conférée contre l'herbivorie est vue comme un processus passif, le rôle actif étant attribué à l'effet photoprotecteur.

L'hypothèse prédit que les risques de dommages par excès de lumière encourus par une plante dans un environnement donné détermineront sa production de métabolites secondaires. Ainsi, les patrons dans les contenus en composés phénoliques observés chez les végétaux ne seraient tributaires ni des ressources disponibles ni des interactions plantes-ennemis biotiques.

Cette hypothèse a le mérite d'apporter un point de vue nouveau à l'ensemble des Théories de la défense, en cherchant des explications adaptatives au phénomène des altérations dans les contenus en métabolites secondaires observés dans divers environnements. Cependant, les motifs sur lesquels se basent ses auteurs pour rejeter les hypothèses la précédant chronologiquement sont critiquables. Par exemple, la façon dont est interprétée l'hypothèse de la Balance Carbone:Nutriment (cf. § La Balance Carbone:Nutriment) fait montre d'une compréhension erronée de cette approche. Entre autres, lorsqu'ils posent que tout excès de carbone, qu'il soit induit par un faible apport en nutriments ou des niveaux élevés de lumière, sera converti automatiquement en composés phénoliques foliaires, Close et McArthur (2003) simplifient à outrance les prédictions de cette hypothèse qui reconnaît l'importance des processus de mise en réserve du carbone en surplus.

## C. La Balance Carbone:Nutriment

L'hypothèse de la Balance Carbone:Nutriment, sous sa forme originale (Bryant et al., 1983), a été développée pour expliquer l'influence de conditions environnementales,

notamment l'apport en nutriments et l'exposition à l'ombre, sur la défense des plantes face aux herbivores. Elle se base d'une part sur l'observation selon laquelle la croissance est altérée de façon préférentielle par rapport à la photosynthèse suite à une limitation minérale et, d'autre part, sur les relations physiologiques connues entre les contenus respectifs d'une plante en carbone et en nutriments, composition qui dicte strictement sa croissance. Des variations de ces ressources, lorsque perçues par la plante comme une altération de son ratio carbone:nutriment, façonneraient sa réponse phénotypique à l'attaque. De cette manière, lorsque le carbone deviendrait disponible en excès par rapport aux besoins de croissance, ce surplus serait dirigé, de façon passive, vers la production de défenses.

Bien que, exprimée ainsi, l'hypothèse n'implique pas obligatoirement que toute défense ne sera produite qu'après que tous les besoins requis par la croissance aient été remplis, elle a souvent été interprétée comme tel (Stamp, 2003). Cette vision, sans doute erronée par rapport à la formulation originale, exclut la possibilité selon laquelle une quantité basale de ressources serait systématiquement allouée à la production de défenses constitutives en plus de la portion provenant des surplus de carbone. Plutôt, elle suggère que la défense n'implique aucun coût d'allocation, puisque les besoins métaboliques primaires ont préséance, la défense ne pouvant se déployer qu'après qu'aient été rencontrés les besoins de croissance.

L'hypothèse de la Balance Carbone:Nutriment a l'avantage de reconnaître explicitement que l'environnement influence l'évolution des fonctions des plantes, un aspect qui n'était pas envisagé dans l'hypothèse de la Défense Optimale. Elle ne peut cependant servir d'assise théorique en ce qui concerne toute une panoplie de réponses des plantes face à l'attaque. Notamment, les réponses rapidement et spécifiquement induites suite à la régulation enzymatique déclenchée en réaction directe à l'élicitation ainsi que celles qui, des parties attaquées où elles sont d'abord produites, s'étendent aux parties distales échappent aux prédictions issues de cette approche conceptuelle. Ces réponses actives seraient davantage reliées à l'hypothèse de la Défense Optimale. En effet, les altérations au ratio carbone:nutriment d'une plante ne sauraient être correctement invoquées qu'en termes de variations dans la quantité de substrats disponible pour la synthèse de métabolites secondaires. Bien plus, il est important de

considérer, lorsque l'on utilise ce cadre conceptuel, qu'il n'implique pas que toutes les plantes sont à même de modifier leur allocation de ressources en réponse à une modification de leur balance carbone:nutriment. Plutôt, il sous-entend que certaines plantes ne possèdent pas la plasticité phénotypique nécessaire et que, dans tous les cas, les surplus de carbone rendus disponibles par un déséquilibre carbone:nutriment pourront, alternativement, être alloués à la mise en réserve de ce carbone en excès plutôt qu'à la défense.

#### D. La Disponibilité des Ressources

L'hypothèse de la Disponibilité des Ressources (Coley et al., 1985) (également connue comme l'hypothèse du Taux de Croissance, mais que l'on aurait tort d'assimiler au Modèle du Taux de Croissance, Hilbert et al. (1981) *in* Hawkes, 2001) s'adresse aux variations génotypiques dans les défenses des plantes. Elle ne s'intéresse ainsi qu'aux différences observées entre espèces distinctes ou autres sous-unités de classification végétale. Elle stipule qu'il existe une relation inverse entre le taux maximal de croissance pouvant être atteint par une espèce donnée dans son habitat optimal et le niveau constitutif de défenses qu'elle exhibe. Le taux de croissance, ici représenté comme la résultante entre la réduction de la croissance causée par le coût de la défense et l'augmentation de la croissance attribuable à la protection conférée par la réponse de défense, est donc le reflet des conditions environnementales dans lesquelles une espèce donnée a évolué. En ce sens, l'hypothèse repose sur la reconnaissance de l'effet de la disponibilité des ressources d'un milieu sur la stratégie évolutive adoptée par les plantes s'y adaptant. Plus spécifiquement, les espèces végétales soumises aux pressions sélectives imposées par un milieu pauvre auront donc acquis de faibles taux de croissance, un avantage présumé dans ce type d'environnement où la croissance est contrainte. À l'opposé, celles adaptées aux environnements riches en nutriments auront des taux de croissance élevés propices à une maximisation de l'acquisition d'énergie.

Les prédictions issues de cette hypothèse en ce qui concerne les défenses des plantes touchent à la fois à leur type (à dominance constitutive ou induite chez les plantes à croissance lente ou rapide, respectivement), à leur quantité (les plantes à croissance lente allouant davantage de ressources à la défense par rapport aux plantes à

croissance rapide qui les investissent plutôt dans l'augmentation de leurs habiletés compétitives), à leur localisation (les tissus ayant une plus grande valeur étant mieux protégés), et à leur issue (les plantes à croissance lente étant moins soumises à l'attaque que leurs homologues à croissance rapide).

Bien que d'un intérêt théorique certain en raison du modèle mathématique qu'elle spécifie (i.e. des courbes « investissement défensif vs taux de croissance observé »), cette hypothèse demeure, en pratique, difficile d'accès. En particulier, il est peu aisé de connaître, pour plusieurs espèces que l'on désire comparer, les taux maximaux de croissance, soit ceux atteints par chacune en conditions optimales, les niveaux de défenses constitutives qui y correspondent, puis les conséquences qu'auraient sur ces niveaux des déviations dans les taux de croissance observés en conditions sous-optimales. De plus, cette hypothèse, qui prédit que le niveau optimal d'investissement dans la défense augmentera avec une diminution du taux de croissance potentiel (donc, de l'habileté de la plante à compenser pour l'attaque), ne fait aucune allusion au facteur « compétition pour les ressources », pourtant important dans le contexte évolutif de cette approche.

#### E. La Balance Croissance-Différenciation

Dans l'hypothèse de la Balance Croissance-Différenciation (Herms et Mattson, 1992), les processus liés à la croissance (i.e. production de racines, tiges et feuilles, et autres processus requérant d'importantes élongations ou divisions cellulaires) et ceux reliés à la différenciation (i.e. amélioration de la structure ou de la fonction de cellules déjà existantes par leur maturation ou leur spécialisation) compétitionnent pour une ressource commune : les photosynthétats. Par définition, cette hypothèse pose donc qu'il est impossible pour une plante de remplir simultanément tous ses différents besoins fonctionnels. Plutôt, selon les conditions environnementales, l'une ou l'autre des voies sera privilégiée, l'allocation préférentielle des ressources vers la croissance ou la différenciation étant effectivement en lien direct avec l'environnement. L'état physiologique résultant du compromis métabolique alors accompli interagira avec les forces sélectives que représentent l'attaque biotique (qui favorise la défense) et la

compétition (qui favorise la croissance) qui, sur une échelle de temps évolutive, contribueront à façonner les différentes stratégies d'histoire de vie.

Entre autres, l'hypothèse envisage explicitement que, lors de situations environnementales affectant la croissance plus négativement que la photosynthèse (e.g., carences minérales), l'augmentation des ressources disponibles pour l'allocation vers des processus liés à la différenciation sera favorisée. En effet, la croissance dépend tellement de la disponibilité des nutriments qu'elle est davantage limitée par ce facteur que ne le sont les autres processus. Conséquemment, de telles conditions conduiront à l'accumulation d'hydrates de carbone non structuraux qui pourront être convertis en métabolites secondaires. Comme dans le cas de la Balance Carbone:Nutriments, le coût métabolique, selon cette conception, serait alors négligeable, puisque la croissance s'avère simplement impossible dans ce cas.

Ainsi, selon que l'environnement sera riche ou pauvre, les plantes dominantes seront respectivement celles dont la stratégie favorise la croissance ou la différenciation, tel que stipulé par l'hypothèse de la Disponibilité des Ressources. Étant donné que, parmi les processus reliés à la différenciation se trouvent les réponses de défense, cette hypothèse prédit donc que les plantes de milieux pauvres, dont la croissance et la capacité photosynthétique sont limitées, alloueront le peu de ressources disponibles à la croissance et seront relativement peu protégées. En conditions intermédiaires, la croissance étant limitée par les ressources du milieu et la photosynthèse demeurant pleinement fonctionnelle, de hauts niveaux de métabolites secondaires issus de l'allocation préférentielle vers les processus de différenciation seront exhibés. Ces plantes seront quantitativement bien défendues (e.g., phénols, tannins, fibres), et à faible coût. En milieu riche, ni l'acquisition d'énergie ni celle de minéraux n'étant limitante, la croissance sera favorisée. Dans ce cas, les défenses, si présentes, seront plutôt de type qualitatif (e.g., alcaloïdes). Dans tous les cas, avec une augmentation de la lumière, la production de métabolites secondaires et celle de métabolites primaires connaîtront des hausses proportionnelles. Ces conditions, qui affectent davantage la photosynthèse que la croissance, ne sont pas vues ici comme favorisant un processus plutôt qu'un autre.

Cette hypothèse possède les mêmes avantages que l'hypothèse de la Balance Carbone:Nutriment, à laquelle elle n'est pas étrangère quant aux prédictions qui en sont issues (quoi que les deux approches diffèrent dans leur interprétation des manifestations observées), en plus d'englober un nombre plus important de situations environnementales que ne le fait la Balance Carbone:Nutriment. De plus, par rapport à l'hypothèse du Taux de Croissance, elle est plus versatile, pouvant s'appliquer tant à l'échelle écologique, qu'à l'échelle évolutive ou à celle de la plante individuelle. Dans ce dernier cas, en considérant des tissus ou organes mûrissant plus ou moins hâtivement, on pourra effectivement tester si les niveaux de métabolites secondaires qu'ils contiennent reflète leur passage plus ou moins rapide du stade de la croissance à celui de la différenciation (Herms et Mattson, 1992). Elle a cependant le désavantage de requérir, pour son test rigoureux, l'inclusion d'un nombre important de niveaux du facteur « ressources ». En effet, le devis expérimental doit alors couvrir l'étendue « ressources pauvres » à « ressources abondantes », en passant par le niveau « ressources intermédiaires ». Trois niveaux représenteraient donc un nombre minimal qu'il serait fortement souhaitable d'augmenter pour raffiner l'interprétation (Herms et Mattson, 1992).

En résumé, les différentes hypothèses élaborées pour expliquer les patrons de défenses des plantes se placent sur un continuum accordant plus ou moins d'importance aux facteurs « interactions plante-ennemi » et « environnement abiotique » en tant que forces sélectives. Les hypothèses de la Défense Optimale, d'une part, et celles de la Photoinhibition et de la Disponibilité des Ressources, d'autre part, s'y placent aux deux extrémités du spectre, tandis que les autres, accordant de l'importance aux deux types de pressions sélectives, se situent entre ces pôles. Elles varient également dans leur niveau de complexité, selon le nombre de facteurs qu'elles considèrent (e.g., l'hypothèse de la Photoinhibition se limite à une seule force sélective, soit la lumière). Les approches les plus inclusives deviennent également les plus difficilement testables expérimentalement. De plus, leurs inférences sont souvent de nature similaire quant à l'observation des patrons de défense observés. Par exemple, l'hypothèse de la Croissance-Différenciation stipule que le taux de production de métabolites secondaires sera façonné par la disponibilité des ressources, à l'exception de la ressource lumineuse, avec un niveau de

défense maximal atteint à une disponibilité de ressources intermédiaire. Ces prédictions sont sensiblement les mêmes que celles issues de la Balance Carbone:Nutriment et de la Disponibilité des Ressources, mais elles diffèrent dans les explications qu'elles proposent.

Avec cette sous-section se termine la présentation des effets physiologiques des inducteurs. Pour couvrir ce sujet, nous avons d'abord présenté, dans certains de leurs détails, différents aspects-clés des réponses des plantes face aux insectes herbivores, aux agents pathogènes, puis aux agents chimiques de résistance induite. Pour comprendre ces manifestations, nous avons ensuite examiné certaines Théories de la défense, dont les postulats de base, prédictions, forces et limites ont été exposés. La discussion qui suit, pour sa part, abordera un nouveau thème, soit la fluorodétection des effets de l'induction de résistance. Nous poursuivrons donc cette revue de la littérature en exposant d'abord les aspects pratiques liés aux principaux usages actuels de la fluorodétection, puis nous aborderons les assises théoriques menant à son interprétation.

### **2.2.2 Fluorodétection des effets physiologiques de l'induction de résistance biotique**

Des considérations théoriques élaborées plus haut, retenons qu'elles sont d'une valeur inestimable pour l'écologiste ou le théoricien, mais d'un maigre secours pour l'agriculteur aux prises avec une infestation de mildiou. En effet, on rapporte fréquemment que les pathogènes fongiques sont déjà bien installés dans leur hôte et ce, depuis un laps de temps relativement important, avant qu'apparaissent les premiers symptômes visibles de la maladie (Kshirsagar et al., 2001). Ce délai dans la détection de l'infection occasionne une réduction significative de la possibilité d'effectuer un contrôle efficace de ce type de stress. En fait, le manque généralisé d'outils pratiques permettant la mise en évidence précoce de stress chez les végétaux en l'absence de symptômes visibles (e.g., lors d'infections racinaires) fournit un motif justifiant que l'on s'attarde à ce problème d'ordres économique et écologique (Ning et al., 1995; Buschmann et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2000).

Or, tel que décrit plus haut, de nombreux changements s'opèrent dans la physiologie de l'hôte soumis à un stress biotique avant que soient apparentes des lésions



caractéristiques. En ce sens, l'identification d'outils permettant la détection de certains de ces événements précoces pourrait constituer une avancée importante dans la lutte contre les pestes des plantes en fournissant l'information nécessaire à la prise de décisions éclairées au niveau du champ. La fluorodétection pourrait être appelée à remplir ce rôle. Pour étayer cette assertion, les principaux usages de l'analyse des émissions de fluorescence chlorophyllienne et bleu-vert des végétaux seront présentés dans la section qui suit, puis son interprétation physiologique sera abordée.

### *2.2.2.1 Principaux usages de la fluorodétection*

Au cours des dernières années, un nombre grandissant d'études portant sur la détection précoce de stress environnementaux ont permis de constater que l'utilisation des différentes bandes d'émission de fluorescence des végétaux (440, 520, 690 et 740 nm) pourrait s'avérer un outil prometteur (Stober et Lichtenthaler, 1993; Nilsson, 1995). À la lumière de ces travaux, il a été proposé que ces émissions caractéristiques constitueraient des sondes intrinsèques de l'état physiologique et de l'activité photosynthétique des plantes (Cerovic et al., 1999). Le principal avantage de la fluorescence par rapport aux méthodes classiques réside en ce que la prise de mesures est rapide, sensible et non destructive (Lichtenthaler et Rinderle, 1988).

Le principe sous-tendant l'utilisation pratique de cette méthode de fluorescence repose sur la détection, la quantification, puis l'analyse des émissions de fluorescence des plantes telles qu'excitées par lumière UV (Corp et al., 1997). Ces émissions sont de deux types distincts, soit 1) la fluorescence chlorophyllienne (ChlF) avec des maxima dans les régions rouge (690 nm) et rouge lointain (740 nm) du spectre, et 2) la fluorescence bleu-vert (BGF) dont le maximum d'émission se situe dans la région bleue du spectre (440 nm) avec un épaulement dans la région verte (520 nm) (Figure 2-1).

#### A. Fluorescence chlorophyllienne

D'un point de vue pratique, la fluorescence chlorophyllienne peut être envisagée selon deux approches. La première, l'approche fonctionnelle, mise sur l'utilisation de la méthode des flashs saturants dans l'estimation de l'efficacité photosynthétique. Cette méthode jouit d'une base théorique solide. Puisqu'elle est largement connue,

d'utilisation courante et qu'elle n'a pas été exploitée lors des expériences effectuées lors du présent projet, elle ne sera pas présentée ici. La seconde méthode est plus récente et son utilisation demeure basée sur des résultats empiriques. Elle mise sur l'analyse des spectres d'émission de fluorescence et représente une approche structurale de la fluorescence chlorophyllienne.

L'intensité de l'émission de cette fluorescence, lorsqu'elle est excitée par une radiation UV, sera en effet directement reliée 1) à la capacité photosynthétique et l'efficacité du PSII (Lichtenthaler et Rinderle, 1988), 2) au contenu en chlorophylle *a* des couches supérieures des feuilles (Buschmann et Lichtenthaler, 1998) et 3) au contenu de l'épiderme en composés absorbant dans l'UV (Bilger et al., 1997; Barnes et al., 2000). Étant donné que certaines de ces variables sont rapidement altérées en réponse à de nombreux stress, la fluorescence chlorophyllienne a le potentiel de s'avérer intéressante pour la détection de stress abiotiques et biotiques (Buschmann et al., 2000). Les deux sections qui suivent seront consacrées à ces caractéristiques de la fluorescence chlorophyllienne selon l'approche structurale et dans une optique de détection.

#### **a) Approche structurale : Analyse des spectres d'émission**

*Indicateur des contenus foliaires en chlorophylle.* Rappelons que le spectre d'émission d'une feuille verte comporte deux pics de ChlF : l'un vers 690 nm, l'autre vers 735 nm. Les intensités relatives des fluorescences rouge ( $F_{690}$ ) et rouge lointain ( $F_{735}$ ) varient de manière caractéristique selon la quantité de chlorophylle présente au niveau d'une feuille (Stober et Lichtenthaler, 1993; Middleton et al., 1996; Corp et al., 1997). En ce sens, une relation curvilinéaire inverse lie le ratio  $F_{690}/F_{735}$  au contenu *in situ* des feuilles en chlorophylle (Lichtenthaler et Rinderle, 1988; Babani et Lichtenthaler, 1996; Buschmann et Lichtenthaler, 1998). En effet, en raison du chevauchement entre les spectres d'absorption de la lumière et d'émission de ChlF des feuilles vertes (entre 640 et 710 nm) (Figure 2-2), une hausse du contenu en chlorophylle fera en sorte que la  $F_{690}$  sera réduite préférentiellement en raison de sa réabsorption, alors que la  $F_{735}$  demeurera largement non affectée. Ainsi, la forme du spectre de ChlF et la valeur du ratio  $F_{690}/F_{735}$  des intensités des deux maxima dépendront de la concentration foliaire en chlorophylle (Lichtenthaler et Rinderle, 1988).

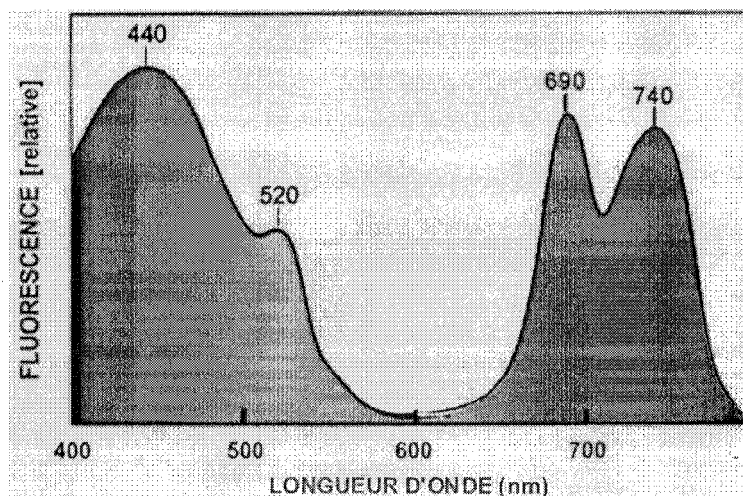


FIGURE 2-1. Spectre d'émission de fluorescence typiquement obtenu pour une feuille verte excitée par une radiation UV-A (340 nm) (modifié de Buschmann et al., 2000).

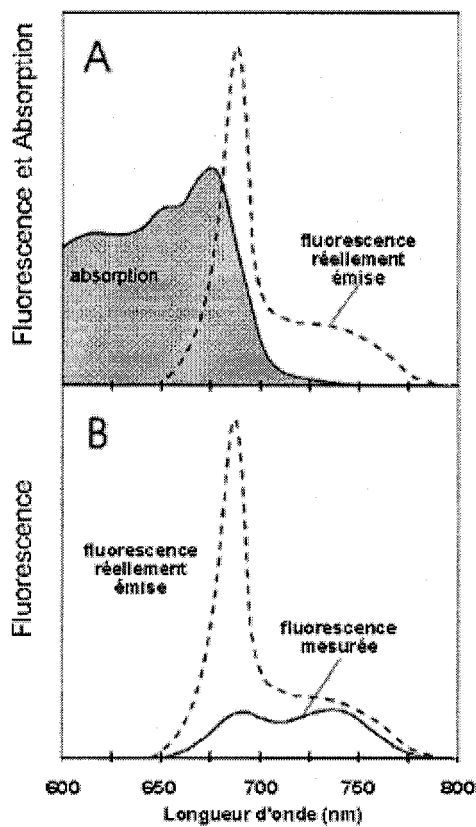


Figure 2-2. Effet de la réabsorption partielle de la fluorescence émise sur l'émission de fluorescence mesurable (modifié de Buschmann et Lichtenthaler, 1998).

*Transmittance de l'épiderme aux rayons UV (TEUV).* Des observations ont fréquemment été rapportées à l'effet que le spectre d'excitation de la fluorescence chlorophyllienne diffère grandement selon qu'il s'agisse d'exciter la fluorescence chez des feuilles d'ombre ou chez des feuilles de soleil (Schweiger et al., 1996; Bilger et al., 1997; Lichtenthaler et Miede, 1997). Chez ces dernières, le rendement de la fluorescence chlorophyllienne est effectivement très réduit lorsque l'excitation provient d'une lumière de longueur d'onde courte (325 nm à 400 nm) plutôt que d'une lumière visible bleue (420 nm à 460 nm). En fait, ces feuilles, en réponse à l'exposition à long terme à de fortes intensités de rayons UV, auraient accumulé dans les vacuoles de leurs cellules épidermiques des substances absorbant dans cette portion du spectre (Barnes et al., 2000). Ces composés non fluorescents, principalement des flavonoïdes (Bilger et al., 1997; Markstädter et al., 2001), préviendraient alors la pénétration des radiations UV dommageables à travers la couche protectrice que constitue l'épiderme. L'énergie d'excitation atteignant les cellules du mésophylle sous-jacent s'en trouvera alors réduite et, conséquemment, il en sera de même de l'émission de fluorescence chlorophyllienne (Schweiger et al., 1996).

Ainsi, puisque sous de faibles lumières d'excitation, l'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à l'irradiance reçue par les pigments photosynthétiques, on obtiendra une mesure relative de la transmittance de l'épiderme aux rayons UV en faisant le ratio des émissions de fluorescence chlorophyllienne telles qu'excitées par lumières UV et bleue ( $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$ ) (Bilger et al., 1997). À partir des résultats d'expérimentations menées en parallèle sur des échantillons de feuilles intactes et après le retrait de leur épiderme (Bilger et al., 1997; Markstädter et al., 2001), chez des feuilles d'ombre et des feuilles de soleil (Barnes et al., 2000) et sur des tissus provenant de plants cultivés en chambre de croissance (Burchard et al., 2000), en serre (Kolb et al., 2001) ou au champ (Barnes et al., 2000) sous différents régimes d'expositions aux rayons UV, l'on sait maintenant que le ratio  $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$  s'avère une mesure rapide et efficace de la transmittance de l'épiderme aux UV (Bilger et al., 1997; Barnes et al., 2000; Markstädter et al., 2001; Wagner et al., 2003).

Ces études ont pu montrer qu'une grande part de la variation de la transmittance était attribuable à la présence de flavonoïdes résultant de la croissance des plantes dans

des conditions de stress (Burchard et al., 2000; Markstädter et al., 2001). Il est intéressant de noter qu'une telle accumulation de flavonoïdes constitue un phénomène qui a été rapporté en réponse à l'attaque pathogénique (e.g., au niveau des tissus sains entourant les lésions formées suite à la réaction hypersensible chez le maïs; Nicholson et Hammerschmidt, 1992). Cependant, Barnes et ses collaborateurs (2000) mentionnent que, dans un cas où l'exposition au stress occasionne plutôt la production d'anthocyanines (e.g., exposition au froid, blessure, attaque de certains pathogènes, stress hydrique, carences minérales; Dixon et Paiva, 1995), le ratio  $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$  n'est plus approprié comme mesure de la transmittance de l'épiderme aux UV. En effet, ces pigments absorbent dans la région bleue du spectre et la portion de la lumière d'excitation de référence qu'ils auront ainsi captée ne pourra contribuer à exciter la fluorescence chlorophyllienne, ce qui pourrait mener à l'observation d'une apparente, mais non représentative, augmentation de la transmittance (Barnes et al., 2000).

#### **b) Détection de stress abiotiques et biotiques**

Lorsqu'on envisage d'utiliser les changements dans l'émission de fluorescence chlorophyllienne des végétaux comme outils de détection de stress, il demeure primordial de garder à l'esprit que plusieurs facteurs de stress différents peuvent induire des symptômes similaires et que les mesures de fluorescence prises individuellement ne sauraient en aucun cas être à même de permettre de déterminer avec certitude la nature exacte de l'agent causal de ces dommages et altérations (Lichtenthaler et Miede, 1997).

Néanmoins, d'intéressantes variations dans les émissions de fluorescence chlorophyllienne de plantes expérimentant divers stress abiotiques (e.g., carences azotées; Hák et al., 1993) et biotiques (e.g., effet d'une toxine fongique; Kshirsagar et al., 2001) ont souvent été rapportées dans la littérature, et de nombreux auteurs plaident pour l'utilisation de cet outil à des fins de détection précoce et de suivi de stress environnementaux (Lichtenthaler et Miede, 1997; Cerovic et al., 1999; Buschmann et al., 2000). Des investigations plus poussées des altérations encourues par l'appareil photosynthétique et les événements reliés au transfert d'énergie suivant l'exposition des plantes à de nombreux types de stress ont également fait appel à l'utilisation de ces outils de fluorescence (Lichtenthaler et Rinderle, 1988; Babani et Lichtenthaler, 1996;

Lichtenthaler et Miehe, 1997; Barbagallo et al., 2003). Des altérations du spectre d'émission de fluorescence telles que des changements dans le ratio  $F_{690}/F_{735}$  de plantes soumises à différents facteurs de stress (e.g., application d'herbicides, exposition prolongée à l'obscurité, déficit en eau, pression mécanique, conditions de températures limitantes et carences minérales) ont été rapportées (Lichtenthaler et Rinderle, 1988; Schweiger et al., 1996; Corp et al., 1997). De plus, l'évaluation du ratio  $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$  s'est non seulement montrée utile pour estimer le degré de protection des plantes contre la hausse du rayonnement UV-B (Barnes et al., 2000), mais est également apparue comme présentant un intérêt en ce qui concerne la détermination du statut minéral des plantes (Samson et al., 2000; Mercure et al., 2004).

En ce qui a trait à la détection de stress biotiques, Buschmann et Lichtenthaler (1998) rapportent, sans toutefois l'interpréter, que l'analyse d'images présentant l'émission de fluorescence de feuilles entières suite à leur attaque par des mites mène à l'observation de taches de fluorescence de haute intensité. Utilisant eux aussi une approche d'imagerie, Balachandran et al. (1994) ont pu distinguer les événements précoces menant à l'apparition de lésions chlorotiques chez le tabac inoculé par le virus de la mosaïque du tabac, puis suivre l'évolution des altérations alors encourues. Ning et ses collaborateurs (1995) rapportent également d'intéressants résultats en ce qui concerne la détection par imagerie de fluorescence de dommages causés par la toxine fongique produite par *Pestalotiopsis spp* (1995). Lors d'une étude portant sur une autre toxine fongique, la cytochalasine E, des résultats concluants ont été obtenus grâce à l'utilisation du spectre d'émission de fluorescence chlorophyllienne des feuilles chez le pommier (Kshirsagar et al., 2001). En ce qui concerne l'effet de messagers secondaires sur les émissions de fluorescence des plantes, peu de données probantes sont disponibles dans la littérature.

#### B. Fluorescence bleu-vert induite par UV

Tel que mentionné plus haut, en raison du rôle physiologique central de la chlorophylle dans le processus de la photosynthèse, la fluorescence chlorophyllienne a été examinée en profondeur et largement utilisée dans de nombreuses études portant sur des aspects fondamentaux de la photosynthèse ainsi que dans le cadre de travaux traitant

de la détection de stress environnementaux divers (Schweiger et al., 1996). Plus récemment, plusieurs études ont rapporté que les feuilles excitées par une lumière UV (entre 320 nm et 380 nm), en plus d'émettre la fluorescence chlorophyllienne habituellement enregistrée, émettaient également dans la région bleu-vert du spectre (Chappelle et al., 1984; Lang et al., 1991; Stober et Lichtenthaler, 1993; Morales et al., 1996).

#### a) Particularités de la fluorescence bleu-vert

Contrairement à la fluorescence chlorophyllienne, qui émane exclusivement des molécules de chlorophylle *a* des cellules des couches supérieures du mésophylle, la fluorescence bleu-vert aurait une origine hétérogène et proviendrait principalement de composés phénoliques variés situés au niveau des parois des cellules épidermiques. Plus particulièrement, la fluorescence bleue ainsi qu'une grande part de la fluorescence verte émaneraient des cellules épidermiques et des nervures, la partie résiduelle de fluorescence verte étant plutôt émise à partir du mésophylle (Schweiger et al., 1996). Le principal fluorophore bleu serait l'acide férulique estérifié aux parois des cellules de l'épiderme (Morales et al., 1996; Lichtenthaler et Schweiger, 1998). Une autre caractéristique distinguant la fluorescence bleu-vert de la fluorescence chlorophyllienne s'observe à l'effet que la première n'exhibe aucune cinétique d'induction, la fluorescence bleu-vert de feuilles acclimatées à l'obscurité étant rigoureusement identique à celle qu'elles émettent lorsqu'elles sont ultérieurement exposées à la lumière (Stober et Lichtenthaler, 1993). Finalement, notons que cette émission semble généralisée à l'ensemble des végétaux. Par exemple, suite à leur étude portant sur l'émission de fluorescence bleu-vert induite par UV, Johnson et coll. (2000) rapportent que les 35 espèces testées montraient toutes un pic d'émission plus ou moins intense dans la région violette à bleue du spectre et que le tiers d'entre elles émettait également un pic défini dans la région verte.

#### b) Détection de stress

À l'échelle microscopique, l'exploitation des propriétés d'absorbance dans l'UV et d'émission de fluorescence de certains composés phénoliques dans l'étude des réactions précoces des plantes face aux assauts des pathogènes a déjà une longue tradition

(Robinson et al., 1988; Nicholson et Hammerschmidt, 1992; Hunt et al., 1996). Dès 1972, l'équipe de Fritig et Legrand rapportait que des changements dans la concentration et le taux de synthèse d'un composé fluorescent (la scopolétine) étaient évidents au niveau des lésions nécrotiques causées par l'inoculation du tabac avec le virus de la mosaïque du tabac et ce, avant même que tout symptôme visuel n'apparaisse (Fritig et al., 1972). Depuis, l'observation d'une intense fluorescence localisée provenant des parois et vacuoles des cellules végétales situées à proximité du site de contact entre une plante et un pathogène fongique (Nicholson et Hammerschmidt, 1992), et des lésions qu'il cause (Baillieul et al., 1995), est considérée comme reflétant une réponse de défense précoce et répandue. De telles observations ont également été rapportées dans le cas d'invasions par des nématodes parasites et, dans une moindre mesure, suite à la blessure mécanique (Robinson et al., 1988).

Dans le cas d'attaques fongiques, la liaison oxydative de très fortes concentrations de composés phénoliques fluorescents aux parois cellulaires de la plante causant cette fluorescence surviendrait avant même qu'il y ait eu pénétration de la cellule-hôte par le pathogène (Piffanelli et al., 1999). Il s'agirait en fait, pour certains, du premier (Carver et al., 1998) ou même du seul (Baillieul et al., 1995) symptôme visible du contact entre le pathogène et les cellules de la plante-hôte. À titre d'exemple, chez l'orge attaquée par *Erysiphe graminis*, la séquence ordonnée d'événements menant à la mort du pathogène est la suivante : 1) fluorescence de la paroi cellulaire près du tube germinatif après quatre heures, puis de la section adjacente à l'appressorium après dix heures, 2) développement de papilles fortement fluorescentes après douze heures, lequel est souvent associé à un échec à la pénétration, et 3) mort de l'appressorium suite à la réaction hypersensible (Huang, 2001). En ce qui concerne l'attaque par des insectes, Belefant-Miller et ses collaborateurs (1994) rapportent que la fluorescence bleue de cellules fortement endommagées était la réponse de résistance la plus rapidement observée suite à l'infestation par l'aphide *Diuraphis noxia* chez l'orge.

