



HAL
open science

Stress photooxydatif et mécanismes de tolérance en réponse à un herbicide, le clomazone, chez deux variétés de tabac (*Nicotiana tabacum* L.)

Majd Darwish

► **To cite this version:**

Majd Darwish. Stress photooxydatif et mécanismes de tolérance en réponse à un herbicide, le clomazone, chez deux variétés de tabac (*Nicotiana tabacum* L.). Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2014. Français. NNT : 2014AVIG0662 . tel-02945328

HAL Id: tel-02945328

<https://theses.hal.science/tel-02945328>

Submitted on 22 Sep 2020

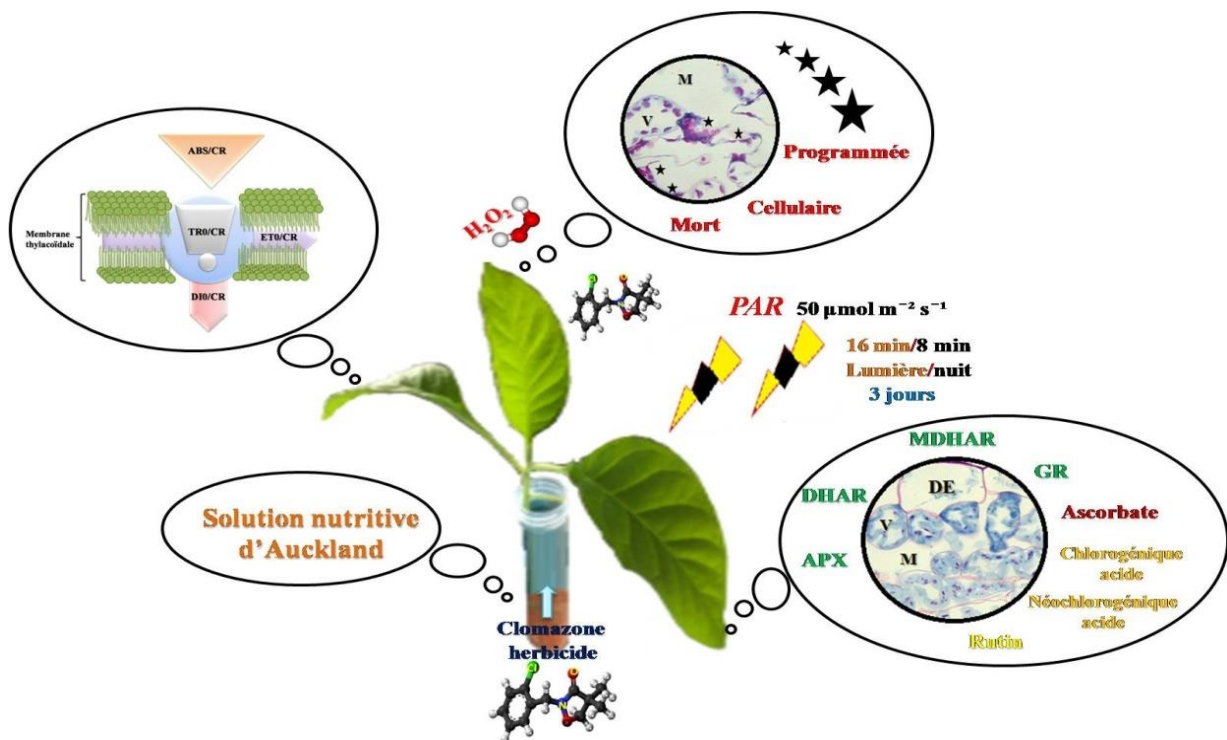
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Stress photooxydatif et mécanismes de tolérance en réponse à un herbicide, le clomazone, chez deux variétés de tabac (*Nicotiana tabacum* L.)

THÈSE
Présentée
Par
Majd DARWISH

Pour l'obtention du Titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET PAYS DES VAUCLUSE
Spécialité: **Physiologie et Biologie végétales**



Soutenu publiquement le 11 décembre 2014 devant le jury composé de

Mohammed El Maataoui
Daniel LAFFRAY
Gérard LEDOIGT
Adnane HITMI
Huguette SALLANON
Félicie LOPEZ-LAURI

Professeur, Université d'Avignon
Professeur, Université de Paris Est-Créteil
Professeur, Université Blaise-Pascal
Maître de conférences, Université d'Auvergne
Professeur, Université d'Avignon
Maître de conférences, Université d'Avignon

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

Remerciements

Parmi toutes les personnes à qui je souhaite adresser mes plus sincères remerciements, Huguette SALLANON est la première, qui a dirigé ce travail de thèse. Je la remercie pour m'avoir encadré avec enthousiasme et dynamisme dans ces idées prospères et pour avoir encouragé les miennes. Sa disponibilité, sa confiance et son ouverture aux discussions argumentées m'ont permis de trouver tout le soutien qui m'était nécessaire au cours de ces quatre années.

Je voudrais remercier également mon co-directrice Félicie Lopez-Lauri pour m'encadrer sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail de thèse. Je la remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir rendu possible cette collaboration.

Je remercie particulièrement Mohamed EL Maataoui avec qui j'ai partagé beaucoup d'heurs en effectuant quelques unes de mes expérimentations mais aussi ses chaleureux encouragements et son aide dans la correction des articles.

Je remercie du fond du cœur Véronique Vidal pour sa collaboration, sa précieuse aide, sa disponibilité et sa sympathie.

Un énorme merci à l'ensemble de l'équipe du Laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes: Laurent Urban, Jawad Aarouf, Florence Charles, David Roux, Frank Lacroix, Sandrine Laurent, Florence Léautier, Emmanuelle Arnoux et Saad Mellah.

Je tiens à remercier les membres du jury Mr Daniel LAFFRAY, Mr Gérard LEDOIGT et Mr Adnane HITMI pour avoir accepté de juger mon travail.

Dans tous les moments difficiles que j'ai endurés, j'ai toujours pu compter sur toi pour me reconforter et m'aider à trouver des solutions. Je voulais que tu saches à quel point ton soutien a été d'une grande aide pour moi. Ma merveilleuse, splendide épouse, tu es d'une très grande importance dans ma vie. Je te remercie infiniment ma chérie Ola.

Mes remerciements chaleureux vont à mes chers parents, mes frères et sœurs grâce à qui, entre autre, je suis aujourd'hui arrivé à cette étape capitale et décisive de ma courte vie.

Mes remerciements vont également à mon pays, la Syrie, qui m'a permis de terminer cette formation, en me fournissant les ressources nécessaires disponibles, en souhaitant de revenir en situation de paix, loin de la violence et prospère. Que tous ceux qui ont contribué à faciliter

cette étude dans ce cadre trouvent ici le témoignage de ma sincère gratitude. Un grand merci également à tous les membres de l'ambassade de Syrie à Paris, et tous les professeurs à la faculté d'agronomie de l'Université Tishreen (Lattaquié-Syrie), en particulier à M. Mohammad Moalla, M. Nazih Rakeih et M. Nizar Harba.

Un clin d'œil à tous les doctorants qui ont soutenue leur thèse: "Ammi" Salah Nofal, Wissam Shaheen, Myssam Khadam, Sanders Junglee, Chayma Ouhibi, Astridkim Raimbault et Cristiane Morgado, et ceux qui ne l'ont pas encore soutenue: Mônica Lopez, Phrutiya Nilprapruck, Oussama Alnasir et Héliarion Vásquez.

De plus, mes remerciements seront incomplets si je ne fais pas mention de mes amis, Rezk, Ahmad, Mesbah, Karim, Adrien, Nathan, Thibaud, Stéphane, Simo, Mathieu, Réjane, Mélanie, Houda, Louise, Luciane, Mathilde, Guilia, Camille, Cloé, Anaïd, Dalia, Nadine, Marie, Balkis, Lea, Isabelle, Marine.

Merci à tous.

Table des matières

Introduction générale	13
Chapitre I: Synthèse bibliographique	17
1. Le tabac: présentation de la plante, origine et histoire	18
2. Les herbicides.....	20
<i>Le clomazone: exploitation et mode d'action</i>	20
3. Action des herbicides sur le fonctionnement photosynthétique	23
3.1. Rappels sur les réactions photochimiques de la photosynthèse	23
3.1.1. La structure du photosystème II (PSII).....	24
3.1.1.1. Le centre réactionnel	25
3.1.1.2. Les antennes collectrices de lumière du Photosystème II (PSII)	26
3.1.1.3. Le complexe de la photolyse de l'eau	26
3.1.2. Structure et fonctionnement du photosystème I (PSI)	27
3.1.3. Fonctionnement de la chaîne de transport des électrons.....	28
3.1.3.1. Transport linéaire d'électrons	28
3.1.3.1. Transport cyclique d'électrons	29
3.2. Effet des herbicides sur le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons	30
4. Mécanismes impliqués dans la protection des plantes contre le stress oxydatif.....	31
4.1. La dissipation d'énergie en chaleur.....	32
4.2. Les phénomènes de transition d'état	33
4.3. La photorespiration.....	33
4.4. Le transport des électrons méta-cyclique	34
4.5. La réaction de Mehler.....	34
4.6. La chlororespiration	35
4.7. Les métabolites antioxydants	36
4.8. Les enzymes antioxydantes	38
5. La cinétique de la fluorescence chlorophyllienne et ses applications pour approcher les réactions photosynthétiques et le transport des électrons	40
5.1. La cinétique lente de la fluorescence chlorophyllienne et les paramètres photosynthétiques calculés ..	40
5.2. La cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne et les paramètres photosynthétiques calculés (test <i>OJIP</i>)	43
6. Objectifs de la thèse	47
Chapitre II: Matériels et méthodes	49
1. Le matériel végétal	50
1.1. Les caractères botaniques	50
1.1.1. Les racines	50
1.1.2. La tige.....	50
1.1.3. Les feuilles	50
1.1.4. Les fleurs	51
1.2. Les variétés.....	52
2. Les conditions de culture.....	53

3. Méthodes	54
3.1. Détermination de la croissance	54
3.2. Détermination des paramètres de fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> et des échanges gazeux	54
3.3. Préparation des chloroplastes	55
3.4. Mesure de l'évolution d'O ₂ et activité de la chaîne de transfert des électrons photosynthétiques.....	56
3.5. Analyses biochimiques	57
3.5.1. Dosage des pigments photosynthétiques	57
3.5.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	57
3.5.3. Dosage de l'ascorbate	58
3.5.4. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes	59
3.5.5. Dosages des composants phénoliques	63
4. Analyses statistiques.....	65
Chapitre III: Étude de l'effet de faibles concentrations de clomazone sur les processus photosynthétiques chez le tabac (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	67
Publication 1	69
1. Introduction	72
2. Materials and methods.....	73
2.1. Plant material and chemical treatment.....	73
2.2. Determination of chlorophyll and carotenoids content.....	74
2.3. Chlorophyll fluorescence and the JIP-test	74
2.4. Statistical analysis	76
3. Results and discussion.....	76
4. Discussion	83
5. Conclusion.....	85
6. Acknowledgements	86
7. References	86
Publication 2	89
1. Introduction	93
2. Materials and methods.....	95
2.1. Plant materials, growth conditions and chemical treatments	95
2.2. Determination of photosynthetic pigments.....	95
2.3. Chloroplast preparation	96
2.4. Measurement of oxygen evolution	96
2.5. Measurement of fast chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients.....	97
2.6. Determination of the H ₂ O ₂ contents.....	98
2.7. Determination of the ascorbate contents.....	98
2.8. Antioxidative enzyme activities	98
2.9. Cytohistological analyses	99
2.10. Statistical analyses.....	100
3. Results	100
3.1. Photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids).....	100
3.2. Chloroplast oxygen evolution.....	101
3.3. Chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients	102

3.4. H ₂ O ₂ and ascorbate contents.....	103
3.5. Antioxidant enzyme activities	104
3.6. Cytohistological analyses	105
4. Discussion	106
5. Acknowledgements	109
6. References	109
Chapitre IV: Effet d'un prétraitement par une alternance de cycles courts lumière/obscurité sur la tolérance du tabac (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) vis-à-vis du clomazone.....	113
Publication 3	115
1. Introduction	119
2. Materials and Methods	120
2.1. Plant material, growth conditions and chemical treatments	120
2.2. Determination of growth parameters	121
2.3. Determination of photosynthetic pigments.....	121
2.4. Determination of H ₂ O ₂ content	121
2.5. Determination of the ascorbate content	122
2.6. Anti-oxidative enzymes activities:	122
2.7. Determination of the chlorophyll fluorescence transients	123
2.8. Statistical Analysis	124
3. Results	125
3.1. Plant growth	125
3.2. Photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids).....	125
3.3. H ₂ O ₂ and antioxidant systems	126
3.4. Chlorophyll fluorescence transients	128
4. Discussion	131
5. Acknowledgements	134
6. References	134
Publication 4	137
1. Introduction	142
2. Materials and Methods	144
2.1. Plant material, growth conditions and chemical treatments	144
2.3. Determination of the H ₂ O ₂ contents.....	145
2.3. Determination of the ascorbate contents.....	145
2.4. Extraction and analysis of phenolic compounds	146
2.5. Chloroplast preparation	146
2.6. Measurement of oxygen-evolving rate	147
2.7. Measurement of fast chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients.....	148
2.8. Determination of gas exchanges.....	148
2.9. Cytohistological analyses	149
2.10. Statistical Analyses.....	150
3. Results	150
3.1. H ₂ O ₂ and ascorbate contents.....	150
3.2. Phenolic compounds.....	150

3.3. Chloroplast oxygen evolution.....	152
3.4. Chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients	152
3.5. Gas exchanges	155
3.6. Cytohistological analyses	158
4. Discussion	160
5. Acknowledgements	162
6. References	162
Chapitre V: Effets à long terme du prétraitement par une alternance de lumière/obscurité sur la tolérance au clomazone chez le tabac (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	165
Publication 5	168
1. Introduction	170
2. Materials and methods.....	172
2.1. Plant materials, growth conditions and chemical treatment	172
2.2. Determination of growth parameters	172
2.3. Determination of chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients	172
2.4. Determination of gas exchanges	173
2.5. Statistical Analysis	174
3. Results	174
3.1. Plant growth	174
3.2. Chlorophyll <i>a</i> fluorescence transients	175
3.3. Gas exchanges	178
4. Discussion	179
5. Acknowledgements	182
6. References	182
Discussion générale	185
Conclusion générale et perspectives	193
Références bibliographiques	197
Matériels	217
1. La chambre de culture climatisée (SANYO MLR-351H Versatile Environmental Test Chamber).....	217
2. Spectrophotomètre visible à balayage (biochrom UV/Visible Libra S22)	218
3. Le Lecteur de microplaques à absorbance (PowerWave HT)	219
4. L'électrode de Clark.....	220
5. Handy-PEA	222
6. Fluorescence Monitoring System (FMS1) (<i>Pulse Amplitude Modulated</i>).....	223
7. Le système portable de la photosynthèse (<i>LI-COR 6400</i>)	225
8. Microscope photonique (Leica Digital Microscope 2000)	227

Abréviations

- ABS:** Flux total d'absorption de photons par l'antenne du photosystème II.
- ADN:** Acide Désoxyribonucléique.
- ADP:** Adénosine diphosphate.
- APX:** Ascorbate peroxydase.
- AsA:** Ascorbate.
- ATP:** Adénosine triphosphate.
- CAT:** Catalase.
- CEO:** Complexe de l'évolution d'oxygène.
- CO₂:** Dioxyde de carbone.
- Chl *a*, Chl *b* et Chls:** Chlorophylle *a*, chlorophylle *b* et chlorophylle (*a+b*).
- 1Chl, 3Chl, Chl*:** Chlorophylle à l'état singulet, triplet et excité.
- CP24, CP26 et CP29:** Complexe mineurs de l'antenne du photosystème II.
- CP47 et CP43:** Antenne interne du PSII.
- CR:** Centre réactionnel.
- Cyt *b₆f*:** Cytochrome *b₆f*.
- D1, D2:** Protéines membranaires du photosystème II.
- DI0:** Énergie dissipée en chaleur par CR.
- DHA:** Dehydroascorbate.
- DHAR:** DHA réductase.
- ET0:** Flux d'électrons transportés par CR.
- ERO:** Espèces réactives de l'oxygène
- F₀:** Fluorescence minimal obtenue par une illumination analytique modulée après l'adaptation à l'obscurité.
- F₀':** Fluorescence minimal obtenue par une illumination analytique modulée après l'illumination dans l'infrarouge (735 nm).
- F_m:** Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité.
- F_m':** Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue.
- F_v:** Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue.
- F_X, F_A et F_B:** Complexes protéiques fer-soufre du photosystème I.
- Fd:** Ferrédoxine.
- FNR:** Ferrédoxine-NADP-oxydoréductase.
- GR:** glutathion réductase.
- H₂O₂:** Peroxyde d'hydrogène.
- Handy-PEA:** «*Plant Efficiency Analyser*».
- LHCI:** Antennes collectrice de lumière du photosystème I.
- LHCII:** Antennes collectrice de lumière du photosystème II.
- MDHA:** Monodehydroascorbate.
- MDHAR:** MDHA réductase.
- NADP⁺:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée.
- NADPH:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite.