Par ailleurs, ce n'est que plus récemment que l'émission de fluorescence bleu-vert a fait son apparition dans la littérature concernant la détection de stress chez les végétaux par l'analyse de leurs émissions de fluorescence (e.g., exposition à de fortes irradiances; Stober et Lichtenthaler, 1993). De nombreux travaux se sont depuis



concentrés sur la mise en évidence de stress abiotiques (Heisel et al., 1996; Langsdorf et al., 2000). Par exemple, chez des plants de maïs dont la croissance s'est effectuée au champ, des plants de haricots exposés à de fortes irradiances et des plantules de citrouille soumises à un stress hydrique, Schweiger et ses collaborateurs (1996) ont observé que l'émission de fluorescence bleu-vert induite par UV était fortement et significativement plus élevée que celle de leurs homologues cultivés en conditions contrôlées. En ce qui concerne des facteurs de stress biotiques, Buschmann et Lichtenthaler (1998) rapportent que l'analyse d'images présentant l'émission de fluorescence de feuilles de tabac suite à leur attaque par des mouches blanches montre l'apparition de nombreux points d'intense fluorescence bleue. L'équipe de Kauffmann et Fritig (Baillieux et al., 1995 ; Kauffmann et al., 2000) rapporte les mêmes observations en ce qui concerne les lésions formées chez le tabac suite à son inoculation par le virus de la mosaïque du tabac. Ils ajoutaient, en 2002, que la fluorescence bleue des lésions causées par l'infiltration de glycoprotéines fongiques élicitrices isolées de la paroi de *Phytophthora megasperma* serait attribuable à la présence de scopolétine en concentration importante au niveau de ces lésions (Costet et al., 2002).

Or, l'accumulation et l'esterification au niveau des parois des cellules végétales de certains composés fluorigènes, tel l'acide férulique, en causeront la rigidification. Cette rigidification s'opposera à la croissance des cellules, laquelle mènera à une cessation de l'expansion foliaire (Kamisaka et al., 1990; Groeneveld et Bergkotte, 1996). En ce sens, en plus de constituer une réponse précoce à certains stress, l'émission de fluorescence bleu-vert induite par UV pourrait également s'avérer une sonde de la capacité de croissance d'une plante et de son inhibition suivant son exposition à ces stress (Mercure et al., 2004).

Ce survol des principaux usages rapportés de la fluorodétection s'achevant, nous présenterons un bref aperçu, à travers une littérature naissante, de l'interprétation théorique des changements de fluorescence. Ce thème sera repris et traité plus en profondeur au Chapitre V.

### 2.2.2.2 Interprétation théorique des changements de fluorescence

Depuis les premières mentions faisant état du potentiel d'utilisation des fluorescences induites par UV comme outil de détection des stress chez les plantes (Stober et Lichtenthaler, 1993), des changements dans les émissions de fluorescence de végétaux soumis à de nombreuses conditions adverses ont été rapportés sur une base régulière (Cerovic et al., 1999). Ainsi, par exemple, tel que déterminé empiriquement et de façon répétée, il est désormais reconnu que la carence en azote provoquera généralement une baisse de l'émission de fluorescence chlorophyllienne induite par UV (Hák et al., 1993), une hausse de l'émission de fluorescence bleu-vert induite par UV (Mercure et al., 2004) et une diminution de la transmittance de l'épiderme aux rayons UV (Samson et al., 2000). De même, l'exposition de plantes à d'autres facteurs de stress, de fortes irradiances par exemple, mènera au développement de symptômes similaires (Buschmann et Lichtenthaler, 1998). *A contrario*, l'exposition aux UV-B a tantôt été rapportée comme menant à une augmentation du ratio BGF/ChlF<sub>UV</sub> (Middleton et al., 1996), tantôt comme provoquant l'effet opposé (Subhash et al., 1995). Dans tous les cas, la position taxonomique de la plante à l'étude, son stade de développement et ses conditions de croissance ont montré une influence non négligeable sur les émissions de fluorescence dont ils complexifient l'interprétation (Cerovic et al., 1999). Ainsi, force est de constater qu'à l'heure actuelle, aucune assise conceptuelle susceptible de chapeauter l'ensemble de ces manifestations n'a pu être élaborée.

L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits se veut un tel cadre de référence. Alors que la section qui suit servira à en introduire les grandes lignes, nous développerons ce thème plus en profondeur au Chapitre V selon le traitement méta-analytique que nous en avons fait. Spécifions toutefois que ce concept, tel qu'appliqué à la fluorodétection des stress, n'est pas issu d'une revue de la littérature et qu'à ce titre, il devra être considéré avec le regard critique qui s'impose. Suite à sa présentation sommaire, pour l'illustrer, le cas particulier des carences en azote sera réévalué selon ses assises. Pour terminer, effectuant un retour vers notre objet principal d'intérêt, soit la résistance des plantes, nous évaluerons le cas des changements de fluorescence en réponse à l'induction à l'intérieur du cadre de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits.

### A. L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits

Sur la base de résultats empiriques rapportés dans la littérature et prenant appui sur les données obtenues dans notre laboratoire au cours des dernières années, il est devenu possible d'envisager un fondement plus physiologique aux changements de fluorescence observés en réponse à certains stress (données non publiées, Tétrault-Garneau, 2004). Cette interprétation fait appel à la notion de métabolisme source:puits. Ici, les activités source sont celles qui fournissent l'énergie (e.g., la photosynthèse), tandis que les activités puits sont celles qui la consomment (e.g., la croissance). En condition normale, ces activités se balancent l'une l'autre (Paul et Driscoll, 1997). L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits prédit que la déviation de cet état d'équilibre métabolique provoquera des changements physiologiques détectables par fluorescence.

En effet, si l'on pose qu'un état de stress menant à un déséquilibre source:puits aura pour conséquence une accumulation de composés phénoliques (Lambers et al., 1998), tantôt fluoresçant dans la région bleue du spectre (Morales et al., 1996; Lichtenthaler et Schweiger, 1998), tantôt absorbant dans l'UV (Burchard et al., 2000; Markstädter et al., 2001), une part importante des manifestations rapportées trouve une explication fondée et généralisable. La logique qui sous-tend ces implications tient au fait que les plantes, dans l'obligation métabolique d'utiliser l'énergie qu'elles fixent à un taux équivalent à celui auquel elles l'acquièrent, actualiseront leur production de métabolites secondaires en fonction de l'activité de leur métabolisme primaire. Ainsi, un déséquilibre entre l'énergie fournie par la photosynthèse (principale activité source) et celle consommée pour la croissance (principale activité puits), lorsque perçu par l'accumulation d'hydrates de carbone non structuraux qu'il cause (Rolland et al., 2002), sera corrigé par la redirection de cette énergie vers la formation de métabolites secondaires (Grace et Logan, 2000). Parmi ceux-ci, les composés phénoliques qui s'accumuleront alors seront détectés par les changements typiques de fluorescence qu'ils occasionnent.

Par rapport à l'approche empirique privilégiée jusqu'ici, la base conceptuelle du Déséquilibre Source:Puits a l'avantage de permettre l'élaboration d'hypothèses vérifiables par la conduite d'observations et d'expérimentations rigoureuses. Appliquée

au cas qui nous occupe, cette pratique passerait par l'élaboration de protocoles où seraient imposés à des plantes d'espèces et stades de développement variés des facteurs de stress affectant de manière disproportionnée la croissance et la photosynthèse, de manière à provoquer un tel déséquilibre source:puits. L'interprétation ultérieure des résultats obtenus serait faite à l'aide de ce cadre conceptuel. Trouver des changements de fluorescence typiques dans ces conditions confirmerait les prédictions de l'hypothèse, ne pas en observer la réfuterait. Une approche alternative permettant de réfuter l'hypothèse consisterait à imposer un stress ne provoquant pas un déséquilibre source:puits, et à mesurer les manifestations typiques prédites par l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits.

**a) Changements de fluorescence en réponse au stress : le cas de l'azote revisité**

À partir de ces assises, il est possible de procéder à une nouvelle interprétation du cas des carences azotées exposé plus haut. Ainsi, lors d'un déficit en azote, le premier processus à être inhibé est la croissance (Herms et Mattson, 1992). Puis, s'accumulent des sucres solubles (Paul et Driscoll, 1997). Finalement, des composés phénoliques sont produits (Stewart et al., 2001). En ce sens, tel que prédit par l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, la croissance de plants d'orge cultivés sous diverses concentrations d'azote s'est vue réduite avec la diminution de l'apport azoté, leur contenu foliaire en composés phénoliques a connu une hausse marquée, leur émission de fluorescence bleu-vert a similairement augmenté et leur transmittance de l'épiderme aux UV a varié dans la direction opposée (Mercure et al., 2004).

**b) Changements de fluorescence en réponse à l'induction de résistance**

En ce qui concerne le stress provoqué par l'induction de résistance, il est difficile d'émettre des hypothèses précises. En effet, les répercussions de l'induction sur le métabolisme source:puits sont peu connues. Certains auteurs rapportent des hausses de photosynthèse (Zhou et al., 1999; Fariduddin et al., 2003), d'autres en ont observé des baisses (Janda et al., 1999; Uzunova et Popova, 2000; Fariduddin et al., 2003) et d'autres encore ont vu ce paramètre inchangé (Gutierrez et al., 1998). De la même manière, la croissance, lorsque mesurée, n'a pas montré de tendance claire vers une augmentation ou une diminution, celle-ci semblant varier selon les conditions de culture (naturelles,

agronomiques, contrôlées), les modes d'élicitation (biotique, chimique) et les paramètres mesurés (rendement, surface foliaire, poids) (Strauss et al., 2002).

Ainsi, bien que l'on sache que l'élicitation de réponses défensives provoque généralement l'accumulation de composés phénoliques (Carver et al., 1998; Gatehouse, 2002), le lien que pourrait avoir cette accumulation avec un déséquilibre source:puits n'a pas été établi. Alternativement, cette production massive et précoce pourrait relever d'un mécanisme actif de redirection des photoassimilats, processus par lequel la priorité serait accordée à la mise en place de défenses plutôt qu'à la croissance normale (hypothèse de la Défense Optimale; McKey, 1974). Dans cette optique, la croissance ne serait pas altérée avant que soient produits des composés phénoliques, mais bien, au contraire, inhibée conséquemment à cette production.

Cette brève incursion dans le domaine de l'interprétation théorique des fluorescences induites par UV par l'usage de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits se termine ici. Ce détour nous aura permis de juger de l'importance de posséder un tel cadre de référence et d'apprécier les forces et faiblesses de celui que nous proposons. La fin de cette discussion marque également le passage vers la seconde grande section de la revue de la littérature, soit celle portant sur la machinerie photosynthétique. Ainsi, suite à l'emphase d'abord placée sur la physiologie particulière des réactions défensives, puis leur fluorodétection, nous nous dirigeons maintenant vers une discussion plus fondamentale de notions inhérentes à la photosynthèse.

### **2.3 APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE**

Tel que mentionné précédemment, la photosynthèse, activité source en importance dans le métabolisme végétal, est affectée par nombre de conditions de stress et paramètres environnementaux. Pour mieux comprendre la manière dont ceux-ci ont le potentiel d'affecter ce processus fondamental, la présente section en exposera les points saillants. Ainsi, la photosynthèse, dont les événements proximal et distal consistent respectivement en la capture d'énergie lumineuse et la fabrication de sucres à partir de cette énergie, sera d'abord décortiquée en trois grandes étapes : les réactions photochimiques primaires, puis le transfert d'électrons auquel est couplée la formation

d'ATP et, finalement, les réactions biochimiques au cours desquelles le CO<sub>2</sub> atmosphérique est utilisé pour la synthèse d'hydrates de carbone. Comme chacune de ces étapes implique un nombre important de réactions partielles, seules les plus significatives seront abordées dans ce qui suit. Cette discussion est largement basée sur les ouvrages de Nobel (1999), Taiz et Zeiger (2002) et Hopkins et Huner (2004). Suite à cette présentation, les bases théoriques des approches méthodologiques employées pour en étudier les manifestations dans le cadre du présent projet seront brièvement exposées. Les résultats alors obtenus, quant à eux, seront exposés au Chapitre IV.

### 2.3.1 Photosynthèse

Le processus de la photosynthèse peut être pratiquement séparé en deux grandes phases : les phases photochimique et biochimique. Suite à une brève présentation du chloroplaste et de ses composantes, la présente section sera subdivisée en deux parties explorant chacune l'une de ces phases.

L'ensemble des événements impliqués dans la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique par le truchement de réactions photochimiques et biochimiques se déroule dans les chloroplastes, organites particuliers à la cellule végétale. Un chloroplaste est formé d'une membrane externe et d'un réseau de nombreux replis internes baignés dans un compartiment fluide, le stroma. Les thylakoïdes, qui forment le réseau membranaire interne, contiennent différents complexes protéiques arrangés en série. Quatre types de complexes existent : les photosystèmes I et II (PSI et PSII), le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* (Cyt *b<sub>6</sub>f*) et l'ATP synthase. Les PSII s'y retrouvent surtout au niveau d'empilements de thylakoïdes (les grana), tandis que les PSI et ATP synthase sont localisés au niveau de thylakoïdes non empilés (ou stromaux). Les pigments photosynthétiques qui permettent la capture de l'énergie lumineuse, pour leur part, se trouvent associés aux photosystèmes sous la forme de complexes liés aux lipides des membranes : les complexes d'absorption de la lumière (LHCPI et LHCPII). Entre ces composantes fixes, des transporteurs mobiles, les plastoquinones (PQ), et des protéines solubles, les plastocyanines (PC) et ferredoxines, font le relais.

L'ensemble des réactions se déroulant dans les thylakoïdes et impliquant ces différentes composantes font l'objet de la sous-section 2.3.1.1 portant sur les réactions

photochimiques et le transport d'électrons. Les réactions biochimiques (Cycle de Calvin), qui sont quant à elles catalysées par des enzymes solubles se trouvant dans le stroma, seront exposées dans la sous-section 2.3.1.2.

### 2.3.1.1 Les réactions photochimiques et le transport d'électrons

#### A. De l'eau au NADPH : génération du pouvoir réducteur

Dans les thylakoïdes, se produit la transformation d'un flux de photons en un flux d'électrons, où la lumière agit en tant que source d'énergie ; l'eau y tient le rôle de donneur primaire d'électrons et le  $\text{NADP}^+$  celui d'accepteur final. Cette transformation d'énergie et sa transduction s'effectuent sous la forme de deux réactions lumineuses et du transport d'électrons qui y est associé. En bref, l'énergie lumineuse est d'abord absorbée par les complexes d'absorption de la lumière (LHCPs), puis transférée *via* des « excitons » aux centres réactionnels des photosystèmes II et I (P680 et P700, respectivement), des chlorophylles spéciales. L'excitation des centres réactionnel P680 et P700 induit un transport d'électrons.

En effet, des suites de ces événements photochimiques primaires, des molécules réduites et oxydées s'accumuleront. Elles constitueront la force motrice du transport photosynthétique des électrons (Genty et Harbison, 1996). Ce transport, à partir des électrons arrachés à l'eau par le P680 excité, se décline comme suit. Chaque électron sera d'abord transféré à une phéophytine (Phéo), puis à une PQ qui, lorsque oxydée, se trouve liée au site  $\text{Q}_B$ . La réduction complète de la PQ suite à son acceptation de deux électrons ( $\text{PQH}_2$ ), laquelle est couplée à la prise de deux protons du stroma, la délogera de son site de liaison. Elle diffusera alors à travers la membrane thylakoïde pour se lier au Cyt  $b_6f$ , auquel elle transférera ses deux électrons. Parallèlement, la  $\text{PQH}_2$  libérera les deux protons  $\text{H}^+$  dans le lumen, ce qui contribuera, au même titre que la photolyse de l'eau, à l'acidification du lumen et à la formation d'un gradient de pH de part et d'autre de la membrane. Par la suite, la PQ se dissociera de son site de liaison sur le Cyt  $b_6f$ , diffusera à travers la membrane, et se liera de nouveau au site  $\text{Q}_B$ . Le Cyt  $b_6f$  réduira ensuite une PC, qui diffusera jusqu'au PSI qu'elle réduira à son tour. L'absorption d'un photon par le P700 lui permettra ensuite de passer à un niveau d'énergie suffisant pour transférer l'électron, *via* une série de transporteurs, à une ferredoxine liée à la

membrane, laquelle donnera cet électron au  $\text{NADP}^+$  via une réaction enzymatique. Le NADPH formé sera utilisé comme équivalent réducteur lors de la production d'hydrates de carbone dans le Cycle de Calvin.

#### B. Photophosphorylation : production chimiosmotique d'ATP

La photolyse de l'eau, la réduction des PQ, le Q-cycle et le transport cyclique d'électrons autour du PSI prenant place dans la chaîne linéaire de transport d'électrons présentée plus haut impliquent la formation d'un important potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane thylakoïde. La formation de ce gradient électrochimique, couplée à l'efflux d'ions  $\text{Mg}^{++}$  balançant l'entrée de protons  $\text{H}^+$ , réglera de nombreuses étapes de la photosynthèse (e.g., modulation de transport d'électrons, activation de processus de dissipation non photochimique de l'énergie, régulation de l'activité d'enzymes stromales) et sera à l'origine de la formation d'ATP dans le chloroplaste.

Cette production photosynthétique d'ATP, ou photophosphorylation (ainsi nommée pour la distinguer de la phosphorylation oxydative mitochondriale), s'effectue par l'entremise de l'ATP synthase. Ce facteur de couplage fonctionne en utilisant l'énergie libérée lors du transport d'électrons et conservée sous forme d'un gradient de protons transmembranaire pour produire de l'ATP, une énergie chimique stable. Plus particulièrement, cette transduction d'énergie implique que l'ATP synthase, complexe auquel sont liés de l'ADP et du phosphate ( $\text{P}_i$ ), a la capacité d'harnacher le potentiel électrochimique créé pour en utiliser l'énergie libre dans la synthèse d'ATP, un moyen d'emmagasiner cette énergie sous forme de liaisons chimiques.

*En résumé, les électrons se rendent de l'eau au  $\text{NADP}^+$  en utilisant la lumière comme source d'énergie. Pour ce faire, les rôles respectifs des PSI et PSII sont : de fournir du pouvoir réducteur, sous la forme de NADPH, et de scinder l'eau (dont l' $\text{O}_2$  représente un sous-produit) pour acheminer ses électrons au PSI via la chaîne de transport d'électrons. Ce transfert d'électrons est couplé au pompage de protons du stroma vers le lumen, engendrant ainsi un important potentiel électrochimique qui sera harnaché par l'ATP synthase et utilisé pour la synthèse chimiosmotique d'ATP*



*(photophosphorylation). Ces pouvoir réducteur et énergie chimique nouvellement convertis sous forme de NADPH et d'ATP seront ensuite utilisés pour l'incorporation du CO<sub>2</sub> atmosphérique dans les hydrates de carbone produits par la plante, à raison de trois ATP et deux NADPH par molécule de CO<sub>2</sub> fixée chez les plantes C<sub>3</sub> (Nobel, 1999). Ces étapes d'assimilation du carbone constitueront la suite de notre discussion.*

### 2.3.1.2 Les réactions biochimiques d'assimilation du carbone

#### A. Le CO<sub>2</sub> : de l'atmosphère au chloroplaste

Tandis que l'énergie nécessaire pour l'assimilation photosynthétique du carbone est issue des réactions photochimiques présentées plus haut, le carbone utilisé par la plante pour la production de sucres *via* le Cycle de Calvin provient du CO<sub>2</sub> atmosphérique. La concentration ambiante en CO<sub>2</sub> (C<sub>a</sub>) s'élève actuellement à environ 350 ppm. En conditions normales, cette concentration n'est pas saturante pour la photosynthèse chez la majorité des plantes C<sub>3</sub>.

La pénétration du CO<sub>2</sub> dans la feuille se fait par diffusion à travers les stomates, pores dont l'ouverture est strictement régulée par la plante. Cette régulation permet un ajustement fin du métabolisme photosynthétique aux conditions prévalant à un moment donné et constitue une importante limitation potentielle au taux d'échange gazeux. Par exemple, certains stress tels que le manque d'eau (Tezara et al., 2002) et l'invasion pathogénique (Huang, 2001) ont pour effet de nuire à la diffusion du CO<sub>2</sub>, causant une augmentation de la résistance stomatique et menant à un déclin de l'assimilation nette du carbone par la plante.

Suite à sa pénétration dans la feuille, le CO<sub>2</sub> diffusera dans les espaces intercellulaires environnant les cellules du mésophylle. La concentration interne en CO<sub>2</sub> alors atteinte (C<sub>i</sub>) sera directement tributaire de la conductance stomatique. À cette étape, le CO<sub>2</sub>, toujours en phase gazeuse, atteindra des concentrations variant entre 4 et 8 μM (Eichelmann et Laisk, 1999). C'est lorsqu'il rejoindra la fine couche d'eau entourant les cellules du mésophylle qu'il passera dans la phase aqueuse. Des parois cellulaires où il sera alors dissous, le CO<sub>2</sub> diffusera à l'intérieur des cellules, puis jusqu'aux

chloroplastes, où il sera fixé dans le stroma sous forme de sucres par le biais du Cycle de Calvin. La concentration de  $\text{CO}_2$  normalement observée au site de carboxylation ( $C_c$ ) sera environ 20 % à 30 % plus faible que la  $C_i$  (Eichelmann et Laisk, 1999).

### B. Du $\text{CO}_2$ aux sucres

La photosynthèse représente le seul processus d'importance biologique à même de convertir le carbone inorganique contenu dans les molécules de  $\text{CO}_2$  atmosphérique en carbone organique assimilable sous forme de sucres. Cette fixation du carbone se fait à travers le Cycle de Calvin, une série de réactions biochimiques. Ce cycle peut être séparé en trois grandes étapes : (1) carboxylation, (2) réduction et (3) régénération.

Lors de la carboxylation, le  $\text{CO}_2$  entre dans le Cycle de Calvin en réagissant avec un accepteur, le ribulose-1,5-biphosphate (RuBP), auquel est incorporée une molécule de dioxyde de carbone. Cette réaction, catalysée par l'enzyme ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), résulte en la formation de deux molécules de 3-phosphoglycérate. Celles-ci seront d'abord phosphorylées (i.e. ajout d'un phosphate inorganique), une réaction faisant appel à l'ATP généré par photophosphorylation, puis réduites, par l'utilisation d'équivalents réducteurs NADPH produits au terme de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons. C'est l'étape de réduction qui fournit, à partir de trois molécules de  $\text{CO}_2$ , deux trioses phosphate issus d'un glyceraldehyde-3-phosphate. Pour assurer la continuité du cycle, les cinq sixième des trioses phosphate ainsi produits seront acheminés vers la régénération de l'important intermédiaire RuBP. Le sixième sera dédié à la synthèse de saccharose ou d'amidon, des sucres qui seront respectivement transloqués ou mis en réserve.

On reconnaît ainsi que trois processus sont susceptibles de limiter l'assimilation photosynthétique du carbone : la capacité de carboxylation de la Rubisco (déterminée par son degré d'activation, sa concentration et le ratio  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ), la régénération du RuBP (tributaire de la disponibilité en ATP et en NADPH fournis par le transport d'électrons dans les thylakoïdes) et la régénération du phosphate inorganique (qui n'est problématique que lors de conditions spécifiques menant à une production excessive de trioses phosphate). L'efficacité avec laquelle la Rubisco catalyse la carboxylation du RuBP constitue la plus importante de ces limitations intrinsèques à l'assimilation

photosynthétique du carbone. Cette efficacité de carboxylation (EC) est donc un élément majeur déterminant le taux net de photosynthèse. Dans les faits, tous les facteurs qui influencent le taux photosynthétique le font ultimement en agissant sur l'activité de la Rubisco ou la concentration de ses substrats, soit le  $\text{CO}_2$  et le RuBP.

La Rubisco existe sous trois formes : deux formes inactives, dont la seconde a la particularité d'avoir subi une carbamylation (addition d'une molécule de  $\text{CO}_2$  qui ne servira pas de substrat), et la forme active, qui est à la fois carbamylée et liée à du  $\text{Mg}^{++}$ . L'étape de la carbamylation, prérequis à la formation des sites actifs où se liera subséquemment le  $\text{Mg}^{++}$ , est fortement favorisée à pH élevé (environ 8). Cependant, avant d'atteindre cette forme active, une autre enzyme devra libérer le RuBP déjà lié à la Rubisco. En effet, la Rubisco inactive initiale a une affinité beaucoup plus grande pour le RuBP que n'en aura sa forme activée. Le RuBP s'avère donc un puissant inhibiteur de la Rubisco. Ainsi, avant de connaître les étapes de carbamylation et de liaison du  $\text{Mg}^{++}$ , ce substrat devra être dissocié. Cette action, qui nécessite l'hydrolyse d'ATP, est catalysée par la Rubisco activase, une enzyme indirectement activée par la lumière.

En ce sens, on reconnaît qu'ultimement, l'activité de la Rubisco est régulée par la lumière. En fait, toutes les enzymes impliquées dans le Cycle de Calvin sont indirectement activées par la lumière (*via* les changements du pH stromal, la génération de pouvoir réducteur et l'efflux d'ions  $\text{Mg}^{++}$  du lumen vers le stroma). C'est qu'à l'obscurité, l'énergie utilisée par la plante est dérivée de la respiration, processus se déroulant au niveau des mitochondries et par lequel les sucres fixés par la voie photosynthétique sont hydrolysés pour fournir de l'énergie. Cette réaction libère du  $\text{CO}_2$ . Ainsi, lorsque le transport photosynthétique d'électrons n'opère pas, ne fournissant alors ni énergie ni pouvoir réducteur, les enzymes impliquées dans la formation de sucres ne fonctionnent pas. De cette manière, la futile conversion cyclique du  $\text{CO}_2$  (relâché par la glycolyse mitochondriale) en sucres (par le Cycle de Calvin) est évitée.

*En résumé, l'assimilation photosynthétique du carbone s'effectue par le biais du Cycle de Calvin en trois étapes successives menant à la réduction du  $\text{CO}_2$ , source inorganique de carbone, en sucres réduits. Ces étapes, la carboxylation, la réduction et la régénération, se déroulent dans le stroma*

*des chloroplastes. Elles utilisent l'énergie réductrice (NADPH) et chimique (ATP) fournie par les réactions photochimiques et sont catalysées par des enzymes dont l'activation dépend de la lumière. D'une importance particulière, l'enzyme Rubisco représente la principale limitation à la fixation du carbone. La réaction catalytique qui en dépend requiert (1) un pH stromal élevé, (2) du  $Mg^{++}$  en concentration suffisante dans le stroma et (3) l'action de la Rubisco activase. Toutes ces conditions sont liées à des événements se produisant lors du transport photosynthétique des électrons.*

Ce survol général des phases photochimique et biochimique de la photosynthèse, de leur localisation au sein de la cellule végétale, des étapes limitant leurs taux de réactions, clôt la revue que nous nous proposons d'en faire. Dans la section qui suit, nous présenterons les approches expérimentales utilisées pour en décortiquer les principaux événements. Ces méthodes, d'usage courant lors de l'étude de stress divers, profitent de solides bases expérimentales et théoriques. Elles ont ici permis de délimiter, puis de disséquer les effets de l'induction (dont les résultats seront présentés au Chapitre IV).

### **2.3.2 Outils de mesure dans l'étude de la photosynthèse**

La physiologie végétale est une science à vocation expérimentale. Aussi, jouit-elle d'une longue tradition d'expériences décisives qui nous lègue aujourd'hui une panoplie de méthodes appropriées à l'investigation d'un grand nombre de réactions liées à cet aspect de la biologie des plantes. Entre autres, l'étude de la photosynthèse a mené à l'élaboration d'approches empiriques maintenant éprouvées qui constituent désormais l'arsenal classique des chercheurs dans ce domaine. Certaines de ces techniques, qui ont été utilisées lors de la conduite du présent projet, seront brièvement expliquées dans la section qui suit. Cet exposé permettra de poser un regard éclairé sur les résultats obtenus au Chapitre IV en y faisant appel.

#### *2.3.2.1 Mesures d'échanges gazeux*

Le taux net d'assimilation du  $CO_2$  ( $A$ ) représente le taux photosynthétique net, tel qu'exprimé comme la balance entre la consommation de  $CO_2$  par le processus de la

photosynthèse et la production de  $\text{CO}_2$  par les processus de la respiration et de la photorespiration (Nobel, 1999). En mesurant le taux net d'assimilation du  $\text{CO}_2$  d'une feuille, on obtient une mesure de son taux photosynthétique à un instant donné, information physiologique d'importance. Pour y arriver, l'analyse des échanges gazeux est une méthode très sensible désormais répandue, rapide et d'usage facile (Long et al., 1996; Long et Bernacchi, 2003).

Cette technique utilise un appareillage constitué d'une chambre de mesure dont la composition en gaz et en vapeur d'eau est contrôlée et mesurée avec précision grâce à un système infrarouge (IRGA). Ce système est composé d'une source infra-rouge (une photodiode), d'une cellule gazeuse (un tube de métal dont les extrémités sont faites d'un matériel transmettant l'infra-rouge), d'un filtre optique et d'un détecteur. Le principe de la méthode repose sur l'analyse du spectre d'absorption attribuable à un gaz donné. En effet, les molécules gazeuses hétéro-atomiques, tel le  $\text{CO}_2$  et l' $\text{H}_2\text{O}$ , absorbent les radiations à des longueurs d'onde spécifiques dans l'infra-rouge. Ainsi, la présence de  $\text{CO}_2$  et d' $\text{H}_2\text{O}$  dans la cellule gazeuse causera une diminution de la quantité de radiations atteignant le détecteur, un signal qui sera converti en unités de concentration par le logiciel présent dans l'appareil. Connaissant le flux continu de gaz qui traverse la cellule, il devient ainsi possible de déterminer avec précision les changements dans la concentration gazeuse se développant dans le temps (Long et al., 1996).

En plaçant une feuille intacte dans un système d'échanges gazeux équipé d'un IRGA, par la mesure du différentiel entre la composition en  $\text{CO}_2$  et en vapeur d'eau de l'air qui pénètre dans la chambre de mesure et de celle qui en sort, on connaîtra ainsi le taux net auquel l'échantillon assimile le carbone ainsi que des informations quant à son activité de transpiration. À partir de ces mesures, von Caemmerer et Farquhar (1981) ont établi une série de formules permettant de déterminer des paramètres physiologiques d'importance, telle l'assimilation photosynthétique du  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) d'une feuille, sa transpiration ( $E$ ), ses conductance ( $g_s$ ) et résistance ( $r$ ) stomatiques ainsi que sa concentration molaire intercellulaire en  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) (Long et al., 1996). Cette technique de mesures présente l'avantage considérable d'acquérir des données en temps réel et de manière non destructive. Elle a cependant le désavantage de fournir des taux de transpiration invalides par rapport à ceux réellement expérimentés par du matériel

végétal exposé à l'air libre et est sujette à certains biais associés à l'appareillage utilisé (e.g., fuites des gaz, effets d'ombre, respiration des tissus entourant la zone mesurée) (Long et Bernacchi, 2003).

Par ailleurs, l'interprétation de la réponse du taux net d'assimilation du  $\text{CO}_2$  d'une feuille à sa concentration intercellulaire en  $\text{CO}_2$  permet de faire des inférences détaillées quant aux limitations biochimiques auxquelles elle est contrainte. Ainsi, de nombreuses informations concernant l'activité photosynthétique d'un échantillon peuvent être obtenues à partir d'une courbe  $A/C_i$ , représentation graphique de cette relation (Figure 2-3). En analysant une telle courbe, il est possible d'obtenir une vue d'ensemble de la capacité photosynthétique d'une plante, en plus d'en évaluer plus spécifiquement l'efficacité de carboxylation *in vivo*, la capacité de régénération du RuBP et le point de compensation en  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma$ ).

Plus précisément, on note, dans une courbe  $A/C_i$  typique, que l'assimilation est d'abord proportionnelle à la concentration intercellulaire en  $\text{CO}_2$  dans toute sa portion inférieure. La pente de cette droite, définie comme l'augmentation du taux photosynthétique par unité de  $\text{CO}_2$ , indique l'efficacité de carboxylation apparente de la Rubisco. Cette pente initiale reflète donc approximativement l'activité de la Rubisco, de telle manière que son déclin indique une baisse de l'activité carboxylase de cette enzyme. Suite à cette augmentation quasi linéaire, la pente diminue de façon marquée et la courbe atteint un plateau à des valeurs de  $C_i$  suffisantes pour saturer la photosynthèse. En effet, aux faibles concentrations initiales, le taux de photosynthèse accompli par la feuille n'était limité que par la disponibilité du  $\text{CO}_2$  en tant que substrat et l'efficacité avec laquelle était carboxylé le RuBP. À des concentrations supérieures, l'augmentation de l'assimilation est beaucoup moins abrupte, car avec une augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$ , la compétition entre le  $\text{CO}_2$  et l' $\text{O}_2$  pour le site actif de la Rubisco est de plus en plus faible, la réaction d'oxygénation étant graduellement réduite au profit de la réaction de carboxylation. De cette manière, à la  $C_i$  au niveau de laquelle la courbe atteint un plateau, la carboxylation étant maximisée, la photosynthèse est alors saturée en  $\text{CO}_2$ . Elle est ici plutôt limitée par la disponibilité de la lumière pour les réactions lumineuses ou par les taux de régénération des enzymes et intermédiaires photosynthétiques. Ainsi, sous des conditions lumineuses saturantes, à ce point,

l'assimilation maximale est atteinte. Cette valeur,  $A_{\max}$ , est donc déterminée par la capacité de l'appareil photosynthétique à régénérer le RuBP, laquelle est connectée avec l'activité de transport d'électrons.

Finalement, à la concentration externe en  $\text{CO}_2$  ( $C_e$ ) au niveau de laquelle l'assimilation nette est nulle (échange net égal à zéro), on observe le point de compensation en  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma$ ). Ce point, qui situe la concentration où le processus de la photosynthèse est exactement balancé par la photorespiration et la respiration, est un indicateur de la capacité photosynthétique d'une plante à absorber et à assimiler efficacement le  $\text{CO}_2$ . Plus il est faible, meilleure est la prise en charge du carbone. Par exemple, l'efficacité de photoassimilation des plantes  $\text{C}_4$  étant élevée, elles auront généralement un  $\Gamma$  très faible (en-deçà de  $10 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ). À l'opposé, les valeurs trouvées chez les plantes  $\text{C}_3$  pourront facilement excéder  $50 \mu\text{mol mol}^{-1}$ .

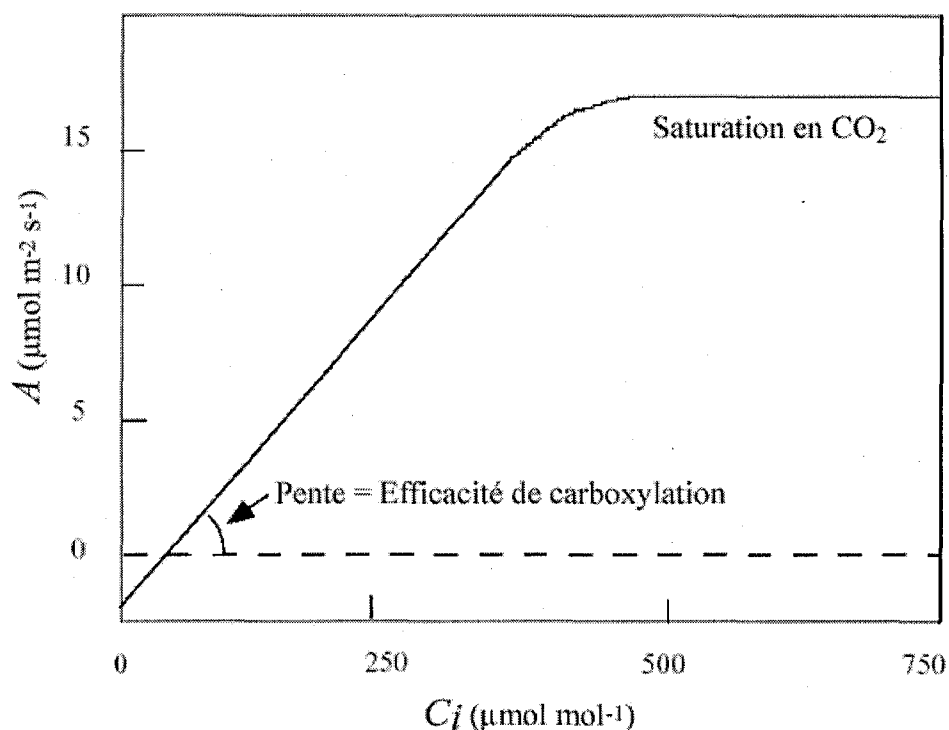


FIGURE 2-3. Courbe  $A/C_i$  idéalisée. À de faibles concentrations de  $\text{CO}_2$ , la photosynthèse est limitée par la capacité de carboxylation de la Rubisco, alors que sous conditions de concentrations en  $\text{CO}_2$  intermédiaires à fortes, la régénération des intermédiaires du Cycle de Calvin limite le taux photosynthétique. La photosynthèse, sous fort  $\text{CO}_2$ , est alors limitée soit par le transport d'électrons, soit par la régénération du  $\text{P}_i$ , mais non plus par la Rubisco comme tel était le cas sous faible  $\text{CO}_2$ .

### 2.3.2.2 Mesure du taux de transport photosynthétique d'électrons

Une méthode communément employée lors d'études visant à quantifier le taux de transport d'électrons d'un échantillon consiste à utiliser un système permettant d'en mesurer le dégagement ou la consommation d'oxygène (Metzner, 1978). En pratique, on se sert d'un appareil constitué d'une électrode à oxygène reliée à un module mesurant le signal émis. L'électrode de type Clark, modèle fréquemment rencontré, est une forme spécialisée de cellule électrochimique constituée de deux électrodes immergées dans une solution d'électrolytes. En appliquant un voltage polarisant à cette solution, les électrolytes s'ioniseront et la série de réactions électrochimiques qui s'ensuivra initiera un flux de courant. Ces réactions consommeront de l'oxygène, de telle manière que l'ampleur du flux créé sera reliée à la concentration en oxygène du médium baignant l'électrode. Pour quantifier la concentration en oxygène de ce médium, il suffira donc d'appliquer un voltage stable et de mesurer simultanément le flux initié. Si l'on place dans le médium du matériel biologiquement actif, la mesure de sa consommation ou de son dégagement d'oxygène dans le temps constituera donc une détermination quantitative de son activité.

Cette approche permet, par exemple, de mesurer le taux de transport photosynthétique d'électrons dans des thylakoïdes isolés. Ainsi, en ajoutant à une suspension de thylakoïdes diverses combinaisons de donneurs et accepteurs d'électrons artificiels, il est possible de quantifier l'activité photosynthétique de la chaîne de transport entière, puis de cibler les réactions partielles impliquées dans le fonctionnement des photosystèmes I et II. En comparant les taux mesurés chez des thylakoïdes issus de plantes soumises à diverses conditions expérimentales, l'intégrité de la chaîne de transport et de ses réactions partielles suite à l'application de ces traitements pourra être évaluée.

Pour obtenir une mesure du système de transport entier, il s'agira, par exemple, d'éclairer un échantillon mis en présence de méthyl viologène (MV), un accepteur d'électrons dont l'affinité le situe en aval du PSI. Dans ce système, l'eau constitue le donneur d'électrons et le taux de consommation mesuré, de l'eau au MV en passant par les PSII et PSI, est issu de la photoréduction du MV. Cette photoréduction implique que,



pour chaque molécule d'O<sub>2</sub> produite par la photolyse de l'eau (i.e.  $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4[\text{e}^-] + \text{O}_2 + 4\text{H}^+$ ), deux molécules d'O<sub>2</sub> seront consommées pour la réduction du MV par la réaction de Mehler (i.e.  $4[\text{e}^-] + 4\text{O}_2 \rightarrow 4\text{O}_2^-$ ;  $4\text{O}_2^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Asada, 1999). Cette consommation d'O<sub>2</sub> étant proportionnelle au taux de transport d'électrons, elle représente ici l'activité des deux photosystèmes. Toute inhibition de la réduction du MV, mesurée comme une baisse dans la consommation d'oxygène, serait le reflet d'un effet inhibiteur d'une substance ou condition donnée sur la chaîne de transport d'électrons et ce, n'importe où entre le système d'évolution d'oxygène et le côté accepteur du PSI. En ajoutant à ce système un découpleur telle la nigéricine, on dissipera le gradient de protons transmembranaire, de manière à lever la restriction au transport d'électrons imposée par l'acidification du lumen. Dans de telles conditions, on obtiendra une mesure de l'unique activité de la chaîne de transport d'électrons.

### 2.3.2.3 *Mesure du gradient de pH*

Il s'avère techniquement difficile de déterminer, en valeur absolue, le pH du compartiment intérieur d'une vésicule délimitée par une membrane. Ainsi, pour mesurer le gradient de pH trouvé de part et d'autre d'une membrane, des méthodes indirectes ont été développées. L'une de ces approches pratiques mise sur la propriété qu'a le 9-aminoacridine (9AA), une molécule fluorescente, d'être liposoluble et de diffuser librement à travers les membranes sous sa forme non chargée, puis d'être retenu à l'intérieur des vésicules et d'y former des dimères non fluorescents dans sa forme protonée.

Tel qu'exposé plus haut, la membrane thylakoïde est caractérisée par un important gradient de pH transmembranaire induit par le transport photosynthétique d'électrons, lequel est effectivement couplé à l'entrée d'ions H<sup>+</sup>. Ainsi, lors de mesures du gradient de pH transmembranaire de suspensions de thylakoïdes, la protonation du groupe aminé des molécules de 9AA telle qu'opérée lorsque celles-ci pénétreront dans le milieu acidifié que représente le lumen suite à son illumination conduira à leur séquestration à l'intérieur de la vésicule. L'accumulation dans le lumen de molécules chargées, puis la formation subséquente de dimères résulteront en une réduction de la fluorescence émise. En mesurant, à l'aide d'un fluorimètre, l'atténuation de la fluorescence observée suivant

l'illumination de l'échantillon, on obtiendra une mesure de l'amplitude du gradient de pH. Cette valeur, le *quenching* de la fluorescence du 9AA ( $q9AA$ ), se chiffrera simplement comme  $q9AA = (F_{\text{obscurité}} - F_{\text{lumière}}) / F_{\text{obscurité}}$ . Plus le *quenching* sera élevé, plus le gradient de pH sera important.

La présentation de cette dernière approche expérimentale termine la section portant sur la machinerie photosynthétique. Elle marque également la fin de la revue de la littérature. Les notions de bases inhérentes à l'induction de réactions de défense (des effets physiologiques distincts de divers agents à la fluorodétection) et au processus de la photosynthèse étant maintenant acquises, il est désormais possible d'aborder les études réalisées à partir de ces assises. Ainsi, dans les trois Chapitres qui suivent, les travaux de recherche expérimentaux et théorique effectués seront présentés. Suivra une conclusion qui en rappellera les faits saillants en regard des objectifs posés en début de parcours, puis une interprétation globale ouvrant sur des perspectives plus larges.

## **CHAPITRE III**

### **DETECTION DES ETATS DE RESISTANCE PAR L'ANALYSE DES EMISSIONS DE FLUORESCENCE**

#### **3.1 RESUME**

La détection des stress chez les végétaux par l'analyse de leurs émissions de fluorescence est appelée à occuper une place importante dans les programmes de gestion des cultures. Or, à l'heure actuelle, bien que l'on sache que la fluorescence induite par UV est affectée par diverses conditions environnementales, on ignore encore l'impact que pourraient avoir sur ces émissions les changements physiologiques encourus par les plantes suite à des interactions biotiques. À la base de ce questionnement, réside notre compréhension encore partielle des bases physiologiques sous-tendant les modulations de fluorescence observées en conditions de stress. Pour y répondre, la présente étude a comparé les émissions de fluorescence chlorophyllienne (induites par lumière bleue et rayonnement UV) et bleu-vert (induite par UV) de plants de tournesol soumis à trois types d'induction de résistance (acide jasmonique, acide salicylique, Actigard®). Parallèlement à ces mesures, des analyses des contenus foliaires en pigments et composés phénoliques solubles ont permis de statuer sur les effets des traitements sur ces paramètres physiologiques d'intérêt. Il est apparu que la fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue et les contenus foliaires en pigments et composés phénoliques étaient affectés par les traitements de manière irrégulière (lors de l'une ou l'autre des quatre répétitions de l'expérience). Les fluorescences induites par UV n'étaient pas modifiées par les traitements. Ces résultats, lorsque interprétés selon les assises de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, entérinent la proposition selon laquelle les changements détectés par fluorescence induite par UV proviennent d'altérations disproportionnées des activités de production et de consommation d'énergie.

#### **3.2 INTRODUCTION**

Les émissions de fluorescence des plantes sont modifiées par divers facteurs environnementaux. Ces stress incluent l'exposition à de fortes irradiances (Stober et

Lichtenthaler, 1993; Schweiger et al., 1996; Bilger et al., 1997; Lichtenthaler et Miede, 1997) et aux rayons UV (Barnes et al., 2000), le stress hydrique (Schweiger et al., 1996), des concentrations toxiques de contaminants et la disponibilité d'éléments nutritifs (Samson et al., 2000; Mercure et al., 2004). En ce sens, le potentiel d'application des fluorescences induites par UV en tant qu'outils pratiques de détermination du statut physiologique des plantes dans leur environnement abiotique a stimulé la recherche au cours des dernières années (Lichtenthaler et Miede, 1997; Cerovic et al., 1999; Buschmann et al., 2000). Plus particulièrement, la possibilité d'établir les besoins nutritifs des plantes à partir de leurs émissions de fluorescence, en raison de son intérêt économique et écologique, est ainsi devenue l'objet d'études de plusieurs groupes de chercheurs (Heisel et al., 1996; Corp et al., 1997; Langsdorf et al., 2000; Samson et al., 2000; Apostol et al., 2003). Des avancées prometteuses ont été effectuées. Il a été montré que certains changements métaboliques survenant lorsque des végétaux d'espèces variées étaient soumis à des carences minérales modifiaient leurs émissions de fluorescence (e.g., Hák et al., 1993). Cependant, à ce jour, les altérations physiologiques à la base de ces « signatures spectrales » demeurent peu définies. L'accumulation foliaire de composés phénoliques (Chishaki et Horiguchi, 1997; Stewart et al., 2001), les altérations de la transmittance de l'épiderme aux rayons UV qu'ils causent (Bilger et al., 1997; Barnes et al., 2000), la diminution des contenus en chlorophylles (Buschmann et Lichtenthaler, 1998) et des modulations de la fonction photosynthétique (Lichtenthaler et Rinderle, 1988) semblent toutes jouer un rôle dans ces changements.

Or, les carences minérales ne sont pas les seuls stress à même de provoquer de tels changements métaboliques (Hendry et Price, 1993; Lichtenthaler et Miede, 1997). Entre autres, l'attaque des plantes par des herbivores et des pathogènes induit souvent le développement de phénotypes de résistance distincts caractérisés par diverses altérations métaboliques ayant certains points communs avec la réponse aux stress nutritifs. D'une part, ces réactions défensives impliquent toutes deux la production et l'accumulation d'un vaste éventail de composés à caractère défensif. Parmi ceux-ci, les composés phénoliques forment l'un des importants aspects de la défense des plantes contre l'attaque biotique (Carver et al., 1998; Gatehouse, 2002). D'autre part, ces assauts causeraient également des pertes de chlorophylle (Huang, 2001).

D'un point de vue pratique, le fait que les plantes cultivées soient souvent la cible d'insectes et pathogènes place donc la détection de ces stress biotiques dans une position intéressante. En effet, l'évaluation de possibles répercussions de l'induction de réponses défensives sur les émissions de fluorescence présente une double problématique. En soi, reconnaissant qu'il existe à l'heure actuelle peu d'approches pratiques, simples et rapides de détection de ces stress (Ning et al., 1995; Buschmann et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2000), cette avenue pourrait mener au développement d'outils prometteurs. Parce qu'elle permettrait d'identifier des changements caractéristiques induits en réponse aux stress biotiques, elle pourrait effectivement devenir une sonde intrinsèque de l'état physiologique des végétaux soumis aux stress biotiques. *A contrario*, une telle répercussion du phénotype de résistance sur les émissions de fluorescence pourrait également être de mauvaise augure. En effet, dans la perspective des usages déjà proposés à la fluorodétection, ces manifestations pourraient constituer un facteur confondant dans la détection d'autres stress telles les carences minérales (Cerovic et al., 1999).

En ce sens, il devient d'un intérêt particulier de statuer sur la présence ou non d'effets de l'attaque biotique sur les émissions de fluorescence des plantes. Bien plus, documenter les réponses physiologiques élicitées par ces stress biotiques est requis pour élargir notre perspective concernant l'usage des fluorescences induites par UV. Nommément, peut-on spécifier sous quelles circonstances les changements métaboliques induits en réponse à un stress donné sont reflétés par des altérations de fluorescence ?

La présente étude a été menée pour clarifier ces interrogations. D'abord, il s'agissait d'identifier des changements caractéristiques dans les émissions de fluorescence de plantes soumises à des attaques biotiques simulées. Puis, que de telles modulations aient été observées ou non, il fallait en comprendre les fondements physiologiques. Pour ce faire, les propriétés inductrices de résistance connues des acides jasmonique, salicylique et benzothiadiazole methyl ester ont été mises à profit. Ces produits ont été choisis pour leurs habiletés respectives à mimer l'attaque d'herbivores (Creelman et Mullet, 1997), simuler l'infection pathogénique (Malamy et al., 1990) et induire chimiquement la résistance à certaines maladies (Gorlach et al., 1996). Les résultats obtenus sont discutés dans l'optique des bases conceptuelles invoquées pour

expliquer la défense des plantes (Stamp, 2003) et la détection des stress par fluorescences induites par UV.

### 3.3 MATERIEL ET METHODE

#### 3.3.1 Matériel végétal et conditions de croissance

Des graines de tournesol nain (*Helianthus annuus* variété 'Sunspot', Stokes Seeds Ltd.) étaient placées entre deux épaisseurs de papier absorbant humide, puis germées à l'obscurité au laboratoire. Une semaine plus tard, des pousses ne présentant pas d'anomalies (e.g., cotylédons déformés, tige tortueuse) et de taille similaire étaient sélectionnées, puis transplantées dans des pots de 6 po contenant un mélange tourbe:perlite:vermiculite (volume 2:1:1), à raison de trois plantules par pot. À partir de ce moment et pour toute la durée de l'expérimentation, les plants étaient arrosés au besoin avec une solution de Hoagland complète dont le pH était ajusté à 6 par l'ajout de NaOH. Les plants étaient répartis sur trois tablettes (blocs) dans une chambre de croissance où prévalaient des conditions de photopériode de 16 h de lumière : 8 h d'obscurité et des températures diurne et nocturne de 23°C et 18°C, respectivement. L'éclairage y était fourni par des lampes HPS de telle façon qu'environ 350  $\mu\text{mol}$  de photon  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR atteignaient les plants à la hauteur du feuillage. Une rotation quotidienne des plants se trouvant sur une tablette donnée a permis de s'assurer de l'homogénéité des conditions environnementales expérimentées par les individus.

Une semaine après les semis, soit au moment où les cotylédons étaient pleinement développés et les premières feuilles avaient commencé à émerger, une éclaircie était effectuée afin de ne conserver qu'un seul plant par pot. Au total, entre 40 et 60 pots (10-15 plants par traitement) étaient sélectionnés. Pour chaque pot, le plant conservé était choisi de manière subjective en fonction d'abord de son absence d'anomalies, puis de critères de taille, de stade de développement et de position dans le pot. Les plants, alors présents à raison d'un par pot, étaient cultivés en chambre de croissance pendant les 17 à 19 jours suivants. L'ensemble des manipulations a été répété quatre fois.

### 3.3.2 Traitements

Des solutions-stocks des éliciteurs testés, soit l'acide jasmonique (AJ), l'acide salicylique (AS) et l'Actigard® (Acti), ont été préparées en dissolvant les produits dans du méthanol pur, puis conservées au congélateur. Tous les produits, à l'exception de l'Actigard® qui nous a été gracieusement fourni par Syngenta Crop Protection (Greensboro, NC), ont été obtenus de Sigma.

Deux jours avant la prise des mesures et le prélèvement des échantillons, l'ensemble des plants étaient traités par l'application à la surface adaxiale d'une feuille par plant (la dixième feuille, telle que déterminée en comptant la première vraie feuille à l'apex du plant comme la feuille 1) de 0,093 g ( $\pm$  0,001 g plant<sup>-1</sup>) d'une pâte de lanoline contenant (1) le volume de méthanol pur correspondant à celui utilisé pour dissoudre les produits testés (témoin), (2) 100 µg d'AJ, (3) 100 µg d'AS, ou (4) 200 µg d'Acti. Le volume de méthanol utilisé pour les témoins correspondait au volume maximal utilisé pour dissoudre les produits testés (i.e. AJ, la solution-stock la moins concentrée). La quantité d'AJ et d'AS appliquée, quant à elle, a été déterminée en considérant les concentrations de ces composés endogènes normalement observées chez les plants sains (Raskin, 1992; Creelman et Mullet, 1997), puis leur augmentation rapportées en réponse aux stress auxquels ils sont respectivement associés (Doares et al., 1995; Dempsey et al., 1999). La quantité d'Acti, finalement, a été choisie pour refléter la composition de l'Actigard®, soit 50% de benzothiadiazole (BTH), 50% d'ingrédient inactif.

Les pâtes étaient préparées moins de deux heures avant l'application, en liquéfiant de la lanoline dans un bain-marie (50°C), puis en y ajoutant une quantité connue des solutions-stocks (Baldwin et al., 1996). Elles étaient étalées à l'aide d'un applicateur à colle en une mince couche couvrant la partie apicale de la feuille sur une longueur de 3 à 4 cm.

### 3.3.3 Échantillonnage

La résistance induite ayant la particularité d'être un phénomène rapide et systémique, des échantillons ont été prélevés 48 heures après l'application des traitements au niveau des feuilles traitées et distales. L'intérêt de tous changements dans les émissions de fluorescence, dans un contexte de fluorodétection des stress, résidait

effectivement dans leur caractère précoce. À l'aide d'un perce-bouchon (diamètre d'un cm), six disques foliaires étaient alors découpés dans la feuille traitée (1), au niveau de la section de la feuille située au-dessus de la zone d'application du traitement. Pour évaluer la réponse systémique, deux disques étaient également prélevés sur la plus jeune feuille (2) se trouvant sur la même orthostichie (feuilles dont les points d'insertion sont directement alignés; Taiz et Zeiger, 2002) que la feuille traitée. Seules les mesures de fluorescence étaient effectuées à ce moment. Les six autres échantillons étaient pesés, trempés dans l'azote liquide, identifiés, puis conservés au congélateur jusqu'aux mesures ultérieures.

### 3.3.4 Mesure des contenus en pigments photosynthétiques

Les contenus foliaires en pigments (chlorophylles *a* et *b*, caroténoïdes totaux) et l'absorbance attribuable aux composés phénoliques solubles dans le méthanol ( $A_{\text{phén}}$ ) de disques foliaires provenant des feuilles traitées ont été déterminés par spectrophotométrie. L'extraction des pigments et composés phénoliques solubles était effectuée en plaçant un disque foliaire broyé dans 10 mL de méthanol pur bouillant. Après 30 minutes à 70°C, l'extrait était refroidi et filtré et son spectre d'absorbance entre 200 et 800 nm était lu. Les contenus en pigments étaient calculés grâce aux coefficients d'extinction et équations développées par Lichtenthaler (1987). Les équations utilisées pour calculer les concentrations en chlorophylle *a* ( $C_a$ ), chlorophylle *b* ( $C_b$ ) et xanthophylles et caroténoïdes ( $C_{x+c}$ ) étaient

$$C_a = 16,72A_{665} - 9,16A_{652}$$

$$C_b = 34,09A_{652} - 15,28A_{665}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1,91C_a - 104,96C_b)/221.$$

Étant donné que ces concentrations étaient en  $\mu\text{g}$  de pigments  $\text{mL}^{-1}$ , elles étaient multipliées par 10 mL (volume de l'extrait), puis divisées par 0,00098  $\text{m}^2$  (surface du disque foliaire duquel étaient extraits les pigments). Le résultat final obtenu était en mg de pigments par unité de surface foliaire ( $\text{mg m}^{-2}$ ).



### 3.3.5 Mesure des composés phénoliques solubles totaux

Pour mesurer les concentrations foliaires en composés phénoliques solubles des feuilles traitées, deux approches ont été employées. D'abord, la méthode d'absorbance a permis de doser les composés phénoliques solubles dans le méthanol ( $A_{\text{phén}}$ ). L' $A_{\text{phén}}$  était déterminée comme les absorbances à 325 nm et à 337 nm ( $A_{325}$  et  $A_{337}$ ) attribuables aux composés phénoliques telles que calculées en déconvoluant des spectres obtenus pour les extraits de pigments ceux mesurés chez des extraits purs de Chl *a* et Chl *b* en prenant compte de leurs coefficients d'extinction molaire respectifs (Ounis et al., 2001).

La seconde méthode employée était la quantification chimique de Folin-Ciocalteu. Pour ces dosages, des échantillons composites ont dû être utilisés pour fournir assez de matériel foliaire pour les analyses. Chaque échantillon, formé de 15 disques foliaires (soit 3 disques prélevés sur la feuille traitée de 5 plants par échantillon), totalisait environ 0,5 g en poids frais (pesés précisément). Sept échantillons par traitement ont ainsi été extraits et mesurés.

Pour l'extraction, les disques étaient d'abord broyés dans l'azote liquide à l'aide de piston et mortier refroidis. Les composés phénoliques solubles étaient extraits en plaçant successivement l'échantillon pulvérisé dans du méthanol pur bouillant (2 X 10 mL, 20 min à 70°C) et du méthanol 50 % (1 X 15 mL, 30 min à température ambiante). Les échantillons étaient décantés et filtrés (Whatman no.4, MA, USA) après chaque étape d'extraction. Les extraits récoltés étaient combinés, mélangés, puis filtrés de nouveau. Le volume obtenu était complété à 50 mL par l'ajout d'eau déionisée.

La quantification des composés phénoliques totaux était ensuite effectuée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Waterman et Mole, 1994). Des échantillons de 25 mL d'extrait étaient placés dans des cylindres gradués contenant 45 mL d'eau déionisée, mélangés, puis 5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma) étaient ajoutés. Les cylindres étaient inversés à quelques reprises, puis, 5 min après l'addition du réactif, 15 mL d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{NaCO}_3$ , 2 g L<sup>-1</sup>) étaient ajoutés. À cette étape, le temps 0 était enregistré. Plusieurs inversions étaient ensuite effectuées pour assurer un brassage vigoureux. L'absorbance à 760 nm ( $A_{760}$ ) était lue 2 h plus tard ( $\pm$  1-2 min) à partir du

surnageant obtenu suite à la centrifugation (7974 g, 6 min) d'un aliquot de la solution finale.

### 3.3.6 Mesure des émissions de fluorescence

Les émissions de fluorescence de disques foliaires étaient mesurées à l'aide d'un fluorimètre Xe-PAM (Walz, Effeltrich, Allemagne). Un disque d'un centimètre de diamètre prélevé sur les feuilles traitée et systémique était fixé au support noir XE-SH-UV, puis inséré dans le porte-cuvette du fluorimètre. Le disque était placé de manière à présenter son côté adaxial. Ainsi positionné à un angle de 45° de la source d'excitation et du détecteur de fluorescence émise, l'échantillon était excité consécutivement par lumière bleue, puis par rayonnement ultraviolet. L'ensemble des manipulations était réalisé en moins de deux minutes, une période au cours de laquelle les pertes hydriques n'ont pas d'effet appréciable sur l'émission de fluorescence des échantillons (Bilger et al., 1997).

*Excitation.* Pour l'excitation bleue, les filtres UV-BLOCKING et BG39 étaient insérés devant la lampe. De plus, l'intensité de l'excitation était diminuée par l'ajout d'une plaque atténuatrice et de filtres de densité neutre. Un filtre DUG11+UG11 était utilisé pour fournir l'excitation UV. Étant donné qu'en l'absence d'échantillon, des signaux étaient produits et détectés à toutes les longueurs d'onde d'excitation utilisées, ces émissions de fond étaient mesurées au début de chaque série de prises de données et soustraites des émissions provenant des échantillons avant toute manipulation des données (Kolb et al., 2001).

*Émission.* Pour recueillir les bandes étroites des émissions de fluorescences chlorophylliennes rouge (F<sub>690</sub>) et rouge lointain (F<sub>740</sub>, F<sub>750</sub>) induites par lumière bleue, les filtres F<sub>690</sub>, F<sub>740</sub> et F<sub>750</sub> étaient respectivement placés devant le détecteur. La détection de la bande large de fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue (ChlF<sub>BLEUE</sub>), pour sa part, était mesurée à l'aide de la combinaison des filtres rouges R65/RG645 et R9. À cette combinaison, un filtre UV-BLOCKING était ajouté dans le cas de la fluorescence chlorophyllienne induite par UV (ChlF<sub>UV</sub>) afin d'éviter la détection des radiations d'excitation (Lichtenthaler et Schweiger, 1998). Finalement, les filtres UV-BLOCKING et BG18 étaient utilisés pour mesurer l'émission de fluorescence

bleu-vert induite par UV (BGF). À l'exception du filtre de densité neutre (Oriel, USA) servant pour l'excitation bleue, tous les filtres (Schott) utilisés étaient ceux fournis par Walz.

*Ratios.* À partir des différentes mesures, les ratios  $F_{690}/F_{740}$ ,  $F_{690}/F_{750}$  et  $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$  étaient calculés. Ce dernier correspondait à une mesure de la transmittance de l'épiderme aux rayons UV (TEUV) (Markstädter et al., 2001).

### 3.3.7 Analyses statistiques

Pour mettre en évidence l'effet des traitements d'induction sur les variables mesurées, des analyses de variance (ANOVA) ont été effectuées. En plus du facteur 'Traitement' (AJ, AS, Acti, Témoin), les facteurs 'Expérience' (I à IV) et 'Bloc' (1 à 3) étaient considérés comme variables explicatives. Ainsi, lorsque les interactions 'Expérience X Traitement' ou 'Bloc X Traitement' expliquaient une part non négligeable de la variation observée dans une variable donnée ( $p < 0,1$ ), chaque expérience ou bloc était analysé(e) séparément. Avant de procéder à ces analyses, la vérification du respect de leurs postulats de base avait permis d'identifier des cas problématiques d'hétérogénéité des variances pour les variables  $\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$ ,  $\text{ChlF}_{\text{UV}}$ ,  $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$ , BGF,  $F_{690}$ ,  $F_{740}$ ,  $F_{750}$ ,  $F_{690}/F_{750}$  mesurées sur les feuilles traitée (1) et systémique (2). L'analyse de ces variables a donc été menée sur les valeurs transformées en  $\text{Log}(x + 1)$ . Ces nouvelles variables rencontraient alors les conditions d'application de l'ANOVA.

Les procédures de comparaisons multiples qui ont suivi, des tests LSD, étaient tantôt protégées (LSD de Fisher), tantôt non protégées ( $F$  traitement non significatifs). Dans ce dernier cas, seules les trois comparaisons postulées *a priori* ont été considérées. Il s'agissait des contrastes (1) témoin vs traités, (2) inducteurs chimique vs naturels, et (3) acides salicylique vs jasmonique. À moins d'indications contraires, tous les résultats rapportés différaient significativement au niveau  $\alpha = 0,05$ .

## 3.4 RESULTATS

Les mesures effectuées devaient permettre de déterminer l'influence de l'induction d'états de résistance sur la physiologie et les émissions de fluorescence du tournesol. Il

est apparu que ces réponses étaient variables selon les répétitions de l'expérience et les conditions environnementales individuelles.

Ainsi, pour les variables Log F<sub>750</sub> 1 ( $p = 0,085$ ), Log ChlF<sub>BLEUE</sub> 2 ( $p = 0,082$ ), Log F<sub>690</sub> 2 ( $p = 0,016$ ), Log F<sub>750</sub> 2 ( $p = 0,027$ ), Log F<sub>740</sub> 2 ( $p = 0,05$ ), Chl *a* ( $p = 0,017$ ), Chl *a+b* ( $p = 0,037$ ), Carot ( $p = 0,052$ ), A<sub>337</sub> ( $p = 0,026$ ) et A<sub>325</sub> ( $p = 0,032$ ), A<sub>760</sub> ( $p = 0,080$ ), l'observation de termes d'interaction 'Expérience X Traitement' statistiquement significatifs suggérait que l'effet des traitements n'était pas le même selon l'expérience. Pour cette raison, bien que nuisant à la puissance des tests, il était nécessaire d'analyser chaque expérience séparément. De même, au cours de ces analyses, lorsque l'interaction 'Bloc X Traitement' apparaissait significative, il fallait analyser chaque bloc séparément. Une telle interaction était observée pour les variables Chl *a* et Chl *a+b* de l'expérience III. Le Tableau 3-1 présente l'ensemble des résultats des analyses de variance menées en respectant ces contraintes.

Les comparaisons de moyennes qui ont suivi devaient répondre à trois questions spécifiques qui représentaient un intérêt biologique dans le cas présent. En se basant sur le raisonnement théorique, ces trois contrastes d'intérêt avaient été établis *a priori*. La première hypothèse à tester touchait à l'effet général de l'application d'inducteurs sur le métabolisme et les émissions de fluorescence des plants (témoin vs traités). Parmi toutes les variables mesurées, seule la fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue de la feuille systémique (Log ChlF<sub>BLEUE</sub> 2) était à même de distinguer entre les plants témoins et les plants traités et ce, uniquement lors d'une des répétitions de l'expérience (Exp III). Cette valeur était, en moyenne, plus faible de 15 % chez les plants en réaction de résistance.

En second lieu, la possibilité d'effets contrastés de l'agent chimique (Acti) et des molécules-signal endogènes (AJ et AS) sur les variables à l'étude a été examinée (Tableau 2-2, Inducteurs chimique vs naturels). Les résultats obtenus ont montré que les contenus foliaires en pigments (Chl *a*, Chl *a+b* et Carot) étaient affectés différemment par ces deux catégories d'induction et dans des directions opposées selon les répétitions de l'expérience. Au cours de l'expérience I, la Chl *a* était diminuée de 23 % et les Carot de 24 % chez les plants induits chimiquement par rapport aux plants induits

TABLEAU 3-1. Effets des trois inducteurs sur différents paramètres physiologiques du tournesol.