NPQ: «*Quenching*» non photochimique de la fluorescence de chlorophylle *a*.
³O₂ et ¹O₂: Oxygène en état triplet et singulet.
O₂⁻: Anion superoxyde.
OH⁻: Radical hydroxyle.
O-J-I-P: Transitions de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne.
Q_A: Quinone A, le premier accepteur d'électrons du photosystème II.
Q_B: Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII.
P_i: Phosphate inorganique.
qN: «*Quenching*» non photochimique de la fluorescence variable.
qP: «*Quenching*» photochimique.
P680: Centre réactionnel du PSII.
P700: Centre réactionnel du PSI.
Phéo: Phéophytine.
PC: Plastocyanine.
PQ: Plastoquinone.
PQH₂: Plastoquinol.
PSI: Photosystème I.
PSII: Photosystème II.
psbO, psbP et psbQ: Protéines extrinsèque du CEO.
SOD: Superoxyde dismutase.
TR0: Flux d'énergie piégé par CR "Trapping".
VDE: Violaxanthine de-époxydase.
Y_Z et Y_D: Tyrosine appartenant à la chaîne protéique de D1 et D2.
Φ_{PSII}: Rendement photochimique opérationnel du PSII.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé, grâce à une bourse franco-syrienne, au sein du laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Ce travail a fait l'objet d'une valorisation sous forme d'articles et de communications orales.

Articles publiés

Darwish, M., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H. 2013. Study of photosynthesis process in the presence of low concentration of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). J. Stress Physiol. Biochem. 9, 229–45.

Darwish, M., Lopez-Lauri, F., El Maataoui, M., Urban, L., Sallanon, H. 2014. Pretreatment with alternation of light/dark periods improves the tolerance of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to clomazone herbicide. J. Photochem. Photobiol. 134, 49–56.

Articles soumis ou en cours de réussir

Darwish, M., Vidal, V., Lopez-Lauri, F., Alnaser, O., Junglee, S., El Maataoui, M., Sallanon, H. Tolerance to Clomazone Herbicide is linked to the State of LHC, PQ-Pool and ROS Detoxification in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). J. Plant Physiol., (accepté).

Darwish, M., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H.

Effect priming of light/dark short periods pretreatment improves the tolerance of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to clomazone herbicide in soil. Pestic. Biochem. Physiol., (soumis).

Darwish, M., Lopez-Lauri, F., Vidal, V., El Maataoui, M., Sallanon, H.

Alternation of light/dark periods priming enhances clomazone tolerance by increasing ascorbate and phenol compounds levels, and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plantlets. J. Photochem. Photobiol., (soumis).

Posters

Darwish, M., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H. 2012. Photosynthesis process in the presence of clomazone herbicide in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie*). 7^{ème} congrès des jeunes chercheurs en Biologie Végétale. Grenoble. France.

Darwish, M., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H. 2013. Light/dark periods pretreatment protects the photosynthetic apparatus in the presence of clomazone herbicide in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). Une demi-journée d'information et d'échange en collaboration de la Structure Fédérative de Recherche TERSYS. Avignon. France.

Introduction générale

Bien que la recherche dans le domaine des herbicides ait commencé au début du 20^{ème} siècle, l'utilisation agronomique des herbicides n'a eu lieu qu'à partir des années 1940, lorsqu'il a été montré que des substances de croissance, appliquées de manière appropriée, tuaient certaines mauvaises herbes à feuilles larges dans les céréales, sans nuire aux récoltes non-ciblées. En raison de l'augmentation de la production agricole, l'utilisation des herbicides a conduit à assurer une sécurité alimentaire dans la plupart des pays du monde. Cependant, les résidus chimiques issus des herbicides sont devenus une menace pour la vie humaine et ont des conséquences environnementales car ils sont toxiques également pour des organismes non ciblés. De plus, l'accumulation des résidus issus des herbicides a induit, au fil des ans, une diminution de la qualité et de la productivité des productions agricoles.

Lors du traitement des cultures, la majeure partie des herbicides apportés atteint le sol, soit parce que les herbicides y sont directement appliqués, soit parce que la pluie lessive le feuillage des mauvaises herbes traitées. Dans le sol, les processus physiques, chimiques et biologiques influencent la dégradation des herbicides, leur transfert vers les autres compartiments de l'environnement (eau, plante, atmosphère) et par conséquent modifient leur impact potentiel sur les êtres vivants exposés. La persistance des herbicides est liée ainsi à leur dégradation (par exemple, la demi vie de l'herbicide clomazone dans le sol est de 5 à 120 jours (Cumming et al., 2002)). La dégradation peut être de nature biotique (dégradation par la microflore, la microfaune et les végétaux) ou abiotique (hydrolyse, photolyse).

Il devient donc essentiel pour réduire l'utilisation des herbicides de poursuivre l'étude des altérations physiologiques induites et ainsi de fournir des informations pouvant conduire à une optimisation de leur utilisation. La majorité des herbicides affecte les processus photosynthétiques. L'effet des herbicides peut s'effectuer directement, en inhibant les réactions photochimiques, le transport des électrons au niveau des photosystèmes II et I, ou indirectement, en altérant des processus métaboliques liés à la photosynthèse (comme la biosynthèse des pigments photosynthétiques, chlorophylle et caroténoïdes). L'effet direct, l'inhibition de la photosynthèse, conduit à la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau du PSII et du PSI, qui par leur action oxydante, produisent d'importants dommages sur les structures cellulaires, et sont en partie, responsables de la toxicité de l'herbicide.

Le clomazone est un herbicide peu cher et très efficace. Bien que très utilisé en agriculture, relativement peu d'études existent sur les altérations physiologiques dues à sa

toxicité. Il a été montré que le clomazone inhibe la synthèse des caroténoïdes, pigments associés aux chlorophylles dans les antennes des PSII et PSI. Si le mécanisme de base de l'action est connu, très peu d'informations sont disponibles sur:

- les conséquences sur le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons.
- les variations de sensibilité des végétaux à l'herbicide et les mécanismes impliqués.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail a été de contribuer à clarifier le mode d'action du clomazone. Les effets de plusieurs faibles doses de clomazone sur les processus photosynthétiques ont été étudiés en utilisant deux variétés de tabac. L'activité photosynthétique, en particulier la fonction du PSII et le transport des électrons ont été étudiés en utilisant la fluorescence chlorophyllienne et l'évolution de l'oxygène chloroplastique. De plus, des analyses biochimiques des ERO et des mesures des activités antioxydantes enzymatiques, ainsi que des observations cytohistologiques ont été effectuées.

Ce travail est structuré en cinq chapitres.

Le premier chapitre comprend une synthèse bibliographique qui regroupe des données sur l'utilisation des herbicides et leur mode d'action et en particulier celui du clomazone, les processus photosynthétiques et le stress photooxydatif, ainsi que les systèmes de défense des plantes.

Le deuxième chapitre présente le matériel végétal et les méthodes utilisées.

Les chapitres suivants sont présentés sous forme de publication.

Le troisième chapitre comprend deux publications parues dans *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, [Darwish et al. 2013](#), "Study of photosynthesis process in the presence of low concentrations of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)" et *Journal of Plant Physiology*, [Darwish et al. 2014](#), "Tolerance to Clomazone Herbicide is Linked to the state of LHC, PQ-Pool and ROS Detoxification in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)", et porte sur l'étude des effets du clomazone sur la chaîne de transport des électrons et sur les mécanismes de tolérance chez deux variétés de tabac *Xanthi* et *Virginie*.

Le quatrième chapitre est également présenté sous forme de deux publications, une parue dans *Journal of Photobiology and Photochemistry*, [Darwish et al. 2014](#), "Pretreatment with Alternation of Light/Dark Periods Improves the Tolerance of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to Clomazone Herbicide" et une soumise dans *Journal of Photobiology and Photochemistry*, "Alternation of light/dark periods priming enhances clomazone tolerance by increasing ascorbate and phenol compounds levels, and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana*

tabacum L.) plantlets. Ce chapitre traite des effets d'un prétraitement de cycles courts d'alternance de lumière et d'obscurité sur la toxicité du clomazone.

Le cinquième chapitre et dernière publication de ce manuscrit, soumise dans *Pesticide Physiology and Biochemistry*, "Priming Effect of Light/Dark short Periods Pretreatment to Improve the Tolerance of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to Clomazone Herbicide in Soil", valide l'acquisition d'une acquisition de tolérance lors de culture en serre jusqu'au stade de floraison du tabac.

Enfin, le manuscrit se termine par une discussion générale suivie d'une conclusion et des perspectives de travail.

Chapitre I: Synthèse bibliographique

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

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

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

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

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

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

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

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

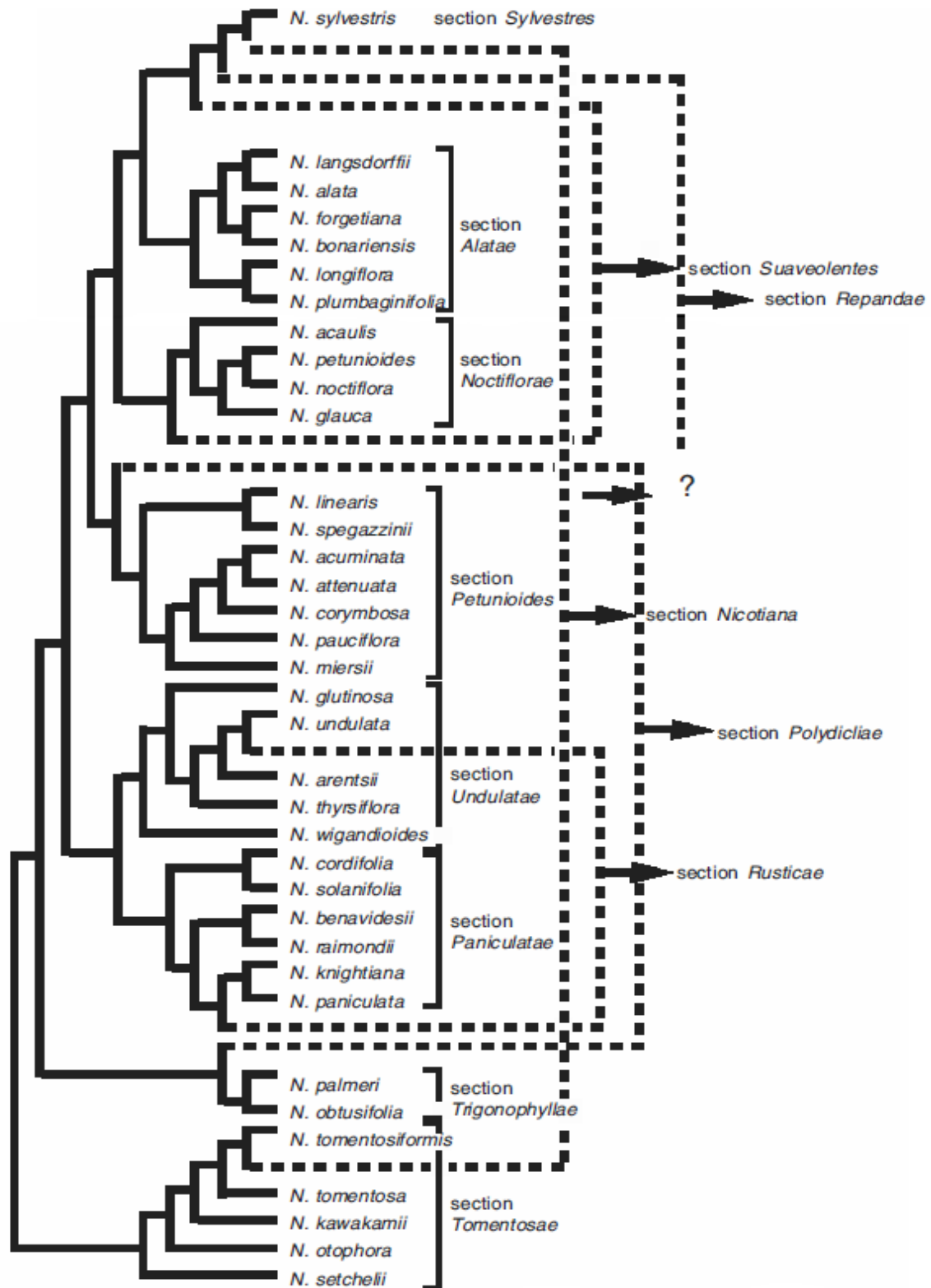


Figure 1. Représentation schématique de la classification du genre *Nicotiana* (d'après Knapp et al., 2004).

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

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

2. Les herbicides

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

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

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

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

Le clomazone: exploitation et mode d'action

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

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

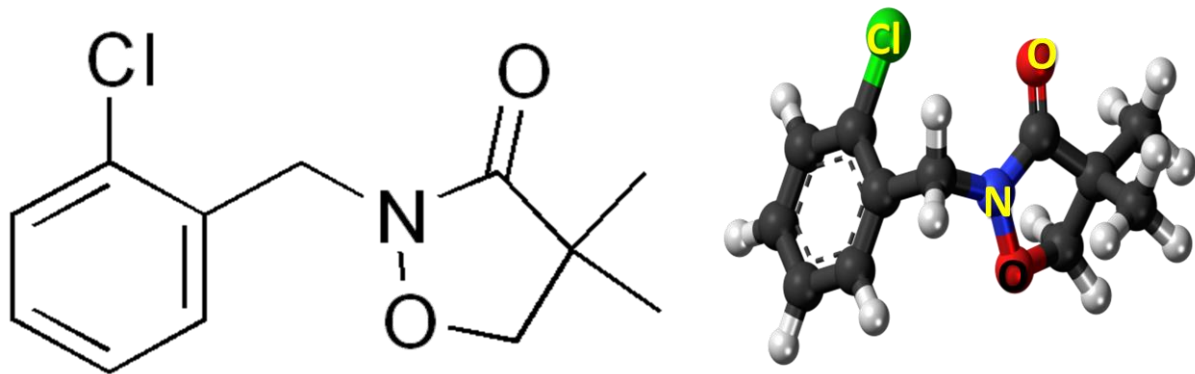
Le clomazone est absorbé par les racines, puis transporté jusqu'aux feuilles avec le flux de transpiration *via* le xylème (Senseman 2007). Il est généralement admis que le clomazone inhibe la biosynthèse des caroténoïdes, ce qui induit un blanchiment (apparence jaune ou vert pâle des feuilles des plantules),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

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

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

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

(A)



(B)

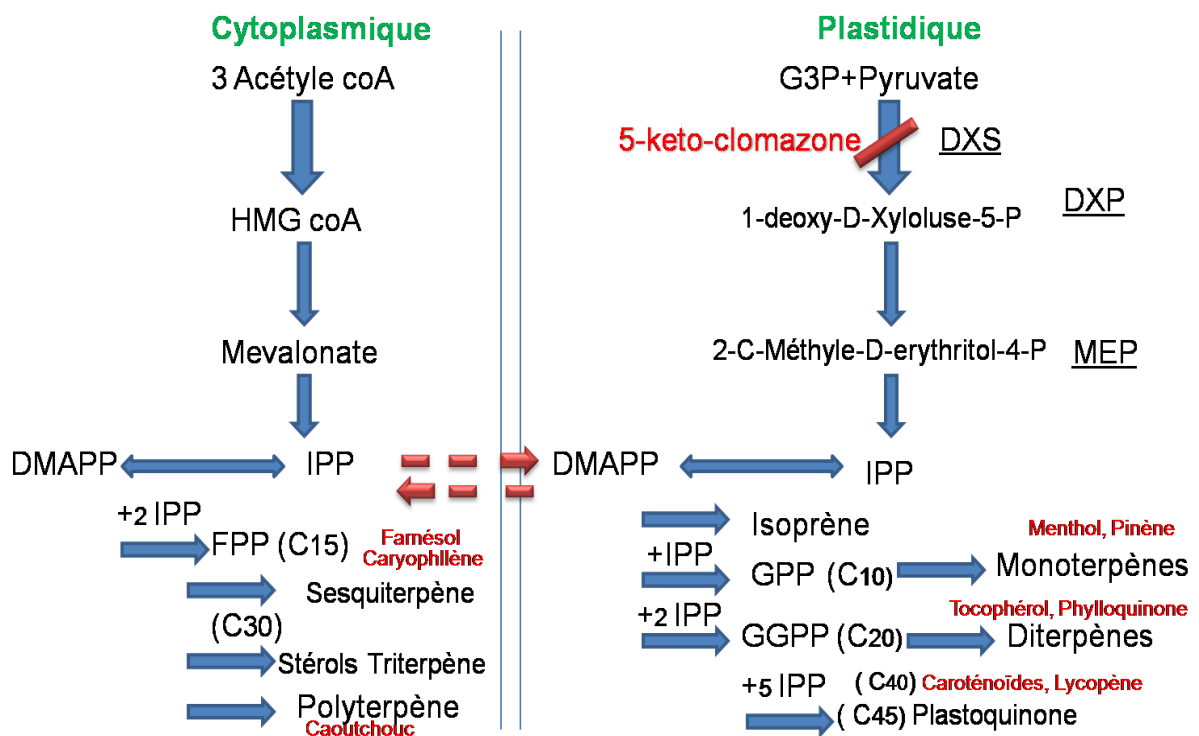
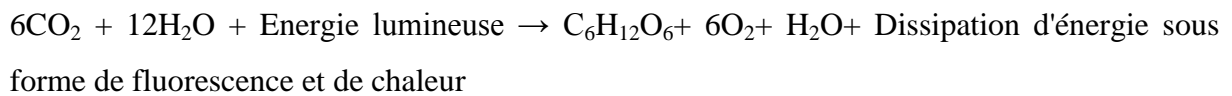


Fig.2. A, Structure du [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-diméthyl-1,2-oxazolidin-3-one]; B, Représentation schématique des voies cytoplasmique et plastidique de la synthèse des isoprénoïdes. Le clomazone inhibe la synthèse de l'enzyme DXS (d'après Ferhatoglu and Barrett, 2006).

3. Action des herbicides sur le fonctionnement photosynthétique

3.1. Rappels sur les réactions photochimiques de la photosynthèse

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



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

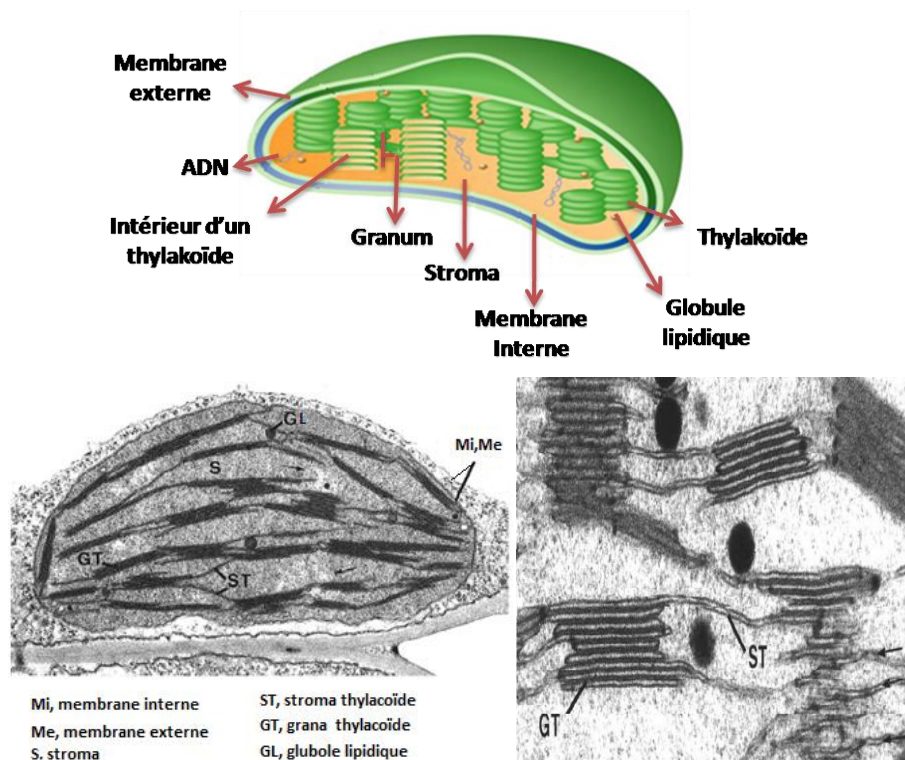


Figure 3.1.A. Structure schématique et micrographie électronique d'un chloroplaste d'un jeune plant de tabac (d'après Staehelin 2003).

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

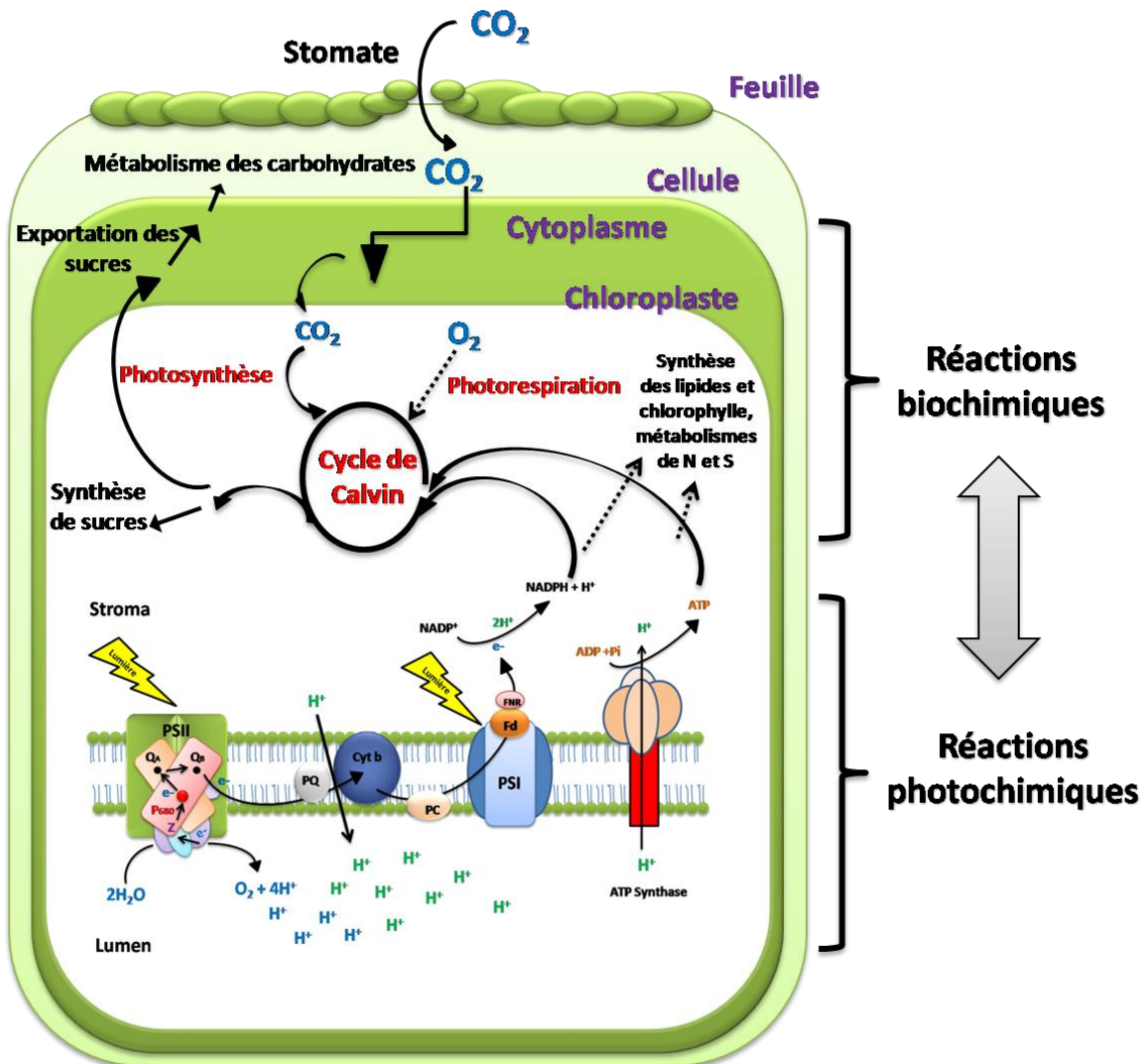


Figure 3.1.B. Représentation schématique des réactions photochimiques de la photosynthèse et des réactions biochimiques dans le chloroplaste (d'après Baker and Rosenqvist, 2004).

3.1.1. La structure du photosystème II (PSII)

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

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

3.1.1.1. Le centre réactionnel

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

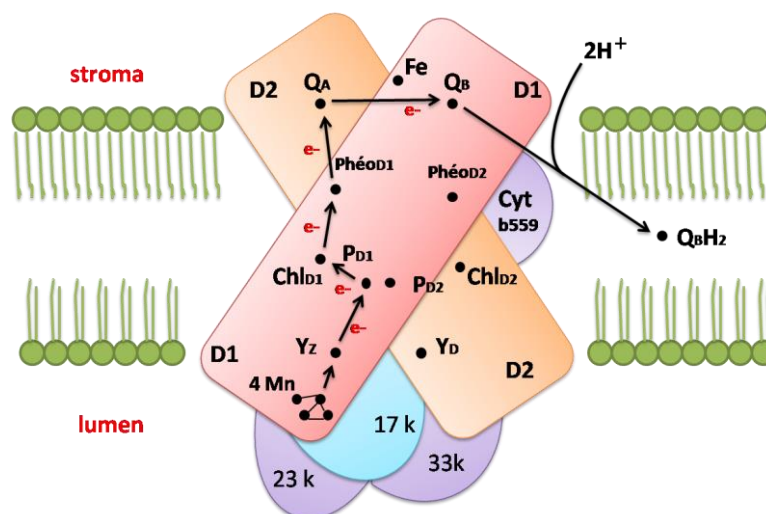


Figure 3.1.1.1. Représentation schématique du centre réactionnel du photosystème II.

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

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

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

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

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

3.1.1.3. Le complexe de la photolyse de l'eau

L'oxydation de l'eau est assurée par un système enzymatique complexe (CEO) effectuant la photolyse de l'eau. CEO est composé d'un "cluster" de manganèse (Mn_4Ca) et de trois protéines extrinsèques. Ce sont des protéines hydrophiles de poids moléculaire de 33, 23, et 17 kDa, codé par les gènes nucléaires *psbO*, *psbP*, *psbQ*, respectivement. Ces trois protéines sont importantes pour maintenir le fonctionnement et à la stabilité de PSII. La protéine de 33 kDa contribue à la stabilisation du "cluster" de manganèse et la liaison des ions Cl^- et Ca^{+2} . En plus, cette protéine maintient la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17 kDa, en conséquence la capacité du complexe PSII pour qu'il soit en état fonctionnel. La protéine de 23 kDa permet de maintenir la structure et le fonctionnement du CEO en fixant les atomes

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

3.1.2. Structure et fonctionnement du photosystème I (PSI)

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

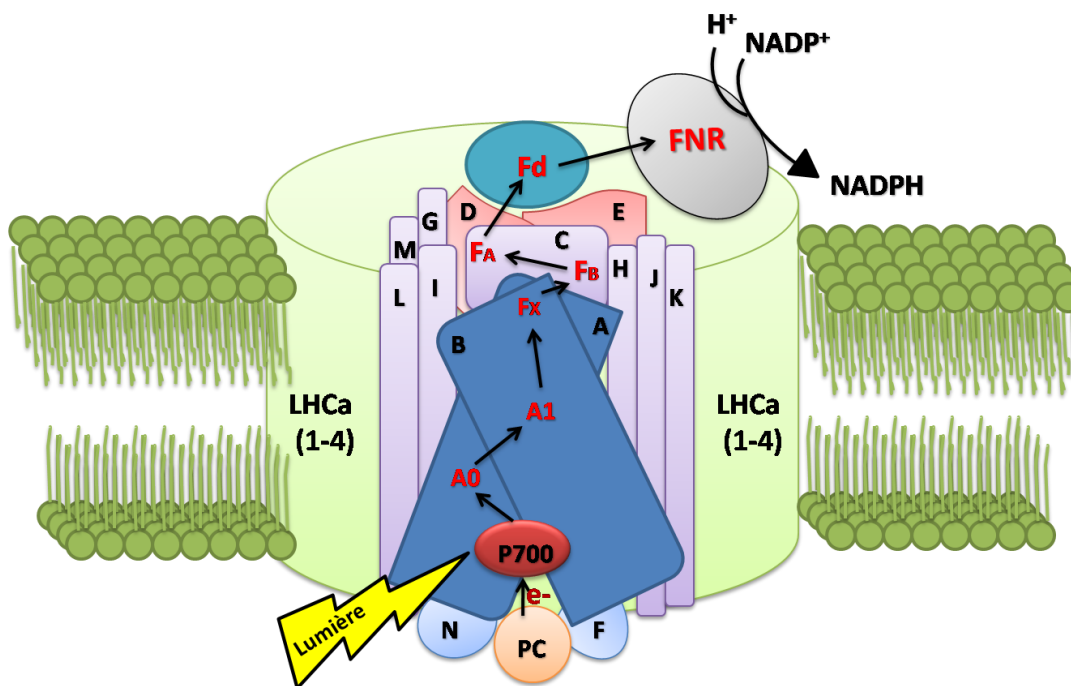


Figure 3.1.2. Représentation schématique du photosystème I (PSI) montrant l'organisation de ses différentes composantes protéiques (d'après Joly 2007).

3.1.3. Fonctionnement de la chaîne de transport des électrons**3.1.3.1. Transport linéaire d'électrons**

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

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

3.1.3.2. Transport cyclique d'électrons

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

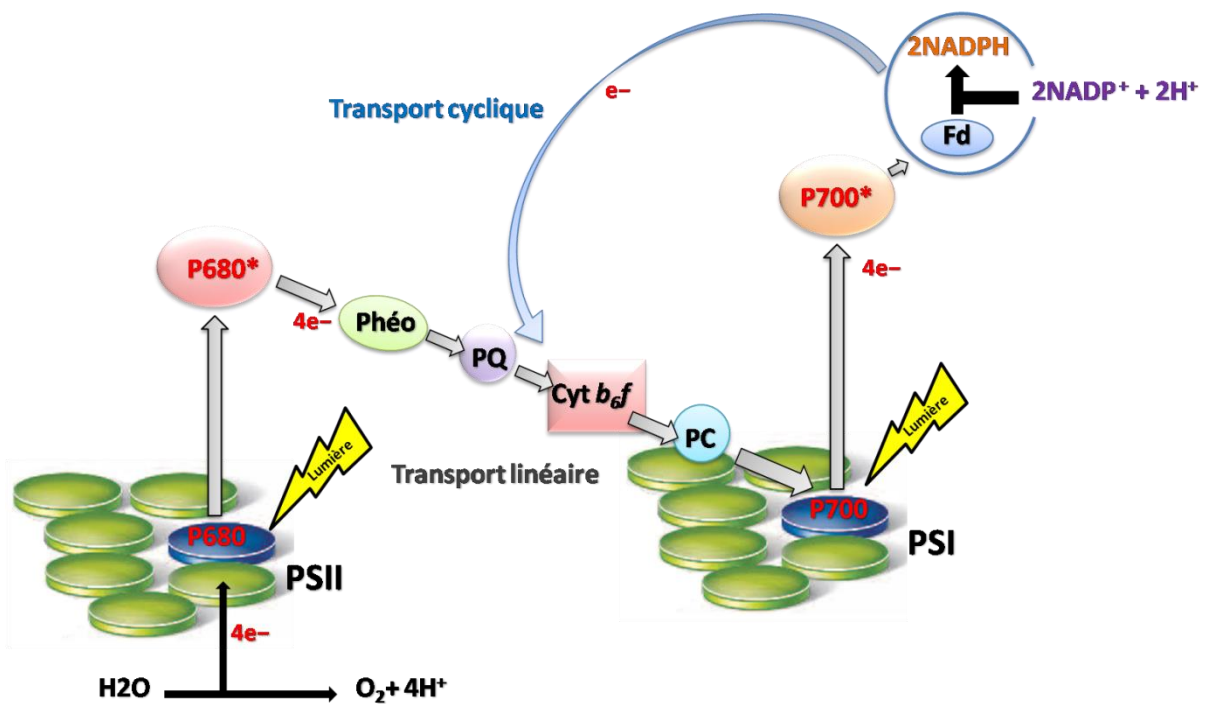


Figure 3.1.3. Représentation schématique du transport linéaire et cyclique d'électrons dans la membrane de thylacoïde.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

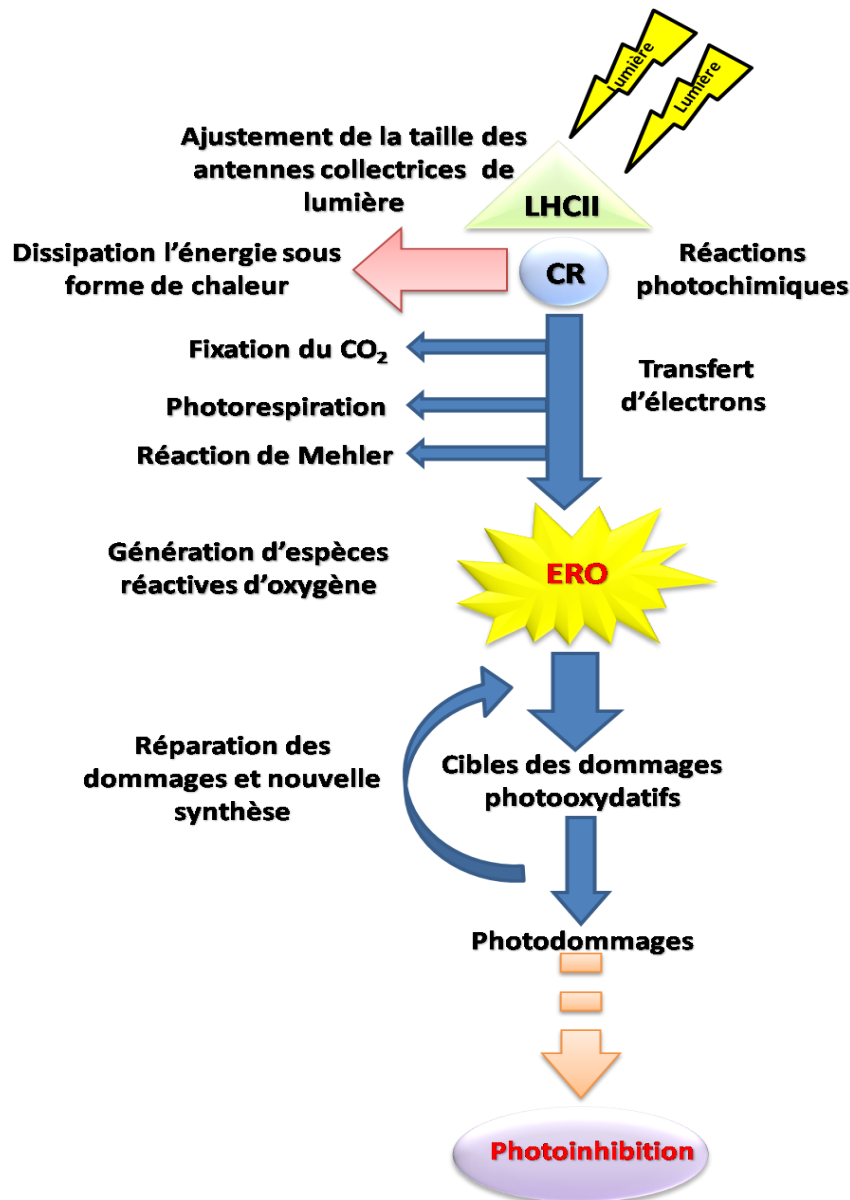


Figure 4. Représentation schématique des processus de la gestion d'énergie lumineuse lorsque le photosystème II subit d'un excès de l'énergie de l'excitation. CR: Centre réactionnel du PSII (d'après Niyogi 1999).