	Traitement d'induction				<i>p</i>
	Témoin	Actigard®	Acide salicylique	Acide jasmonique	
<i>Feuille 1 (traitée)</i>					
<i>Chl a (mg m<sup>-2</sup>)</i>					
Exp I	309±40 (10)	296±38 (10) <sup>a</sup>	371±29 (9) <sup>B</sup>	398±28 (10) <sup>B</sup>	0,149
Exp II	267±23 (12) <sup>a</sup>	276±40 (10) <sup>a</sup>	177±15 (11) <sup>b</sup>	193±21 (10) <sup>b</sup>	<b>0,019</b>
Exp III					
Bloc 2	198±26 (5)	279±38 (5)	168±34 (5) <sup>a</sup>	285±37 (5) <sup>b</sup>	0,063
Bloc 3	303±51 (5)	284±42 (5)	277±42 (5)	179±32 (5)	0,202
Exp IV	376±18 (15)	379±16 (15)	359±22 (15)	339±19 (15)	0,390
<i>Chl b (mg m<sup>-2</sup>)</i>	68±3 (47)	70±4 (45)	60±3 (45)	65±4 (45)	0,154
<i>Chl a+b (mg m<sup>-2</sup>)</i>					
Exp I	376±47 (10)	363±47 (10)	437±34 (9)	472±37 (10)	0,223
Exp II	332±27 (12) <sup>a</sup>	340±48 (10) <sup>a</sup>	225±20 (11) <sup>b</sup>	237±27 (10) <sup>b</sup>	<b>0,021</b>
Exp III					
Bloc 2	257±30 (5)	354±48 (5)	218±40 (5) <sup>a</sup>	360±43 (5) <sup>b</sup>	0,060
Bloc 3	361±59 (5)	338±50 (5)	328±49 (5)	219±37 (5)	0,218
Exp IV	455±21 (15)	461±19 (15)	432±25 (15)	417±23 (15)	0,132
<i>Chl a/b</i>	4,6±0,2 (47)	4,7±0,1 (45)	5,0±0,3 (45)	4,9±0,3 (45)	0,421
<i>Carot (mg m<sup>-2</sup>)</i>					
Exp I	65±8 (10)	63±8 (10) <sup>a</sup>	81±4 (9) <sup>B</sup>	84±6 (10) <sup>B</sup>	0,077
Exp II	59±5 (12)	60±8 (10) <sup>a</sup>	44±3 (11) <sup>B</sup>	48±3 (10) <sup>B</sup>	0,057
Exp III					
Bloc 2	34±5 (5) <sup>a</sup>	53±7 (5) <sup>a</sup>	29±9 (5) <sup>a</sup>	54±6 (5) <sup>b</sup>	<b>0,033</b>
Bloc 3	64±11 (5)	57±9 (5)	57±8 (5)	35±7 (5)	0,144
Exp IV	77±5 (15)	78±5 (15)	77±7 (15)	69±5 (15)	0,298
<i>Chl a+b/Carot</i>	6,1±0,2 (47)	6,0±0,1 (45)	6,1±0,4 (45)	5,9±0,2 (45)	0,751
<i>A<sub>337</sub></i>					
Exp I	0,089±0,006 (10)	0,103±0,006 (10)	0,098±0,002 (9)	0,088±0,005 (10)	0,101
Exp II	0,091±0,005 (12)	0,097±0,008 (10)	0,073±0,003 (11) <sup>a</sup>	0,093±0,010 (10) <sup>b</sup>	0,059
Exp III	0,073±0,005 (10)	0,068±0,005 (10)	0,077±0,005 (10)	0,071±0,005 (10)	0,666
Exp IV	0,091±0,003 (15)	0,089±0,003 (15)	0,089±0,002 (15)	0,092±0,003 (15)	0,814
<i>A<sub>325</sub></i>					
Exp I	0,105±0,007 (10)	0,120±0,006 (10)	0,116±0,003 (9)	0,106±0,006 (10)	0,130
Exp II	0,108±0,006 (12) <sup>a</sup>	0,114±0,008 (10) <sup>a</sup>	0,088±0,002 (11) <sup>b</sup>	0,111±0,010 (10) <sup>a</sup>	<b>0,035</b>
Exp III	0,087±0,006 (10)	0,082±0,006 (10)	0,089±0,005 (10)	0,085±0,006 (10)	0,881
Exp IV	0,106±0,003 (15)	0,104±0,003 (15)	0,104±0,002 (15)	0,110±0,004 (15)	0,516
<i>A<sub>760</sub></i>					
Exp II	0,411±0,012 (2)	0,507±0,071 (2)	0,339±0,009 (2)	0,473±0,055 (2)	0,185
Exp III	0,322±0,021 (2)	0,288±0,020 (2)	0,352±0,054 (2)	0,292±0,067 (2)	0,747
Exp IV	0,301±0,012 (3)	0,303±0,018 (3)	0,298±0,009 (3)	0,314±0,020 (3)	0,892
<i>ChlF<sub>BLEUE</sub></i>	1227 ± 45 (48)	1214±44 (45)	1233±52 (47)	1170±42 (46)	0,332
<i>ChlF<sub>UV</sub></i>	840±50 (48)	858±68 (45)	903±69 (47)	805±53 (46)	0,698
<i>ChlF<sub>UV</sub>/ChlF<sub>BLEUE</sub></i>	0,710±0,046 (48)	0,722±0,054 (45)	0,738±0,042 (47)	0,715±0,045 (46)	0,784
<i>BGF</i>	1125±77 (48)	1138±104 (45)	1108±75 (47)	1124±100 (46)	0,949

TABLEAU 3-1. (suite)

	Traitement d'induction				<i>p</i>
	Témoin	Actigard®	Acide salicylique	Acide jasmonique	
F <sub>690</sub>	350±24 (48)	362±27 (45)	402±36 (47)	344±27 (46)	0,288
F <sub>740</sub>	528±27 (25)	503±13 (24)	493±16 (25)	517±15 (25)	0,469
F <sub>750</sub>					
Exp I	374±24 (10) <sup>a</sup>	375±18 (10) <sup>a</sup>	351±16 (10) <sup>ac</sup>	319±15 (10) <sup>bc</sup>	<b>0,048</b>
Exp II	605±22 (13)	661±48 (11)	728±50 (12) <sup>a</sup>	591±40 (11) <sup>b</sup>	0,101
Exp III	637±62 (10)	576±26 (10)	558±38 (10)	590±23 (10)	0,540
Exp IV	544±17 (15)	544±13 (14)	530±11 (15)	551±17 (15)	0,827
F <sub>690</sub> /F <sub>740</sub>	0,548±0,035 (25)	0,581±0,033 (24)	0,613±0,049 (25)	0,585±0,045 (25)	0,379
F <sub>690</sub> /F <sub>750</sub>	0,638±0,033 (48)	0,664±0,034 (45)	0,708±0,043 (47)	0,650±0,036 (46)	0,195
<i>Feuille 2 (systémique)</i>					
ChlF <sub>BLEUE</sub>	1144±332 (48)	1086±235 (46)	1101±277 (46)	1059±225 (47)	0,177
Exp I	720±26 (10)	759±46 (10)	699±15 (10)	727±19 (10)	0,708
Exp II	1261±56 (13)	1216±55 (11)	1282±65 (12)	1102±50 (12)	0,187
Exp III	1492±120 (10) <sup>a</sup>	1226±68 (10) <sup>B</sup>	1314±58 (10) <sup>B</sup>	1277±48 (10) <sup>B</sup>	0,085
Exp IV	1095±25 (15)	1116±22 (15)	1080±25 (14)	1102±24 (15)	0,717
ChlF <sub>UV</sub>	558±52 (48)	577±55 (46)	620±57 (46)	502±36 (47)	0,538
ChlF <sub>UV</sub> /ChlF <sub>BLEUE</sub>	0,512±0,044 (48)	0,560±0,056 (46)	0,570±0,047 (46)	0,500±0,039 (47)	0,208
BGF	621±39 (48)	582±45 (46)	594±36 (46)	629±47 (47)	0,431
F <sub>690</sub>					
Exp I	264±17 (10) <sup>ab</sup>	281±15 (10) <sup>a</sup>	224±14 (10) <sup>b</sup>	236±13 (10) <sup>b</sup>	<b>0,036</b>
Exp II	440±35 (13)	413±32 (11)	476±24 (12) <sup>a</sup>	371±23 (12) <sup>b</sup>	0,114
Exp III	570±64 (10)	444±28 (10)	496±37 (10)	491±31 (10)	0,255
Exp IV	182±23 (15) <sup>a</sup>	258±17 (15) <sup>b</sup>	209±15 (14) <sup>a</sup>	210±17 (15) <sup>ab</sup>	<b>0,039</b>
F <sub>740</sub>					
Exp III	634±53 (10)	512±28 (10)	554±27 (10)	535±22 (10)	0,063
Exp IV	441±12 (15)	447±10 (15)	433±11 (15)	436±12 (15)	0,722
F <sub>750</sub>					
Exp I	319±11 (10) <sup>a</sup>	353±12 (10) <sup>b</sup>	304±9 (10) <sup>a</sup>	310±12 (10) <sup>a</sup>	<b>0,009</b>
Exp II	571±26 (13)	546±28 (11)	575±31 (12)	504±27 (12)	0,329
Exp III	654±46 (10) <sup>a</sup>	528±27 (10) <sup>b</sup>	572±26 (10) <sup>a</sup>	550±20 (10) <sup>b</sup>	<b>0,027</b>
Exp IV	483±13 (15)	491±10 (15)	472±12 (14)	481±13 (15)	0,650
F <sub>690</sub> /F <sub>740</sub>	0,601±0,057 (25)	0,689±0,035 (25)	0,652±0,048 (24)	0,656±0,052 (25)	0,314
F <sub>690</sub> /F <sub>750</sub>	0,675±0,037 (48)	0,708±0,026 (46)	0,704±0,034 (46)	0,680±0,031 (47)	0,797

Pour chaque traitement, les valeurs présentées sont les moyennes ( $\pm$  SE, *n* entre parenthèses) issues des échantillons mesurés à chacune des répétitions de l'expérience. Lorsque les pentes des relations traitement-réponse différaient entre les quatre répétitions de l'expérience, la moyenne obtenue pour chaque expérience individuelle est présentée. Lorsque les pentes des relations traitement-réponse différaient entre les blocs, la moyenne obtenue pour chaque bloc est présentée. Il est à noter que les analyses statistiques ont été effectuées sur les données transformées  $[\log(x+1)]$  lorsque requis (tous les paramètres de fluorescence, sauf les ratios F<sub>690</sub>/F<sub>740</sub> 1, F<sub>690</sub>/F<sub>740</sub> 2 et F<sub>690</sub>/F<sub>750</sub> 2).

<sup>a, b, B, c</sup> Les valeurs *P* indiquent le niveau de signification atteint pour l'effet du traitement. Lorsque le *F traitement* n'atteignait pas une valeur *P* égale ou supérieure à 0,05, seuls les contrastes postulés *a priori* étaient effectués. Pour ces contrastes, deux traitements accompagnés d'une même lettre majuscule étaient considérés dans les analyses comme constituant un seul groupe auquel était comparé un autre traitement (i.e. contrastes 1 et 2). Dans le cas où le *F traitement* était significatif, des tests LSD de Fisher permettaient de mettre en évidence les différences existant entre les traitements.

TABLEAU 3-2. Réponses induites de façon différentielle selon la catégorie d'inducteurs.

	Présence (+, -) ou absence (0) de différence <sup>a</sup>							
	Chl <i>a</i>	Chl <i>a+b</i>	Carot	A337	A325	F <sub>750</sub> 1	F <sub>690</sub> 2	F <sub>750</sub> 2
Inducteurs chimique vs naturels	+ <sup>b</sup> , - <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup> , - <sup>b</sup>	0	0	+ <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	+ <sup>b</sup>
Acides salicylique vs jasmonique	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>

<sup>a</sup> La présence ou l'absence de différence est déduite du Tableau 3-1. Les symboles + et - indiquent respectivement une augmentation ou une diminution significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au traitement comparatif (contrastes qualitatifs), alors qu'un 0 indique l'absence d'un effet significatif pour les quatre répétitions de l'expérience.

<sup>b</sup> Dans l'une des quatre répétitions, ce paramètre différait significativement entre les traitements.

<sup>c</sup> Dans deux des quatre répétitions, ce paramètre différait significativement entre les traitements.

naturellement. Lors de l'expérience II, les Chl *a*, Chl *a+b* et Carot étaient respectivement plus hautes de 50 %, 47 % et 30 %. En ce qui concerne les émissions de fluorescence, la fluorescence chlorophyllienne mesurée sur la feuille systémique à 690 nm (Log F<sub>690</sub> 2), lors des expériences I et IV, et mesurée à 750 nm (Log F<sub>750</sub> 2), lors de l'expérience I, étaient plus élevées chez les plants induits chimiquement (en moyenne 19 % et 13 % pour Log F<sub>690</sub> 2 et Log F<sub>750</sub> 2, respectivement).

Ces deux mêmes paramètres permettaient de discriminer plus avant entre les deux types d'élicitation biotique, soit la dernière question envisagée (Tableau 3-2, Acides salicylique vs jasmonique). La réponse aux pathogènes, par le déclenchement du sentier de l'AS, et la réponse à l'attaque d'herbivores, par la stimulation du sentier de l'AJ, étaient ainsi différenciables au cours des seconde et troisième répétitions de l'expérience. La réponse à l'AS était caractérisée par une Log F<sub>750</sub> des feuilles traitée (Exp II) et systémique (Exp III) plus élevée de 19 % et 4 %, respectivement. La Log F<sub>690</sub> 2 montrait la même tendance, soit une valeur plus élevée de 22 % pour le traitement AS par rapport au traitement AJ (Exp II). Au cours de l'expérience II, les absorbances attribuables aux composés phénoliques, pour leur part, étaient diminuées de 21 % chez les plants AS. Lors de l'expérience III, ce sont les contenus en pigments qui étaient plus faibles chez les plants AS (Chl *a* : -41 %, Chl *a+b* : -36 %, Carot : -46 %).

### 3.5 DISCUSSION

La présente étude cherchait à identifier des changements caractéristiques dans les émissions de fluorescence de plantes soumises à diverses formes d'induction de résistance, puis à en fournir les bases physiologiques sous-jacentes. De tels changements, bien que n'ayant pas été observés de manière reproductible, ont été détectés majoritairement au niveau des feuilles distales du point d'application des traitements et concernaient tous des paramètres de fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue. Des altérations dans les concentrations foliaires en pigments ont également été observées et, dans une moindre mesure, dans les contenus en composés phénoliques. Aucune différence dans les émissions de fluorescence induite par UV n'a été mesurée. Ces observations, qui reflètent les effets de l'application à doses non phytotoxiques d'inducteurs de résistance chez le tournesol, sont discutées dans les paragraphes qui suivent.

Les études rapportant la production précoce, puis l'accumulation massive de composés défensifs chez les plantes réagissant au contact d'un agent biotique ennemi sont désormais courantes dans la littérature concernant la résistance des plantes (Hutcheson, 1998; Walling, 2000). Ainsi, diverses Théories de la défense des plantes s'accordent pour reconnaître cette réponse comme le fait saillant de la défense, la plaçant au cœur même des assises conceptuelles sur lesquelles elles se basent pour effectuer des prédictions et hypothèses (e.g, hypothèse de la Défense Optimale; McKey, 1974). D'autres assimilent plutôt le phénotype de résistance à un effet secondaire d'une réaction plus large de la plante à des contraintes imposées par son environnement abiotique (e.g., hypothèse de la Photoinhibition; Close et McArthur, 2002). Finalement, certains accordent de l'importance tant aux conditions du milieu qu'aux interactions plante-ennemis biotiques. La logique qui sous-tend une telle approche conceptuelle veut que les plantes, qui possèdent les moyens de sentir leur environnement abiotique par la modulation de leur composition en carbone et en nutriment (Coruzzi et Bush, 2001), seraient à même d'attribuer spécifiquement une part plus ou moins grande de leur énergie vers la production de tissus de croissance ou celle de composés ou structures de défense. Cette allocation serait modulée par les interactions biotiques et ressources



expérimentées par la plante à un moment donné (e.g., hypothèse de la Balance Croissance-Différenciation; Herms et Mattson, 1992).

Cette dernière vision se rapproche de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, cadre théorique qui nous sert actuellement à expliquer les changements de fluorescence que l'on observe en réponse à divers stress abiotiques de natures variées. Le concept repose sur la reconnaissance d'une régulation serrée entre la production et la consommation d'énergie chez la plante (Rolland et al., 2002). Il propose que des changements dans les activités qui sont à la source de cette d'énergie, lorsqu'ils ne sont pas reflétés par des modifications parallèles des activités qui la puisent, mèneront à un déséquilibre qui provoquera des modulations métaboliques. Ces dernières, en raison de certains impacts physiologiques qu'elles causent, seraient détectables par fluorescence. Dans ce contexte, la réciproque, où des changements dans les activités puits qui ne sont pas accompagnés de variations de même envergure des activités sources seraient détectables, est aussi valable.

La logique qui sous-tend la détection de telles manifestations d'un déséquilibre source:puits est simple. D'abord, on pose que les plantes réagissent au trop-plein de photosynthétats en redirigeant ces sucres non structuraux vers la production de métabolites phénoliques (Grace et Logan, 2000), plutôt que vers la voie normale (ou métabolisme primaire), et vice versa. Puis, reconnaissant que ces métabolites secondaires, parce que certains émettent une fluorescence bleue lorsque excités par UV (Morales et al., 1996; Lichtenthaler et Schweiger, 1998) et que d'autres s'accumulent au niveau de l'épiderme où ils absorbent les rayons UV (Burchard et al., 2000; Markstädter et al., 2001), il résulte que toute exposition d'une plante à des conditions adverses provoquant des changements de son métabolisme source:puits sera susceptible d'être détectée par des mesures de la fluorescence induite par UV émise par ses feuilles. À titre d'exemple, lors des nombreux processus où la croissance est affectée bien avant la photosynthèse (e.g., carences minérales; Paul et Driscoll, 1997), la fluorescence bleu-vert induite par UV augmentera et la transmittance de l'épiderme aux UV diminuera (Mercure et al., 2004).

Dans le cadre de la présente expérience, les hypothèses testées spécifiquement s'apparentaient davantage aux théories de la Défense Optimale qu'à l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits. Les assises conceptuelles sur lesquelles nous basions nos prédictions stipulaient ainsi que des métabolites défensifs seraient rapidement et massivement produits en réponse à l'élicitation (McKey, 1974), et non qu'ils seraient issus d'un processus plus ou moins passif de redirection des photoassimilats comme l'envisage l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits. Des composés défensifs devaient donc être détectés lors des mesures comme des augmentations de la fluorescence bleu-vert induite par UV ou des diminutions de la transmittance de l'épiderme aux UV. Tel n'a pas été le cas. Il est possible que des défenses aient bien été produites par les plantes, mais que ces métabolites aient plutôt été de type spécifique, et non, comme plus largement mesuré ici, des composés phénoliques à activité large. Ces défenses spécifiques (e.g., alcaloïdes, terpènes), qui sont bien connues comme étant qualitativement importantes mais quantitativement réduites (Feeny, 1976), auraient sans doute eu avantage à être mesurées. Que des changements dans les fluorescences induites par UV n'aient pas été trouvés concorde donc avec l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits. Dans la présente étude, il est effectivement peu probable que des altérations de croissance précédant des baisses de photosynthèse aient déjà pris place lors des mesures (qui étaient effectuées 48 heures après l'application des traitements). Toutes les différences trouvées avaient ici trait à la fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue, des changements plutôt attribuables aux concentrations foliaires en pigments chlorophylliens et anthocyanines.

Nos résultats concernant les contenus en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) ont montré que l'induction d'états de résistance, l'irradiance de croissance, telle que suggérée par les différences inter-blocs, ainsi que certaines conditions de croissance non spécifiées, qui différaient d'une expérience à l'autre, avaient toutes le potentiel d'affecter les contenus foliaires en pigments et les émissions de fluorescence chlorophyllienne. La lumière de croissance est bien connue pour influencer les concentrations en pigments (Lichtenthaler, 1987) et il était prévisible, vu leurs effets souvent rapportés, que les traitements d'induction mèneraient également à une perte de chlorophylle (Huang, 2001). Des modulations dans les contenus en xanthophylles et

caroténoïdes, pour leur part, sont également des réponses au stress couramment mesurées (Hendry et Price, 1993). L'accumulation de ces pigments aurait un rôle photoprotecteur, par son implication dans la dissipation, sous forme de chaleur, de l'excès d'énergie lumineuse (Logan et al., 1998). Les anthocyanines, autres métabolites susceptibles de protéger les plantes des stress oxydatifs imposés par l'excès de lumière, n'ont pour leur part pas été dosées. Leur accumulation en réponse à l'induction (Fang et al., 1999) et aux conditions lumineuses excessives (Grace et Logan, 2000) est cependant probable et il est plausible que celle-ci soit en cause dans les baisses de fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue mesurées au cours de certaines répétitions de l'expérience (Barnes et al., 2000).

L'aspect irrégulier de ces observations, par contre, demeure nébuleux. En fait, comme l'avaient également reconnu Black et ses collaborateurs (2003) suite à leur étude des effets de l'acide jasmonique, ces résultats montrent que les traitements ont le potentiel d'affecter les contenus en pigments et émissions de fluorescence, mais que ces manifestations dépendent d'autres facteurs (e.g., lumière, humidité, âge; Shah, 2003). Lorsque ces facteurs seront compris et que des variables inhérentes pourront être mesurées, ces paramètres prendront un intérêt plus grand.

L'observation tenant au fait que la plupart des changements de fluorescence se produisaient au niveau de feuilles distales du point d'attaque simulée est d'un intérêt à la fois théorique et pratique. D'une part, il est désormais reconnu que les plantes sont à même d'allouer une portion plus importante de leur budget de défense vers les parties qui sont le plus susceptibles de représenter une perte importante en termes de *fitness* (Stamp, 2003). Les feuilles distales, étant encore en pleine croissance et destinées à fournir l'énergie à la plante, auraient donc ici une valeur plus grande que les feuilles traitées, lesquelles étaient déjà moins importantes quant à leur contribution à la production de photosynthétats. Les plantes à croissance rapide telles que le tournesol ont généralement un taux de renouvellement des feuilles élevé qui leur permet de maximiser l'acquisition d'énergie. Ces plantes, adaptées aux milieux riches en ressources, démontreront de hauts taux de croissance, de faibles niveaux de métabolites secondaires et des défenses de type qualitatif (Feeny, 1976; Coley et al., 1985). Ces caractéristiques concordent avec les résultats obtenus ici.

D'un point de vue pratique, l'un des intérêts des changements de fluorescence observés sur des feuilles distales du site d'attaque simulée se formule en terme de spécificité de l'outil de détection (Rothman et Greenland, 1998). Cette qualité d'un test réfère au risque qu'il implique de déclarer une plante saine alors qu'elle est réellement sous attaque. En ce sens, la probabilité de sélectionner, au hasard, la feuille directement soumise à l'action d'un agent biotique est moins grande que celle de sélectionner toute autre feuille d'un plant. Dans l'optique d'applications de la fluorodétection des stress chez des plantes cultivées, cette caractéristique devient primordiale, puisqu'elle accroît la spécificité de la méthode.

L'un des inconvénients de l'approche de fluorodétection employée ici réside cependant en ce qu'elle n'a pu être suffisamment sensible pour fournir des résultats reproductibles. Ainsi, il apparaît que certains facteurs environnementaux d'intérêt concourent aux changements de fluorescence obtenus en réponse à l'élicitation ou les altèrent. Cette limite n'est cependant pas incontournable. Ainsi, pour utiliser une telle méthode de détection des stress, il pourrait simplement s'avérer nécessaire d'effectuer un calibrage périodique préalablement à la prise de mesures de routine. De cette manière, les conditions environnementales confondantes prévalant à un moment donné seraient prises en compte. Quoique théoriquement attrayante, il demeure qu'une telle approche devrait être vérifiée en pratique. Par exemple, sur la base des résultats obtenus ici, il est possible de proposer une démarche séquentielle (Figure 3-1). À la première étape, il s'agirait de trouver un paramètre permettant de différencier les plants sains des plants en phase précoce de réaction de résistance. De toutes les variables mesurées ici, les contrastes qualitatifs ont montré que seule la fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue de la feuille systémique était à même de distinguer entre les plants témoins et les plants traités (Exp III). Cette valeur était, en moyenne, plus faible de 15 % chez les plants en réaction de résistance. Ainsi, la première étape du processus de calibrage de la mesure consisterait, dans ce cas particulier, à mesurer la  $ChlF_{BLEUE\ 2}$  chez des plants témoins et des plants soumis aux différents agents dont on désirerait détecter la présence. Suite à l'obtention de cette mesure de base, il s'agirait de distinguer entre les différents stress. À titre d'exemple, deux grandes catégories d'induction de résistance étaient étudiées ici : une induction chimique, par l'Actigard®, et deux inductions

mimant des stress biotiques (AJ et AS). Les résultats obtenus ont montré que la fluorescence chlorophyllienne mesurée à 690 nm (Exp I et IV) et à 750 nm (Exp I) au niveau de feuilles systémiques était plus élevée chez les plants induits chimiquement (en moyenne 19 % et 13 % pour les  $F_{690}$  2 et  $F_{750}$  2, respectivement). Ces deux mêmes paramètres permettaient de discriminer plus avant entre les plants AJ et AS, les deux types d'élicitation biotique (Exp II et III). La réponse à l'AS était caractérisée par une  $F_{750}$  des feuilles traitée (Exp II) et systémique (Exp III) plus élevée (19 % et 4 %, respectivement) que celles observées en réponse à l'AJ et une  $F_{690}$  des feuilles systémiques montrant la même tendance (plus élevée de 22 % pour le traitement à l'AS, Exp II). L'observation d'un tel patron, dans un contexte de fluorodétection des stress, deviendrait donc un indicateur d'intérêt. Par l'application d'un processus itératif similaire, d'autres stress pertinents dans des situations données pourraient également être investigués, puis des changements de fluorescence typiques pourraient leur être attribués.

La présente expérimentation visait à identifier les possibles répercussions de l'induction de réactions défensives chez les plantes par l'utilisation de leurs émissions de fluorescence. Ainsi, sur la base des attaques simulées et élicitation chimique effectuées en utilisant des doses « conservatrices » de produits, il semble que peu d'impacts soient détectables par fluorescences induites par UV chez le tournesol. Cette observation suggère l'absence d'un effet potentiellement confondant qu'auraient pu avoir ces stress sur la fluorodétection d'autres stress dont on a déjà montré la détectabilité (e.g., carence azotée). Cependant, elle ne permet pas d'exclure la possibilité que de tels effets puissent se développer à plus longue échéance, sous d'autres conditions de croissance ou chez des espèces différentes du tournesol. Aussi, des interactions possibles entre des stress de différentes natures n'étant pas exclues, avant de conclure que l'élicitation de réactions de défense, qu'elle soit d'origine biotique ou chimique, n'entrave pas la possibilité de déceler d'autres stress, des expériences factorielles combinant diverses conditions environnementales contrôlées à l'induction de résistance devraient être effectuées. Les théories et hypothèses présentées ici pourraient alors être vérifiées.

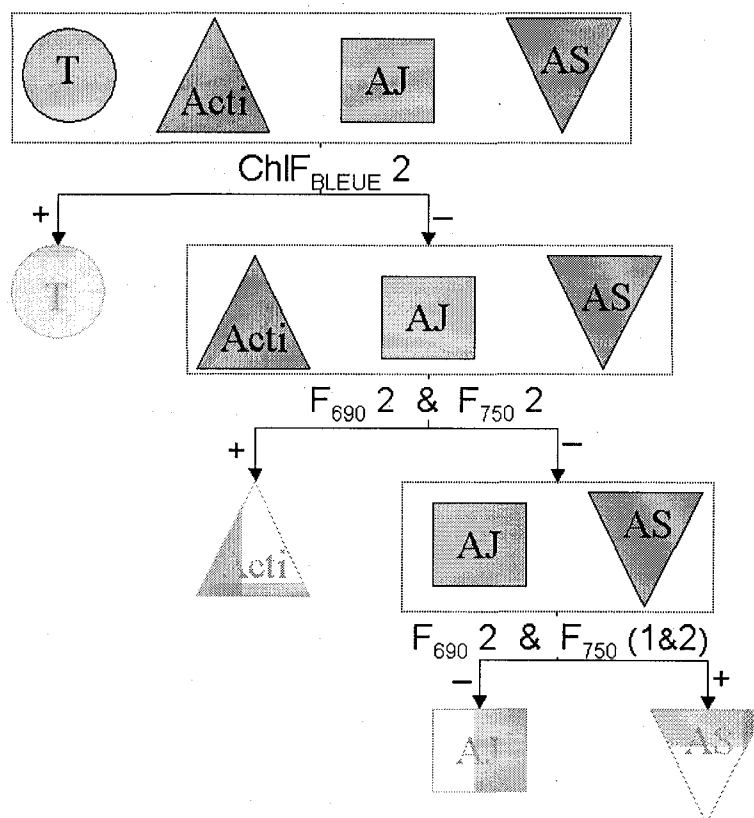


FIGURE 3-1. Démarche séquentielle de discrimination des stress provoqués par divers types d'inducteur de résistance. Le but d'établir une telle arborescence est de trouver des paramètres permettant la séparation de groupes de départ hétérogènes en sous-groupes homogènes, jusqu'à l'obtention d'ensembles distincts. Les résultats issus de la présente expérience sont ici présentés à titre d'exemple. On y remarque que les paramètres de fluorescence chlorophyllienne induite par lumière bleue ( $ChlF_{BLEUE}$ ,  $F_{690}$ ,  $F_{750}$ ), surtout lorsque mesurés sur des feuilles distales du points d'application (2), variaient de façon contrastée entre les groupes de traitements (voir le texte pour une discussion plus approfondie). T : témoin; Acti : Actigard®; AJ : acide jasmonique; AS : acide salicylique.

## CHAPITRE IV

### COÛT MÉTABOLIQUE DE LA RÉSISTANCE

NOTE. Au Chapitre II - Revue de la littérature, nous avons présenté le cadre théorique nouvellement utilisé pour expliquer les changements dans les fluorescences induites par UV de plantes soumises au stress. Ces bases physiologiques reposent sur le concept du Déséquilibre Source:Puits, où des inhibitions disproportionnées des processus de production d'énergie (e.g., photosynthèse) et de consommation de cette énergie (e.g., croissance) mènent au développement d'un débalancement métabolique. L'accumulation de composés phénoliques, l'un des changements dans la composition foliaire des plantes soumises à un tel déséquilibre, était exposée comme pouvant mener à des manifestations caractéristiques détectables par la mesure des émissions de fluorescence induite par UV des feuilles. Nous avons par ailleurs proposé que l'accumulation de composés phénoliques observée lors de l'induction de réactions de défense serait également susceptible de provoquer de tels changements dans les émissions de fluorescence induite par UV.

L'expérience dont les résultats ont été relatés au Chapitre III n'a pas conduit à l'observation de ces altérations de fluorescence, rejetant ainsi cette seconde hypothèse. En ce qui concerne l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, deux pistes d'explications étaient alors envisageables : soit l'induction de résistance, dans sa phase précoce, ne provoquait pas un déséquilibre source:puits, soit un tel déséquilibre avait pris place, mais n'avait pu être détecté. Les variables mesurées au cours de cette expérimentation ne permettaient pas de répondre à ces questions de manière non équivoque. Pour ce faire, il fallait connaître l'état de la photosynthèse et celui de la croissance au moment des mesures, afin de statuer de possibles altérations différentielles de ces processus.

Une seconde série d'expériences, dont le but premier était d'identifier les impacts possibles des inducteurs de résistance sur la photosynthèse, a pu fournir une piste de réponse à cette interrogation. Au cours de cette seconde séquence de manipulations, la photosynthèse ainsi que la croissance ont toutes deux été mesurées en parallèle pendant une semaine chez des plants suite à leur induction. Les résultats obtenus sont présentés dans le Chapitre qui suit.

## CHAPITRE IV

### COÛT MÉTABOLIQUE DE LA RÉSISTANCE

#### 4.1 RESUME

La résistance des plantes à une attaque biotique est un phénomène par lequel le contact de certaines parties d'un végétal avec un agent biotique ou un éliciteur spécifique entraîne le développement d'une capacité accrue de la plante à combattre l'envahisseur. Cette résistance implique souvent un coût métabolique se manifestant, entre autres, par une baisse de la photosynthèse chez les plantes en réaction de défense. À ce jour, cette réponse demeure mal comprise. Pour décortiquer les effets de trois inducteurs de résistance largement étudiés (acide jasmonique, AJ ; acide salicylique, AS ; Actigard®, une formulation commerciale de benzothiadiazole) sur l'activité photosynthétique, nous avons testé, chez le tournesol, deux hypothèses concernant les causes d'une diminution de la photosynthèse : (1) l'hypothèse de la rétroinhibition de la photosynthèse et (2) celle d'un effet direct des inducteurs sur la machinerie photosynthétique. Dans les conditions expérimentales utilisées, soit au cours des 6 jours suivant l'application foliaire des inducteurs à concentration physiologique (100 µg de produit actif/plant), seul l'AS a eu un effet néfaste sur le taux net d'assimilation du carbone ( $A$ ) mesuré par échanges gazeux et ce, le lendemain de son application (diminution de 32 %,  $n = 12$ ,  $p = 0,028$ ). Pour localiser plus avant le site de cette inhibition, des courbes-réponse au CO<sub>2</sub> ( $A/C_e$ ) ont été établies à partir de mesures effectuées sur des feuilles intactes, puis les taux de transport d'électrons et le gradient de pH transmembranaire ont été déterminés chez des suspensions de thylakoïdes. Les résultats obtenus montrent que l'AS appliqué à concentration physiologique a) diminue l'efficacité de carboxylation (EC) des feuilles, b) n'affecte directement ni l'activité du PSII ni celle du PSI et c) agit en tant que découpleur de la chaîne de transport d'électrons. L'observation d'inhibitions de l'EC et du gradient de pH (diminutions respectives de 23 % et 26 % par rapport aux témoins) suggère un mode d'action à l'AS, où la baisse de l'EC serait reliée à cette dissipation partielle du gradient de pH, possiblement *via* une diminution de l'activation de la Rubisco.



## 4.2 INTRODUCTION

Suite à leur contact avec des agents biotiques ennemis ou des éliciteurs spécifiques, les plantes développent généralement un phénotype de résistance caractérisé par une accumulation de métabolites à caractère défensif (Ward et al., 1991). Cette réaction est accompagnée d'altérations au fonctionnement normal de la plante (Stotz et al., 1999). Ainsi, on reconnaît communément qu'un coût métabolique est associé à la résistance induite, coût dont l'ampleur n'est toutefois pas encore bien définie (Heil, 2001). Effectivement, parmi les importants processus modifiés au cours de la réaction de défense, en parallèle à l'augmentation de la dépense énergétique encourue par la plante assaillie, une baisse de la photosynthèse est l'une des manifestations les plus fréquemment rapportées (Huang, 2001). Or, un certain questionnement subsiste en ce qui concerne les causes de cette réaction (Heil et Baldwin, 2002).

D'un point de vue physiologique, l'inhibition de la photosynthèse mesurée chez une plante en réponse au stress peut être issue d'une entrave au bon fonctionnement de divers processus dont dépend son taux net d'assimilation du carbone. Il peut s'agir, de façon non exclusive, (1) du taux de transport d'électrons et de la réduction des accepteurs, lesquels mènent à la production d'ATP et de NADPH, (2) de l'activité de la Rubisco par unité de surface qui, elle, dépend indirectement de la lumière (pour son activation) et directement de la disponibilité de ses substrat (RuBP et CO<sub>2</sub>), (3) du taux de régénération du RuBP, lequel est réglé par la disponibilité en ATP et NADPH, (4) de l'apport en CO<sub>2</sub>, tributaire de la conductance stomatique ( $g_s$ ) et de la concentration externe en CO<sub>2</sub> ( $C_e$ ), et (5) de la consommation des photoassimilats (e.g., pour la synthèse de saccharose ou d'amidon) et des électrons par des processus alternatifs de dissipation de l'énergie lumineuse, consommation qui maintiendra un équilibre entre l'offre et la demande d'énergie (Lawlor et Cornic, 2002).

De manière générale, il est donc prévisible qu'une baisse rapide de l'assimilation du carbone proviendra d'éléments affectant directement le processus de la photosynthèse. Il s'agirait alors de changements au niveau de la chaîne de transport d'électrons, du degré d'activation de la Rubisco ou de la disponibilité en CO<sub>2</sub>. Entre autres, ces éléments sont strictement régulés par l'état de réduction des molécules

acceptrices, la formation du gradient de pH transthylakoïde et l'ouverture des stomates. Dans le cas d'une diminution du taux d'assimilation survenant à plus long terme suite au déclenchement d'un état de stress, la disparité entre la production et la consommation des photoassimilats, telle que perçue par l'entremise de mécanismes de *sugar-sensing* (Oswald et al., 2001; Rolland et al., 2002), est plus à même d'expliquer une telle inhibition. En effet, un stress menant à une inhibition de croissance sans affecter directement l'activité photosynthétique contribuera à l'établissement graduel d'un déséquilibre Source:Puits qui, lorsque perçu par une augmentation de sucres solubles, provoquera une rétro-inhibition de la photosynthèse, en vue d'ajuster le métabolisme photosynthétique aux nouvelles contraintes environnementales (Stitt et Krapp, 1999).