4.1. La dissipation d'énergie en chaleur

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

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

4.2. Les phénomènes de transition d'état

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

4.3. La photorespiration

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

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

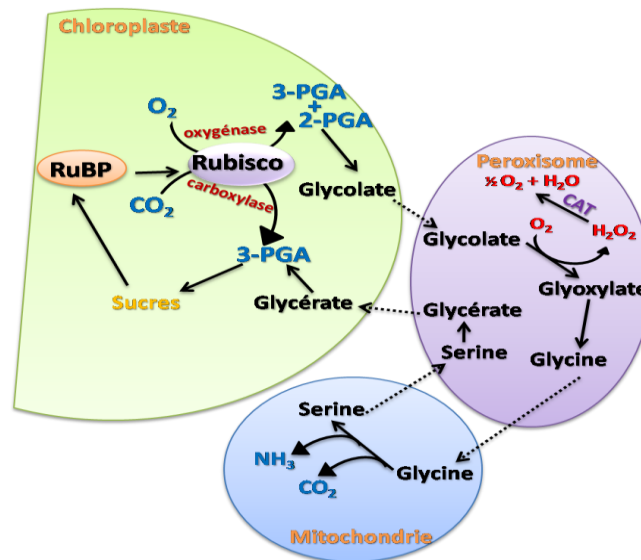


Figure 4.3. Représentation schématique de la voie photorespiratoire (d'après Busch 2012). CAT, catalase; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; NH_3 , ammoniac; 3-PGA, 3-Phosphoglycolate; 2-PGA, 2-Phosphoglycolate; RuBP, ribulose 1,5-bisphosphate; Rubisco, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase.

4.4. Le transport des électrons méta-cyclique

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

4.5. La réaction de Mehler

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

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

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

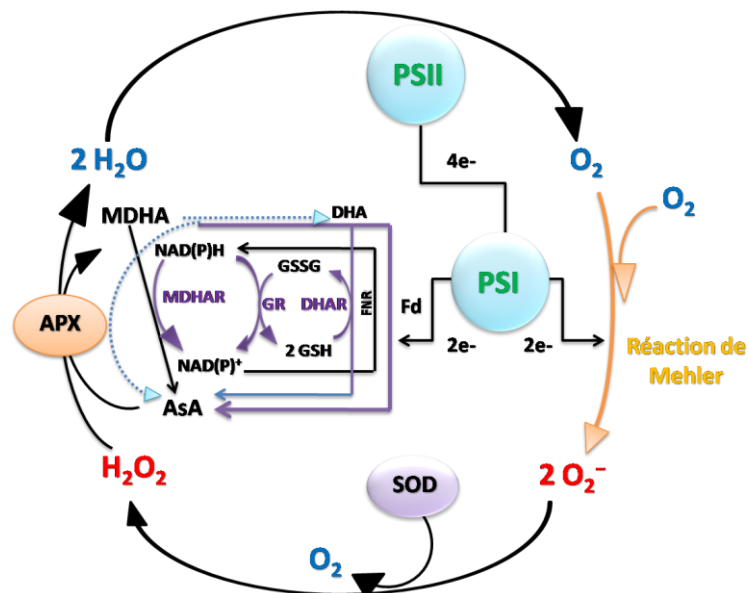


Figure 4.5. Représentation schématique des réactions de la voie Mehler-ascorbate peroxydase ou le cycle eau-eau (water-water cycle) (d'après Miyake 2010). AsA, ascorbate; DHA, déhydroascorbate; Fd, ferrédoxine; FNR, Fd-NADP oxydoréductase; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; MDHA, monodéhydroascorbate; MDHAR,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

4.6. La chlororespiration

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

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

4.7. Les métabolites antioxydants

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

- Les caroténoïdes

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

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

- L'acide ascorbique

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

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

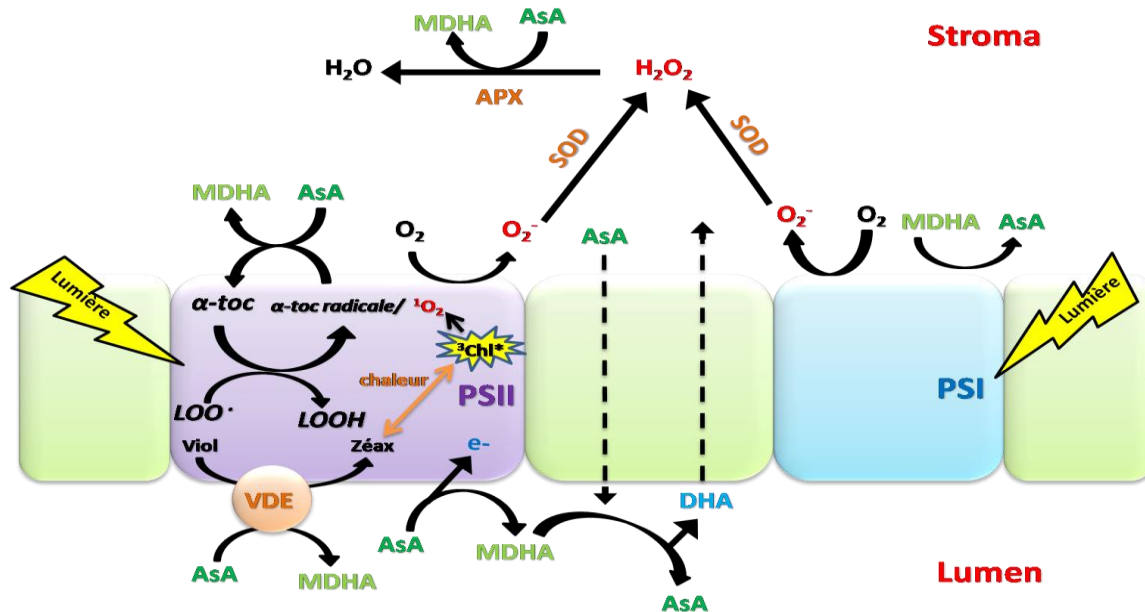


Figure 4.7. Représentation schématique montrant le rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse en situation d'excès de lumière (d'après Smirnoff 2000a). AsA, ascorbate; 3Chl*, chlorophylle triplet; DHA, déhydroascorbate; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; $LOO\cdot$, radical lipide peroxy; $LOOH$, lipide hydroperoxyde;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

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

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

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

- Les polyphénols

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

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

4.8. Les enzymes antioxydantes

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

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

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

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

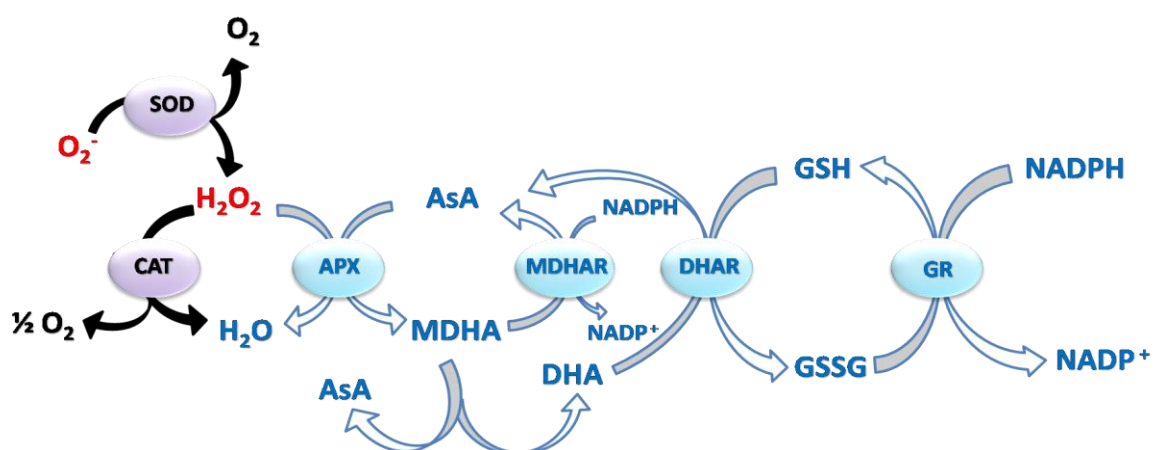


Figure 4.8. Représentation schématique montrant la détoxification des ERO par le cycle ascorbate/glutathion et l'action des enzymes SOD et CAT. SOD, superoxyde dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbate peroxydase; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase; DHAR, déhydroascorbate réductase; GR glutathion réductase.

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

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

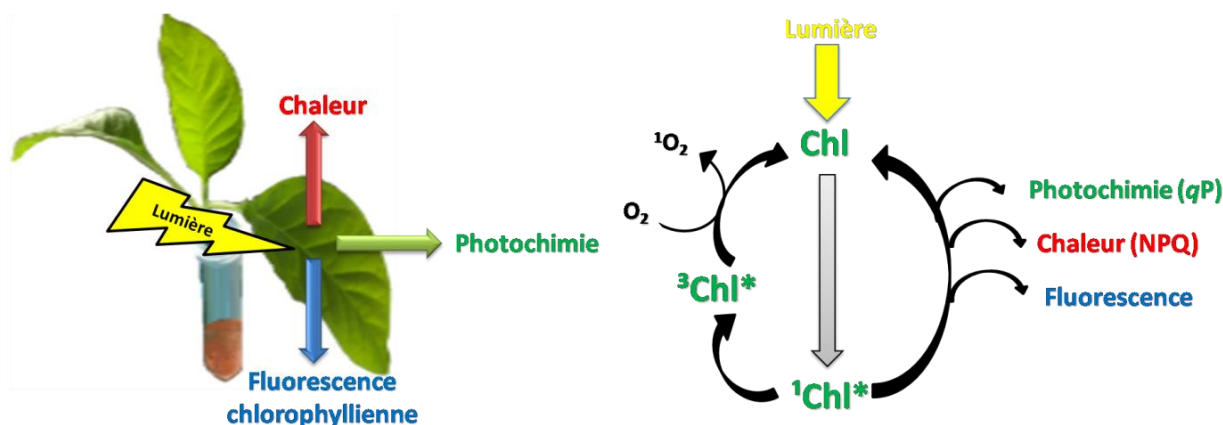


Figure 5. Représentation schématique de la gestion d'énergie lumineuse absorbée, et des voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle excitée. $^1\text{Chl}^*$ et $^3\text{Chl}^*$: chlorophylle excitée à l'état singulet et triplet, respectivement.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

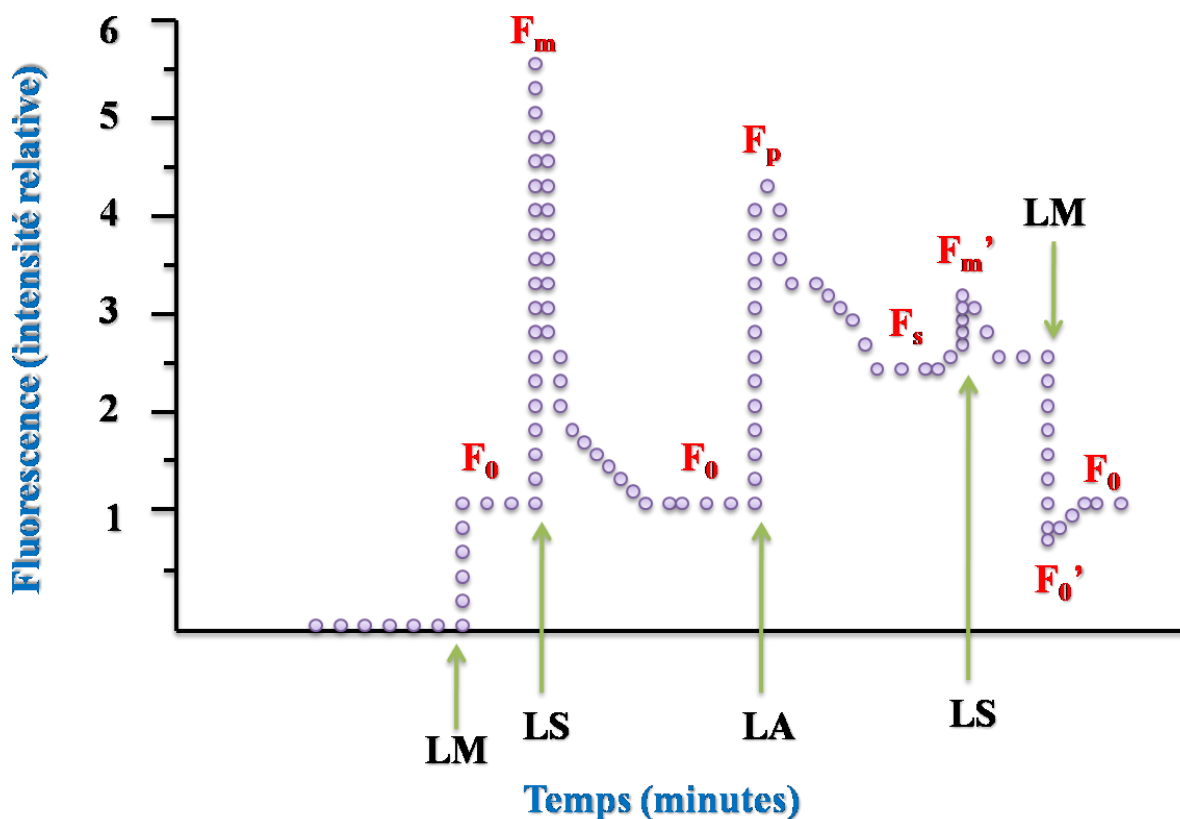


Figure 5.1. Représentation schématique montrant la variation de la fluorescence modulée en fonction du temps (d'après Rohaček 2002). F_0 : fluorescence constante pour une plante adaptée à l'obscurité; F_0' : fluorescence constante pour une plante adaptée à la lumière; F_v : fluorescence variable; F_m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

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

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

La fluorescence au niveau de transition O, appelé aussi F_0 , est mesurée après 50 μ s d'illumination ($3,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La phase OJ se termine à 2 ms où se situe l'étape J ([Strasser and Strasser, 1995](#)). La fluorescence minimale F_0 représente l'état d'oxydation de Q_A où les centres réactionnels du PSII sont "ouverts". La valeur F_0 peut être utilisée comme indicateur de l'état redox de Q_A au début de l'illumination ([Tóth 2006](#)). La phase OJ représente l'état de la réduction progressive de Q_A et la fermeture graduelle des centres réactionnels du PSII ([Neubauer and Schreiber, 1987](#)). Plusieurs facteurs peuvent influencer la phase OJ, parmi eux: l'état de l'antenne du PSII, l'état redox du pool des plastoquinones et les limitations du côté donneur d'électrons du PSII ([Tóth 2006](#)). L'étape J, qui se trouve à 2 ms dans la cinétique de fluorescence, peut refléter l'échange d'une molécule de PQH_2 avec une molécule de plastoquinone au site de Q_B . Il est admis que l'étape J représente le maximum de réduction de Q_A . L'étape I est déterminée à 30 ms et correspond à une réduction de Q_B et à l'accumulation de $Q_A^-Q_B^-$ ([Strasser and Strasser, 1995](#)), elle peut aussi exprimer la réoxydation d'une molécule de plastoquinol par le complexe de Cyt *b₆f* ([Tóth 2006](#)). La phase JI peut donc refléter la réduction partielle du pool de plastoquinones. L'augmentation de la fluorescence jusqu'à la transition P, reflète une accumulation progressive de $Q_A^-Q_B^{-2}$ ([Strasser and Govindjee, 1991](#)). La phase IP peut donc représenter la réduction du côté accepteur du photosystème I. Le niveau maximum de fluorescence (F_m) est atteint quand toutes les Q_A sont réduites ainsi que le pool de plastoquinone. Strasser et ses collaborateurs ont analysés ces paramètres et proposés un modèle: le test *OJIP* ([Figure 5.2.B](#)).

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

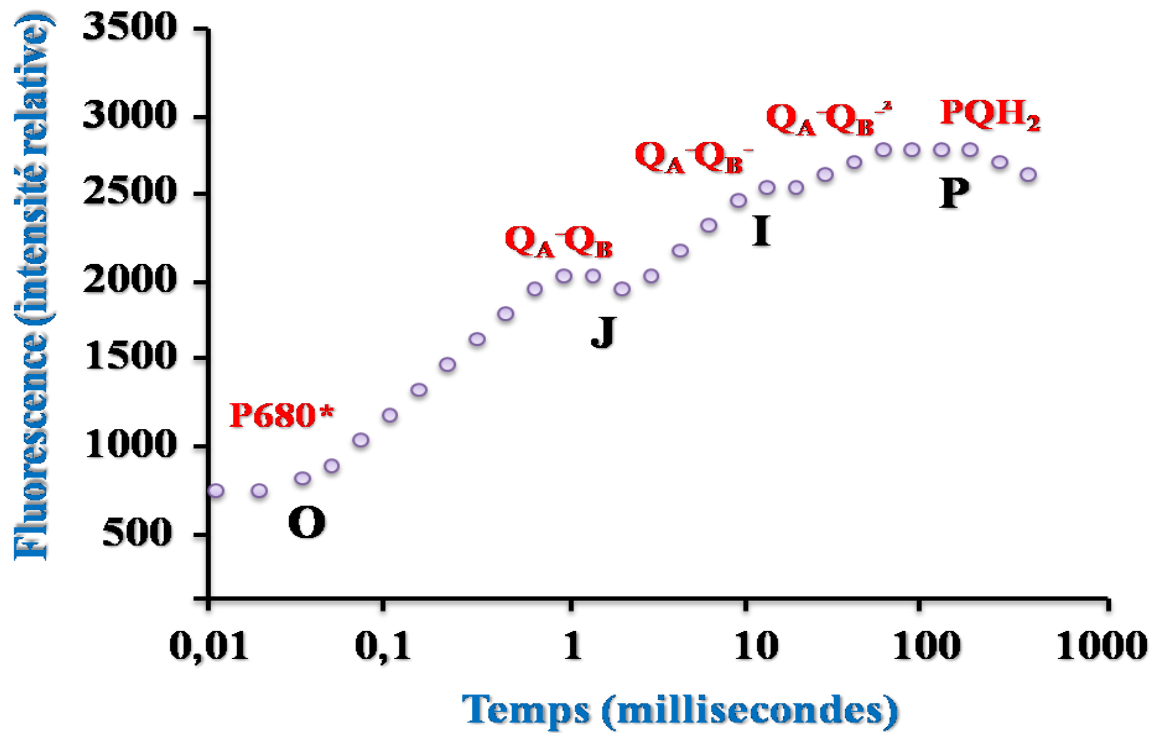


Figure 5.2.A. La courbe de Kautsky montrant les transitions *OJIP*. Q_A et Q_B : accepteurs d'électrons du PSII; PQH_2 : Plastoquinone réduite (Strasser et al., 2000; 2004; Stirbet and Govindjee, 2011).