À ce jour, ni l'inhibition de photosynthèse engendrée par l'induction de résistance ni ses causes potentielles ne font cependant consensus. Par exemple, dans le cas de l'acide jasmonique (AJ), molécule-signal associée à la réponse des plantes aux herbivores (Créelman et Mullet, 1997), la diminution de l'assimilation nette du carbone souvent observée suite à son application a été attribuée, selon le cas, à un effet direct de ce dérivé d'acide gras sur la chaîne de transport d'électrons (Rakwal et Komatsu, 2001), à une répression sélective de gènes encodant des protéines impliquées dans l'assimilation photosynthétique du carbone (Reinbothe et al., 1994; Reinbothe et al., 1997; Schittko et al., 2001; Wasternack et Hause, 2002) et, à plus longue échéance, à une perte de chlorophylle (Avdiushko et al., 1997). En ce qui concerne l'acide salicylique, composé phénolique agissant comme signal endogène de l'attaque pathogénique (Malamy et al., 1990), plusieurs situations contrastées ont été rapportées. Ainsi, les auteurs ont tantôt observé une stimulation de la photosynthèse (Zhou et al., 1999; Fariduddin et al., 2003), tantôt une absence d'effets sur ce processus (Gutierrez et al., 1998), tantôt son inhibition (Janda et al., 1999; Uzunova et Popova, 2000; Fariduddin et al., 2003). Dans ce dernier cas, des baisses de l'activité du PSII et de l'activité carboxylase de la Rubisco ont pu être mises en cause. Finalement, les études menées sur les effets du benzothiadiazole (BTH) (e.g., Gorchach et al., 1996; Benhamou et Belanger, 1998), un composé chimique utilisé commercialement en tant qu'inducteur de résistance aux pathogènes (Inbar et al., 2001; Agostini et al., 2003), n'ont pas exploré son potentiel d'inhibition de la photosynthèse.

Bien plus, à ces absences de généralisation en ce qui concerne l'observation de baisses de photosynthèse et l'identification de causes sous-jacentes, s'ajoute un facteur important qui commande la prudence dans l'évaluation des pistes d'explications apportées à ce jour. Plusieurs réponses attribuées à l'action des molécules-signal ont été dérivées d'expérimentations utilisant des doses parfois non physiologiques de produits ; on reconnaît donc que la possibilité d'inférer des mécanismes causaux réalistes s'en trouve d'autant éloignée.

Pour répondre à ces questionnements, la présente étude a misé sur l'application à concentration physiologique de trois inducteurs, les acides jasmonique (AJ), salicylique (AS) et benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioïque S-méthyl ester (BTH). Dans un premier temps, il s'agissait d'en montrer les effets néfastes sur l'assimilation photosynthétique du carbone. Suite à la mise en évidence de tels effets, il fallait en élucider les causes. Pour ce faire, deux scénarios ont été envisagés et deux hypothèses les concernant ont été spécifiquement élaborées et testées. Le premier cas de figure prévoyait l'observation d'une baisse de photosynthèse à moyen terme, le second s'attardait à l'éventualité d'une inhibition rapide suite à l'élicitation. Les hypothèses respectives se formulaient comme suit : (1) en inhibant d'abord la croissance, puis la photosynthèse, les inducteurs provoquent un déséquilibre Source:Puits causant indirectement une rétro-inhibition de la photosynthèse chez les plantes induites, et (2) les inducteurs exercent une action directe sur la photosynthèse, provoquant des changements dans (a) les activités de transport d'électrons ou (b) la capacité de carboxylation de la Rubisco.

Ces hypothèses ont été testées chez le tournesol cultivé en chambre de croissance. Il est apparu que ni l'AJ ni le BTH n'affectaient l'assimilation photosynthétique du carbone au cours de la période d'une semaine étudiée. L'AS, pour sa part, avait un effet direct, qui se concrétisait par une baisse de l'efficacité de carboxylation et un découplage de la chaîne de transport d'électrons. Ces résultats sont discutés et l'hypothèse d'une possible rétro-inhibition exercée, à plus long terme, par l'AS et le BTH est envisagée.

### 4.3 MATERIEL ET METHODE

#### 4.3.1 Matériel végétal et conditions de croissance

Des graines de tournesol nain (*Helianthus annuus* variété 'Sunspot', Stokes Seeds Ltd.) étaient placées entre deux épaisseurs de papier absorbant humide, puis germées à l'obscurité. Après une semaine, des pousses ne présentant pas d'anomalies (e.g., cotylédons déformés, tige tortueuse) et de taille similaire étaient sélectionnées, puis transplantées dans des pots de 4 po contenant un mélange tourbe:perlite:vermiculite (volume 2:1:1). À partir de ce moment et pour toute la durée de l'expérimentation, les plants étaient arrosés au besoin avec une solution de Hoagland (Taiz et Zeiger, 2002) dont le pH était ajusté à 6 par l'ajout de NaOH. Les plants étaient placés dans une chambre de croissance où prévalaient des conditions de photopériode de 16 h de lumière : 8 h d'obscurité et des températures diurne et nocturne de 23 et 18°C, respectivement. L'éclairage y était fourni par des lampes HPS de telle façon qu'environ 350  $\mu\text{mol}$  de photon  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR atteignaient les plants à la hauteur du feuillage. Une rotation quotidienne de l'emplacement des plants permettait d'assurer l'homogénéité des conditions environnementales.

Les différentes mesures étaient effectuées à partir du 35<sup>ème</sup> jour suivant la germination. À ce stade de développement, les feuilles situées au second nœud avaient atteint la taille minimale permettant de les insérer dans la chambre de mesure d'échanges gazeux de manière à remplir l'espace de 6,5  $\text{cm}^2$  qui s'y trouve, tout en laissant libres les premiers 2 cm à partir de l'apex (surface réservée à l'application des traitements).

#### 4.3.2 Traitements

Des solutions-stocks des éliciteurs testés, soit l'acide jasmonique (AJ), l'acide salicylique (AS) et l'Actigard® (Acti), ont été préparées en dissolvant les produits dans du méthanol pur, puis conservées au congélateur. Tous les produits, à l'exception de l'Actigard® fourni par Syngenta Crop Protection (Greensboro, NC), ont été obtenus de Sigma.

Les plants étaient traités par l'application, à la surface adaxiale d'une feuille par plant (l'une de celles se trouvant au second nœud), de 0,047 ( $\pm$  0,001)  $\text{g plant}^{-1}$  d'une

pâte de lanoline contenant (1) le volume de méthanol pur correspondant à celui utilisé pour dissoudre les produits testés (témoin), (2) 100 µg d'AJ, (3) 100 µg d'AS, ou (4) 200 µg d'Acti. Le volume de méthanol utilisé pour les témoins correspondait au volume maximal utilisé pour dissoudre les produits testés (i.e. AJ, la solution-stock la moins concentrée). La quantité d'AJ et d'AS appliquée, quant à elle, a été déterminée en considérant les concentrations de ces composés endogènes normalement observées chez les plants sains (Raskin, 1992; Creelman et Mullet, 1997), puis leur augmentation rapportées en réponse aux stress auxquels ils sont respectivement associés (Doares et al., 1995; Dempsey et al., 1999). La quantité d'Acti, finalement, a été choisie pour refléter la composition de l'Actigard®, soit 50% de benzothiadiazole, 50% d'ingrédient inactif.

Les pâtes étaient préparées moins de deux heures avant l'application, en liquéfiant de la lanoline dans un bain-marie (50°C), puis en y ajoutant une quantité connue des solutions-stocks (Baldwin et al., 1996). Elles étaient étalées à l'aide d'un applicateur à colle en une fine couche couvrant l'apex de la feuille sur une longueur de 2 cm. La longueur de 3-4 cm utilisée au cours de l'expérience présentée au Chapitre III n'a pas été conservée ici parce que la taille des feuilles était moindre chez les plants de la présente expérience. La diminution de la surface traitée visait à préserver une proportion surface traitée par rapport à surface totale équivalente.

### 4.3.3 Mesures morphologiques

#### A. Échantillon et mesures

Lors d'une première série d'expériences, 48 plants (12 pour chaque traitement et 12 témoins) étaient traités. La feuille traitée de chaque plant était photographiée quotidiennement à l'aide d'un appareil numérique (Pentax) pendant sept jours à partir du jour du traitement (jours 0 à 6). Ces prises de données étaient effectuées immédiatement après les mesures d'échanges gazeux. La feuille était alors placée sur un fond blanc où était imprimé un carré de deux cm de côté, lequel était installé sur un support surmonté de la caméra numérique. La photographie était prise à 90°. Lors de la prise de l'image, une plaque de plexiglas transparent était posée sur la feuille et une légère pression y était

appliquée pour en aplanir la surface. La surface totale était déterminée ultérieurement à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (SigmaScan Pro 5, SPSS).

#### B. Analyse des données morphologiques

L'analyse des données morphologiques devait permettre de mettre en évidence lesquels, parmi les traitements étudiés, affectaient l'expansion foliaire et à quel moment survenaient ces changements. Ainsi, deux facteurs (*traitement* et *temps*), dont le second pouvait constituer un problème de mesures répétées, devaient être pris en compte correctement dans les analyses. Les mesures de surface foliaire prises aux différents temps sur une même feuille ont donc été considérées comme des mesures répétées. La stratégie adoptée a misé sur la vérification de la satisfaction de la condition de H-F. Cette condition, qui s'intéresse aux matrices des covariances des différents termes d'erreurs, était respectée. Des analyses de variance (ANOVAs) en tiroirs conventionnelles ont subséquemment été utilisées (Collin, 2003).

#### 4.3.4 Échanges gazeux

Au moins une heure avant de débiter les mesures d'échanges gazeux, les plants étaient arrosés avec de la solution de Hoagland (pH 6). Les mesures étaient effectuées sur des feuilles intactes, au niveau d'une section de tissu adjacente à la zone traitée et dépourvue de nervures importantes, dans les conditions contrôlées de la chambre de croissance ( $T = 23^{\circ}\text{C}$ , humidité relative = 45 %). Pour la prise de mesures, les plants étaient d'abord placés directement sous une lampe pendant plusieurs minutes afin de stimuler l'ouverture des stomates. Les mesures étaient effectuées à l'aide du système LCA-4 (ADC BioScientific Ltd., Herts, England) sous environ  $1000 \mu\text{mol de photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de PAR. La prise de mesures était toujours précédée par les procédures préparatoires recommandées (ADC, 1993).

##### 4.3.4.1 Taux net d'assimilation du $\text{CO}_2$ (A)

#### A. Échantillon et mesures

Les paramètres d'échange gazeux ont d'abord été mesurés chez 48 plants, soit ceux ayant également fait l'objet des mesures morphologiques décrites plus haut. Quatre

traitements étaient alors évalués (AJ, AS, Acti, témoin), à raison de 12 répétitions par traitement. Une première mesure visant à s'assurer de la similarité initiale des plants a été effectuée trois jours avant l'application des traitements (jour -3). Puis, quotidiennement à partir du moment du traitement (jour 0), ils étaient de nouveau mesurés pendant six jours (jours 1 à 6). L'ensemble des mesures était effectué en mi-journée, soit entre 10h00 et 15h00. Après l'installation de la feuille traitée dans la chambre de mesure, une période d'acclimatation de 2.5 minutes précédait la prise de mesures. Tel que révélé lors d'expériences préliminaires, cet intervalle de temps était suffisant pour l'obtention de données stables dans les conditions prévalant dans la chambre de croissance.

#### B. Analyse des données d'A

Comme dans le cas des données morphologiques, l'analyse des données du taux net d'assimilation devait mettre en évidence lesquels, parmi les traitements étudiés, affectaient la photosynthèse et à quel moment survenaient ces changements. Les mêmes facteurs, *traitements* et *temps*, devaient également être pris en compte correctement dans les analyses. De nouveau, la condition de H-F était rencontrée par les données, de telle manière qu'il a été possible de procéder aux ANOVAs subséquentes en obtenant des valeurs  $p$  valides (Collin, 2003).

Les résultats obtenus à cette étape guidaient la conduite des expériences ultérieures, lesquelles visaient à vérifier les causes potentielles de toute inhibition de photosynthèse trouvée chez les plants traités. Ainsi, le traitement AS s'étant ici avéré le seul à affecter négativement l'assimilation du  $\text{CO}_2$  et ce, le lendemain de son application, cette combinaison de facteurs a été adoptée pour la suite des manipulations.

#### 4.3.4.2 *Courbes A/C<sub>e</sub>*

Bien qu'il ait d'abord été envisagé de produire des courbes du taux net d'assimilation en fonction de la concentration interne en  $\text{CO}_2$ ,  $A/C_i$ , il s'est avéré impossible de le faire. En effet, les valeurs de  $C_i$  n'ont pu être calculées par l'appareil lorsque le  $\text{CO}_2$  ambiant était abaissé. Il est possible que cette incapacité ait été due à un niveau d'humidité trop faible. Sans égard aux raisons qui ont empêché le calcul des

valeurs de  $C_i$ , les changements dans l'assimilation nette ont plutôt été évalués en fonction de la concentration externe en  $\text{CO}_2$ ,  $C_e$  (Pankovic et al., 1999).

#### A. Échantillon et mesures

Pour les mesures plus spécifiques des altérations photosynthétiques induites par l'application d'acide salicylique, quatre répétitions par traitement ont été effectuées. Étant donné l'investissement de temps nécessaire aux mesures inhérentes à l'établissement des courbes  $A/C_e$  (environ deux heures par plant), il était effectivement plus avantageux d'effectuer une sélection rigoureuse des plants pour en minimiser la variabilité, plutôt que de miser sur une augmentation de la taille de l'échantillon. Ainsi, parmi plus d'une centaine de plants semés au même moment et cultivés en conditions contrôlées, les plants qui semblaient les plus sains et qualitativement semblables étaient choisis, traités puis mesurés le lendemain.

La feuille traitée était d'abord placée dans la chambre de mesure, puis une première donnée à concentration ambiante de  $\text{CO}_2$  (s'élevant entre 666 et 985  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  dans la chambre de croissance) était prise après une période d'acclimatation de 5 minutes. Pour chaque plant, des données étaient ensuite collectées à 10 concentrations de  $\text{CO}_2$ , soit à environ 665, 590, 515, 440, 365, 290, 215, 140, 65 et 30  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . Suivant la commande de changement de concentration, environ cinq minutes étaient nécessaires avant l'atteinte de la nouvelle concentration. Chacune des mesures était donc prise dix minutes après qu'ait été passée la commande, ce qui laissait une période d'acclimatation de cinq minutes. Les mesures étaient effectuées dans l'ordre décroissant de concentrations présenté, sous une lumière incidente se trouvant, en moyenne, entre 945 et 1350  $\mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

#### B. Analyse des données des courbes $A/C_e$

L'analyse des données a débuté par la génération de fonctions décrivant approximativement la relation  $A/C_e$  pour chaque plant mesuré (SigmaPlot 8.02, SPSS). Un total de 13 équations était généré (une fonction polynomiale quadratique, six fonctions de croissance exponentielle et six fonctions logarithmiques) et leurs coefficients de détermination ( $R^2$ ) étaient examinés. Il est apparu que la fonction



logarithmique de troisième ordre décrivait généralement le mieux la relation  $A/C_e$ . Cependant, avec un ajustement d'en moyenne 0,14% plus faible ( $R^2$  moyens de 0,9888 et 0,9874 pour les fonctions logarithmique de 3<sup>ème</sup> ordre et quadratique, respectivement), la fonction quadratique a été préférée pour sa simplicité. Ces équations étaient ensuite utilisées pour calculer le taux net d'assimilation sous condition atmosphérique de  $CO_2$ ,  $A_{350}$ , soit la valeur de  $A$  où le  $CO_2$  externe est égal à 350 ppm, ainsi que le point de compensation en  $CO_2$  ( $\Gamma$ ), soit la valeur de  $CO_2$  externe où l' $A$  est égale à 0.

L'efficacité de carboxylation maximale (EC), pour sa part, a été évaluée comme la pente initiale de la courbe  $A/C_e$ . Pour ce faire, une droite de régression linéaire était générée dans la portion de chaque courbe se trouvant entre 0 et 520  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $CO_2$  externe (Systat 10, SPSS).

La comparaison des taux d'assimilation, points de compensation en  $CO_2$  et efficacités de carboxylation était ensuite effectuée par l'entremise de tests- $t$  appariés. Le pairage consistait à jumeler deux à deux les plants traité et témoin mesurés l'un après l'autre.

#### **4.3.5 Taux de transport d'électrons et gradient de pH**

##### *4.3.5.1 Échantillons*

Les mesures des taux de transport d'électrons et du gradient de pH ont été effectuées à partir de suspensions de thylakoïdes isolés de feuilles de tournesol cultivés et traités tel que décrit plus haut, soit par l'application foliaire de lanoline contenant de l'AS ou du méthanol (témoin) le jour précédant les mesures. Chaque échantillon était constitué d'environ 15 g de tissu foliaire dépourvu de nervures majeures. Cette quantité de tissu était obtenue en prélevant la feuille traitée de six plants par échantillon. Pour chaque traitement, quatre isolations indépendantes ont été effectuées ( $n = 4$ ).

##### *4.3.5.2 Isolation des thylakoïdes*

Les thylakoïdes étaient isolés à partir de ces échantillons composites. Toutes les étapes se déroulaient sous lumière verte, à 4°C. Les fragments de limbes foliaires étaient d'abord broyés dans 100 mL d'une solution à 4°C à l'aide d'un mélangeur domestique

refroidi (3 brèves pulsations de 2-3 secondes). La solution de broyage utilisée consistait en 0,3 M NaCl, 30 mM Tricine-NaOH (pH 7,8), 3 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mM Fe-EDTA (Whitmarsh et Ort, 1984). L'homogénat obtenu était filtré à travers une épaisseur de Miracloth (Calbiochem, CN biosciences, La Jolla, CA, USA), puis centrifugé à 1464 g pendant 2 min à 4°C. Le surnageant était ensuite éliminé, puis le culot était délicatement resuspendu à l'aide d'un pinceau à poils doux dans une solution de 0,2 M sorbitol, 5 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 2 mM MgCl<sub>2</sub> et 0,5 mg mL<sup>-1</sup> BSA (Whitmarsh et Ort, 1984). Une seconde centrifugation d'une durée de 20 sec (1464 g, 4°C) suivait. Le surnageant était filtré à travers un tissu Kimwipe pour en retirer les débris. Le filtrat recueilli était de nouveau centrifugé (1464 g, 3 min, 4°C). Après en avoir éliminé le surnageant, les culots obtenus dans chaque tube étaient combinés et resuspendus au pinceau dans une solution contenant 330 mM sorbitol, 30 mM Tricine-NaOH (pH 8,2), 10 mM KCl et 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Samson et Bruce, 1996). Une dernière centrifugation suivait (1464 g, 3 min, 4°C), le surnageant obtenu était éliminé, puis le culot était resuspendu dans 1-2 mL de ce milieu d'essai.

Pour déterminer la concentration finale de chaque échantillon en chlorophylles *a+b*, 50 µL de suspension était prélevé, suspendu dans 10 mL d'acétone 80% et filtré (pores de 0,45 µm, Millipore, MA, USA). L'absorbance était ensuite lue à 647 nm, 664 nm et 750 nm. La concentration en chlorophylles totales était calculée en µg Chls mL<sup>-1</sup> selon l'équation de Porra et al. (1989)

$$\text{Chl } a+b = 17,76 (A_{647}-A_{750}) + 7,34 (A_{664}-A_{750}).$$

#### 4.3.5.3 Mesures

Le taux de transport d'électrons était évalué à partir de mesures du taux de consommation d'oxygène et le gradient de pH transmembranaire était déterminé par le *quenching* de la fluorescence du 9-aminoacridine (*q9AA*). Les mesures du taux de consommation d'oxygène et du *q9AA* étaient effectuées immédiatement après l'isolation des thylakoïdes, en moins de 90 minutes.

#### A. Taux de consommation d'oxygène

Le taux de consommation d'oxygène était mesuré à l'aide d'une électrode de type Clark branchée à un oxygraphe (Hansatech, Norfolk, England). Les mesures étaient effectuées à 23°C sur des échantillons vigoureusement agités et éclairés par une lumière saturante. Avant la prise de mesures, le système était calibré avec de l'eau déminéralisée et oxygénée à température ambiante. Après stabilisation, du dithionite de sodium (un agent réducteur) était ajouté, jusqu'à consommation complète de l'oxygène se trouvant dans la cuvette.

Les échantillons ensuite mesurés, d'un volume final de 2 mL, contenaient un aliquot de la suspension de thylakoïdes correspondant à une concentration finale en Chl *a+b* de 20 µg Chls mL<sup>-1</sup> ainsi que du méthyl viologène (MV), un accepteur d'électrons. Deux conditions expérimentales étaient utilisées afin d'identifier de possibles inhibitions au niveau de la chaîne de transport d'électrons : un transport couplé et un transport découplé. Ainsi, le flux d'électrons (1) de l'eau au méthyl viologène (MV, 100 µM) était mesuré chez des échantillons couplés (transport d'électrons non cyclique). Chez des échantillons découplés par l'addition de nigéricine, le taux de consommation d'oxygène était mesuré en présence de (2) MV (100 µM). La cuvette de l'appareil était rincée abondamment avec de l'eau déminéralisée entre chaque essai.

#### B. Gradient de pH (q9AA)

Pour déterminer le gradient de pH transmembranaire, le *quenching* de la fluorescence du 9-aminoacridine (9AA) était mesuré à l'aide d'un fluorimètre Xenon-PAM (Walz, Effeltrich, Allemagne). Les filtres utilisés à l'excitation et à l'émission étaient respectivement le DUG11+UG11 et la combinaison UV-BLOCKING et BG18 (Schott). Chaque échantillon (volume final : 2 mL) était placé dans une cuvette de quartz et agité vigoureusement durant les mesures. Le zéro du système de mesure était d'abord établi à partir de la fluorescence émise par l'échantillon ne contenant que l'aliquot de thylakoïdes (20 µg Chls mL<sup>-1</sup>), 100 µM MV (pour favoriser le transport d'électrons) et le milieu d'essai. Le 9AA (2 µM) était ajouté et l'émission de fluorescence de l'échantillon à l'obscurité était enregistrée pendant environ 2 min ( $F_{\text{obscurité}}$ ). L'échantillon était ensuite illuminé par une lumière saturante et la fluorescence mesurée pendant environ 2

min ( $F_{\text{lumière}}$ ). Le *quenching* de la fluorescence du 9AA,  $q9AA$ , était finalement déterminé comme  $q9AA = (F_{\text{obscurité}} - F_{\text{lumière}}) / F_{\text{obscurité}}$  (Johnson et al., 1994), puis exprimé en pourcentage. Pour chaque échantillon, entre une et trois mesures étaient prises et la valeur moyenne obtenue était utilisée pour les analyses.

#### 4.3.5.4 Analyse des données de taux de consommation d' $O_2$ et de $q9AA$

Pour mettre en évidence la présence d'effets significatifs du traitement à l'AS, des tests-*t* appariés ont été effectués. L'appariement consistait à jumeler entre eux les couples d'échantillons traités, isolés, puis mesurés l'un à la suite de l'autre.

#### 4.3.6 Produits chimiques

Sauf lorsque autrement précisé, tous les produits composant la solution de Hoagland, ceux utilisés pour les traitements, ceux ayant servi aux procédures d'isolation des thylakoïdes ainsi que ceux nécessités lors des mesures subséquentes provenaient de Sigma.

#### 4.3.7 Analyses statistiques

Sauf si précisé, toutes les différences rapportées étaient significatives au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ . Avant chaque analyse, les postulats de base inhérents à chaque test étaient vérifiés. Aucune transformation des données n'a été nécessaire. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Systat (Systat 10, SPSS).

### 4.4 RESULTATS

#### 4.4.1 Effets des inducteurs sur les taux d'assimilation photosynthétique du $CO_2$ et l'expansion foliaire

Le jour suivant les traitements, les plants étaient d'apparence similaire. Cette absence de symptômes visuels s'est maintenue tout au long de l'expérience. Au départ (jour -3), leurs taux d'assimilation photosynthétique du carbone ( $A$ ), également identiques, s'élevaient en moyenne à  $34,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Cependant, dès la première minute suivant l'application des traitements, tous les plants ont connu une baisse transitoire de leur taux net d'assimilation ( $F = 4,562$ ,  $p = 0,038$ ), à l'exception des plants

traités à l'acide jasmonique ( $F = 0,760$ ,  $p = 0,307$ ). Au cours des minutes suivantes, l'ensemble des plants recouvraient leur taux d'assimilation initial et ne différaient plus entre eux (résultats non illustrés). De même, pour tous les autres paramètres mesurés (transpiration, résistance stomatique, conductance stomatique,  $\text{CO}_2$  interne), les plants traités et témoins ne différaient pas entre eux.

Afin de mettre en évidence l'ordre d'apparition de symptômes-clés liés à l'application foliaire d'inducteurs de résistance, les paramètres photosynthétiques et de croissance ont ensuite été mesurés dans le temps, au cours des six jours suivants. Les changements dans le taux net d'assimilation du  $\text{CO}_2$  observés pendant cette période sont présentés à la Figure 4-1A. Outre l'effet très rapide de l'application des traitements déjà rapporté en ce qui concerne tous les plants sauf les plants AJ (jour 0), il est apparu que le traitement à l'acide salicylique exerçait un effet sur l'assimilation nette du  $\text{CO}_2$  au lendemain de son application (jour 1). Contrairement à l'AJ, l'AS causait une diminution du taux d'assimilation par rapport aux témoins ( $29,06$  vs  $42,88 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0,028$ ). Cet effet, qui ne se maintenait pas dans le temps ( $p > 0,178$ ), a été investigué plus avant lors d'expérimentations ultérieures (voir plus bas). Le taux d'assimilation des feuilles distales du point d'application des traitements, quant à lui, lorsque mesuré aux cinquième et sixième jours suivant le traitement, ne différait pas selon le traitement (résultats non illustrés).

Parallèlement à ces mesures d'échanges gazeux, la surface foliaire des feuilles traitées étaient mesurée chaque jour (Figure 4-1B). La feuille traitée des plants AS et Acti tendait à être de taille plus faible que celle des témoins. Ainsi, au moment de la dernière mesure, six jours après les traitements, les différences de surfaces étaient significatives (AS :  $72.80 \text{ cm}^2$ , Acti :  $73,95 \text{ cm}^2$ , Témoin :  $82.71 \text{ cm}^2$ ,  $n=12$ ,  $p < 0,036$ ).

#### **4.4.2 Effets de l'acide salicylique sur la photosynthèse**

##### *4.4.2.1 Échanges gazeux et courbes $A/C_e$*

De manière générale, les courbes  $A/C_e$  générées au jour 1 présentaient des taux d'assimilation négatifs pour de faibles concentrations en  $\text{CO}_2$  (en-deçà de  $177 \text{ ppm}$ , en moyenne), une augmentation linéaire de ce taux sur la majeure portion de la courbe,

laquelle incluait la concentration atmosphérique actuelle en CO<sub>2</sub> (c. 350 ppm), puis une tendance vers l'atteinte d'un plateau chez certains plants à des concentrations en CO<sub>2</sub> supérieures à 600 ppm (Figure 4-2). À des concentrations externes en CO<sub>2</sub> entre 360,5 et 367,6 ppm, l'*A* moyen était de 8,49 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (*n* = 7, SE = 1,05) et la conductance stomatique (*g<sub>s</sub>*) de 0,326 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (*n* = 7, SE = 0,074).

#### A. Taux d'assimilation (*A*) et conductance stomatique (*g<sub>s</sub>*) en réponse au traitement

Le taux d'assimilation moyen sous conditions de CO<sub>2</sub> atmosphérique, *A*<sub>350</sub>, tel qu'estimé à *C<sub>e</sub>* = 350 ppm à partir des fonctions approximatives générées pour chaque échantillon, était de 6,89 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> pour les plants AS et de 9,24 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> chez les témoins. Bien que non significative au seuil de 95 % (*t* = -7,671, *df* = 3, *p* = 0,074), la différence observée illustre une tendance intéressante. En effet, en interpolant les valeurs d'assimilation nette à des concentrations externes en CO<sub>2</sub> plus élevées, on obtient qu'à partir de 382 μmol CO<sub>2</sub> mol d'air<sup>-1</sup>, le taux photosynthétique des plants AS se situe à 8,16 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, tandis que celui des plants témoins s'élève à 10,74 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, une différence qui, cette fois, s'avère significative (*t* = -9,008, *df* = 3, *p* = 0,050). Pour sa part, la *g<sub>s</sub>* des plants n'était pas affectée par les traitements (*t* = -0,189, *df* = 3, *p* = 0,862) et se trouvait, en moyenne, à 0,620 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### B. Taux d'assimilation maximal (*A<sub>max</sub>*)

Le taux d'assimilation maximal n'a pas été mesuré. Dans les conditions utilisées, la concentration en CO<sub>2</sub> nécessaire à l'atteinte de l'*A<sub>max</sub>* n'était pas incluse.

#### C. Efficacité de carboxylation (EC)

L'efficacité de carboxylation (EC) des plantes a été évaluée comme la pente initiale (entre 9 et 520 ppm CO<sub>2</sub>) de la droite de régression linéaire du taux net d'assimilation de CO<sub>2</sub> en fonction de la concentration externe en CO<sub>2</sub> (*A/C<sub>e</sub>*). Ainsi, au lendemain de l'application foliaire d'AS, l'efficacité de carboxylation des plants traités (EC = 0,0425 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) était, en moyenne, 23 % plus faible que celle des plants témoins (EC = 0,0553 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (*t* = -4,205, *df* = 3, *p* = 0,025).

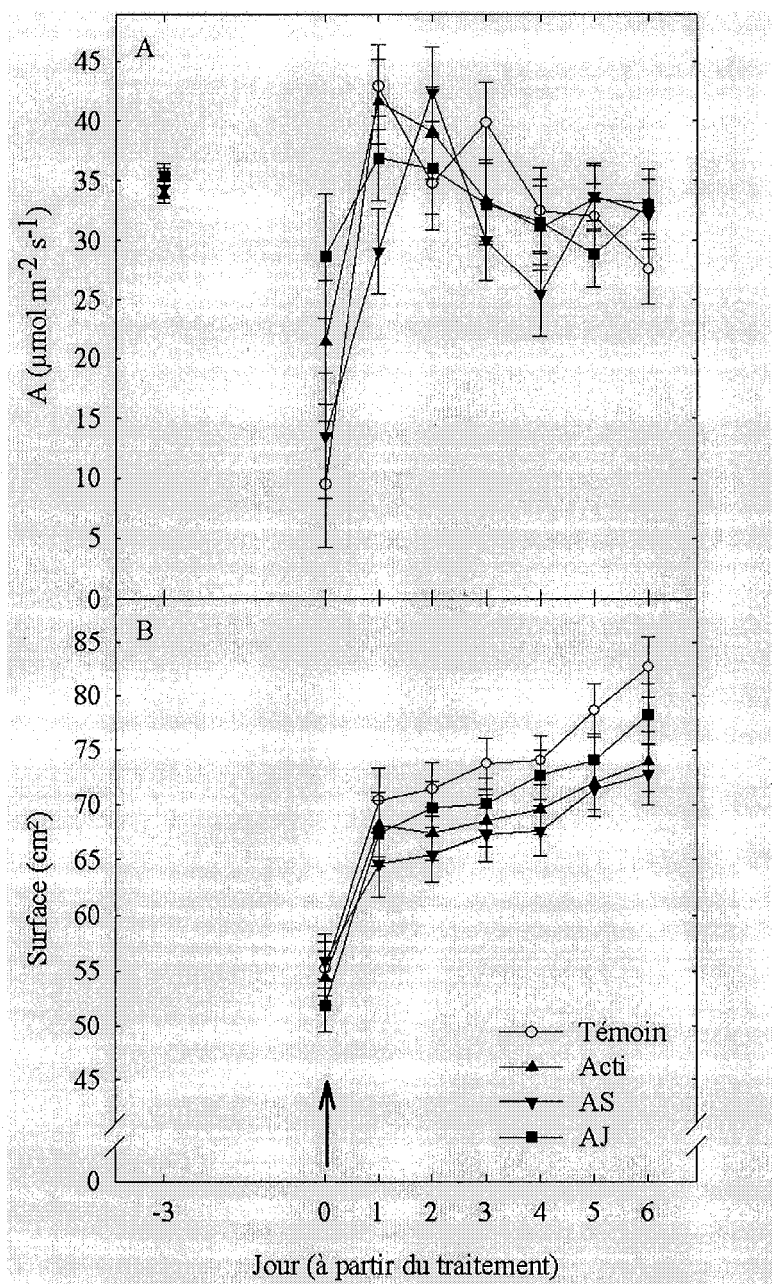


FIGURE 4-1. Changements dans le taux net d'assimilation du  $\text{CO}_2$  (A) et la surface totale de la feuille traitée (B) suivant l'application foliaire d'acide jasmonique (AJ, ■), salicylique (AS, ▼), Actigard® (Acti, ▲), ou méthanol (témoin, ○) chez le tournesol ( $n = 12$ ). La flèche indique le jour de l'application des traitements (jour 0). Les valeurs d'assimilation nette (A) présentées au jour -3 sont présentées à titre de référence. L'A des plants AJ était plus élevée que celle des témoins dans les minutes suivant le traitement ( $p = 0,010$ ). L'A des plants AS était plus faible que celle des témoins le lendemain des traitements ( $p = 0,028$ ). Ces effets ne se sont pas maintenus dans le temps. La surface foliaire de la feuille traitée des plants AS et Acti différait de celle des témoins au jour 6 ( $p < 0,036$ ).

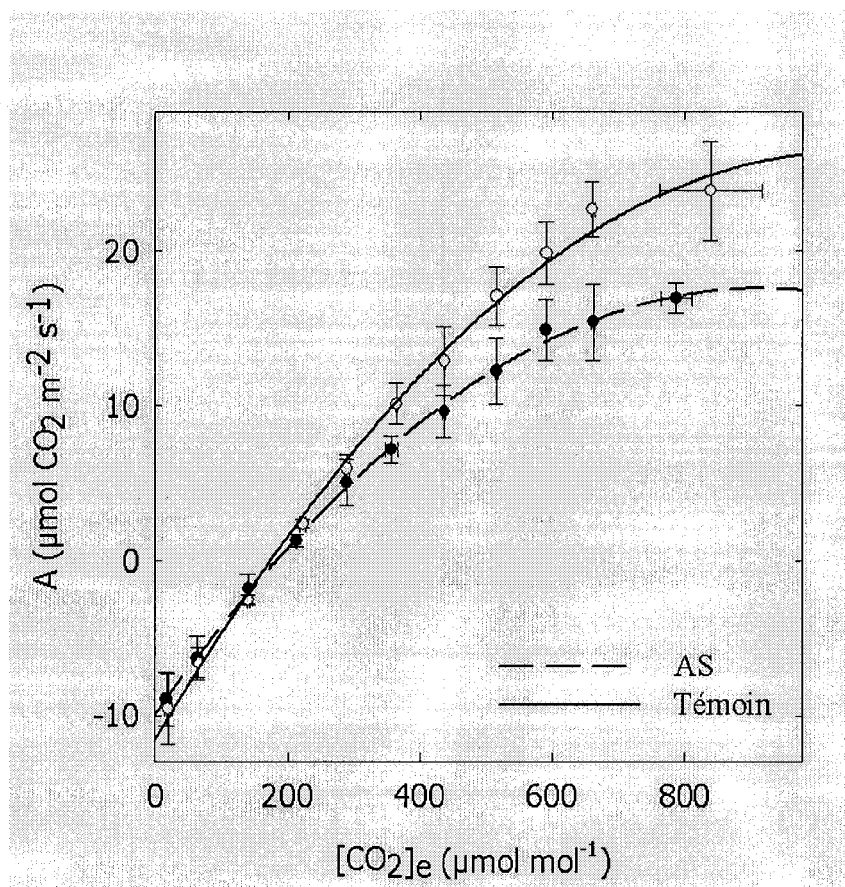


FIGURE 4-2. Réponse du taux net d'assimilation du CO<sub>2</sub>,  $A$ , à la diminution de la concentration externe en CO<sub>2</sub>,  $[CO_2]_e$ , chez des plants traités par l'application foliaire d'acide salicylique (AS, ●) ou de méthanol (témoin, ○) le jour précédant les mesures d'échanges gazeux. Les mesures ont été effectuées à l'aide du LCA4, sous c. 945 à 1350  $\mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pour chaque concentration externe en CO<sub>2</sub>, les symboles représentent la valeur moyenne  $\pm$  SE obtenue suite à la mesure indépendante de quatre plants par traitement ( $n = 4$ ). La pente initiale (efficacité de carboxylation, EC) des plants AS est plus faible de 26 % par rapport aux témoins ( $p = 0,025$ ).

#### D. Point de compensation en CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ )

Le point de compensation en CO<sub>2</sub>, qui s'évalue empiriquement comme la concentration externe en CO<sub>2</sub> au niveau de laquelle l'assimilation nette est égale à 0  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a été interpolé à partir des équations d' $A/C_e$  générées. Cette concentration, pour une valeur de  $A$  égale à 0, s'élevait en moyenne à 177 ppm et ne différait pas entre les plants AS et témoins ( $t = 0,563$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,613$ ).



#### 4.4.2.2 Taux de transport d'électrons et gradient de pH trans-thylakoïde

Pour déterminer le fonctionnement du PSII, du PSI, de la chaîne de transport d'électrons et la formation du gradient de pH transmembranaire, des thylakoïdes de tournesol photochimiquement actifs ont été isolés suite à l'application foliaire d'AS. Il est à noter que la diminution de l'*A* mise en évidence antérieurement rendait probable une inhibition de l'un ou l'autre de ces éléments de l'appareil photosynthétique, mais n'impliquait pas nécessairement une altération de ces processus. En effet, *in planta*, les électrons transportés *via* la chaîne auraient pu être transférés à d'autres accepteurs que le CO<sub>2</sub>.

Le taux de transport d'électrons (eau → MV), tel que mesuré par la consommation d'oxygène de suspensions de thylakoïdes couplées (résultats non illustrés) et découplés (Tableau 4-1), n'était pas affecté par le traitement à l'AS.

Le gradient de pH transmembranaire, tel qu'évalué à partir du *q9AA*, était diminué de 26 % par le traitement à l'AS ( $t = 5,803$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,010$ ). Le *q9AA* moyen des plants témoins s'élevait effectivement à 24,3 % ( $n = 4$ ,  $SE = 3,8$ ) et celui des plants traités à l'AS était de 17,9 % ( $n = 4$ ,  $SE = 4,1$ ) (Figure 4-3). En moyenne, la différence des *q9AA* observée entre les paires d'échantillons était de l'ordre de  $6,5 \pm 2,2$  % en faveur des plants témoins.

TABLEAU 4-1. Effet de l'application foliaire d'acide salicylique (AS, 100µg) sur le transport photosynthétique des électrons ( $\mu\text{mol O}_2$  consommé  $\text{mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) dans des thylakoïdes de tournesol ( $20 \mu\text{g Chls mL}^{-1}$ ).

Préparation de thylakoïdes	Réaction <sup>a</sup>	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons <sup>b</sup>	Taux de consommation d'O <sub>2</sub> <sup>c</sup>		<i>p</i> <sup>c</sup>
				Témoin	AS	
Découplée	PSII au PSI	H <sub>2</sub> O	MV	47 ± 10	37 ± 8	0,333

<sup>a</sup> PSII : photosystème II, PSI : photosystème I.

<sup>b</sup> MV : méthyl viologène (100 µM).

<sup>c</sup> moyennes des valeurs absolues ± erreurs-types obtenues pour quatre répétitions indépendantes. Aucune différence significative n'est apparue entre les traitements (tests-*t* appariés).

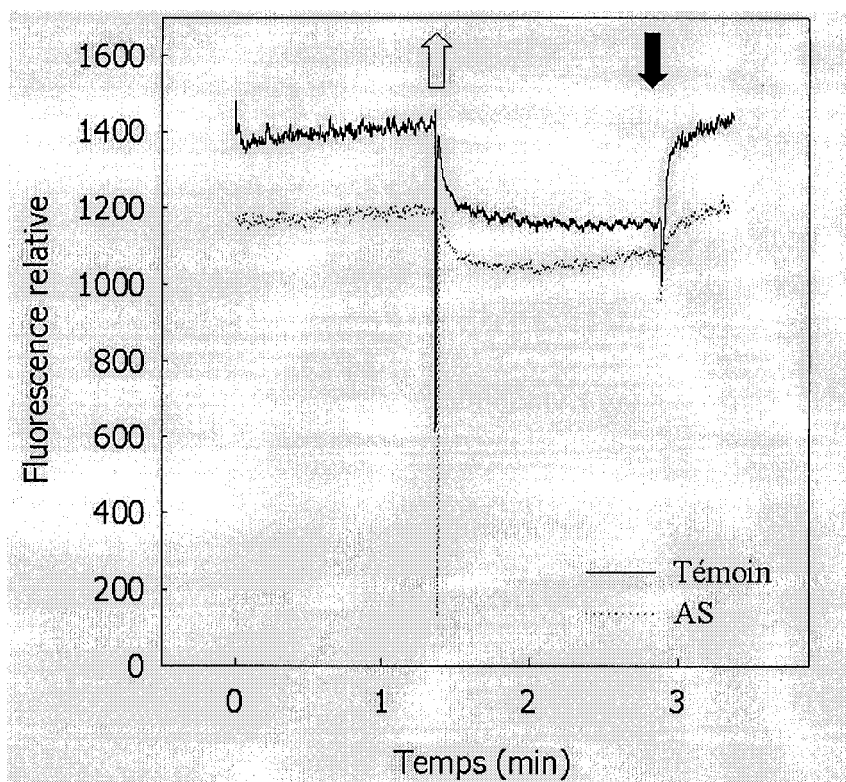


FIGURE 4-3. Effet de l'application foliaire d'acide salicylique (AS) sur le gradient de pH trans-thylakoïde ( $\Delta pH$ ). Le  $\Delta pH$  a été mesuré par le *quenching* de la fluorescence du 9-aminoacridine [ $q9AA = (F_{\text{obscurité}} - F_{\text{lumière}}) / F_{\text{obscurité}}$ ]. Les flèches pointant vers le haut et le bas indiquent respectivement le début de la période d'illumination et sa fin. Les résultats présentés sont issus d'une répétition représentative de l'expérience ( $n = 4$ ). Le  $q9AA$  moyen des plants traités à l'AS était 23 % plus faible que celui des plants témoins ( $t = 5,803$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,010$ ).

#### 4.5 DISCUSSION

Dans le cadre de la présente expérience, différents inducteurs de résistance ont été appliqués à des plants de tournesol à concentration physiologique. De cette manière, les effets d'attaques d'herbivores et de pathogènes ont pu être simulés, et leurs conséquences sur l'activité photosynthétique du tournesol précisément évaluées. De plus, l'utilisation de l'Actigard®, un inducteur de résistance commercialisé, a permis de statuer sur l'existence ou non d'effets indésirables de la résistance induite en tant que moyen de protection des plantes cultivées. Il est ainsi apparu que, dans les conditions expérimentales utilisées, seul l'acide salicylique affectait négativement la photosynthèse et ce, en découplant la chaîne photosynthétique de transport photosynthétique des

électrons. Cette dissipation du gradient de pH pourrait être à l'origine de la baisse d'amplitude similaire de l'efficacité de carboxylation mesurée parallèlement. À plus long terme, la diminution de l'expansion foliaire par ailleurs observée chez les plants traités à l'acide salicylique et à l'Actigard® suggère le développement d'une plus grande susceptibilité à une rétroinhibition de la photosynthèse. L'acide jasmonique, pour sa part, n'a provoqué ni altération de photosynthèse ni inhibition de croissance.

Les taux net d'assimilation photosynthétique du carbone et de conductance stomatique moyens des feuilles traitées mesurés ici sous  $\text{CO}_2$  ambiant (c.  $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ) ( $n = 48$ ) sont des valeurs comparables à celles rapportées dans la littérature pour le tournesol en conditions similaires d'illumination (Lawlor et Cornic, 2002; Cechin et Fumis, 2004). Ces mesures, prises en simultané avec la surface foliaire des feuilles traitées, ont d'abord permis de mettre en évidence la présence d'effets significatifs de l'application d'inducteurs sur ces paramètres. En outre, la mesure quotidienne de ces données se voulait un moyen de tester l'Hypothèse 1, selon laquelle l'inhibition de photosynthèse observée à long terme chez les plants induits était le fait d'un déséquilibre source:puits. Ainsi, un premier effet des traitements est d'abord apparu dans l'assimilation nette de tous les plants, sauf ceux traités à l'acide jasmonique, dès la première minute suivant l'application. Le lendemain, les plants traités à l'acide salicylique exhibaient toujours une assimilation nette diminuée. Ces effets ne se sont pas maintenus dans le temps. La diminution de l'expansion foliaire, quant à elle, était observable à partir du sixième jour suivant les traitements et ce, non seulement chez les plants traités à l'acide salicylique, mais également chez ceux induits à l'Actigard®. Dans la plage de temps mesurée, cette diminution n'était pas accompagnée d'une baisse concomitante de photosynthèse. Chacun de ces résultats nouveaux est maintenant discuté et un modèle décrivant l'effet physiologique de l'acide salicylique sur l'activité photosynthétique des plantes est proposé.

En ce qui concerne l'effet très rapide des traitements, tel qu'observé comme un taux d'assimilation diminué chez tous les plants sauf ceux traités à l'acide jasmonique, nos données suggèrent que l'administration des traitements constituait en elle-même un stress. Toutefois, l'acide jasmonique, lorsque appliqué au même moment que ce stress mécanique, exercerait une forme de protection, empêchant que soit déclenchée une

inhibition transitoire de la photosynthèse. Ce rôle proposé à l'acide jasmonique serait en accord avec son implication dans la cascade signalétique entourant la réponse des plantes à la blessure mécanique (Creelman et Mullet, 1997). En ce sens, les plantes soumises aux autres traitements auront répondu par une rapide synthèse *de novo* de ce messager secondaire. De cette manière, les plants témoins et ceux traités à l'Actigard® auront recouvré leur niveau d'assimilation basal dès le lendemain. Il est plausible que le traitement à l'acide salicylique aura prévenu un tel rétablissement en raison d'effets antagonistes des sentiers signalétiques de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique (Farmer et al., 2003).

La diminution rapide de l'assimilation du CO<sub>2</sub> causée par l'acide salicylique le lendemain de son application (Hypothèse 2) a, quant à elle, été investiguée plus avant. Notons d'abord que ce léger décalage des effets respectifs des acides jasmonique et salicylique est en accord avec les résultats de Lou et Baldwin (2004) qui rapportaient un tel asynchronisme dans la production endogène de ces messagers secondaires suite à l'administration d'éliciteurs. Le déclin du taux net d'assimilation du CO<sub>2</sub> observé chez les plants traités à l'acide salicylique était accompagné d'une baisse de 23 % de leur efficacité de carboxylation. Étant donné que la conductance stomatique ne semblait pas en être la cause, cette inhibition pouvait être (1) indirectement causée par une baisse dans l'activité du sentier métabolique de réduction du RuBP ou, (2) issue d'un effet direct du traitement sur le taux de transport d'électrons non cyclique dans le chloroplaste. Pour distinguer entre ces deux possibilités, le taux de consommation d'O<sub>2</sub> (sous-hypothèse a) a été mesuré chez des thylakoïdes dont le transport photosynthétique d'électrons avait été découplé de la fixation de CO<sub>2</sub> et de la photophosphorylation. Les taux de consommation d'oxygène mesurés correspondaient aux valeurs généralement présentées (Metzner, 1978) et ne différaient pas entre les plants traités à l'acide salicylique et les témoins. L'absence d'effet du traitement sur ces taux de transport suggérait que l'inhibition précoce de l'assimilation photosynthétique du carbone observée constituait un phénomène lié à une action directe de l'élicitation, ou d'événements associés à ce processus, sur d'autres éléments de la machinerie photosynthétique.

La sous-hypothèse b), selon laquelle cette baisse pouvait découler d'altérations au niveau de la formation du gradient de pH transthylakoïde, a donc été vérifiée. À la base, la photosynthèse dépend non seulement du degré d'intégrité du transport d'électrons au sein des thylakoïdes, mais également du potentiel électrochimique engendré de part et d'autre de cette membrane. Entre autres, l'établissement de ce gradient de pH transmembranaire est nécessaire à l'activation complète de l'enzyme Rubisco. Plus particulièrement, l'élévation du pH stromal et l'efflux d'ions  $Mg^{++}$  vers le stroma, couplés à l'influx de protons vers le lumen à l'origine de la formation du  $\Delta pH$  (Heldt, 1979; Taiz et Zeiger, 2002), s'avèrent d'une importance capitale. D'une part, l'activité optimale de la Rubisco requiert un pH alcalin (pH 8) ; d'autre part, la liaison des ions  $Mg^{++}$  aux sites actifs de la Rubisco est indispensable à son activation (Lorimer et al., 1976; Portis, 1992).

Ainsi, nous avons observé que le gradient de pH était effectivement affecté chez les thylakoïdes isolés de plants traités à l'acide salicylique, comme le rapportaient Norman et al. (2004) suite à leur étude sur l'effet de l'acide salicylique sur la chaîne mitochondriale de transport d'électrons chez le tabac. Il est intéressant de constater que ce découplage était d'une amplitude similaire à celle observée dans l'efficacité de carboxylation (26 % et 23 %, respectivement). Bien que la nature de la relation liant le gradient de pH transthylakoïde à l'activation de la Rubisco soit inconnue, les données obtenues permettent de proposer un nouveau modèle du mode d'action de l'acide salicylique au niveau du chloroplaste chez le tournesol (Figure 4-4). Nommément, l'acide salicylique en application externe, soit par une action directe de la molécule qui rejoindrait l'intérieur du chloroplaste, soit par une action indirecte impliquant des facteurs inconnus, découplerait partiellement le transport photosynthétique d'électrons. De cet événement découlerait une diminution de la prise de protons du stroma vers le lumen, une baisse consécutive du pH stromal et de l'efflux d'ions  $Mg^{++}$  auquel elle est couplée, puis un abaissement de la concentration stromale en  $Mg^{++}$ . Ces altérations stromales au pH et à la concentration en  $Mg^{++}$  exerceraient alors une régulation à la baisse de l'efficacité de carboxylation de la Rubisco dont elles diminueraient le degré d'activation.

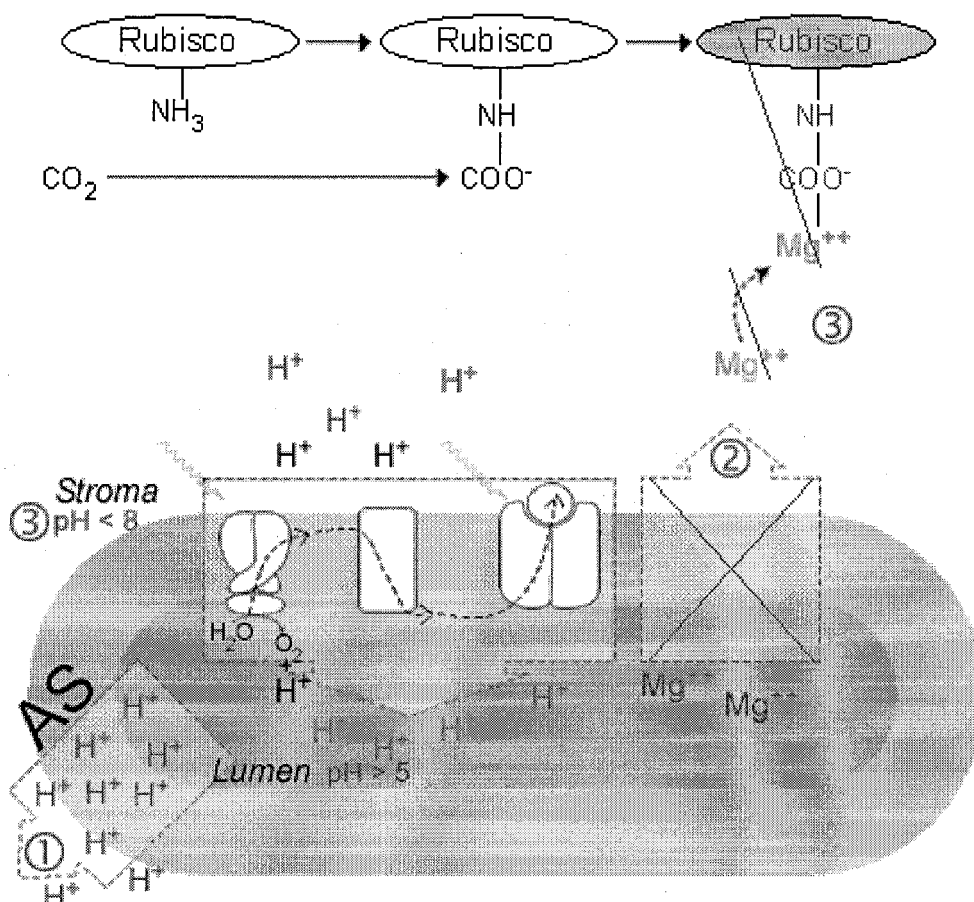


FIGURE 4-4. Modèle expliquant l'effet à court terme de l'acide salicylique (AS) sur l'activité photosynthétique. L'action de l'AS se concrétise par un découplage de la chaîne de transport d'électrons. De la diminution de la concentration de protons dans le lumen (①) découle une baisse de l'efflux d'ions  $\text{Mg}^{++}$  vers le stroma (②), processus couplé à la formation du gradient de pH trans-thylakoïde. Les faibles pH et concentration en ions  $\text{Mg}^{++}$  alors retrouvés dans le stroma (③) régulent à la baisse l'activité de la Rubisco. S'ensuit une diminution de l'efficacité de carboxylation de la Rubisco. Noter que le fonctionnement des photosystèmes I et II, le transport d'électrons ainsi que la disponibilité en  $\text{CO}_2$  ne sont pas affectés.

Dans un contexte plus large, l'absence de différence significative dans l'assimilation nette à une concentration externe en  $\text{CO}_2$  de  $350 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , soit sous les conditions de  $\text{CO}_2$  atmosphérique prévalant actuellement, révèle que la réaction de défense des plantes induite par la cascade signalétique de l'acide salicylique n'impute

présentement pas un coût métabolique important. Cependant, comme le suggèrent les valeurs évaluées pour des concentrations de  $382 \mu\text{mol mol}^{-1}$  et plus, il est plausible d'envisager que l'accroissement des concentrations en  $\text{CO}_2$  prévu dans le cadre des changements climatiques globaux aura un impact sur les interactions plantes-pathogènes (Veteli et al., 2002). En ce sens, puisque l'activité photosynthétique des plantes soumises à l'attaque de pathogènes serait significativement affectée, leur sensibilité aux maladies s'en trouverait augmentée et un coût métabolique lié à cette détérioration de leur état physiologique serait à prévoir. L'effet bénéfique d'une augmentation du taux net d'assimilation apporté chez le tournesol par une concentration externe en  $\text{CO}_2$  élevée (Cheng et al., 2000) serait donc mitigé en conditions naturelles, où l'attaque pathogénique est la règle plutôt que l'exception. Malgré son importance, une évaluation expérimentale de cette éventualité ne semble pas avoir été effectuée chez le tournesol. À l'instar des effets de la température (Cheng et al., 2000), du statut hydrique (Tezara et al., 2002) et de la compétition intraspécifique (Sims et al., 1999), l'interaction entre les effets d'attaques pathogéniques et de concentrations élevées en  $\text{CO}_2$  aurait avantage à être étudiée.

Finalement, à plus longue échéance, il est possible d'envisager que les traitements à l'acide salicylique et à l'Actigard® mèneraient éventuellement à une rétro-inhibition de la photosynthèse. L'accumulation d'hydrates de carbone non structuraux suggérée par la diminution de l'expansion foliaire observée au sixième jour suivant les traitements, alors que l'assimilation nette du  $\text{CO}_2$  était pleinement fonctionnelle, serait susceptible d'interagir avec le métabolisme photosynthétique. Le maintien d'un tel état où les photoassimilats ne sont pas métabolisés (e.g., pour la croissance) à un taux équivalent à celui auquel ils sont produits (i.e., par la photosynthèse) représente effectivement une perte d'énergie pour la plante (Oswald et al., 2001). Ce type de déséquilibre entre les activités source et puits survient fréquemment lorsqu'un végétal est soumis à des conditions de stress affectant d'abord la croissance (e.g., carences minérales, acclimatation au fort  $\text{CO}_2$ ) (Paul et Driscoll, 1997; Stitt et Krapp, 1999). Dans de tels cas, il a été démontré que la plante pourra réagir en diminuant sa photosynthèse (Rolland et al., 2002). En fait, toute accumulation d'hydrates de carbone non structuraux, qu'elle soit issue d'un déséquilibre entre les activités sources et puits ou d'une déficience dans

la translocation des photoassimilats (e.g., en réponse à l'infection fongique; Wright et al., 1995; Scholes et Rolfe, 1996; Tang et al., 1996), serait ultimement susceptible de déclencher une répression de la photosynthèse. Ainsi, bien que cette avenue n'ait pas été explorée plus avant dans le cadre de la présente expérience, la mise en place, à moyen terme, d'une telle répression chez les plants traités à l'acide salicylique et l'Actigard® demeure probable. À l'inverse, tel que rapporté par Iriti et Faoro (2003) suite à leur étude des effets de l'induction au BTH chez la fève, il est possible que la photosynthèse ne soit pas affectée et que seul le rendement final se trouve diminué. Dans pareil cas, une augmentation de l'activité photosynthétique ou de la concentration en chlorophylle par unité de surface pourrait, par exemple, mener à une telle observation d'absence d'effet sur la photosynthèse.

Bien qu'ayant mené à la mise en lumière de manifestations encore peu explorées de l'induction de résistance chez les plantes et forte de l'exploitation de mesures de photosynthèse selon des méthodes fiables qui ont déjà été utilisées avec succès dans l'investigation de nombreux stress, l'interprétation des données issues de la présente étude doit tenir compte de ses limites. Trois d'entre elles sont discutées dans les lignes qui suivent.

D'abord, les méthodes de culture et d'induction pourraient être remises en question. En effet, les plantes cultivées dans les conditions contrôlées d'une chambre de croissance ne représentent pas la réalité beaucoup plus complexe des interactions se déroulant au champ ou en nature. Ces interactions ont un effet non négligeable sur la réponse des plantes à l'élicitation (van Dam et Baldwin, 2001; Close et al., 2003). De plus, bien que reconnue comme pouvant imiter l'attaque biotique, l'application d'inducteurs ne reflète pas l'ensemble des événements impliqués dans le stress occasionné chez la plante par un herbivore ou un pathogène (e.g., perte de surface foliaire, limitation mécanique à la diffusion du CO<sub>2</sub>, etc.) (Strauss et al., 2002). Toutefois, ces approches ont été utilisées avec succès par le passé (e.g., Baldwin et al., 1996; Halitschke et al., 2001; Schittko et al., 2001) et l'on reconnaît aujourd'hui que le caractère hautement conservé des événements précoces impliqués dans la réaction de résistance des plantes permet d'extrapoler aux systèmes agronomiques et naturels les résultats obtenus de tels systèmes-modèles (Stotz et al., 1999). Ici, cette méthodologie a



permis de dresser un portrait préliminaire des effets de l'induction de résistance sur l'activité photosynthétique des plantes.

En second lieu, l'efficacité de carboxylation mesurée dans le cadre de la présente expérience ne correspond pas exactement à l'EC réelle. L'EC se définit comme l'augmentation du taux photosynthétique observée par unité de CO<sub>2</sub> supplémentaire au site de fixation du CO<sub>2</sub> ( $C_c$ ). Or, lors d'études visant à mesurer l'impact de la concentration en CO<sub>2</sub> sur la photosynthèse, il est techniquement difficile d'établir avec précision la concentration en CO<sub>2</sub> atteinte au site même de carboxylation (Lawlor et Cornic, 2002). Ainsi, en général, mesure-t-on plutôt la concentration intercellulaire en CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), considérée comme une bonne approximation de la concentration au site de carboxylation (Eichelmann et Laisk, 1999). Cependant, dans le cas présent, il n'a pas été possible de déterminer cette valeur de  $C_i$  sous faible apport en CO<sub>2</sub>. Cette observation a été rapportée précédemment (Pankovic et al., 1999) et la validité des valeurs calculées de  $C_i$  a déjà fait l'objet de questionnements (Lawlor et Cornic, 2002). En conséquence, la concentration en CO<sub>2</sub> utilisée dans les calculs d'EC effectués ici n'était ni la  $C_c$  ni la  $C_i$ , mais bien celle présente dans l'atmosphère externe de la plante ( $C_e$ ). Cette approche, qui a été employée avec succès chez le tournesol (Pankovic et al., 1999), a permis de produire des courbes  $A/C_e$  satisfaisantes. Bien qu'il s'agisse alors d'une évaluation qualitative de l'EC, cette mesure demeure informative. En elle-même, elle ne permettait cependant pas d'exclure que la différence dans l'assimilation observée ne soit d'origine stomatique. La fermeture des stomates pourrait effectivement expliquer en grande partie les différences observées. Elle aurait eu pour effet de diminuer la concentration de CO<sub>2</sub> retrouvée au site de carboxylation chez les plants, réduisant ainsi leur taux net d'assimilation. Or, le fait qu'aucune différence n'ait été trouvée entre les conductance stomatique et le point de compensation en CO<sub>2</sub> des plants traités et témoins suggère que leur capacité à absorber le CO<sub>2</sub> de l'environnement n'était pas altérée. La diminution de l'efficacité de carboxylation mise en évidence serait donc bien en cause dans l'inhibition de photosynthèse mesurée.

Finalement, nous n'avons pu explorer la possibilité selon laquelle la régénération du RuBP serait à mettre en cause dans l'inhibition de la photosynthèse. Pour ce faire, les courbes  $A/C_e$  produites auraient dû inclure des valeurs plus élevées de CO<sub>2</sub> externe, de

telle manière qu'un plateau dans l'assimilation aurait été observé. Chez les plantes  $C_3$  telles que le tournesol, l'assimilation maximale, sous lumière saturante, est généralement atteinte lorsque la  $C_i$  se trouve à c. 400 ppm (Lawlor et Cornic, 2002). Or, même aux valeurs de  $C_e$  les plus fortes utilisées ici, lesquelles permettaient d'obtenir une concentration intercellulaire de cet ordre, un tel plateau n'a pas été atteint. Cette observation suggère que les conditions lumineuses n'étaient pas saturantes. En effet, les plantes de soleil, dont fait partie le tournesol, sont capables de photosynthèse à des intensités lumineuses relativement élevées sans devenir photoinhibées. Ces plantes, bien que peu efficaces à utiliser la lumière en conditions de faible irradiance, sont ainsi à même de conserver de hauts taux photosynthétiques sous forte intensité lumineuse.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de la présente expérience ont permis de mettre au jour des manifestations encore méconnues de l'induction de résistance. Leur principale contribution réside dans la mise en évidence de l'inhibition de la photosynthèse provoquée par l'acide salicylique à concentration physiologique, puis dans l'élucidation de ses causes. Cet effet direct était issu d'une dissipation partielle du gradient de pH trans-thylakoïde et d'une réduction de l'efficacité de carboxylation, la première étant possiblement à l'origine de la seconde. Ces altérations étaient spécifiques à l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'Actigard® n'affectant pas la photosynthèse dans la plage de temps mesurée. Nous avons par ailleurs obtenu des données suggérant que l'Actigard®, au même titre que l'acide salicylique, pourrait causer, à plus longue échéance, dans une rétro-inhibition de la photosynthèse. Cette éventualité, qui n'a pas été investiguée plus avant, pourrait faire l'objet d'études ultérieures. Au terme des présents travaux, il est finalement apparu que, des trois inducteurs testés, seul l'acide jasmonique semblait apte à induire une forme de résistance qui n'impliquait aucun coût métabolique mesurable. La pertinence de ces conclusions serait à vérifier en conditions non contrôlées, selon des paramètres différents de ceux de photosynthèse et d'expansion foliaire utilisées ici et sur une plus longue période de temps.

**CHAPITRE V**  
**INTERPRETATION PHYSIOLOGIQUE DES EMISSIONS DE**  
**FLUORESCENCES INDUITES PAR UV : META-ANALYSE DE**  
**L'HYPOTHESE DU DESEQUILIBRE SOURCE:PUITS**

NOTE. Les Chapitres III et IV présentaient les résultats obtenus lors des deux volets de la phase expérimentale du présent projet de recherche. Il s'agissait d'abord de l'analyse des émissions de fluorescence du tournesol en réponse aux inductions de résistance, puis des répercussions de ces résistances induites sur la photosynthèse et la croissance. À l'aide de ces informations, il nous devient possible de proposer une interprétation physiologique des émissions de fluorescences induites par UV en réponse aux inducteurs de résistance en regard de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits. Tel que mentionné lors de sa présentation sommaire (cf. Chapitre II), cette hypothèse requiert effectivement, pour son évaluation, que soient connus les émissions de fluorescences induites par UV, d'une part, et l'état des métabolismes source et puits, d'autre part.

Cette hypothèse, nous l'avons succinctement présentée dans le cadre de la Revue de littérature. Le Chapitre qui suit en effectuera un traitement plus approfondi. Cette discussion s'articulera autour des résultats obtenus suite à une méta-analyse d'un ensemble d'expériences indépendamment menées au laboratoire de physiologie végétale de l'UQTR sous la direction du Professeur Guy Samson.

Ce cinquième Chapitre sera suivi d'une conclusion qui clora le présent travail en liant les résultats obtenus expérimentalement au cadre théorique développé au Chapitre V.

## CHAPITRE V

### INTERPRETATION PHYSIOLOGIQUE DES EMISSIONS DE FLUORESCENCES INDUITES PAR UV : META-ANALYSE DE L'HYPOTHESE DU DESEQUILIBRE SOURCE:PUITS

#### 5.1 RESUME

À ce jour, le potentiel d'utilisation des fluorescences induites par UV en tant qu'outil de détection des stress a maintes fois été rapporté. En ce sens, il a fait l'objet de nombreuses revues de littérature qui ont démontré que ces émissions typiques des plantes jouissaient d'un excellent support empirique. Or, malgré plus de dix années d'un intérêt grandissant pour la question, aucun fil conducteur ne semble émerger des résultats exposés. En ce sens, adoptant une approche méta-analytique, nous avons colligé puis examiné un ensemble d'études indépendantes rapportant des résultats concernant les émissions de fluorescences induites par UV, la photosynthèse et la croissance. Les résultats obtenus montrent une corrélation intéressante entre la transmittance de l'épiderme aux UV (TEUV), un paramètre de fluorescence, et le métabolisme source:puits ( $r^2=0,99$ ). La forme inverse de la relation liant ces paramètres est conforme aux prédictions de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits et passe par le point d'équilibre. Le faible nombre d'échantillons ( $n=5$ ) constitue la principale limite de cette étude.

#### 5.2 INTRODUCTION

L'interprétation des émissions de fluorescences induites par UV des plantes, dans son état actuel, repose majoritairement sur des évidences empiriques. De manière répétée, des études ont montré le potentiel d'utilisation de cette approche en tant qu'outil de détection et de suivi des stress environnementaux (e.g., Stober et Lichtenthaler, 1993; Schweiger et al., 1996; Barnes et al., 2000). Aucun cadre théorique susceptible d'apporter une base physiologique solide et de fournir un support cohérent à son usage en tant que sonde intrinsèque de l'état des végétaux n'a été suggéré à ce jour. À ce titre, la formulation d'un tel cadre et la démonstration de son bien-fondé pourraient constituer

des avancées importantes dans le domaine de la fluorodétection des stress chez les végétaux.

L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits se propose de remplir cette fonction d'assises théoriques. Cette hypothèse, qui s'intéresse à la manière dont les fluorescences induites par UV sont modulées par l'état physiologique des plantes, s'insère dans un courant actuel en biologie qui tend à synthétiser les masses d'information disponibles (e.g., Hawkes et Sullivan, 2001). En ce sens, l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits utilise les manifestations physiologiques rapportées à ce jour et les assemble pour former un tout cohérent.

Elle postule que l'altération disproportionnée des processus de production et de consommation d'énergie chez un végétal occasionnera un déséquilibre métabolique qui sera corrigé par une révision de l'allocation des photoassimilats. Cette allocation préférentielle se traduira par une production plus ou moins importante de métabolites secondaires, laquelle sera fonction de l'activité métabolique primaire. En ce sens, avec une inhibition du puits potentiel que représente la croissance ne s'accompagnant pas d'une inhibition de l'activité photosynthétique de même envergure, la synthèse de métabolites secondaires sera stimulée. Parmi ces composés nouvellement produits, des phénylpropanoïdes aux propriétés d'absorbance dans l'UV et d'émission de fluorescence bleu-vert induite par UV seront susceptibles de s'accumuler. À l'aide de mesures des émissions de fluorescences induites par UV, il serait dès lors possible de détecter ces accumulations indicatrices de stress. Ultiment, on pourrait étendre le concept pour en déduire que tout stress causant une rupture de l'équilibre source:puits serait détectable par l'analyse des émissions de fluorescence de la plante qui en est affectée.

Actuellement, ces postulats jouissent individuellement de bonnes démonstrations empiriques. Ainsi, le rôle physiologique primordial du métabolisme source:puits (Oswald et al., 2001; Rolland et al., 2002), la modulation de son état d'équilibre telle qu'influencée par les conditions environnementales (Stitt et Krapp, 1999), les variations dans les concentrations en métabolites secondaires causées par des déviations de cet équilibre (Lambers et al., 1998) et l'impact de certains de ces métabolites sur les émissions de fluorescences induites par UV (Morales et al., 1996; Lichtenthaler et

Schweiger, 1998; Burchard et al., 2000; Markstädter et al., 2001) ont tous fait l'objet de solides mises en évidence.