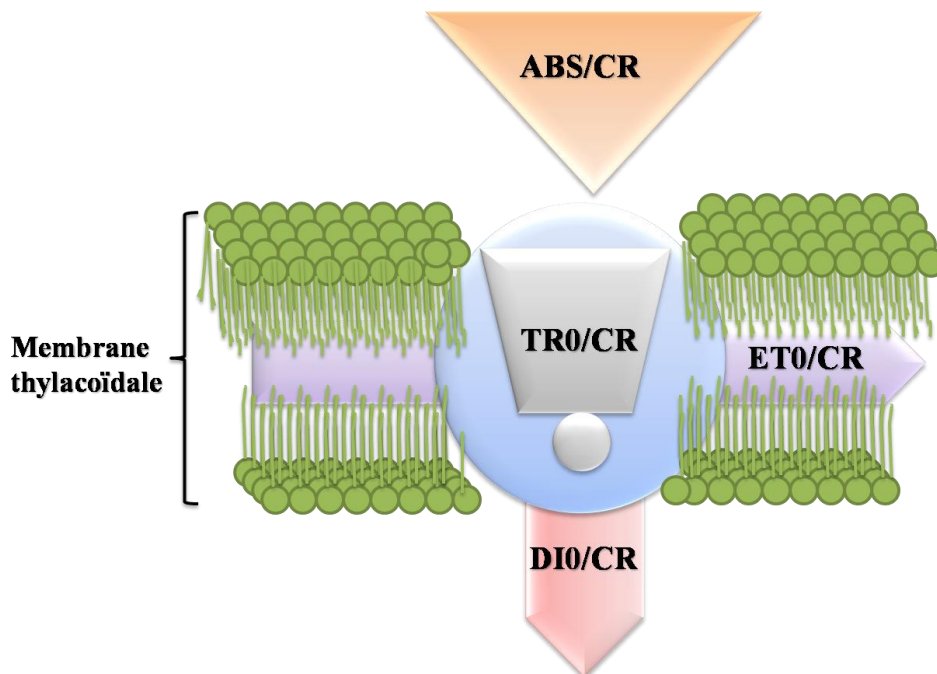


Figure 5.2.B. Modèles expriment les différentes voies de dissipation de l'énergie: flux total d'absorption d'énergie lumineuse par l'antenne du PSII (ABS), le flux d'énergie piégé "Trapping" (TR0), l'énergie dissipée en chaleur (DI0) et le flux d'électrons transportés (ET0) par le nombre des centres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

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

Tableau.1. Quelques paramètres du test JIP**Flux d'énergie spécifique exprimé par le centre réactionnel (CR)**

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

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

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

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

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

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

Efficacité (ratios ou rendements)

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

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

Efficacité avec laquelle un photon absorbé induit un électron transporté

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

Efficacité avec laquelle une excitation piégée peut se déplacer un électron dans la chaîne de transport d'électrons

au delà de Q_A^- $ET0/TR0 = (ET0/CR) (TR0/CR) = 1 - V_J$

Indice de Performance

La fonction des Composés d'absorption de l'énergie lumineuse, l'efficacité de Q_A réduite et la conversion d'énergie au transport des électrons..... $PI_{abs} =$

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

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

6. Objectifs de la thèse

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

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

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

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

Chapitre II: Matériels et méthodes

1. Le matériel végétal

1.1. Les caractères botaniques

1.1.1. Les racines

Le tabac a une racine vigoureuse, qui se compose d'une racine principale et de racines secondaires. Ces racines peuvent atteindre jusqu'à 1,5-2 m de profondeur dans le sol, bien que la majorité de ces racines (80-70 %) se concentre dans la première couche du sol.

Il est important d'indiquer que la nicotine est fabriquée dans les racines et stockée dans les feuilles des plantes.

1.1.2. La tige

Le tabac a une tige presque cylindrique et duveteuse plus large à la base. La longueur des tiges est généralement de 0,6 à 3 m selon les variétés et les conditions environnementales de développement. La longueur de tige est de 1 m environ chez *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* tandis que chez *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie* elle peut atteindre 3 m.

1.1.3. Les feuilles

Les feuilles de la plante sont différentes par la taille, la forme, la couleur et les nervures selon les variétés. Les feuilles, chez la variété *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*, prennent une forme ovale à lancéolée et sont plus petites par rapport à celles de la variété *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie*, qui ont une forme ovale plus large. Le nombre de feuilles est différent selon les variétés, et il peut varier entre 18-20 feuilles chez *Virginie* et de 22 à 30 feuilles chez *Xanthi*. L'angle de feuille avec la tige est différent aussi selon la variété, il est de 45 à 55 ° pour la variété *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* et de 60 à 70 ° pour la variété *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie*. La forme de la plante est liée à l'angle des feuilles, la distance entre les nœuds de tige et la disposition des feuilles sur la tige. Cette forme peut être cylindrique (cv. *Xanthi*), ovale ou conique (cv. *Virginie*) ([Figure 1.1.3](#)).

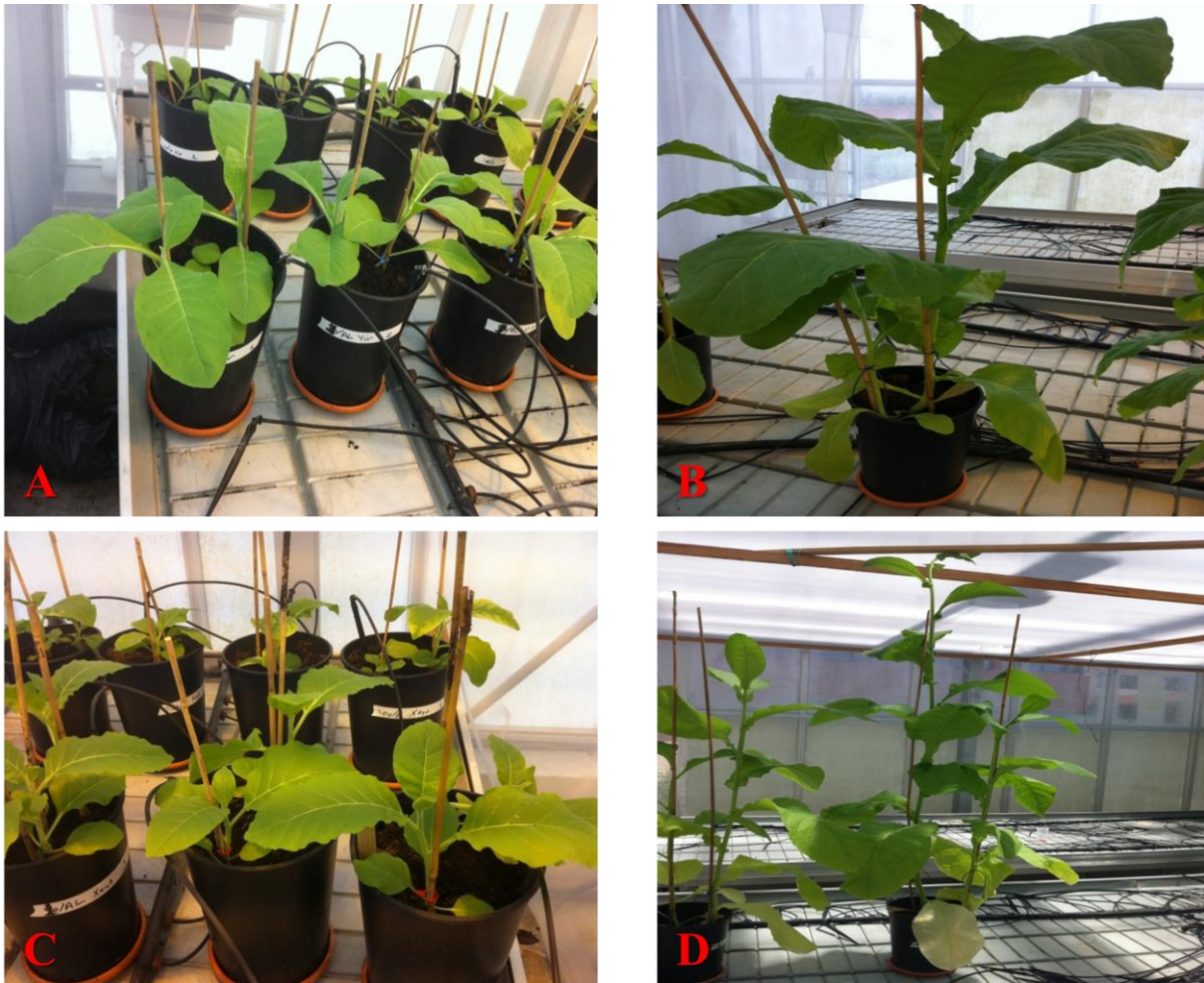


Figure 1.1.3. Plantes de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) cv. *Virginie* vk51 après 15 jours (A) et 30 jours (B) de croissance et cv. *Xanthi* après 15 jours (C) et 30 jours (D) de croissance en culture sous serre.

1.1.4. Les fleurs

Les fleurs de tabac se regroupent sous la forme d'une inflorescence composée de type racème (Figure 1.1.4.A). Le nombre de fleurs dans l'inflorescence est différent selon les variétés. Les fleurs généralement hermaphrodites présentent un pistil et des étamines. La pollinisation est assurée par les insectes. Les fleurs sont régulières, les pétales sont soudés entre eux à des hauteurs variables pour donner la forme d'une étoile ou d'une trompette. Comme pour les pétales, les sépales sont soudés à des hauteurs variables qui forment un tube qui présente cinq lobes au sommet. Les fleurs, dans leur grande majorité, présentent un périanthe différencié en calice et corolle (avec cinq sépales et cinq pétales, respectivement), un androcée avec cinq étamines et deux carpelles unis formant un gynécée avec un ovaire supère. Les fleurs sont

vert-jaunâtre, blanches ou rosées selon la variété. La durée de la formation du tube pollinique jusqu'à la fin de la fécondation des fleurs est de 48 h, trois semaines après la fécondation, les ovules deviennent des grains matures. Le fruit, qui se forme jusqu'en octobre, est une capsule, de 1,5 cm de long (Figure 1.1.4.B). Il renferme de nombreuses petites graines (500-4000 graines).



Figure 1.1.4. Les fleurs (A), les capsules et les graines (B) du tabac *Nicotiana tabacum* L.

1.2. Les variétés

La plus célèbre classification du tabac, celle qui s'appuie sur la valeur commerciale et les caractères industriels du tabac, a été faite par le département de l'agriculture des Etats-Unis.

Selon cette classification, le tabac *Nicotiana tabacum* L. comprend 4 grands types:

*Le type fire-cured: (ex. *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie*). Cette variété est la plus cultivée dans le monde, elle représente 48 % de la production des feuilles du tabac en France. La taille de la plante atteint 185 à 210 cm. Les feuilles sont larges (60-70 cm) de couleur vert clair, leurs nombre est de 18 à 20 par plante. Il est conseillé, pour cette variété de couper la partie aérienne en début de la floraison. Les feuilles ont un faible arôme avec un pourcentage de nicotine de 1,5 à 2 % (Figure 1.1.3).

* Les tabacs d'Orient: Ces tabacs sont d'origine orientale, Syrie, Chypre, Grec et Turquie, (ex. *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*). Les plantes ont une taille réduite (100 à 110 cm) et de

petites feuilles très aromatiques. Le nombre des feuilles sur la plante est compris entre 22 et 30 feuilles. Les feuilles ont un faible pourcentage de nicotine (0,7-1,5 %) (Figure 1.1.3).

* Le type de Burley ou le tabac clair

* Le type de tabac Brun ou (dark-aire cured)

Deux variétés ont été utilisées pour ce travail:

-La variété *Nicotiana tabacum* L. cv *Xanthi* qui appartient au type orient. Cette variété est moins cultivée pour la production de tabac; elle est utilisée comme modèle pour l'étude de la résistance aux pathogènes.

-La variété *Nicotiana tabacum* L. cv *Virginie vk51* appartient au type fire-cured. Cette variété est la plus cultivée dans le monde pour la production du tabac.

2. Les conditions de culture

Les graines de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) ont été semées dans un terreau stérilisé. La germination a été effectuée dans une chambre climatique contrôlée. Après 6 semaines, les plantules au stade trois feuilles sont transférées dans des tubes (20-50 mL) contenant un milieu nutritif hydroponique renouvelé tous les deux jours et préparé à base de la solution d'Auckland. La solution nutritive est composée de 1 M KNO₃; 1 M Ca(NO₃)₂.H₂O; 1 M MgSO₄.7H₂O; 1 M KH₂PO₄ et 0,01 M FeEDDHA.

Le clomazone est apporté à la solution nutritive à des concentrations de 10⁻⁵ à 1 µM, six semaines après le début de la germination et est maintenu jusqu'à 14 jours. Les plantules ont été maintenues dans une chambre climatique où la température est de 22 °C le jour et de 17 °C la nuit, l'humidité relative est de 60 %, le cycle jour/nuit est de 16 h/8 h et l'intensité lumineuse (PPFD) de 50 µmol photons m⁻² s⁻¹.

Au cours des expérimentations qui ont permis l'étude des mécanismes impliqués dans la toxicité du clomazone chez les deux variétés *Xanthi* et *Virginie*, les différentes mesures ont été effectuées après 14 jours de traitement par le clomazone. La concentration en clomazone retenue a été de 1 µM.

Un lot de plantules de la variété *Virginie* ont été placées sous une alternance jour/nuit de 16 min/ 8 min, à partir du J₀ et ceci pendant trois jours. Au cours de cette expérimentation, les différentes mesures effectuées l'ont été à J₀, J₃, J₁₀, J₁₇, J₂₄.

Les plantules ayant subi ce traitement ont été repiquées en culture sous serre dans un mélange terreau/tourbe (v:v) pendant 60 jours supplémentaires jusqu'au stade de floraison du tabac (Figure 2).

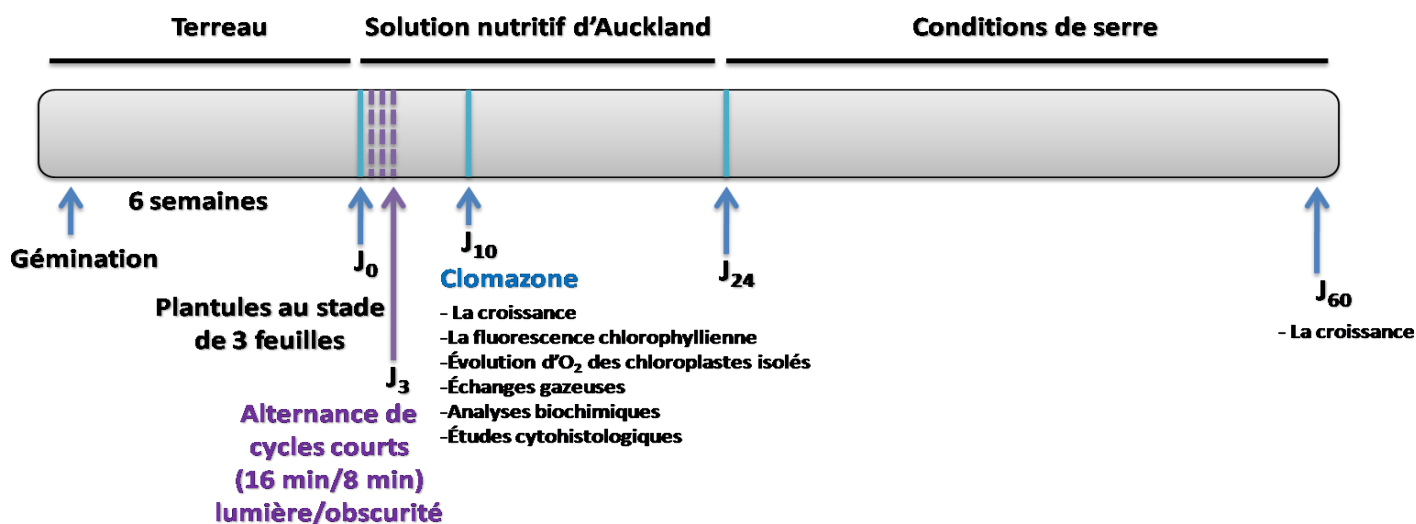


Figure 2. Représentation schématique du protocole expérimental, des traitements et des conditions de culture. J₀, J₃, J₁₀, J₂₄ et J₆₀ se réfèrent aux jours après le traitement par l'alternance.

3. Méthodes

3.1. Détermination de la croissance

La croissance des plants de tabac a été déterminée par des mesures de surface foliaire, de longueur de tiges et des mesures de masses fraîche et sèche. La surface foliaire est calculée grâce au logiciel Image J. La masse fraîche est obtenue par pesée immédiatement après le prélèvement. La masse sèche est obtenue après passage à l'étuve à 80 °C jusqu'à obtention d'un poids constant.

3.2. Détermination des paramètres de fluorescence de la chlorophylle *a* et des échanges gazeux

L'efficacité photochimique maximale (F_v/F_m) du PSII a été mesurée en utilisant les cinétiques rapide et lente de fluorescence. Les feuilles de tabac sont adaptées à l'obscurité pendant 20 minutes. Les cinétiques rapides sont mesurées en utilisant un fluorimètre Handy-PEA (Hansatech Ltd., Kings Lynn, UK). L'intensité du flash saturant est de $3,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. L'efficacité photochimique maximale du PSII, l'index de performance (PI_{abs}) et les différents

paramètres du test *OJIP*, développés par Strasser, ont été calculés automatiquement. L'efficacité photochimique du PSII à la lumière ($\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_0')/F_m'$), le taux de transport d'électrons photosynthétiques à la lumière saturée ($\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times A \times 0.5$) et le quenching photochimique ($qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$) ont été mesurés en utilisant un système de mesure d'échanges gazeux couplés à des mesures de fluorescence (LI-6400-40 LCF, LI-Cor, Lincoln NE, USA), sous une intensité lumineuse (PPFD) de 500 et 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La teneur en CO_2 est de 400 ppm et l'humidité relative de 60 %. La photosynthèse nette et maximale (P_n et P_{max}), la conductance stomatique, la concentration cellulaire en CO_2 et la transpiration ont été mesurés grâce au système de mesure des échanges gazeux photosynthétiques (LI-Cor, Lincoln, Nebr., USA) équipé d'une chambre de mesure pour feuille (LI-6400-40 LCF). L'échantillon de feuille est placé dans la chambre de mesure dans laquelle, la teneur en CO_2 , obtenue grâce à un mélangeur de gaz est de 400 ou 2,000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. L'intensité lumineuse est de 500 ou 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Toutes les mesures ont été effectuées entre 10 h et 12 h sur la troisième feuille des plantules et sur la première feuille adulte épanouie lorsque les plants sont cultivés en serre.

3.3. Préparation des chloroplastes

Toutes les étapes de l'isolement des chloroplastes ont été effectuées dans la glace (4 °C). Les échantillons de chloroplastes intacts ont été préparés à partir des feuilles de plantes de tabac, 5 g de limbes des feuilles de chaque variété ont été coupés et bien lavés avec l'eau distillée (les nervures auront été supprimées). Les limbes ont été broyés pendant 20-30 secondes dans une solution de 30 mL de tampon d'extraction (ME) froid contenant: 6 mL du milieu de base (MB), 18 g de Sorbitol et 300 mL d'eau distillé, à l'aide d'un mixeur de cuisine. Le milieu (MB) contient: Sorbitol (660 mM), KCl (20 mM), EDTA Na_2 (2 mM) et HEPES-KOH (100 mM) (pH 7,9). Après le broyage, le mélange est filtré à l'aide de cinq couches de gaze. Le filtrat est rapidement centrifugé à $1500 \times g$ pendant 2 min à 4 °C.

Le culot récupéré contient en partie des chloroplastes isolés. Pour éclater les chloroplastes, le dernier culot est resuspendu dans un milieu de suspension (MS) dilué 10 fois en utilisant de l'eau distillée. Le milieu de suspension (MS) contient: 10 mL du (MB), 100 μL de solution MgCl_2 (200 mM), et 100 μL d'une solution de MnCl_2 (200 mM).

La teneur totale en chlorophylle (*a*, *b*) des échantillons de chloroplastes a été estimée en prenant 10 μL de l'échantillon qui ont été ajoutés à 1 mL d'acétone à 80 % (v:v). Le mélange a été homogénéisé et vortexé pendant 2 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 645

nm et 663 (A_{645} et A_{663} , respectivement) à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom Libra S22, Ltd., UK). La concentration en chlorophylle *a* été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\mu\text{g Chl mL}^{-1} = (12,7 A_{663} - 2,69 A_{645}) + (22,9 A_{645} - 4,68 A_{663})$$

3.4. Mesure de l'évolution d'O₂ et activité de la chaîne de transfert des électrons photosynthétiques

Grâce à une électrode de Clark (Oxygraph système DW1, Hansatech Instruments, Norfolk, UK) l'évolution d'oxygène a été mesurée en présence d'une suspension de chloroplastes éclatés en milieu hypotonique pour permettre l'entrée de l'ensemble des composés utilisés tels que les accepteurs d'électrons, peu aptes à traverser les membranes. En l'absence d'un accepteur d'électrons, le fonctionnement de la chaîne de transport photosynthétique est partiellement ou totalement inhibé. Il est donc nécessaire d'ajouter à la solution un accepteur d'électrons. Les mesures effectuées correspondent alors aux variations d'émission d'oxygène lors de l'ajout d'un accepteur externe d'électrons. Ceci permet également d'exclure de la mesure les variations de concentration en oxygène dues à la respiration mitochondriale, ou au fonctionnement de la NADPH oxydase par exemple.

Les mesures ont été effectuées en présence de ferricyanure de potassium, nigéricine, benzoquinone et méthylviologène.

Le ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$ (2 mM)), est le classique accepteur d'électrons dans la réaction de Hill. Ce composé se comporte comme un accepteur artificiel d'électrons agissant à l'extrémité de la chaîne de transfert des électrons, à la place de la ferrédoxine (laquelle a diffusé hors du stroma lors de la rupture de l'enveloppe). C'est donc un accepteur pour le photosystème I. Les mesures représentent l'activité de l'ensemble de la chaîne de transfert des électrons.

La vitesse d'évolution d'oxygène et de transfert des électrons en présence de ferricyanure est fortement stimulée, d'un facteur 8 à 10 par l'ajout de nigéricine. Ce composé se comporte comme un découplant et annule le gradient de protons existant sous éclaircissement entre le lumen et le stroma. En effet le gradient de pH transmembranaire freine le transport des électrons en déplaçant l'équilibre chimique entre les plastoquinones réduites et oxydées. Un fort gradient de pH est associé à une accumulation des quinones réduites, ce qui est à l'origine d'une diminution de l'émission des électrons par le PSII.

Le ferricyanure de potassium peut être remplacé par de la benzoquinone, une quinone exogène qui prend la place de la quinone naturelle Q_B dans son site D1 et court-circuite les plastoquinones du pool membranaire. La vitesse d'évolution de l'oxygène observée rend alors compte du fonctionnement du PSII indépendamment de l'ensemble de la chaîne de transport.

Le méthylviologène (MV) est un accepteur d'électrons de bas potentiel apte à fixer les électrons destinés à la ferrédoxine au niveau du PSI. Une molécule de MV est réduite par deux électrons en provenance du PSI et est protonnée pour donner MVH_2 . Ce composé instable s'oxyde spontanément pour donner de l'eau oxygénée, ce qui fait que le transfert des électrons se traduit ici par une consommation d' O_2 résultant de l'oxydation de MVH_2 en MV et H_2O_2 . Dans cette dernière réaction, le 2,6 chlorophénolendophénol (DCPIP) est utilisé comme donneur d'électrons en amont du PSI.

3.5. Analyses biochimiques

3.5.1. Dosage des pigments photosynthétiques

L'extraction et le dosage ont été effectués suivant la méthode décrite par [Lichtenthaler \(1987\)](#). Cent milligrammes de feuilles de tabac ont été broyées dans l'acétone, incubés 15 minutes dans la glace, centrifugés à $15,000 \times g$ pendant 5 min à 4 °C. La chlorophylle totale ($a+b$) et les caroténoïdes sont déterminés immédiatement après l'extraction en mesurant avec un spectrophotomètre ([Biochrom Libra S22, Ltd., UK](#)) les absorbances pour les longueurs d'ondes 470, 645 et 662 nm.

La teneur en pigments photosynthétiques a été calculée en utilisant les équations suivantes:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 11,24 \text{ DO}_{662} - 2,04 \text{ DO}_{645}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = 20,13 \text{ DO}_{645} - 4,19 \text{ DO}_{662}$$

$$\text{Car (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)} = (1000 \text{ DO}_{470} - 1,90 \text{ Chl } a - 63,14 \text{ Chl } b) / 214$$

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche (MF).

3.5.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

L'extraction et le dosage de H_2O_2 ont été effectués selon la méthode décrite par [Murshed et al. \(2013\)](#) avec certaines modifications. Deux cent cinquante milligrammes de feuilles de tabac ont été broyées et homogénéisées dans 1 mL de 0,1 % d'acide trichloracétique (TCA). Le broyat a été centrifugé à $12,000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C. Les aliquotes de 100 μL de chaque tube ont été placées dans des microplaques à 96 puits, et avec 50 μL de 10 mM d'un tampon phosphate de potassium (KH_2PO_4/K_2HPO_4) (pH 7) et 100 μL de 1 M KI ont été ajoutés dans

chaque puits. Les échantillons de contrôle ont été faits avec de l'eau au lieu de KI pour enlever la couleur de fond de l'extrait à 390 nm. Chaque plaque contenait également du H₂O₂ commercial pour générer une gamme étalon. Les plaques ont été agitées et les lectures d'absorbance ont été prises à 390 nm dans un lecteur de microplaque ([Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France](#)). La concentration de H₂O₂ a été déterminée à partir de courbe étalon. Les résultats sont exprimés en nmol/g de matière fraîche (MF) ou nmol/g de matière sèche (MS).

Les solutions de dosage:

0,1 % TCA: 0,2 g TCA dans 200 mL H₂O

10 mM Tp phosphate (pH 7): 3,85 mL (1 M KH₂PO₄) + 6,15 mL (1 M K₂HPO₄)

1 M KI: 4,15 g (KI) + 25 mL H₂O

Solution mère de H₂O₂ pour la gamme étalon: 1 µL H₂O₂ 30 % + 8,823 mL H₂O

3.5.3. Dosage de l'ascorbate

Les concentrations d'ascorbate réduit (AsA) et de dehydroascorbate (forme oxydée) (DHA) sont mesurées sur des feuilles de tabac broyées et conservées à -80 °C suivant la méthode décrite par [Murshed et al. \(2014\)](#) en y apportant certaines modifications. Cent milligrammes de poudre de feuille de tabac ont été homogénéisés avec 1 mL de 6 % d'acide trichloracétique (TCA) à 4°C. Les échantillons ont été centrifugés à 15,000 × g pendant 10 min à 4 °C, et 10 µL de surnageant ont été utilisés dans chaque essai. L'AsA total (AsA+DTT) a été déterminé en ajoutant du dl-dithiothréitol (DTT) afin de réduire le DHA en AsA. 10 µL de chaque échantillon ont été distribués dans un puits (en trois répétitions) sur 2 microplaques de 96 puits, et mélangés avec 10 µL de DTT 20 mM (l'essai de l'AsA total, microplaque 1) ou 0,2 M d'un tampon phosphate (pH 7,4) (l'essai de l'AsA réduit, microplaque 2). Les plaques ont été incubées à 42 °C pendant 15 min. Ensuite, 10 µL de la N-éthylmaléimide (NEM) (dosage de l'AsA total) ou 0,2 M d'un tampon phosphate (pH 7,4) (dosage de l'AsA réduit) ont été ajoutés et mélangés, suivi par 150 µL d'un réactif de coloration (contenant TCA 10 %; H₃PO₄; FeCl₃ et 2,2 dipyridil). Après l'incubation à 42 °C pendant 40 min, les plaques ont été agitées et les lectures d'absorbance ont été effectuées à 525 nm dans un lecteur de microplaque ([Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France](#)). Les concentrations en AsA des échantillons sont calculées à partir d'une courbe standard réalisée avec L-acide ascorbique commercial. La concentration de DHA est estimée à partir de la différence entre l'ascorbate total et AsA.

Les résultats sont exprimés en mg/g de matière fraîche (MF) ou mg/g de matière sèche (MS).

Les solutions de dosage:

6 % TCA: 12 g TCA dans 200 mL H₂O

10 % TCA: 20 g TCA dans 200 mL H₂O

0,2 M Tp phosphate (pH 7,4): 39,6 mL (1 M KH₂PO₄) + 160,4 mL (1 M K₂HPO₄)

20 mM DTT: 30,85 mg dithiothréitol (DTT) + 20 mL 0,2 M Tp phosphate (pH 7,4), conservé comme 1 mL à -20 °C

1 % NEM: 100 mg N-éthylmaléimide + 20 mL H₂O, conservé comme 1 mL à -20 °C

Solution mère de 1 M AsA pour la gamme étalon: 176,12 mg AsA + 10 mL TCA 6 %

: 100 µL 1 M AsA + 900 µL TCA 6 %

150 µL de réactif de coloration: 5 mL TCA 10 % + 4 mL H₃PO₄ 42 % + 4 mL 2,2 dipyridil (70 % éthanol) + 3 % FeCl₃

3.5.4. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

1. Extraction des enzymes

L'extraction des protéines a été réalisée selon [Murshed et al. \(2008\)](#). Cent cinquante milligrammes de poudre des feuilles de tabac conservées à -80 °C ont été homogénéisées dans 1 ml de tampon 50 mM MES/KOH (pH 6) contenant: 40 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, et 1 mM de l'AsA. Le mélange est ensuite centrifugé à 15,000 × g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et il représente la fraction des protéines ou extrait brut qui sera immédiatement utilisé pour la détermination des activités enzymatiques.

Les solutions d'extraction:

50 mM MES/KOH (pH 6): 0,976 g MES (Méthionine) + 0,2982 g KCl (40 mM KCl) + 0,0222 g CaCl₂ (2 mM CaCl₂) + 100 mL H₂O

Solution mère de 1 M AsA est préparé au dernier moment: 176,12 mg AsA + 10 mL H₂O

1 mM AsA: 30 µL (1 M AsA) + 30 mL tampon MES

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines dans chacun des extraits protéiques obtenus est effectué suivant la méthode décrite par [Bradford \(1976\)](#). Cette méthode est basée sur la liaison de Bleu de Coomassie G-250 avec les liaisons peptidiques. Cette réaction conduit d'un changement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm.

Une partie de surnageant ou l'extrait des échantillons est déposé dans les puits des plaques. Puis 250 µL de réactif de Bradford sont ajoutés dans chacun des puits et les plaques sont alors

incubées à température ambiante pendant 45 min. L'absorbance est lue à 595 nm dans un lecteur de microplaque ([Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France](#)).

Les solutions de dosage:

Standard BSA (Bovine Serum Albumine): solution mère de 10 mg/mL BSA + le tampon d'extraction pour préparer la gamme étalon

3. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

Toutes les activités enzymatiques ont été déterminées dans des réactions cinétiques, avec un volume final de 0.2 ml à 25 ° C en utilisant des microplaques contenant 96 puits ([Murshed et al., 2008](#)).

- L'ascorbate peroxidase (APX)

L'activité de l'APX a été déterminée spectrophotométriquement en suivant la diminution de l'absorbance de l'AsA à 290 nm ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) due à son oxydation. Le mélange réactionnel est constitué de 50 mM tampon phosphate (pH 7), 0,25 mM AsA, 5 μL de l'extrait et 5 mM de H_2O_2 . La réaction est initiée par l'addition de 5 μL de H_2O_2 (200 mM).

Les solutions d'analyse:

50 mM tampon phosphate (pH 7): 19,25 mL (1 M KH_2PO_4) + 30,75 mL (1 M K_2HPO_4), puis complété à 1 L avec H_2O .

0,25 mM AsA: 5 μL 1 M AsA + 20 mL tampons phosphate (pH 7)

5 mM H_2O_2 : 100 μL H_2O_2 30 % + 4,3 mL H_2O , puis 5 μL par puits

- Déhydroascorbate reductase (DHAR)

L'activité de DHAR a été déterminée dans 200 μL d'un mélange réactionnel constitué de 50 mM de tampon HEPES (pH 7), 0,1 mM EDTA, 2,5 mM GSH, 0,2 mM DHA et 5 μL de l'extrait protéique. L'activité a été déterminée en mesurant la production d'ASA à A_{265} et a été calculée à partir du coefficient d'extraction $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Les solutions d'analyse:

50 mM tampon HEPES (HydroxyEthyl Pipérazine Ethane Sulfonique) (pH 7): 1,1915 g HEPES dans 100 mL H_2O (le pH est ajusté avec NaOH)

0,1 mM EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique): 1,641 g EDTA dans 10 mL H_2O (solution mère à 0,5 M (pH 8))

4 μL (0,5 M EDTA) dans 20 mL tampon HEPES

2,5 mM GSH (Glutathion réduit): 0,153366 g GSH dans 2 mL H_2O (solution mère à 250 mM) 200 μL (250 mM GSH) dans 20 mL tampon HEPES

0,2 mM DHA (Déhydroascorbate): 0,027856 g DHA dans 10 mL H₂O (solution mère à 8 mM)

5 µL (0,2 mM DHA) par puits

- *Monodéhydroascorbate reductase (MDHAR)*

L'activité de MDHAR a été déterminée dans un mélange réactionnel comprenant de 100 mM tampon HEPES (pH 7,6), 2,5 mM AsA, 0,25 mM NADH, 5 µL de l'extrait protéique et 0,4 unités d'ascorbate oxydase. L'activité est déterminée en mesurant l'oxydation du NADH à 340 nm pendant 5 min et est calculée à partir du coefficient d'extraction 6,22 mM⁻¹cm⁻¹.