Partant de ces principes généraux, l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits a donc été testée au laboratoire de physiologie végétale de l'UQTR au cours de séries distinctes d'expérimentations indépendantes. Ces travaux, menés au cours des dernières années sous la direction du Professeur Guy Samson, ont misé sur les propriétés connues de diverses conditions de stress à rompre l'équilibre source:puits.

Ainsi ont été testées chez des végétaux d'espèces variées lors d'expérimentations indépendantes des conditions de culture susceptibles d'occasionner un déséquilibre source:puits, qu'il s'agisse alors d'une inhibition préférentielle de l'activité puits par rapport à l'activité source (S:p), ou de sa réciproque, une altération plus grande du métabolisme source par rapport au métabolisme puits (s:P). Les résultats alors obtenus représentaient tous des données intrinsèquement pertinentes possédant chacune leur intérêt propre. Parallèlement, ils concourraient à la vérification des prédictions de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits dont ils suggéraient la généralisabilité.

Cependant, présentées de manière individuelle, ces données empiriques ne rendaient pas compte de l'état actuel d'avancement de cette hypothèse. Elles ne capturaient pas son intéressant potentiel et n'en fournissaient pas une représentation synthétique. Ces résultats représentaient certes une nouvelle vague de données empiriques intéressantes, auxquelles il demeurait cependant conceptuellement difficile d'accorder le mérite qu'elles suggéraient.

En ce sens, une manière commune de colliger l'ensemble des résultats obtenus à propos d'un thème donné dans un laboratoire consiste à exploiter les outils de la méta-analyse (Finney, 1995). Cette forme critique de revue des données de recherche se distingue des revues de littérature conventionnelles par l'emploi de techniques statistiques. Elle arrive ainsi à fournir des conclusions quantitatives sur un sujet d'intérêt. En plus de regrouper un ensemble de bases de données ou de résultats en un tout synthétique, elle permet d'examiner des questions d'ordre théorique sous un angle nouveau.

Dans le cadre de la présente étude, l'exploitation de cette approche méta-analytique a permis de fournir une vision synthétique des différentes évidences empiriques recueillies au laboratoire au cours des dernières années. Les résultats obtenus montrent le bien-fondé de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits en tant que base conceptuelle à l'interprétation des émissions de fluorescence chlorophyllienne induite par UV. La fluorescence bleu-vert induite par UV, pour sa part, n'a pas montré le même potentiel. Des résultats pouvant aider à la sélection de conditions expérimentales à tester lors de travaux futurs sont par ailleurs présentés.

### 5.3 METHODE

#### 5.3.1 Échantillonnage et critères d'inclusion

La présente étude a misé sur une revue systématique des différentes données obtenues entre les années 2001 et 2004 au laboratoire de physiologie végétale de l'UQTR. Ces données pouvaient indifféremment se trouver sous la forme de bases de données proprement compilées ( $n=3$ ), de rapports non publiés ( $n=5$ ) ou de publications dans des revues scientifiques ( $n=1$ ). Pour être retenues, elles devaient présenter (1) des résultats concernant les émissions de fluorescence; (2) des résultats concernant au moins une des deux variables suivantes : activité photosynthétique, croissance; (3) les valeurs obtenues pour les plants traités et témoins pour chacune de ces variables; (4) une méthodologie satisfaisante (avec mentions explicites des conditions de croissance utilisées, description du matériel végétal, instruments employés, traitement des données). Sur la base de ces critères d'inclusion, six études ont été retenues. Les six conditions colligées consistaient en (1) la carence azotée 25 % chez l'orge (*Hordeum vulgare*) (Mercure et al., 2004), (2) la carence azotée 20 % chez le tournesol (*Helianthus annuus*), (3) l'hypoxie racinaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*), (4) la toxicité du cuivre chez *H. annuus*, (5) l'inhibition de l'expansion foliaire ABA-dépendante chez *H. annuus*, et (6) une courte photopériode (illumination quotidienne d'une heure) chez *H. annuus*<sup>6</sup>.

---

<sup>6</sup> Les conditions 2 à 6 n'ont fait l'objet d'aucune publication et sont attribuables à Lamothe, 2003; Bédard, 2004; Bourgoïn, 2004; Ibrahim, 2004; Tétrault-Garneau, 2004.

Lorsque plus d'un niveau des facteurs étaient présentés pour une même étude ( $n=1$ ), un seul était conservé pour minimiser tout biais potentiel induit par une série expérimentale déficiente. De même, lorsque des mesures avaient été effectuées à plusieurs jours ( $n=4$ ) ou sur différentes feuilles ( $n=2$ ), une seule journée ou une seule feuille était conservée. Il s'agissait alors de ne garder que la première journée à partir de laquelle des altérations significatives dans les émissions de fluorescence, activité source ou activités puits, étaient observables (ou, le cas échéant, la feuille où étaient observées de telles différences).

### 5.3.2 Variables

L'intérêt de la présente analyse portait sur les variables inhérentes aux (1) émissions de fluorescences induites par UV, considérées comme les variables dépendantes, et (2) activités source (S) et puits (P), représentant les variables explicatives. Pour chacune des variables analysées, les valeurs moyennes fournies étaient utilisées. Lorsque ces valeurs n'étaient pas rapportées, elles étaient évaluées à partir des graphiques présentés. À partir des résultats ainsi colligés pour les plants traités et témoins de chaque condition expérimentale, des valeurs d'altérations relatives des émissions de fluorescence, activités source et activités puits telles que causées par les traitements étaient calculées. Pour chaque paramètre, il s'agissait alors d'exprimer les valeurs obtenues pour la condition traitée en pourcentage de la condition témoin.

#### 5.3.2.1 Choix des variables

Émissions de fluorescences induites par UV. Quatre variables liées aux émissions de fluorescences induites par UV ont été recensées : (1) fluorescence chlorophyllienne induite par UV ( $\text{ChlF}_{\text{UV}}$ ) ( $n=5$ ) ; (2) fluorescence bleu-vert induite par UV (BGF) ( $n=5$ ) ; (3) ratio BGF/ $\text{ChlF}_{\text{UV}}$  ( $n=6$ ) ; (4) transmittance de l'épiderme aux UV ( $\text{TEUV}$ , alternativement présentée comme  $\text{ChlF}_{\text{UV}}/\text{ChlF}_{\text{BLEUE}}$ ) ( $n=6$ ). Parmi ces quatre variables, le choix de celle(s) à inclure dans l'analyse était basé sur la mention d'effets significatifs des traitements sur ces paramètres. En l'absence d'une telle mention ( $n=1$ ), la présence d'effets significatifs pouvait alternativement être évaluée subjectivement à partir des graphiques présentés. Dans ce cas, un jugement critique prenant appui sur les mesures de variabilité normalement obtenues a été exercé.



Activité source. En ce qui concerne la variable S, les seules données pouvant en constituer une estimation juste étaient les valeurs du taux net d'assimilation photosynthétique du CO<sub>2</sub> (n=4). Deux études ne présentaient pas de valeurs de S (carence azotée 25 % et courte photopériode). Dans le cas de la courte photopériode, une valeur de S=6,25% a été estimée (soit  $S=(100*1/16)$ , où 1 représente la photopériode d'une heure utilisée et 16 la photopériode normale employées pour toutes les autres expériences). Dans le cas particulier de la carence azotée 25 %, une valeur de S a été estimée à titre indicatif en postulant une relation linéaire du type  $TEUV=b_0 + b(S/P)$  (où les paramètres  $b_0=141,178$  et  $b=-44,539$  étaient ceux de la droite de régression liant la TEUV à S/P telle qu'obtenue pour les cinq autres études retenues). Lors des analyses de corrélation ultérieures, l'estimé de S ainsi prédit à partir des valeurs relatives de TEUV et de P n'a pas été pris en compte.

Activité puits. Dans le cas de la variable P, plusieurs variables étaient présentées : surface foliaire (n=2) ; masse fraîche totale (n=4), masse racinaire (n=2), masse aérienne (n=2) et masse foliaire (n=3). Lorsque la masse fraîche totale était rapportée, elle était utilisée (n=4). Sinon, la masse des parties aériennes était utilisée (n=2).

#### 5.3.2.2 Calcul de la variable explicative S:P

Pour fins d'analyses, un paramètre synthétique représentant le métabolisme source:puits a été mis au point. Ce paramètre allait servir de variable indépendante utilisée pour expliquer les variations des fluorescences induites par UV. Un tel paramètre n'étant présenté dans aucune étude retenue, une mesure quantitative a été construite à partir des données disponibles. Pour ce faire, les variables représentant les activités source (S) et puits (P) ont été utilisés. La détermination du paramètre indicateur S:P était ainsi effectuée en faisant le rapport des valeurs relatives S sur P obtenues suite au traitement des données moyennes présentées ou évaluées.

#### 5.3.3 Analyses

Le but de l'analyse était de décrire la relation entre les émissions de fluorescences induites par UV des plantes et leur métabolisme source:puits tels qu'altérés par des conditions de stress. Une approche de corrélation a été préconisée (Systat 10, SPSS).

## 5.4 RESULTATS

### 5.4.1 Description de l'échantillon

Des six études colligées, cinq rapportaient les valeurs d'intensité de fluorescence. Chez trois des cinq études présentant ces valeurs de  $\text{ChlF}_{\text{UV}}$  et BGF, des différences significatives avaient été observées. Quatre des six mentionnaient de telles différences en ce qui concerne le ratio empirique  $\text{BGF}/\text{ChlF}_{\text{UV}}$  et la TEUV. Dans ce dernier cas, une cinquième étude signalait une valeur  $p$  s'approchant du seuil de signification  $\alpha=0,05$  (courte photopériode,  $p=0,065$ ) et une sixième, qui ne rapportait les résultats d'aucune analyse statistique des données, présentait un graphique permettant de présumer de l'atteinte du seuil de signification (carence azotée 20 %).

Des quatre études qui présentaient des données de photosynthèse (S), trois avaient observé des baisses significatives. Dans chacune des six études retenues, des mesures de croissance (P) avaient été effectuées et rapportées explicitement. Toutes avaient mesuré des altérations significatives de ce facteur.

Sur la base de leur inhibition préférentielle des activités source (s:P) ou puits (S:p), deux grandes catégories de conditions expérimentales ont été identifiées (Tableau 5-1). Étaient considérées comme causant une inhibition S:p, les études dont le ratio de l'activité photosynthétique sur la croissance s'élevait au-dessus de l'unité ( $\text{S:P} > 1,0$ ). La majorité des expérimentations colligées, soit cinq sur six, correspondait à cette catégorie de stress. Ainsi en était-il des conditions (1) carence azotée 25 % chez *H. vulgare* ( $\text{S:P} \approx 1,8$ ), (2) carence azotée 20 % chez *H. annuus* ( $\text{S:P} = 2,2$ ), (3) hypoxie racinaire chez *P. vulgaris* ( $\text{S:P} = 1,7$ ), (4) toxicité du cuivre chez *H. annuus* ( $\text{S:P} = 1,4$ ), et (5) inhibition de l'expansion foliaire ABA-dépendante chez *H. annuus* ( $\text{S:P} = 1,4$ ). De ces cinq conditions, trois avaient des effets adverses à la fois sur les activités source et puits, une n'affectait que la croissance sans inhiber la photosynthèse (carence azotée 20 % chez *H. annuus*) et l'autre augmentait le taux net de photosynthèse tout en inhibant la croissance (hypoxie racinaire chez *P. vulgaris*). Des six études, une seule condition reflétait le déséquilibre réciproque s:P, soit (6) une courte photopériode chez *H. annuus*. ( $\text{S:P} \approx 0,125$ ). Celle-ci inhibait à la fois les activités source et puits, quoique exerçant

présumément un effet plus grand sur la première (cette valeur a été estimée tel que décrit dans la Méthode).

#### 5.4.2 Effets des stress sur les émissions de fluorescences induites par UV

La TEUV était la seule variable affectée par toutes les conditions expérimentales explorées. Dans un seul cas, la valeur de  $p$  rapportée n'atteignait pas le seuil  $\alpha=0,05$  (courte photopériode,  $p=0,065$ ). Cette donnée a été conservée pour les fins de présentation graphique, mais n'a pas été incluse dans l'analyse de corrélation.

#### 5.4.3 Méta-analyse

Étant donné le faible nombre d'échantillons, la seule analyse effectuée avait trait à l'unique variable dont l'effet significatif des traitements avait été rapporté systématiquement, soit la TEUV (Figure 5-1). En effet, d'autres analyses auraient pu inclure tout au plus trois cas, un nombre jugé insuffisant. Pour les fins de l'analyse de corrélation, les données o et n (courte photopériode chez *H. annuus* et carence azotée 25 % chez *H. vulgare*, respectivement), dont les valeurs de S étaient des estimés, ont été retirées. Le  $r^2$  alors obtenu s'élevait à 0,99 ( $n=5$ ). La relation ainsi produite passe par le point de coordonnées ( $x, y$ ) (S:P=1,0 ; TEUV=97 %). Ce point, soit la valeur de TEUV pour une condition d'équilibre source:puits, confirme les prédictions de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits.

TABLEAU 5-1. Données utilisées dans la méta-analyse des effets d'altérations du métabolisme source:puits sur la transmittance de l'épiderme aux UV (TEUV).

Condition expérimentale	espèce	% du témoin		
		TEUV	Source <sup>a</sup>	Puits
S:p				
carence azotée (25 %)	<i>H. vulgare</i>	60	82	45
carence azotée (20 %)	<i>H. annuus</i>	40	100	45
hypoxie racinaire	<i>P. vulgaris</i>	67	118	69
cuivre (75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<i>H. annuus</i>	76	65	48
ABA (10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> )	<i>H. annuus</i>	83	76	53
s:P				
courte photopériode (1h jour <sup>-1</sup> )	<i>H. annuus</i>	135	6,25	50

<sup>a</sup> Les valeurs en italiques ont été estimées tel que décrit dans la méthode. La valeur 'carence azotée (25 %)' n'a pas été utilisée dans le calcul du coefficient  $r^2$  présenté.

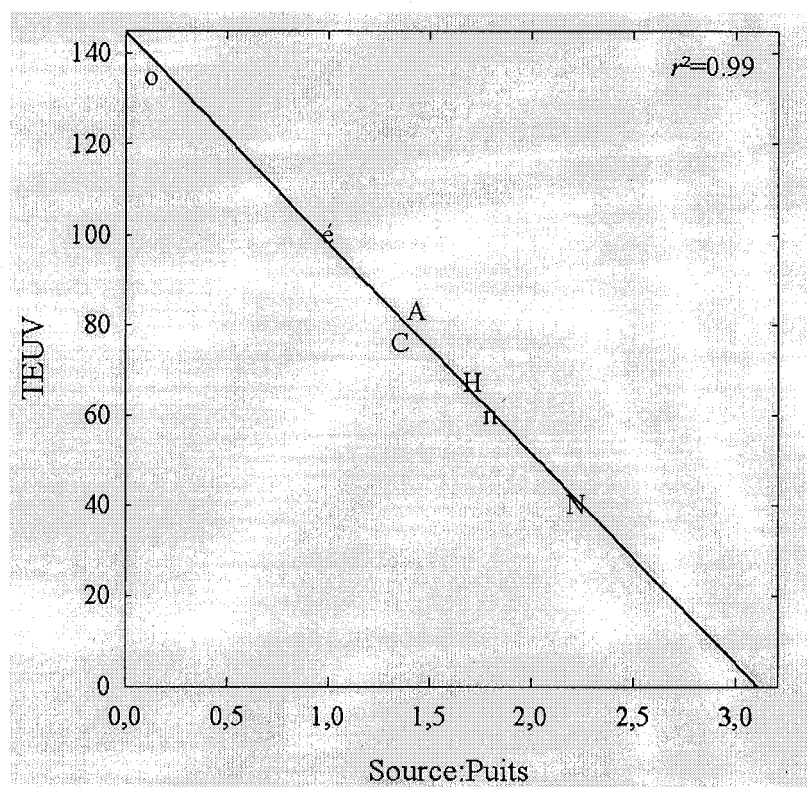


FIGURE 5-1. L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits et son lien avec la transmittance de l'épiderme aux UV (TEUV). L'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits prédit que, dans des conditions où la demande en énergie (puits) ne concorde pas avec l'offre (source), le déséquilibre métabolique ainsi créé provoquera des modulations dans la production de composés phénoliques qui se traduiront par des altérations de la TEUV mesurables par fluorescence. L'axe Source:Puits correspond au ratio des taux net de photosynthèse et croissance moyens, tels qu'exprimés en pourcentage par rapport aux témoins. Les valeurs de TEUV sont les moyennes des plants traités exprimées en pourcentage des moyennes des témoins. Remarquer que la valeur à l'équilibre (é), soit une TEUV de 100 % en condition d'équilibre source:puits (1,0), est ici incluse dans l'analyse à titre indicatif, bien qu'un facteur de stress n'occasionnant aucun déséquilibre n'ait encore été testé expérimentalement. Les autres valeurs présentées sont des données non publiées provenant de manuscrits rédigés dans le cadre de Séminaires de fin d'étude (sauf la donnée n, Mercure et al. 2004). Lorsque les chiffres n'étaient pas disponibles, les valeurs ont été évaluées à partir des graphiques présentés. o : courte photopériode (S:P=6,25:50 ; TEUV=135 %) ; n : carence azotée 25 % (S:P=82:45 ; TEUV=60 %) ; A : acide abscissique (S:P=76:53 ; TEUV=83 %) ; C : cuivre (S:P=65:48 ; TEUV=76 %) ; H : hypoxie (S:P=118:69 ; TEUV=67 %) ; N : carence azotée 20 % (S:P=100:45 ; TEUV=40 %).

\* Aucune indication quant au métabolisme source n'étant fournie dans ces cas, les valeurs de S ont été évaluées tel que présenté dans la Méthode. Noter que les valeurs ainsi évaluées, soit des activités photosynthétiques correspondant à 6,25 % et 82 % des valeurs témoins pour les conditions o et n, semblent réalistes. La valeur pour la condition 'n' évaluée à partir de la relation TEUV vs Source:Puits établie ici n'a pas été incluse dans le calcul du  $r^2$  et n'est présentée ici qu'à titre indicatif.

## 5.5 DISCUSSION

À ce jour, le potentiel d'utilisation des fluorescences induites par UV en tant qu'outil de détection des stress a maintes fois été rapporté. En effet, plusieurs groupes de recherche y travaillent activement et publient régulièrement des articles relatant les résultats souvent encourageants qu'ils ont obtenus en exploitant cette approche (Babani et Lichtenthaler, 1996; Heisel et al., 1996; Middleton et al., 1996; Corp et al., 1997; Barnes et al., 2000; Burchard et al., 2000; Langsdorf et al., 2000; Samson et al., 2000; Samson et al., 2000; Apostol et al., 2003; Corp et al., 2003). À leur niveau de synthèse maximale, ces données sont présentées sous forme de revues de littérature (Lichtenthaler et Miehe, 1997; Buschmann et Lichtenthaler, 1998; Cerovic et al., 1999). Ces revues, plus ou moins systématiques selon les cas, sont de plus en plus nombreuses à démontrer que les émissions de fluorescence typiques des plantes jouissent actuellement d'un excellent support empirique. Cependant, malgré plus de dix années d'un intérêt grandissant pour la question, un fil conducteur ne semble pas émerger des résultats exposés. Une telle cohérence est désormais souhaitée.

Notre effort en ce sens s'est caractérisé par la mise au point de plusieurs séries d'expérimentations dont la finalité allait au-delà de l'unique démonstration du potentiel d'utilisation des émissions de fluorescence dans le cas de conditions individuelles de stress. Plutôt, nous nous sommes attardés à tester les prédictions issues d'une hypothèse générale permettant d'expliquer physiologiquement les résultats obtenus. Cette approche conceptuelle, l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, suggère que des changements dans les activités sources ou puits, lorsqu'ils ne sont pas d'ampleur équivalente, mèneront à un déséquilibre qui provoquera des modulations métaboliques reflétées par des modifications des émissions de fluorescences induites par UV.

L'intérêt de l'approche ne réside pas seulement dans son aspect théoriquement invitant, mais trouve également sa justification dans l'avancée pratique qu'elle pourrait représenter. En effet, de nombreux stress des plantes de milieux cultivés et naturels sont caractérisés par l'écart à l'équilibre source:puits qu'ils engendrent. D'une importance particulière dans le domaine agronomique, se trouve par exemple la problématique des carences minérales et de leur suivi régulier (Van Alphen et Stoorvogel, 2000). Ces

conditions délétères sont effectivement reconnues pour affecter précocement et préférentiellement la croissance par rapport à la photosynthèse (Herms et Mattson, 1992). Or, comme elles sont susceptibles de provoquer d'importantes baisses de rendements (Taiz et Zeiger, 2002), toute avancée permettant d'en améliorer le contrôle par une meilleure gestion serait salutaire. La mise au point d'outils de détection de ce stress a été proposée comme pouvant concourir à l'amélioration de ce cas problème (Hail, 2002). En regard de cette application pratique, la fluorescence, sur une échelle de temps raisonnable, semble donc pouvoir faire partie de la solution.

Il en est de même pour le suivi des stress environnementaux qui, à ce jour, n'a su exploiter pleinement le potentiel des plantes vasculaires terrestres en tant qu'organismes bio-indicateurs. À ce titre, la toxicité causée par les métaux lourds de l'environnement, par la rupture de l'équilibre source:puits qu'elle sous-tend (Cook et al., 1997), pourrait devenir facilement identifiable par l'analyse des émissions de fluorescences induites par UV. Un tel programme de suivi environnemental ferait alors appel au cadre explicatif proposé par l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits pour interpréter les variations observées.

Pour concourir au développement de cette hypothèse, de nouvelles expérimentations devront être conçues et leurs résultats confrontés aux prédictions théoriques. Pour guider le choix des conditions qui seraient susceptibles d'améliorer l'état de nos connaissances, les constats émanant de la présente analyse pourraient avoir leur utilité. En effet, des six études incluses dans l'analyse, cinq utilisaient des facteurs causant une inhibition préférentielle de l'activité puits par rapport à l'activité source (S:p), et une seule reflétait le déséquilibre réciproque (s:P). Il pourrait ainsi s'avérer intéressant d'investiguer plus avant ce type de conditions expérimentales pour s'assurer de l'actuelle linéarité de la relation établie.

Bien qu'intéressants, les résultats de la présente analyse doivent être considérés comme préliminaires. En effet, seul un petit nombre d'échantillons a pu être inclus et certaines valeurs ont dû être estimées. Des conclusions plus robustes pourront être tirées suite à la prise en compte de nouveaux travaux.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION

#### 6.1 RAPPEL DES OBJECTIFS ET CONCLUSIONS SPECIFIQUES

Le présent projet visait essentiellement à étudier les manifestations physiologiques inhérentes à diverses formes d'induction de résistance. Pour ce faire, une étude séparée en trois volets distincts, mais conceptuellement reliés, a été menée. Deux de ceux-ci constituaient la phase expérimentale du projet effectuée sur le tournesol nain. L'autre correspondait à un travail d'analyse davantage théorique.

Dans un premier temps, l'analyse des émissions de fluorescence induite par UV a permis de constater que celles-ci n'offraient pas la possibilité de mettre en évidence une signature spectrale propre aux états de résistance induits par l'application d'acide jasmonique, d'acide salicylique ou de benzothiadiazole. Les émissions de fluorescence induite par lumière bleue, pour leur part, ont semblé pouvoir représenter un certain potentiel. Ces résultats requéraient un cadre explicatif cohérent. Ses fondements physiologiques allaient être confortés par les résultats obtenus lors de la seconde partie de la phase expérimentale et ses assises conceptuelles allaient être fournies par l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits.

Ainsi, dans le second volet expérimental, l'examen des effets des inducteurs de résistance sur la photosynthèse et l'expansion foliaire a permis de constater qu'un déséquilibre source:puits n'était pas perceptible au moment des mesures de fluorescence, soit 48 heures après l'application des inducteurs. Cette expérimentation a par ailleurs mené à la mise en évidence de l'inhibition de photosynthèse précoce causée par l'acide salicylique. Celle-ci se caractérisait par une baisse de 32 % du taux net d'assimilation de  $\text{CO}_2$  le jour suivant le traitement, diminution concordant avec des baisses de 23 % et 26 % de l'efficacité de carboxylation et du gradient de pH trans-thylakoïde. Cet inducteur ainsi que son analogue chimique, le benzothiadiazole, provoquaient par la suite une diminution de l'expansion foliaire. L'acide jasmonique, pour sa part, était le seul à n'impliquer aucun coût métabolique mesurable en termes de photosynthèse et de croissance foliaire.

Finalement, la méta-analyse des émissions de fluorescence de végétaux soumis à différents stress effectuée en fin de parcours a permis de montrer l'intéressante corrélation existant entre la transmittance de l'épiderme aux UV (TEUV), un paramètre de fluorescence induite par UV, et le ratio des activités photosynthétique et de croissance, un paramètre représentant le métabolisme source:puits. Cette relation était en droite ligne avec l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits dont elle constituait une démonstration tangible.

C'est ainsi que, sur la base des résultats obtenus lors des deux études de la phase expérimentale, il a été possible d'expliquer l'absence d'effets des inducteurs sur les émissions de fluorescence induite par UV. Ensemble, ces données suggéraient effectivement que la présence d'un déséquilibre source:puits lors d'un stress, tel que proposée par l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, était une condition nécessaire à l'observation d'altérations des fluorescences induites par UV. Ici, l'absence d'inhibition des métabolismes source et puits lors des mesures de fluorescence justifiait donc qu'aucune répercussion n'ait été mesurée par fluorescences induites par UV.

## 6.2 CONCLUSION GENERALE

Les diverses expériences effectuées au laboratoire au cours des dernières années nous mènent à penser que c'est le déséquilibre Source:Puits causé par un stress donné qui provoque des changements métaboliques détectables par fluorescences induites par UV. Ce déséquilibre implique que, des suites de l'exposition d'une plante à des conditions menant à une inhibition de croissance précédant toute inhibition de photosynthèse, une accumulation de sucres non structuraux sera provoquée, puis reliée à l'inhibition ultérieure de la photosynthèse qui s'ensuivra si les conditions normales ne sont pas rétablies. Dans le cas présent, il est peu probable qu'un déséquilibre Source:Puits ait été présent lors des mesures de fluorescences effectuées dès le surlendemain des traitements d'élicitation. Cette situation expérimentale où aucun déséquilibre Source:Puits n'était induit en réponse à un facteur de stress n'avait pas encore été étudiée dans le cadre du programme de recherche poursuivi au laboratoire de physiologie végétale de l'UQTR. L'assise conceptuelle du Déséquilibre Source:Puits l'envisageait toutefois (voir Figure 5-1, où le point 'é' représente cette situation à



l'équilibre) et prévoyait qu'elle ne devrait mener à aucun changement de fluorescence, tel que rapporté ici.

À ce titre, nos observations vont dans le sens de l'hypothèse de travail explorée au laboratoire et suggèrent la poursuite de cette investigation. Sur la base des résultats obtenus lors de la présente expérience, il est possible de proposer qu'à partir du sixième jour suivant les traitements, la croissance des plants induits à l'acide salicylique et à l'Actigard® étant significativement réduite et leur assimilation photosynthétique du carbone ne l'étant pas, le déséquilibre Source:Puits ainsi créé provoquera des changements de leurs émissions de fluorescence induite par UV. Détecter des changements de fluorescences induites par UV dans de telles conditions constituerait donc une confirmation supplémentaire de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits.

Les résultats issus du présent projet ont par ailleurs pu fournir des informations nouvelles en ce qui concerne les effets physiologiques qu'imposent les stress hormonaux/métaboliques d'induction de réponses défensives chez les plantes. Ces résultats contribuent à notre compréhension de ces phénomènes et s'inscrivent dans les priorités de recherche préconisées par certains auteurs (Bohnert et Sheveleva, 1998). Par ailleurs, en étudiant les effets physiologiques d'inducteurs de résistance dont les mécanismes sont appelés à être utilisés commercialement, le présent projet a voulu contribuer à remplir le fossé qui sépare encore les domaines appliqué et théorique de la biologie végétale. De tels rapprochements sont primordiaux dans l'optique de la « nouvelle biologie végétale » (Bazzaz, 2001) qui se dirige de plus en plus vers une considération globale de la plante dans son environnement, que celui-ci soit naturel ou modifié par l'homme pour servir ses besoins grandissants.

Dans une perspective plus académique, une appréciation des cadres de référence utilisés au cours du présent projet permet de proposer que l'adoption éventuelle d'une théorie unificatrice, tant dans les domaines de la défense des plantes que dans ceux de la fluorodétection des stress, sera graduelle et non révolutionnaire (visions popperienne vs kuhnienne; Chalmers, 1987). Ainsi, les hypothèses envisagées de plus en plus sérieusement sont caractérisées par leur degré d'inclusion grandissant des concepts les ayant précédés, et non par le rejet radical de leurs prédécesseurs et contemporains, alors

perçus comme obsolètes ou incompatibles. Ces approches inductivistes se bâtissent actuellement autour d'une accumulation d'observations qui entrent dans un cadre qui les synthétise.

Ainsi en est-il, par exemple, de l'hypothèse de la Croissance:Différenciation. Possédant déjà les attributs d'une théorie relativement mature, elle ne s'est jamais placée dans une position diamétralement opposée aux autres courants de pensée. Son état de maturation se caractérise par la suite qu'elle donne à un intérêt historique pour la question des défenses de plantes, le cadre de référence unifiant plusieurs hypothèses explicatives qu'elle fournit, et la synthèse nouvelle la rendant plus performante dont elle a fait l'objet (i.e. du concept original de Loomis en 1932 à l'actuelle version de Herms et Mattson, 1992). Cette réinterprétation repose sur l'utilisation des innovations techniques accomplies depuis sa formulation initiale (Robles et Desharnais, 2002). Son éventuelle progression vers le stade de Théorie devrait être accompagnée de l'intégration de composantes permettant de rendre compte d'un nombre grandissant de situations, reflet de la complexité sous-jacente à son objet d'intérêt, et de l'accumulation de mises en évidences empiriques diversifiées (e.g., aux points de vue méthodologiques, techniques, disciplinaires, etc.) qui élimineront les unes après les autres les hypothèses alternatives qui se présenteront. En fournissant ainsi un modèle de plus en plus sophistiqué par suite de modifications mineures et d'ajouts des détails requis pour expliquer plus convenablement la réalité, elle se placerait à l'abri des aléas de changements conceptuels radicaux, étoffes qui la conforteraient dans ce statut de Théorie. Ultiment, son succès à long terme dépendra davantage de l'accumulation d'études échouant dans leurs tentatives à en réfuter les généralisations, que de recherches menées dans le but spécifique de la renforcer et de rapprocher de plus en plus ses prédictions des faits.

De même, l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits, qui passe tout juste du stade inductif au stade hypothético-déductif (Mentis, 1988), devra se structurer et s'orienter, se pliant au passage aux aléas de nombreuses démonstrations empiriques. Aucun paradigme pré-existant n'étant mis au défi dans ce cas-ci, puisque ce cadre conceptuel fait figure de pionnier dans son champ de connaissance, sa formalisation est de bonne augure. Elle constituerait l'un de ces sous-produits essentiels de la méthode scientifique qui sont tant recherchés. L'interprétation physiologique des émissions de fluorescence

des végétaux est effectivement appelée à connaître une évolution nécessaire, fournissant alors un cadre particulier impliquant à la fois les hypothèses théoriques générales, les lois et les techniques nécessaires à son application. Son adoption par la communauté scientifique dépendra de son habileté à rendre compte d'un nombre grandissant de situations expérimentales et de sa capacité à s'intégrer au « monde réel ». Son succès à long terme reposera sur sa capacité à demeurer simple et cohérente et sur la faible occurrence de données « anormales » allant à l'encontre de ses prédictions. Cependant, ne pas reconnaître de telles anomalies sous prétexte qu'elles ne correspondraient pas au cadre de référence serait une entrave néfaste à sa progression. En effet, la conception de l'hypothèse du Déséquilibre Source:Puits n'en étant qu'à ses débuts, elle saura profiter des raffinements proposés par toute donnée d'abord perçue comme erratique (quoique de sévères anomalies ou l'accumulation de données non conformes aux prédictions constitueraient éventuellement un motif indéniable de rejet de l'hypothèse) (Graham et Dayton, 2002).

Pour aider à guider le choix des conditions de croissance qui auraient avantage à être testées dans cet effort, un schéma d'expériences inspiré des résultats obtenus à ce jour est proposé à la Figure 6-1. Ainsi, on y constate que les stress étudiés au laboratoire au cours des dernières années impliquaient tantôt une inhibition des activités puits (hypoxie, toxicité du cuivre, acide abscissique, carences azotées, courte photopériode) ou source (courte photopériode), tantôt une stimulation apparente des activités sources (hypoxie), tantôt une absence de changements dans le métabolisme source:puits (la présente expérience). À l'examen de ce schéma récapitulatif, on remarque d'abord qu'une seule condition de déséquilibre source:puits consistant en une réduction de l'acquisition de carbone plus grande que son utilisation a été testée. Cette situation, une photopériode quotidienne d'une heure, n'était toutefois pas susceptible de représenter un état réellement expérimenté par une plante en milieu naturel. En ce sens, il serait intéressant de rompre l'équilibre source:puits d'une plante en retirant ou couvrant certaines de ses feuilles, de manière à réduire son habileté à acquérir du carbone sans en modifier nécessairement l'accès aux nutriments. Cette démarche aurait l'avantage d'imiter une condition réelle, soit la défoliation exercée par les insectes brouteurs (Stamp, 2003). On constate également que l'aspect de stimulation du métabolisme puits

n'a pas encore été investigué, une piste de recherche qui pourrait s'avérer intéressante. Pour ce faire, il serait envisageable d'utiliser des parasites racinaires tels qu'*Orobranche* qui, en agissant littéralement comme des pompes à photoassimilats, augmenteraient le puits de carbone (Serghini et al., 2001) sans trop en affecter la source.

Les travaux menés dans les prochaines années sauront donc contribuer à l'évolution de ces champs de savoir tant par les retombées pratiques qu'ils permettront que par les implications fondamentales que chacun représentera dans la construction de ces sciences en essor. Leur succès à long terme reposera sur leur capacité à répondre à une nécessité sociale et à résoudre les problèmes qui les ont engendrés. La présente étude, nous l'espérons, aura collaboré à cet effort.