Les solutions d'analyse:

100 mM tampon HEPES (pH 7,6): 2,383 g HEPES dans 100 mL H₂O (le pH est ajusté avec NaOH)

0,25 mM AsA: 50 µL (1 M AsA) dans 20 mL tampon HEPES

0,25 mM NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide): 0,0071 g NADH dans 1 mL H₂O (solution mère à 10 mM)

: 0,5 mL (10 mM NADH) dans 20 mL tampon HEPES

0,4 unité AO (Ascorbate Oxydase): 134,4 U dans 0,5 mL H₂O (solution mère à 264,8 U/mL)

: 100 µL (264,8 U/mL AO) + 1,55 mL H₂O, puis 5 µL par puits

- *Glutathione reductase (GR)*

L'activité de GR a été analysée dans un mélange réactionnel constitué de 50 mM tampon HEPES (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 0,25 mM NADPH, 5 µL de l'extrait et 0,5 mM GSSG. L'activité est déterminée en mesurant l'oxydation du NADPH à 340 nm et calculé à partir de coefficient d'extinction de 6.22 mM⁻¹cm⁻¹.

Les solutions d'analyse:

50 mM tampon HEPES (pH 8): 1,1915 g HEPES dans 100 mL H₂O (le pH est ajusté avec NaOH)

0,5 mM EDTA: 25 µL (0,5 M EDTA) dans 20 mL tampon HEPES

0,25 mM NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) : 0,01042 g NADPH dans 1,25 mL H₂O (solution mère à 10 mM)

: 0,5 mL (10 mM NADPH) dans 20 mL tampon HEPES

0,5 mM GSSG (Glutathione disulphide): 0,0245 g GSSG dans 2 mL H₂O (solution mère à 20 mM), puis 5 µL par puits

- *Catalase (CAT)*

L'activité de CAT a été mesurée dans un mélange réactionnel contenant 50 mM tampon phosphate (pH 7), 15 mM H₂O₂ et 5 µL de l'extrait. La disparition de H₂O₂ est mesurée à 240 nm et calculé à partir de coefficient d'extinction de 43.6 M⁻¹cm⁻¹.

Les solutions d'analyse:

50 mM tampon phosphate (pH 7): 19,25 mL (1 M KH₂PO₄) + 30,75 mL (1 M K₂HPO₄), puis complété à 1 L avec H₂O

15 mM H₂O₂: 300 µL H₂O₂ 30 % + 4,1 mL H₂O (solution mère à 600 mM), puis 5 µL par puits

- *Superoxyde dismutase (SOD)*

L'activité de la SOD a été déterminée dans 0,1 mL d'un mélange de réaction contenant 50 mM tampon phosphate (pH 7,8), 13 mM méthionine, 75 mM (NBT), 0,1 mM EDTA, 10 µM l'extrait, et 2 µM riboflavine. Chaque microplaque contient également 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 et 1.8 U de SOD commerciale ([de foie bovin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA](#)) pour générer une courbe d'étalonnage. Les microplaques sont ensuite placées au-dessus de la lumière blanche fournie par un commercial projecteur commercial ([Horizon, Model Apollo, Lincolnshire, IL, USA](#)) pendant 5 min. Puis l'absorbance est lue à 560 nm dans un lecteur microplaque. La SOD présente dans l'extrait inhibe la réduction photochimique de NBT en bleu formazan. L'activité est calculée en unités de SOD à partir de la courbe d'étalonnage. Une unité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber la photoréduction de NBT par 50 %.

Les solutions d'analyse:

50 mM tampon phosphate (pH 7,8): 4,6 mL (1 M KH₂PO₄) + 45,4 mL (1 M K₂HPO₄), puis complété à 1 L avec H₂O

13 mM methionine: 0,19396 g methionine dans 100 mL tampon phosphate

75 mM NBT (Nitro Blue Titrazolium): 0,006132 g NBT dans 100 mL tampon phosphate

0,1 mM EDTA: 20 µL (0,5 M EDTA) dans 100 mL tampon phosphate

2 µM riboflavine: 0,07528 g riboflavine dans 100 mL tampon phosphate (solution mère à 2 mM)

: 100 µL (2 µM riboflavine) dans 100 mL tampon phosphate

Standard SOD: La gamme étalon a été préparée à la base d'une solution mère (15000 U dans 0,5 mL H₂O, alors solution mère à 30 U µL⁻¹)

3.5.5. Dosages des composants phénoliques**1. Extraction**

Cent milligrammes des feuilles de tabac lyophilisées ont été extraits dans 2 mL de solvant d'extraction méthanol/eau (80:20 v:v) acidifié avec 0,1 % d'acide chlorhydrique (1N) et contenant un étalon interne, la méthoxyflavone ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). L'extraction est réalisée par passage au bain à ultrasons dans de l'eau glacée pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite congelés dans de l'azote liquide puis mélangés aux vortex de manière à détruire les structures cellulaires. Ils sont ensuite agités par passage aux ultrasons pendant 5 min avant d'être centrifugés ($14.000 \times g$, 15 min, à 4 °C). Les surnageants sont filtrés sur filtre-seringue avec membrane en cellulose régénérée de 0,45 μm .

2. Le dosage par HPLC

L'analyse chromatographique des extraits de feuilles de tabac a été réalisée sur une chromatographie liquide à haute performance Waters Alliance (Mildford, MA, USA) équipée d'une pompe Modèle 600, d'un contrôleur de gradient Modèle 600, d'un injecteur automatique Modèle 717 plus et d'un détecteur UV à barrette de photodiodes (Waters 2996 PDA) et pilotée par le logiciel Empower (Waters). La séparation des composés phénoliques a été réalisée sur une colonne Waters SunFire™ C18 (250 \times 4,6 mm) de 5 μm avec une pré-colonne Waters SunFire™ C18 (4 \times 4,6 mm ID). Les solvants A (acétonitrile/acide formique 0,5 %) et B (eau/acide formique 0,5 %) sont utilisés pour effectuer le gradient d'élution comme décrit ci-dessous:

Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B
0	5	95
5	5	95
37	35	65
40	100	0
45	100	0
47	5	95
52	5	95

La séparation est réalisée à un débit de 1 mL/min et à une température de 30 °C. Le volume d'extrait méthanolique injecté est de 10 μL . Toutes les analyses ont été effectuées trois fois. Les composés phénoliques ont été identifiés sur la base de leur absorbance UV à 280 nm et de

leur temps de rétention, et quantifiés à l'aide des droites d'étalonnage obtenues à partir de composés standards provenant du commerce ([Extrasynthèse, Genay, France](#)). La teneur en composés phénoliques a été exprimée en mg/g de matière sèche (MS).

3.6. Analyses cytohistologiques

3.6.1 Prélèvements et fixation des échantillons

Pour chacune des deux variétés étudiées des fragments de limbe d'à peu près 5 mm² ont été excisés de la partie médiane de 3 feuilles collectées au hasard. Au fur et à mesure de leur excision, les échantillons ont été immergés dans une solution fixatrice constituée de: paraformaldéhyde à 4 % et de glutaraldéhyde à 4 % dans le tampon phosphate 0,2 M, pH 7,4 contenant de la caféine à 1 %. Pour faciliter la pénétration du fixateur, les échantillons ont été soumis à un vide ménagé (20 minutes, trompe à vide) et conservés à 4 °C pendant 48 h.

3.6.2 Inclusion et section

Après fixation, les échantillons ont été rincés à l'eau, déshydratés dans l'éthanol (séries 70-100 %) avant infiltration et inclusion à l'historesine Technovit 7100 (Kultzer) selon les recommandations du fournisseur. Un microtome à rétraction (Supercut 2025, Leica, Wetzlar, Allemagne) a été utilisé pour la réalisation de coupes transversales de 3µm d'épaisseur qui ont été collectées sur des lames porte objets.

3.6.3 Colorations

Les analyses cytohistologiques ont été réalisées sur des sections colorées selon les procédures cytochimiques PAS (acide périodique/réactif de Schiff) et naphthol blue black. Le test PAS révèle spécifiquement les polysaccharides (amidon, cellulose, pectines) en rose vif et le naphthol blue black (NBB) colore en bleu les substances protéiques (voir [El Maâtaoui et Pichot, 1999](#)). Les substances phénoliques ont été révélées sous éclairage UV (fluorescence naturelle) sur des sections non colorées montées dans l'huile à immersion.

3.6.4 Analyses microscopiques

Les sections ont été analysées à l'aide d'un microscope optique (Leica DMR, Wetzlar, Allemagne) équipé pour la l'épifluorescence et connecté à une caméra digitale (Leica DFC 300 FX, Wetzlar, Allemagne). Pour chaque variété, 5 fragments provenant des 3 feuilles utilisées ont été analysés.

4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce aux tests Wilcoxon et ANOVA sur l'ensemble des données.

Le nombre d'échantillons pour chaque analyse sera précisé avec les résultats dans les chapitres suivants.

**Chapitre III: Étude de l'effet de faibles
concentrations de clomazone sur les
processus photosynthétiques chez le tabac
(*Nicotiana tabacum* L.)**

Étude de l'effet des faibles concentrations de clomazone sur les processus photosynthétiques chez le tabac (*Nicotiana tabacum* L.)

Ce chapitre est divisé à deux parties:

La première partie est présentée sous la forme d'un article publié dans *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* (Darwish et al., 2013).

La deuxième partie est présentée sous la forme d'un article au cours d'acceptation dans *Journal of Plant Physiology*.

Publication 1

Study of photosynthesis process in the presence of low concentrations of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 9 No. 1 2013, pp. 229-245 ISSN 1997-0838
Original Text Copyright © 2013 by Darwish, Lopez-Lauri and Sallanon

L'objectif de ce travail a été de rechercher si les mesures des paramètres de fluorescence chlorophyllienne permettent de mettre en évidence l'existence d'un stress photooxydatif en réponse au clomazone chez deux variétés de tabac *Xanthi* et *Virginie*.

Expérimentation

Les plantules de chaque variété au stade trois feuilles ont été traitées par de faibles concentrations de clomazone (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 0 μM) pendant 14 jours. Le clomazone est ajouté à la solution nutritive qui est renouvelée tous les deux jours. L'expérimentation a été effectuée dans une chambre de culture, avec un cycle jour/nuit de 16 h/8 h, une température de 22 °C pendant le jour et 17 °C la nuit, une humidité relative de 60 % et une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les mesures effectuées ont été les dosages des pigments photosynthétiques (chlorophyll (*a*, *b*) et caroténoïdes) et les paramètres photosynthétiques calculés de test *OJIP* à partir des mesures de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne.

Principaux résultats

Le clomazone réduit la teneur en chlorophylle totale (*a+b*) et en caroténoïdes, ainsi que la teneur en LHC (le ratio chlorophylle *a/b*). L'efficacité photochimique maximale (F_v/F_m) du photosystème II (PSII) diminue dans les feuilles jeunes par rapport aux feuilles adultes de manière plus importante chez *Virginie* que chez *Xanthi*. De très faibles concentrations (10^{-4} μM) affectent les paramètres du test *OJIP*. Leur sensibilité se révèle très efficace pour discriminer les variétés. Pour un grand nombre de paramètres, la variété *Virginie* est plus affectée par le clomazone que la variété *Xanthi*.

Conclusion

Les résultats montrent que le clomazone induit un stress photooxydatif et que la variété *Virginie* est plus sensible au clomazone que la variété *Xanthi* bien que sa teneur en caroténoïdes soit plus élevée. Hors, l'effet toxique du clomazone est décrit comme étant le résultat de l'inhibition de l'activité de l'enzyme DXS, première enzyme de la voie des isoprénoïdes, voie qui conduit à la biosynthèse des caroténoïdes. La teneur en pigments chlorophylliens n'est donc pas le seul paramètre lié à la toxicité du clomazone.

Les mesures de la fluorescence de la chlorophylle *a* et du test *OJIP* montrent que plusieurs paramètres (PI_{abs} , $1-V_J$, ABS/RC , $DI0/RC$, $TR0/RC$, $ET0/RC$ et $ET0/ABS$) sont affectés par le clomazone sans relation directe avec la synthèse des pigments.

Le test *OJIP* peut être utilisé avec efficacité pour étudier les effets du clomazone sur la chaîne de transport des électrons. La compréhension des mécanismes d'action du clomazone sur la chaîne de transport des électrons nécessite des études plus approfondies.

Study of photosynthesis process in the presence of low concentrations of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Majd Darwish · Félicie Lopez-Lauri · Huguette Sallanon
Laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse
301, rue
Baruch de Spinoza BP 21239, 84916 Avignon cedex 9, France
Tel.: +33-4-9084-2200; fax: +33-4- 9084-2201
E-mail address: majd.darwish@alumni.univ-avignon.fr

Received October 25, 2012

The effect of chemical residues of clomazone on photosynthetic processes has been studied by using several low concentrations of the herbicide (0, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 and 0.00001) μM and seedlings of two varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*; *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*). The content of photosynthetic pigments, the parameters of the chlorophyll *a* fluorescence and the JIP-test were performed on an adult leaf (AL) and a young leaf (YL), which gave a complementary design to know the action's mode of clomazone on the plant physiological processes. Clomazone reduced the total chlorophyll (*a+b*), carotenoids pigments (reduction in size antenna pigments judged by an increase in the chlorophyll *a/b* ratio) in young leaves more than adult leaves. The maximal photochemical efficiency (F_v/F_m) of photosystem II (PSII) decreased significantly in young leaves compared to adult leaves and in *Virginie* than *Xanthi*. Among the parameters calculated of the JIP-test most affected by the treatment, PI_{abs} , $1-V_J$, ABS/RC , $DI0/RC$, $TR0/RC$, $ET0/RC$, $ET0/ABS$, which indicated a comparable effects of clomazone (1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM) between the two types of leaves and the varieties used. More, the results showed that the concentration (1 μM) was the most effective among the other low concentrations used and the *Virginie* variety is more sensitive than the *Xanthi* variety. We conclude that clomazone has probably two combined functions (physiological, toxic) judged by the different behavior of both types of leaves in the presence of the herbicide.

Keywords: *Chlorophyll fluorescence; JIP-test; Photosynthesis; Photosystem II; Tobacco*

1. Introduction

The plant uses light energy to synthesize organic compounds. The light reactions of photosynthesis in higher plants are conducted through the cooperation of two photosystems, PSI and PSII, which are physically distinct in the stroma and grana of the thylakoid membrane, respectively (Whitmarsh and Govindjee 1999; Dekker and Boekema 2005). Today, because of the current development in agricultural production, pesticides and herbicides that are named plant protection products have become a major environmental danger which menaces the plants on earth's life. Herbicides are chemicals commonly used to control weeds in agriculture and most of them are continually discharged into aquatic environments through surface runoff (Kloepfel et al., 1997). Many studies have been performed to determine the action's mode of herbicides in the production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and the three intermediate redox states (superoxide, peroxide and hydroxyl radical) which are more reactive (Wong 2000; Frankart et al., 2003). Other studies have been conducted in particular to elucidate the action's mechanism of herbicides on plant physiology (growth rate, pigment content and chlorophyll fluorescence) and vegetable production (Waldhoff et al., 2002; Kaňa et al., 2004; Walters and young 2010; Souza et al., 2012). In the case of plants exposed to herbicides, and under a continuous light, electron transport will be blocked and Q_A will stay in reduced state, promoting the formation of reactive oxygen species, such as ($^1\text{O}_2$), *via* chlorophyll triplet ($^3\text{Ch}^*$) (Rutherford and Krieger-Liszakay 2000; Fufezan et al., 2002). During recent years, an intensive use of herbicides has raised increasing concern mainly because of their massive pollution of the environment. Glyphosate, Clomazone and Paraquat are the most widely used broad-spectrum herbicides (Rosso et al., 2010).

Clomazone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one] is a pre-emergence herbicide used against broad-leafed and grassy weeds (Chang and Konz 1984; Warfield et al., 1985). It is widely used to control weeds in canopies of soybean, cotton, sugar cane, maize, rice, tobacco (Chang et al., 1997). Clomazone is used in 78% of the planted area. Before flooding the fields for cultivation of the rice, clomazone alone or in combination with other herbicides is applied for control of weeds (Saldain and Deambrosi 2009). Clomazone is absorbed by roots and emerging shoots, and transported with the transpiration stream in the xylem (Senseman 2007). It is generally accepted that clomazone prevents the accumulation of chloroplast pigments and plastidic isoprene evolution (Duke and Kenyon 1986; Zeidler et al., 2000). All results showed that the impact of clomazone on carotenoids and chlorophyll

biosynthesis leads to bleaching of leaves. Recently it was shown that the toxicity of clomazone is not induced by clomazone itself, but rather by its break down product, 5-ketoclomazone that blocks 1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate (DXP) synthase, the first enzyme of the plastidic isopentenyl diphosphate(IPP) synthesis pathway (Mueller et al., 2000; Ferhatoglu et al., 2001). More, (Souza et al., 2012) indicated that combined clomazone with ametryn herbicide had caused an oxidative stress in the *Emilia coccinea* plants. In reality, most the experiments which have used high concentrations of clomazone indicate the toxic effect of clomazone on plastid enzymes (DXP, MEP, IPP) and therefore on the biosynthesis of photosynthetic pigments (chlorophyll (*a*, *b*) and carotenoids). Limited reports have been published on the effects of low concentrations of clomazone on photosynthesis using chlorophyll *a* fluorescence parameters and particularly in cultivar tobacco. The aim of this work was to study the low concentrations' effects (chemical residues which may exist in the environment) on the physiological process by using several low concentrations of the clomazone. And also if the herbicide leads to an oxidative stress by special regard to changes in photosynthetic pigments, parameters of the chlorophyll *a* fluorescence and by using the JIP-test as a method to evaluate the photosynthesis in adult leaves and young leaves of tobacco's seedling growing in the medium containing clomazone.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and chemical treatment

Seeds of two varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*; *Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*) were cultivated in soil for two weeks. Germination was carried out in sterile conditions. Tobacco seedlings were obtained in three leaves stage after 5 weeks of the germination. Then, seedlings were placed for 14 days in a nutrient solution of Auckland (1 M KNO₃ (101 g/L) 1 M Ca(NO₃)₂.H₂O (236 g/L) 1 M MgSO₄.7H₂O (246.5 g/L) 1 M KH₂PO₄ (136.08 g/L), 0.01 M FeEDDHA (4.352 g/L)) with low concentrations (0, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001) μ M of the clomazone herbicide (Sigma-Aldrich, USA) in tubes (15 mL). The culture solution was refreshed two times a week. The plants were grown in a growth chamber with temperature of 22/17 °C, humidity 60%, 16 h light/8 h dark cycle and the flux of photons (PAR) 70 μ mol m⁻² s⁻¹, to minimize the effect of light and its role in the phenomenon of bleaching, (Duke and Kenyon 1986) shown that the use of the light intensity 150 μ mol photons PAR m⁻² s⁻¹ caused the photobleaching in seedlings of cowpea primary.