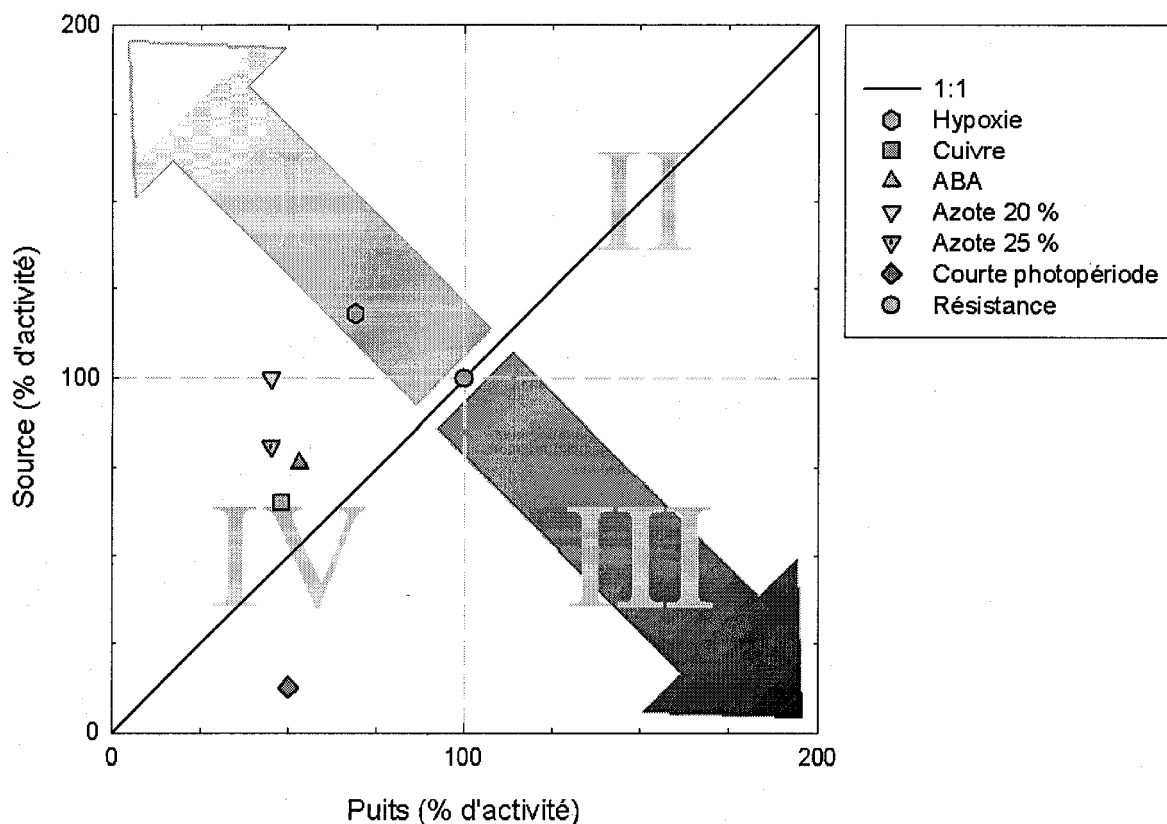


FIGURE 6-1. Schéma récapitulatif de diverses conditions de stress étudiées et des altérations au métabolisme source:puits et à la transmittance de l'épiderme aux UV (TEUV) qu'elles causent. Chaque point représente les résultats d'études indépendantes menées sur les facteurs de stress présentés dans la légende (voir Figure 5-1 pour les détails). L'intensité de gris de chacun des points placés sur la figure représente le pourcentage d'inhibition ou d'augmentation de la TEUV (par rapport au témoin) mesuré au cours des expériences dépeintes. Les dégradés de gris des flèches réfèrent au comportement prévu de la TEUV en réponse à des divergences de part et d'autre de l'équilibre Source:Puits (augmentation du pâle au foncé). Remarquer qu'un seul point se situe sur ou sous la ligne d'équilibre et que les conditions expérimentales d'augmentation du métabolisme puits (quadrants II et III) n'ont pas été investiguées à ce jour.

## **REMERCIEMENTS**

Françoise, Yves, Mariannick, Natacha, Rosalie, Sylvie, Martine et François, ma famille et source d'inspiration, je vous remercie pour votre soutien et votre présence de tous les instants. Bien que l'ayant déjà manifesté dans l'Avant-propos, je réitère toute ma reconnaissance pour mon directeur et ami, Guy Samson. Au laboratoire, l'aide précieuse et la collaboration de Sébastien, Émilie et Valérie m'ont été chères. Aux membres de mon Comité d'orientation, Hélène Glémet et Guy Charpentier, pour votre temps et vos conseils, merci.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADC** (1993) Operating manual for Leaf Chamber Analyser type LCA-4 (Issue 2). ADC BioScientific Ltd, Herts
- Agostini JP, Bushong PM, Timmer LW** (2003) Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease* **87**: 69-74
- Agrawal AA, Strauss SY, Stout MJ** (1999) Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. *Evolution* . Aug. **53**: 1093-1104
- Apostol S, Viau AA, Tremblay N, Briantais J-M, Prasher S, Parent L-É, Moya I** (2003) Laser-induced fluorescence signatures as a tool for remote monitoring of water and nitrogen stresses in plants. *Canadian Journal of Remote Sensing* **29**: 57-65
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601-639
- Avdiushko SA, Brown GC, Dahlman DL, Hildebrand DF** (1997) Methyl jasmonate exposure induces insect resistance in cabbage and tobacco. *Environmental Entomology* **26**: 642-654
- Babani F, Lichtenthaler HK** (1996) Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO<sub>2</sub> assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *Journal of Plant Physiology* **148**: 555-566
- Baillieux F, Genetet I, Kopp M, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S** (1995) A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: A fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant Journal* **8**: 551-560
- Balachandran S, Osmond CB, Daley PF** (1994) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves in vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* **104**: 1059-1065
- Baldwin IT, Schmelz EA, Zhang ZP** (1996) Effects of octadecanoid metabolites and inhibitors on induced nicotine accumulation in *Nicotiana sylvestris*. *Journal of Chemical Ecology* **22**: 61-74
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE, Baker NR** (2003) Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* **132**: 485-493
- Barnes PW, Searles PS, Ballare CL, Ryel RJ, Caldwell MM** (2000) Non-invasive measurements of leaf epidermal transmittance of UV radiation using chlorophyll fluorescence: Field and laboratory studies. *Physiologia Plantarum*. **109**: 274-283

- Bazzaz FA** (2001) Plant biology in the future. Proceedings of the National Academy of Sciences **98**: 5441–5445
- Bédard L** (2004) Fluorodétection de la phytotoxicité du cuivre chez le tournesol nain (*Helianthus annuus L.*) : relation physiologique entre l'inhibition de croissance et les variations de fluorescence. In Séminaire BIO-1001, UQTR, H-04
- Belefant MH, Porter DR, Pierce ML, Mort AJ** (1994) An early indicator of resistance in barley to Russian wheat aphid. Plant Physiology **105**: 1289-1294
- Benhamou N, Belanger RR** (1998) Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiology Rockville **118**: 1203-1212
- Benhamou N, Grenier J, Chrispeels MJ** (1991) Accumulation of Beta Fructosidase in the Cell Walls of Tomato Roots Following Infection by a Fungal Wilt Pathogen. Plant Physiology Rockville **97**: 739-750
- Berenbaum MR** (1995) The chemistry of defense: theory and practice. Proceedings of the National Academy of Sciences **92**: 2-8
- Bilger W, Veit M, Schreiber L, Schreiber U** (1997) Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. Physiologia Plantarum **101**: 754-763
- Black CA, Karban R, Godfrey LD, Granett J, Chaney WE** (2003) Jasmonic acid: A vaccine against leafminers (Diptera : Agromyzidae) in celery. Environmental Entomology **32**: 1196-1202
- Bohnert HJ, Sheveleva E** (1998) Plant stress adaptations -- making metabolism move. Current Opinion in Plant Biology **1**: 268-274
- Bourgoin D** (2004) L'acide abscissique est-il responsable des effets similaires de différents facteurs de stress sur les émissions de fluorescence chez le tournesol nain (*Helianthus annuus*). In Séminaire BIO-1001, UQTR, H-04
- Bryant JP, Chapin FS, III, Klein DR** (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. Oikos **40**: 357-368
- Burchard P, Bilger W, Weissenboeck G** (2000) Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. Plant Cell and Environment **23**: 1373-1380
- Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler HK** (2000) Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. Photosynthetica **38**: 483-491
- Buschmann C, Lichtenthaler HK** (1998) Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. Journal of Plant Physiology **152**: 297-314
- Cabello HF, Durst F, Jorrin JV, Werck RD** (1998) Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. Phytochemistry Oxford **49**: 1029-1036



- Carver TLW, Thomas BJ, Robbins MP, Zeyen RJ** (1998) Phenylalanine ammonia-lyase inhibition, autofluorescence, and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 223-243
- Cechin I, Fumis TD** (2004) Effect of nitrogen supply on growth and photosynthesis of sunflower plants grown in the greenhouse. *Plant Science* **166**: 1379-1385
- Cerovic ZG, Samson G, Morales F, Tremblay N, Moya I** (1999) Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: Present state and prospects. *Agronomie Paris*. Oct. Nov. **19**: 543-578
- Chalmers AF** (1987) Qu'est-ce que la science? recents developpements en philosophie des sciences : Popper, Kuhn, Lakatos, Feyerabend. La Découverte, Paris
- Chappelle EW, Wood FM, McMurtrey YE, Newcomb WW** (1984) Laser induced fluorescence of green plants. 3. LIF spectral signatures of five major plant types. *Applied Optics* **24**: 74-80
- Cheng WX, Sims DA, Luo YQ, Coleman JS, Johnson DW** (2000) Photosynthesis, respiration, and net primary production of sunflower stands in ambient and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations: an invariant NPP : GPP ratio? *Global Change Biology* **6**: 931-941
- Chishaki N, Horiguchi T** (1997) Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Science and plant nutrition* **43 SI**: 987 - 991
- Ciampi S, Gentili E, Guidi L, Soldatini GF** (1996) The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Science* **118**: 177-184
- Cipollini D, Purrington CB, Bergelson J** (2003) Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology* **4**: 79-85
- Cipollini DF, Sipe ML** (2001) Jasmonic acid treatment and mammalian herbivory differentially affect chemical defenses and growth of wild mustard (*Brassica kaber*). *Chemoecology* **11**: 137-143
- Close D, McArthur C, Paterson S, Fitzgerald H, Walsh A, Kincade T** (2003) Photoinhibition: A link between effects of the environment on eucalypt leaf chemistry and herbivory. *Ecology* **84**: 2952-2966
- Close DC, McArthur C** (2002) Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage not herbivores? *Oikos* **99**: 166-172
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FS, III** (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**: 895-899
- Collin J** (2003) Dispositifs expérimentaux BVG - 60678 Notes de cours,
- Conconi A, Miquel M, Browse JA, Ryan CA** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linolenic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology* **111**: 797-803

- Cook CM, Kostidou A, Vardaka E, Lana T** (1997) Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of Phaseolus plants. *Photosynthetica* **34**: 179-193
- Corp LA, McMurtrey JE, Chappelle EW, Daughtry CST, Kim MS** (1997) UV band fluorescence (in vivo) and its implications for the remote assessment of nitrogen supply in vegetation. *Remote Sensing of Environment* **61**: 110-117
- Coruzzi G, Bush DR** (2001) Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiology* **125**: 61-64
- Costet L, Cordelier S, Dorey S, Baillieul F, Fritig B, Kauffmann S** (1999) Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Molecular Plant Microbe Interactions* **12**: 655-662
- Costet L, Fritig B, Kauffmann S** (2002) Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus-infected tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **115**: 228-235
- Creelman RA, Mullet JE** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4114-4119
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 355-381
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833
- de Bruxelles G, Roberts M** (2001) Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Critical Reviews in plant sciences* **20**: 487-521
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut RM, Kessmann H, Ward E, Ryals J** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-1250
- Dempsey DA, Shah J, Klessig DF** (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**: 547-575
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature London*. [print] **411**: 843-847
- Dixon RA, Harrison MJ, Paiva NL** (1995) The isoflavonoid phytoalexin pathway: From enzymes to genes to transcription factors. *Physiologia Plantarum* **93**: 385-392
- Dixon RA, Paiva NL** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097
- Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA** (1995) Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4095-4098

- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K** (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence: A review. *Gene* **179**: 45-51
- Dorey S, Baillieul F, Pierrel MA, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S** (1997) Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant Microbe Interactions* **10**: 646-655
- Drew MC** (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 223-250
- Edwards R, Stones SM, Gutierrez MMC, Jorin J** (1997) Characterization and inducibility of a scopoletin-degrading enzyme from sunflower. *Phytochemistry* **45**: 1109-1114
- Eichelmann H, Laisk A** (1999) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content, assimilatory charge, and mesophyll conductance in leaves. *Plant Physiology* **119**: 179-189
- Fang Y, Smith MAL, Pepin MF** (1999) Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). In *Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* **35**: 106-113
- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A** (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* **41**: 281-284
- Farmer EE** (2001) Surface-to-air signals. *Nature* **411**: 854-856
- Farmer EE, Almeras E, Krishnamurthy V** (2003) Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 372-378
- Farmer EE, Ryan CA** (1990) Interplant Communication Airborne Methyl Jasmonate Induces Synthesis of Proteinase Inhibitors in Plant Leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7713-7716
- Farmer EE, Ryan CA** (1992) Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134
- Feeny P** (1976) Plant apparency and chemical defence. *Recent Advances in Phytochemistry* **10**: 1-40
- Finney DJ** (1995) A statistician looks at met-analysis. *Journal of Clinical Epidemiology* **48**: 87-103
- Fritig B, Legrand M, Hirth L** (1972) Changes in the metabolism of phenolic compounds during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. *Virology* **47**: 845-848

- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756
- Gatehouse JA** (2002) Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* **156**: 145-169
- Genty B, Harbison J** (1996) Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. *In* NR Baker, ed, *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 67-99
- Gorlach J, Volrath S, Knauf BG, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**: 629-643
- Goy PA, Signer H, Reist R, Aichholz R, Blum W, Schmidt E, Kessmann H** (1993) Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* X *Nicotiana debneyi*. *Planta Heidelberg* **191**: 200-206
- Grace SC, Logan BA** (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**: 1499-1510
- Graham MH, Dayton PK** (2002) On the evolution of ecological ideas: paradigms and scientific progress. *Ecology* **83**: 1481-1489
- Graham MY, Graham TL** (1991) Rapid Accumulation of Anionic Peroxidases and Phenolic Polymers in Soybean Cotyledon Tissues Following Treatment with *Phytophthora-Megasperma-F-Sp-Glycinea* Wall Glucan. *Plant Physiology* **97**: 1445-1455
- Grant M, Mansfield J** (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 312-319
- Groeneveld HW, Bergkotte M** (1996) Cell wall composition of leaves of an inherently fast- and an inherently slow-growing grass species. *Plant Cell and Environment* **19**: 1389-1398
- Grubb PJ** (1992) A positive distrust in simplicity - lessons from plant defences and from competition among plants and among animals. *Ecology* **80**: 585-610
- Gutierrez CMA, Trejo LC, Larque SA** (1998) Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry Paris* **36**: 563-565
- Gutierrez MC, Parry A, Tena M, Jorin J, Edwards R** (1995) Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* **38**: 1185-1191
- Hail RS** (2002) Assessing the risks associated with new agricultural practices. *Nature* **418**: 685-688
- Hák R, Rinderle ZU, Lichtenthaler HK, Nátr L** (1993) Chlorophyll a fluorescence signatures of nitrogen deficient barley leaves. *Photosynthetica Prague* **28**: 151-159

- Halitschke R, Schittko U, Pohnert G, Boland W, Baldwin IT** (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiology* **125**: 711-717
- Hawkes CV, Sullivan JJ** (2001) The impact of herbivory on plants in different resource conditions: A meta-analysis. *Ecology* **82**: 2045-2058
- Heil M** (2001) The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology* **107**: 137-146
- Heil M, Baldwin IT** (2002) Fitness costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**: 61-67
- Heil M, Bostock RM** (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* **89**: 503-512
- Heisel F, Sowinska M, Miehe JA, Lang M, Lichtenthaler HK** (1996) Detection of nutrient deficiencies of maize by laser induced fluorescence imaging. *Journal of Plant Physiology* **148**: 622-631
- Heldt HW** (1979) Light-dependent changes of stromal H<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentration controlling CO<sub>2</sub> fixation. In M Gibbs, E Latzko, eds, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 6. Springer-Verlag, Berlin, pp 202-207
- Hendry GAF, Price AH** (1993) Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In *Methods in comparative plant ecology*, pp 148-152
- Herms DA, Mattson WJ** (1992) The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**: 283-335
- Hopkins WG, Hüner NPA** (2004) *Introduction to plant physiology*, Ed third. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.
- Huang J-S** (2001) *Plant pathogenesis and resistance : biochemistry and physiology of plant-microbe interactions*. Kluwer Academic, Boston
- Hunt MD, Neuenschwander UH, Delaney TP, Weymann KB, Friedrich LB, Lawton KA, Steiner HY, Ryals JA** (1996) Recent advances in systemic acquired resistance research: A review. *Gene* **179**: 89-95
- Hutcheson SW** (1998) Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 59-90
- Inbar M, Doostdar H, Gerling D, Mayer RT** (2001) Induction of systemic acquired resistance in cotton by BTH has a negligible effect on phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **99**: 65-70
- Ibrahim G** (2004) Relation physiologique entre l'inhibition de croissance et les variations de fluorescence chez le tournesol nain (*Helianthus annuus*) induites par une carence en azote. In Séminaire BIO-1001, UQTR, H-04
- Iriti M, Faoro F** (2003) Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? *Journal of Plant Pathology* **85**: 265-270

- Jackson AO, Taylor CB** (1996) Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell* **8**: 1651-1668
- Janda T, Szalai G, Tari I, Paldi E** (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta Berlin* **208**: 175-180
- Jelitto VDEP, Vidal S, Denecke J** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: A novel early response before pathogenesis-related gene induction. *Plant Cell* **11**: 1935-1943
- Johnson GA, Mantha SV, Day TA** (2000) A spectrofluorometric survey of UV-induced blue-green fluorescence in foliage of 35 species. *Journal of Plant Physiology* **156**: 242-252
- Johnson GN, Young AJ, Horton P** (1994) Activation of non-photochemical quenching in thylakoids and leaves. *Planta* **194**: 550-556
- Jung JL, Fritig B, Hahne G** (1993) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins: Induction by aspirin (acetylsalicylic acid) and characterization. *Plant Physiology Rockville* **101**: 873-880
- Kamisaka S, Takeda S, Takahashi K, Shibata K** (1990) Diferulic and ferulic acid in the cell wall of avena coleoptiles their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiologia Plantarum* **78**: 1-7
- Karban R, Baldwin IT** (1997) Induced responses to herbivory. University of Chicago Press, Chicago
- Kauffmann S, Dorey S, Fritig B** (2000) Les stratégies de défense. *Pour la Science*: 116-121
- Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin J-C, Kloareg B, Fritig B** (2003) Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16**: 115-121
- Klessig DF, Malamy J** (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* **26**: 1439-1458
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U** (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Rockville* **128**: 1046-1056
- Kolb CA, Kaeser MA, Kopecky J, Zotz G, Riederer M, Pfuendel EE** (2001) Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology Rockville* **127**: 863-875
- Krause GH, Weis E** (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review in Plant Molecular Biology* **42**: 313-349

- Kshirsagar A, Reid AJ, McColl SM, Saunders VA, Whalley AJS, Hilary Evans E** (2001) The effect of fungal metabolites on leaves as detected by chlorophyll fluorescence. *New Phytologist* **151**: 451-457
- Kuc J** (2000) Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop Protection* **19**: 859-861
- Kuc J** (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 7-12
- Lam E, Kato N, Lawton M** (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL** (1998) *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, New York
- Lamothe A** (2003) Relation physiologique entre l'inhibition de croissance et les variations de fluorescences chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) soumis à un stress hypoxique. *In Séminaire BIO-1001, UQTR, A-03*,
- Lang M, Stober F, Lichtenthaler HK** (1991) Fluorescence Emission Spectra of Plant Leaves and Plant Constituents. *Radiation and Environmental Biophysics* **30**: 333-347
- Langsdorf G, Buschmann C, Sowinska M, Babani F, Mokry M, Timmermann F, Lichtenthaler HK** (2000) Multicolour fluorescence imaging of sugar beet leaves with different nitrogen status by flash lamp UV-excitation. *Photosynthetica Prague* **38**: 539-551
- Lawlor DW, Cornic G** (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 275-294
- Lehman RH, Rice EL** (1972) Effect of Deficiencies of Nitrogen, Potassium and Sulfur on Chlorogenic Acids and Scopolin in Sunflower. *American Midland Naturalist* **87**: 71-80
- Leon J, Rojo E, Sanchez SJJ** (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1-9
- Li C, Liu G, XU C, Lee GI, Bauer P, Ling H-Q, Ganai MW, Howe GA** (2003) The tomato *Suppressor of prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell* **15**: 1646-1661
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *In* SP Colowick, Kaplan, N.O., ed, *Methods in Enzymology*, Vol 148. Academic Press, San Diego - New York - Berkeley - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto, pp 350-382
- Lichtenthaler HK, Babani F, Langsdorf G, Buschmann C** (2000) Measurement of differences in red chlorophyll fluorescence and photosynthetic activity between sun and shade leaves by fluorescence imaging. *Photosynthetica Prague* **38**: 521-529

- Lichtenthaler HK, Miede JA** (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in plant science* **2**: 316-320
- Lichtenthaler HK, Rinderle U** (1988) The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions of plants. *CRC Critical reviews in analytical chemistry* **19**: s29-s85
- Lichtenthaler HK, Schweiger J** (1998) Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology* **152**: 272-282
- Logan BA, Demmig AB, Adams WW, III, Grace SC** (1998) Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. acclimated to four growth PFDs in the field. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1869-1879
- Long S, Farage P, Garcia R** (1996) Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1629-1662
- Long SP, Bernacchi CJ** (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2393-2401
- Lorimer GH, Badger MR, Andrews TJ** (1976) The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry* **15**: 529-536
- Lou YG, Baldwin IT** (2004) Nitrogen supply influences herbivore-induced direct and indirect defenses and transcriptional responses to *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **135**: 496-506
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ** (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of performed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7802-7806
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I** (1990) Salicylic Acid a Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science* **250**: 1002-1004
- Markstädter C, Queck I, Baumeister J, Riederer M, Schreiber U, Bilger W** (2001) Epidermal transmittance of leaves of *Vicia faba* for UV radiation as determined by two different methods. *Photosynthesis Research* **67**: 17-25
- Mazeyrat F, Mouzeyar S, Nicolas P, De LDT, Ledoigt G** (1998) Cloning, sequence and characterization of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogen-induced gene showing sequence homology with auxin-induced genes from plants. *Plant Molecular Biology* **38**: 899-903
- McCarty RE, Jagendorf AJ** (1965) Chloroplast damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids. *Plant Physiology* **40**: 725-735



- McKey D** (1974) Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist* **108**: 305-320
- Mentis MT** (1988) Hypothetico-deductive and inductive approaches in ecology. *Functional Ecology* **2**: 5-14
- Mercure S-A, Daoust B, Samson G** (2004) Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants. *Canadian Journal of Botany* **82**: 815-821
- Métraux J-P** (2002) Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in plant science* **7**: 332-334
- Metzner H** (1978) Photosynthetic oxygen evolution. Academic Press, New York
- Meuwly P, Molders W, Buchala A, Métraux JP** (1995) Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiology* **109**: 1107-1114
- Middleton EM, Chappelle EW, Cannon TA, Adamse P, Britz SJ** (1996) Initial assessment of physiological response to UV-B irradiation using fluorescence measurements. *Journal of Plant Physiology* **148**: 69-77
- Moore JP, Taylor JE, Paul ND, Whittaker JB** (2003) Reduced leaf expansion as a cost of systemic induced resistance to herbivory. *Functional Ecology* **17**: 75-81
- Morales F, Cerovic ZG, Moya I** (1996) Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta* **3**: 251-262
- Moran PJ, Cheng Y, Cassell JL, Thompson GA** (2002) Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **51**: 182-203
- Mueller MJ** (1997) Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **100**: 653-663
- Nicholson RL, Hammerschmidt R** (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review in Phytopathology* **30**: 369-389
- Nilsson H-E** (1995) Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Annual Review in Phytopathology* **15**: 489-527
- Ning L, Edwards GE, Strober GA, Daley LS, Callis JB** (1995) Imaging fluorometer to detect pathological and physiological changes in plants. *Applied Spectroscopy* **49**: 1381-1389
- Nobel PS** (1999) *Physicochemical and environmental plant physiology*, Ed 2nd. Academic Press, San Diego
- Norman C, Howell KA, Millar AH, Whelan JM, Day DA** (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology* **134**: 492-501

- Olson MM, Roseland CR** (1991) Induction of the Coumarins Scopoletin and Ayapin in Sunflower by Insect-Feeding Stress and Effects of Coumarins on the Feeding of Sunflower Beetle Coleoptera Chrysomelidae. *Environmental Entomology* **20**: 1166-1172
- Oswald O, Martin T, Dominy PJ, Graham IA** (2001) Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 2047-2052
- Ounis A, Cerovic ZG, Briantais JM, Moya I** (2001) Dual-excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Remote Sensing of Environment* **76**: 33-48
- Pancheva TV, Popova LP, Uzunova AN** (1996) Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology* **149**: 57-63
- Pankovic D, Sakac Z, Kevresan S, Plesnicar M** (1999) Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *Journal of Experimental Botany* **50**: 127-138
- Pare PW, Tumlinson JH** (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology Rockville* **121**: 325-331
- Paul MJ, Driscoll SP** (1997) Sugar repression of photosynthesis: The role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant Cell and Environment* **20**: 110-116
- Pieterse CMJ, Van WSCM, Van PJA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, Van LLC** (1998) A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1571-1580
- Piffanelli P, Devoto A, Schulze-Lefert P** (1999) Defence signalling pathways in cereals. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 295-300
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**: 384-394
- Portis ARJ** (1992) Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 415-437
- Rakwal R, Komatsu S** (2001) Jasmonic acid-induced necrosis and drastic decreases in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice seedlings under light involves reactive oxygen species. *Journal of Plant Physiology* **158**: 679-688
- Rao MV, Lee Hi, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR** (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**: 1633-1646
- Raskin I** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 439-463

- Redman AM, Cipollini DF, Jr., Schultz JC** (2001) Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia Berlin* **126**: 380-385
- Reinbothe C, Parthier B, Reinbothe S** (1997) Temporal pattern of jasmonate-induced alterations in gene expression of barley leaves. *Planta* **201**: 281-287
- Reinbothe S, Mollenhauer B, Reinbothe C** (1994) JIPs and RIPs: The Regulation of Plant Gene Expression by Jasmonates in Response to Environmental Cues and Pathogens. *Plant Cell* **6**: 1197-1209
- Reymond P, Farmer EE** (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 404-411
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. [print] May **12**: 707-719
- Robinson MP, Atkinson HJ, Perry RN** (1988) The association and partial characterisation of a fluorescent hypersensitive response of potato roots to the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nématologie* **11**: 99-107
- Robles C, Desharnais R** (2002) History and current development of a paradigm of predation in rocky intertidal communities. *Ecology* **83**: 1521-1536
- Rogers A, Ellsworth DS, Humphries SW** (2001) Possible explanation of the disparity between the in vitro and in vivo measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1555-1561
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14**: S185-S205
- Rothman KJ, Greenland S** (1998) *Modern Epidemiology*, Ed 2nd. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
- Ryan CA** (1990) Protease inhibitors in plants : Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review in Phytopathology* **28**: 425-449
- Samson G, Bruce D** (1996) Origins of the low yield of chlorophyll a fluorescence induced by single turnover flash in spinach thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1276**: 147-153
- Samson G, Dextraze L, Tremblay N, Wollring J** (2000) Prediction of leaf nitrogen content and relative growth rate in corn by laser-induced fluorescence. *In* Progress report on the laser-induced fluorescence project, pp 1-15
- Samson G, Tremblay N, Dudelzak AE, Babichenko SM, Dextraze L, Wollring J** (2000) Nutrient stress of corn plants: early detection and discrimination using a compact multiwavelength fluorescence lidar. *In* Proceedings of the EARSeL Workshop on LIDAR Remote Sensing of Land and Sea, Dresden, Germany, pp 1-8

- Sauerborn J, Buschmann H, Ghiasi KG, Kogel KH** (2002) Benzothiadiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasitic weed *Orobanche cumana*. *Phytopathology* **92**: 59-64
- Schittko U, Hermsmeier D, Baldwin IT** (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. *Plant Physiology Rockville* **125**: 701-710
- Scholes JD, Rolfe SA** (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): Quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* **199**: 573-582
- Schweiger J, Lang M, Lichtenthaler HK** (1996) Differences of fluorescence excitation spectra of leaves between stressed and non-stressed plants. *Journal of Plant Physiology* **148**: 536-547
- Serghini K, Luque APd, Castejón-Muñoz M, García-Torres L, Jorrín JV** (2001) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2227-2234
- Shah J** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 365-371
- Sims DA, Cheng WX, Luo YQ, Seemann JR** (1999) Photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub> in a sunflower canopy. *Journal of Experimental Botany* **50**: 645-653
- Slesak E, Slesak M, Gabrys B** (2001) Effect of methyl jasmonate on hydroxamic acid content, protease activity, and bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) probing behavior. *Journal of Chemical Ecology* **27**: 2529-2543
- Smart CD, Myers KL, Restrepo S, Martin GB, Fry WE** (2003) Partial resistance of tomato to *Phytophthora infestans* is not dependent upon ethylene, jasmonic acid, or salicylic acid signaling pathways. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16**: 141-148
- Smith CJ** (1996) Tansley Review No. 86: Accumulation of phytoalexins: Defence mechanism and stimulus response systems. *New Phytologist* **132**: 1-45
- Spletzer ME, Enyedi AJ** (1999) Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology* . Sept. **89**: 722-727
- Stamp N** (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology* **78**: 23-55
- Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, Graham I, Martin T, Crozier A** (2001) The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell and Environment* **24**: 1189-1197
- Stitt M, Krapp A** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell and Environment* **22**: 583-621

- Stober F, Lichtenthaler HK** (1993) Characterization of the laser-induced blue, green and red fluorescence signatures of leaves of wheat and soybean grown under different irradiance. *Physiologia Plantarum* **88**: 696-704
- Stober F, Lichtenthaler HK** (1993) Studies on the constancy of the blue and green fluorescence yield during the chlorophyll fluorescence induction kinetics (Kautsky effect). *Radiation and Environmental Biophysics* **32**: 357-365
- Stotz HU, Kroymann J, Mitchell-Olds T** (1999) Plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 268-272
- Stout MJ, Fidantsef AL, Duffey SS, Bostock RM** (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack: Systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **54**: 115-130
- Stout MJ, Zehnder GW, Baur ME** (2002) Potential for the Use of Elicitors of Plant Resistance in Arthropod Management Programs. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **51**: 222-235
- Strauss SY, Rudgers JA, Lau JA, Irwin RE** (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 278-285
- Subhash N, Mazzinghi P, Agati G, Fusi F, Lercari B** (1995) Analysis of laser-induced fluorescence line shape of intact leaves: application to UV stress detection. *Photochemistry and Photobiology* **62**: 711-718
- Taiz L, Zeiger E** (2002) *Plant Physiology*, Ed third. Sunauer Associates, Inc., Sunderland
- Tal B, Robeson DJ** (1986) The induction, by fungal inoculation, of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* **25**: 77-79
- Tal B, Robeson DJ** (1986) The metabolism of sunflower phytoalexins ayapin and scopoletin. *Plant Physiology* **82**: 167-172
- Tang X, Rolfe SA, Scholes JD** (1996) The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **19**: 967-975
- Tétrault-Garneau L** (2004) Importance de la relation source-puits sur les émissions de fluorescence chez le tournesol nain, *Helianthus annuus*. In Séminaire BIO-1001, UQTR, H-04,
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor DW** (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1781-1791
- Theis N, Lerdau M** (2003) The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* **164**: S93-S102
- Tosi L, Luigetti R, Zizzerini A** (1999) Benzothiadiazole induces resistance to *Plasmopara helianthi* in sunflower plants. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **147**: 365-370

- Uzunova AN, Popova LP** (2000) Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica Prague* **38**: 243-250
- Vallélian-Bindschedler L, Métraux J-P, Schweizer P** (1998) Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Molecular Plant Microbe Interactions* **11**: 702-705
- Van Alphen BJ, Stoorvogel JJ** (2000) A methodology for precision nitrogen fertilization in high-input farming systems. *Precision Agriculture* **2**: 319-332
- van Dam NM, Baldwin JT** (2001) Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotina attenuata*. *Functional Ecology* **15**: 406-415
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews in Phytopathology* **36**: 453-483
- Vanacker H, Lu H, Rate DN, Greenberg JT** (2001) A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **28**: 209-216
- Veteli TO, Kuokkanen K, Julkunen-Tiitto R, Roininen H, Tahvanainen J** (2002) Effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on plant growth and herbivore defensive chemistry. *Global Change Biology* **8**: 1240-1252
- Vom ED, Kijne JW, Memelink J** (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: What regulates the regulators? *Phytochemistry Oxford* **61**: 107-114
- von Caemmerer S, Farquhar GD** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376-387
- von Ropenack E, Parr A, Schulze-Lefert P** (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 9013-9022
- Wagner H, Gilbert M, Wilhelm C** (2003) Longitudinal leaf gradients of UV-absorbing screening pigments in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* **117**: 383-391
- Walling LL** (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 195-216
- Walters DR, Mitchell AF, Hampson J, McPherson A** (1993) The induction of systemic resistance in barley to powdery mildew infection using salicylates and various phenolic acids. *Annals of Applied Biology* **122**: 451-456
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl GP, Métraux JP, Ryals JA** (1991) Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **3**: 1085-1094
- Warden JT, Csatorday K** (1987) On the mechanism of linolenic acid inhibition in Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* **890**: 215-223

- Wasternack C, Hause B** (2002) Jasmonates and octadecanoids : signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleid Acid Research and Molecular Biology* **72**: 165-221
- Waterman PG, Mole S** (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Weber H** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 217-224
- Whitmarsh J, Ort DR** (1984) Stoichiometries of electron transport complexes in spinach chloroplasts. *Archives of biochemistry and biophysics* **231**: 378-389
- Wright DP, Baldwin BC, Shephard MC, Scholes JD** (1995) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**: 237-253
- Wright DP, Baldwin BC, Shephard MC, Scholes JD** (1995) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**: 255-267
- Wurms K, Labbe C, Benhamou N, Belanger RR** (1999) Effects of Milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* **89**: 728-736
- Xu Y, Chang PFL, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM, Bressan RA** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**: 1077-1085
- Zhou XM, MacKenzie AF, Madramootoo CA, Smith DL** (1999) Effects of stem-injected plant growth regulators, with or without sucrose, on grain production, biomass and photosynthetic activity of field-grown corn plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* **183**: 103-110