2.2. Determination of chlorophyll and carotenoids content

Total chlorophyll (*a+b*) and the total carotenoids were determined by extraction using pure acetone (100%) as solvent. Samples were incubated 15 min on ice. Then the samples were centrifuged 5 min at 15000 *g* and 4 °C. Quantification of chlorophyll and carotenoids was performed immediately after extraction. Absorbance readings were made at 662 and 645 nm for chlorophyll pigments and 470 nm for carotenoids. The content was calculated using the formula of [Lichtenthaler \(1987\)](#).

2.3. Chlorophyll fluorescence and the JIP-test

The behavior of photosystem II (PSII) can be evaluated using a rapid kinetics of the chlorophyll *a* fluorescence emitted by the leaves of plants adapted to darkness. The Chlorophyll *a* fluorescence was used to evaluate the state of seedlings in two different varieties of tobacco. The chlorophyll *a* fluorescence was determined in the dark, seedlings are adapted for 20 minutes in the dark, an adult (AL) and a young leaf (YL) was taken from each seedling for the measurement. The chlorophyll *a* fluorescence (expressed in relative units) was measured using a portable Handy ([PEA, Hansatech, UK](#)). A strong pulse of light (3,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) is used to determine the chlorophyll *a* fluorescence. The fluorescence parameters were calculated automatically, $\Phi_p0 = F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, which represents the maximal quantum yield photochemical of PSII ([Kitajama and Butler 1975](#)), and the quantum yield of open centers of PSII ([Maxwell and Johnson 2000](#)). The JIP-test was performed on all measures of fluorescence transient and is based on a simple model, how the flux of photons absorbed by photosynthetic pigments antenna (ABS) is dissipated as heat (DI) and fluorescence or transported as the trapped flux (TR) of reaction centers to be converted into energy redox by reducing the plastoquinone (Q_A) to (Q_A^-). Then (Q_A^-) is reoxidized to (Q_A), therefore the creation of an electron transport (ET) that leads to CO₂ fixation ([Heerden et al., 2004](#)). These fluxes are expressed in specific energy flux (per reaction center) or as proportions of other flux (ratios or yields). The values of fluorescence are corresponding to time intervals, the steps O-J-I-P were recorded and used as data origins in the JIP-test ([Strasser et al., 2000](#)). Including: the fluorescence intensity maximum (F_m), the fluorescence intensity at 50 μs (F_0), 300 μs (F_{300}), and 2 ms (F_J). The calculation of energy flux and ratios of specific flux was fully explained by Strasser and coworkers ([Strasser and Strasser 1995](#); [Tsimilli-Michael et al., 1995](#); [Strasser et al., 2000](#); [Hermans et al., 2003](#)).

Flux of specific energy expressed by the reaction center (RC)

Slope at the origin of the of normalized fluorescence rise Slope at the origin of the of normalized fluorescence rise: $M0 = (F_{300}-F_0) / (F_m-F_0) / 0, 25 \text{ ms}$

Observed rate of Q_A reduction: $TR0/RC = (M0/V_J) = (ABS/RC) (F_v/F_m)$

Rate of electron transport beyond Q_A^- : $ET0/RC = (TR0/RC) (1-V_J)$
 $= (TR0/RC) (ET0/TR0)$

Rate of photon absorption: $ABS/RC = (TR0/RC) / [(F_m-F_0)/F_m]$

Rate of heat dissipation: $DI0/RC = (ABS/RC) - (TR0/RC)$

Relative variable fluorescence at 2 ms: $V_J = (F_{2ms}-F_0) / (F_m-F_0)$

Efficiencies (or flux ratios)

Maximum efficiency with which an absorbed photon results in Q_A reduction:

$$TR0/ABS = (TR0/RC) / (ABS/RC) = (F_m-F_0)/F_m$$

Efficiency with which an absorbed photon results in electron transport beyond Q_A^- :

$$ET0/ABS = (ET0/RC) / (ABS/RC)$$

Density of reaction centers per the chlorophyll Functional reaction centers per cross-sectional leaf area: $RC/ABS = (RC/TR0) (TR0/ABS)$

Efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain further than Q_A^- : $ET0/TR0 = (ET0/RC) (TR0/RC) = 1-V_J$

Performance index

Compound function of light energy absorption, efficiency of Q_A reduced and conversion energy to electron transport:

$$PI_{abs} = [RC/ABS] [(TR0/ABS)/(F_0/F_m)] [(ET0/TR0)/V_J]$$

The subscript "0" indicates the quantification of PSII behavior at the onset of fluorescence induction.

ABS is proportional to the concentration of photosynthetic pigments of chlorophyll antenna Chl_{ant} .

2.4. Statistical analysis

Differences between treatment means were compared using the Wilcoxon test with R statistical software at the 95% probability. Data are presented for values \pm SE. The Significance levels are represented by letters (a, b, c, d) to determine significant differences between treatments.

3. Results and discussion

For a long time, carotenoids have been given a central role in photoprotection of the photosynthetic apparatus by limiting the destructive reactions ($^1\text{O}_2$) or by quenching the triplet state of Chl (Chl*), which is sensitive to the formation of reactive oxygen species (Cogdell et al., 1992; Telfer et al., 1994; Bartley and Scolnik 1995). Levels of chlorophyll (Chl *a*, Chl *b*) and total carotenoids were significantly reduced in leaves of the both tobacco's varieties at the highest concentration of clomazone (1 μM) used (Fig. 1C, D, G and H). Agrees with previous results showing that the photosynthetic pigments (Chls, carotenoids) decreased with increasing the concentration of clomazone (Lutzow et al., 1990; Weimer et al., 1992; Kaňa et al., 2004). But we find that the decrease in chlorophyll and carotenoids is more significant in young leaves of *Virginie* variety (Chls 55.77% (*Xanthi*), 77.91% (*Virginie*), carotenoids 51.09% (*Xanthi*), 73.61% (*Virginie*)) than adult leaves of *Xanthi* variety (Chls 5.78% (*Xanthi*), 38.88% (*Virginie*), carotenoids 3.08% (*Xanthi*), 33.82% (*Virginie*)). Clomazone caused a significant increase in ratio (chl *a/b*) in young leaves at the concentration (1 μM) in *Xanthi* variety and (1, 0.1 μM) in *Virginie* variety (Fig. 1B and F). The increase in ratio (chl *a/b*) indicates that the amount of pigments antenna (LHCII) reduced in the PSII of the thylakoid membrane (Lichtenthaler et al., 1982; Anderson et al., 1998; Kaňa et al., 2004). In addition, with (1 μM) of clomazone, there is a significant reduction in the ratio (chl (*a+b*)/car) in both type of leaves in *Virginie*, compared with *Xanthi* which shows a reduction not significant in the young leaves (Fig. 1A and E). This reduction expresses that carotenoids are more affected than Chls by the herbicide.

Chlorophyll fluorescence has been widely used in research of photosynthesis, such as studying the effect of several herbicides on the photosynthetic performance (Frankart et al., 2003; Kaňa et al., 2004; Vaillant-Gaveau et al., 2007). A significant decrease in (F_v/F_m) was observed at the (1 μM) treatment in adult leaves of *Virginie* variety and it was not significant in *Xanthi* variety, (Fig. 2C and F). Related to young leaves, F_v/F_m decreased significantly at the concentration (1 μM) ($F_v/F_m = 0.279$ (*Virginie*); $F_v/F_m = 0.454$ (*Xanthi*)). This result don't

corresponds with result of [Kaňa et al. \(2004\)](#) showing that clomazone cause a small reduction not significant in F_v/F_m , and with results of [Duke and Kenyon \(1986\)](#), who observed no direct effect of clomazone on electron transport in PSII. In addition, the performance index (PI_{abs}) had provided information on the seedlings tobacco's state treated with clomazone. We notice that clomazone (1 μ M, 0.1 μ M) affected both types of leaves, and the young leaves were the most affected. We found that there is a large reduction compared to the control for this parameter ((1 μ M) of clomazone $PI_{abs} = 0.054$ for (*Virginie*) and $PI_{abs} = 0.163$ for (*Xanthi*)) ([Fig. 2B and E](#)). This parameter is related to one hand with the density of reaction centers per chlorophyll, and the other hand with the maximum quantum yield (TR0/ABS) and the efficiency with which a trapped electron can go beyond Q_A^- in chain electron transport ($1 - V_j = ET0/TR0$) ([Strasser et al., 2000](#)).

The J step considered to be associated with an accumulation of $Q_A^- Q_B^-$ from as demonstrated by experimental results and theoretical simulations. Therefore it is necessary to follow the JIP-test to determine whether the effect of the herbicide on the photosynthetic apparatus is limited on the toxicity of clomazone, which inhibits the synthesis of (Chls, carotenoids), or there is another effect on the process of photosynthesis (the status of electron transport) accordingly. The JIP-test has been used to access the sensitivity of plants to different environmental conditions ([Tsimilli-Michael et al., 1995](#); [Krüger et al., 1997](#); [Ripley et al., 2004](#); [Appenorth et al., 2001](#); [Strauss et al., 2006](#); [Bussotti et al., 2007](#)). Our study confirmed that electron transport at the acceptor side of PSII was a clomazone-induced inhibitory site when tobacco's seedlings exposed to clomazone. A decrease value in the efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain further than Q_A^- ($1 - V_j = ET0/TR0$) in exposure to (1 μ M) clomazone in both young and adult leaves. But, the decrease was more pronounced in the young leaves and the *Virginie* variety ([Fig. 2A and D](#)). A significant increase in photons absorbed by the reaction center (ABS/RC) was observed in adult leaves of *Virginie* at the concentration (1 μ M), compared to *Xanthi* and other concentrations of the herbicide. In the young leaves, the effect of clomazone (1 μ M) touched the two varieties with a greater increase of (ABS/RC) in *Virginie* variety ([Fig. 3E and J](#)), agrees with [Hermans et al. \(2003\)](#), who noted that the total flux of photon absorbance of PSII by the number reaction center (ABS/RC) was decreased in plants collected, which have a poor performance, and with [Xia and Tian \(2009\)](#), who reported that (ABS/RC) increased in *Chlorella pyrenoidosa* exposed to excess Cu. The parameter (TR0/RC) is proportional to the excitation flux trapped by the reaction center (RC) ([Strasser et al., 2000](#)). A significant increase (TR0/RC) was only observed in adult leaves of the variety *Virginie* with clomazone

treatment (1 μM) (Fig. 3D). In the young leaves, (1 μM) of clomazone increased the energy trapped by the reaction center in both varieties, but the increase was greater in *Virginie* than *Xanthi* (Fig. 3I). This result is contradictory with Hermans et al. (2003), indicating that the excitation flux trapped by reaction centers of the PSII reduced with a poor performance of the plants collected. Our result corresponds to results obtained by Kaňa et al. (2004), who found that the (TR0/RC) parameter increased (30%) for barley plants cultivated in the presence of 500 μM clomazone compared to the control, that can be due to the increase in yield of light in the leaves, this may caused the acceleration of supply and excitation to the reaction center. In our case, this increase (TR0/RC) is due to the increase in photons absorbance (ABS) flux compared with number of reaction centers (RC). Energy dissipated into heat by the reaction center was only significantly increased in adult leaves treated with (1 μM) of clomazone in *Virginie* (Fig. 3C). In young leaves, (1 μM) clomazone leads to increase levels of energy dissipation (DI0) by the reaction center (RC), and the more increase was in *Virginie* (DI0= 30.27) compared to *Xanthi* (DI0= 3.59) (Fig. 3H). We find nevertheless an increase in the energy trapped by the reaction center. There is an important amount of energy that was dissipated as heat and this corresponds to Hermans et al. (2003) who reported the increase of energy dissipated into heat for plants of poor performance compared with control, agrees with Khamis et al. (1990) and Verhoeven et al. (1997), who indicated that the increase of dissipation into heat of the excited energy is probably due to the intervention of the xanthophyll cycle under conditions of treatment (a deficiency of nitrogen and light intensive). In addition, it is possible that the dissipation of energy into heat by the reaction center has increased with the reduction of carotenoids (LHCs), and therefore it has reduced the ability of pigments to protect the xanthophyll cycle (Kaňa et al., 2004). The electrons transported (ET0) by the reaction center (RC) were significantly reduced for adult leaves in *Virginie* at (1 μM) of clomazone and no difference was found in *Xanthi* (Fig. 3B). In young leaves, clomazone (1 μM) decreased the electrons transported beyond Q_A^- in both varieties, but the high decrease was in *Virginie* (50.79% compared to the control) compared to *Xanthi* (7.21% compared to the control) (Fig. 3G).

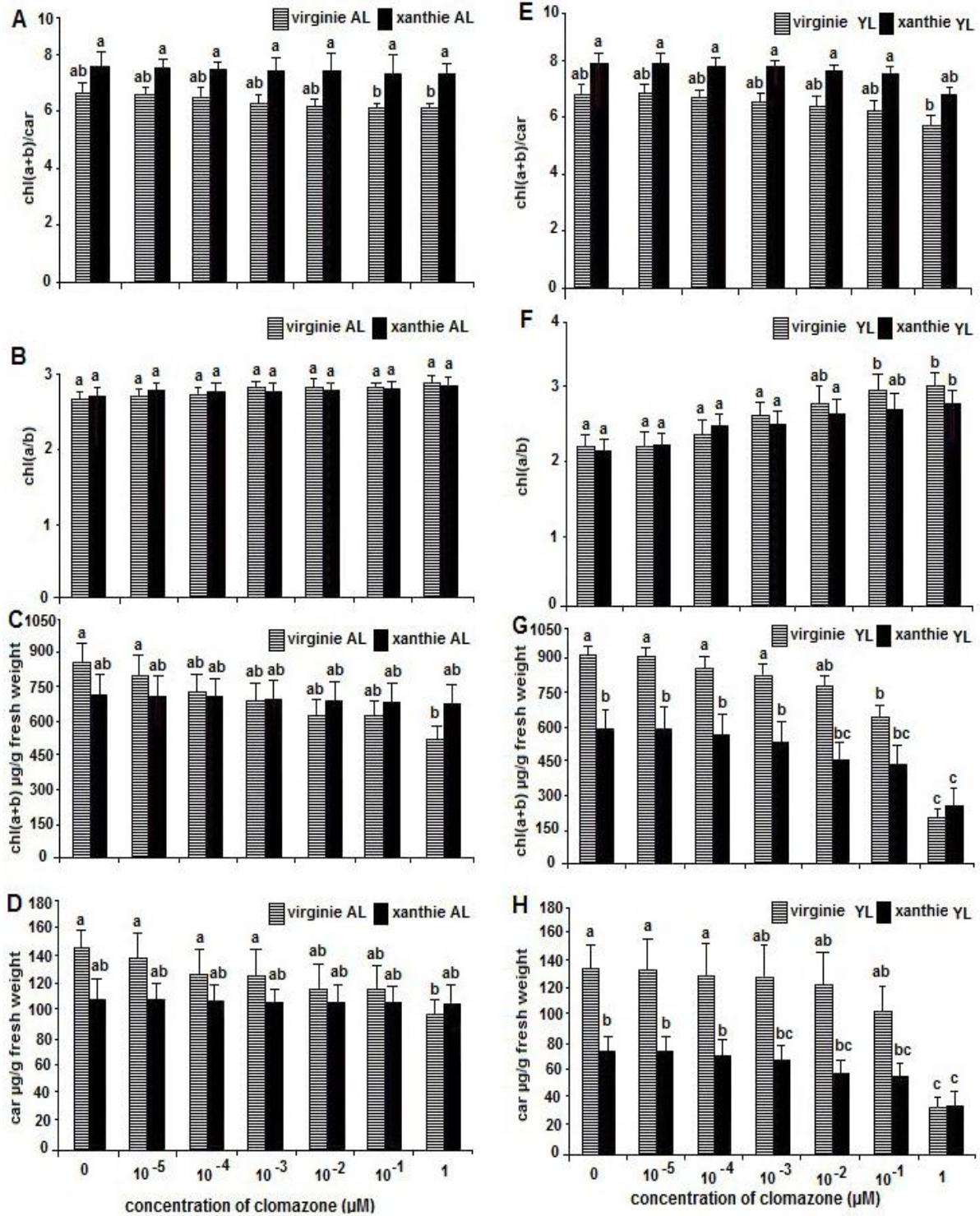


Fig 1. Influence of several low concentrations of clomazone on pigment content in leaves of two varieties of tobacco. All data represent means, SE for n= 8 and different letters (a, b, c, d) to determine significant differences between the treatments.

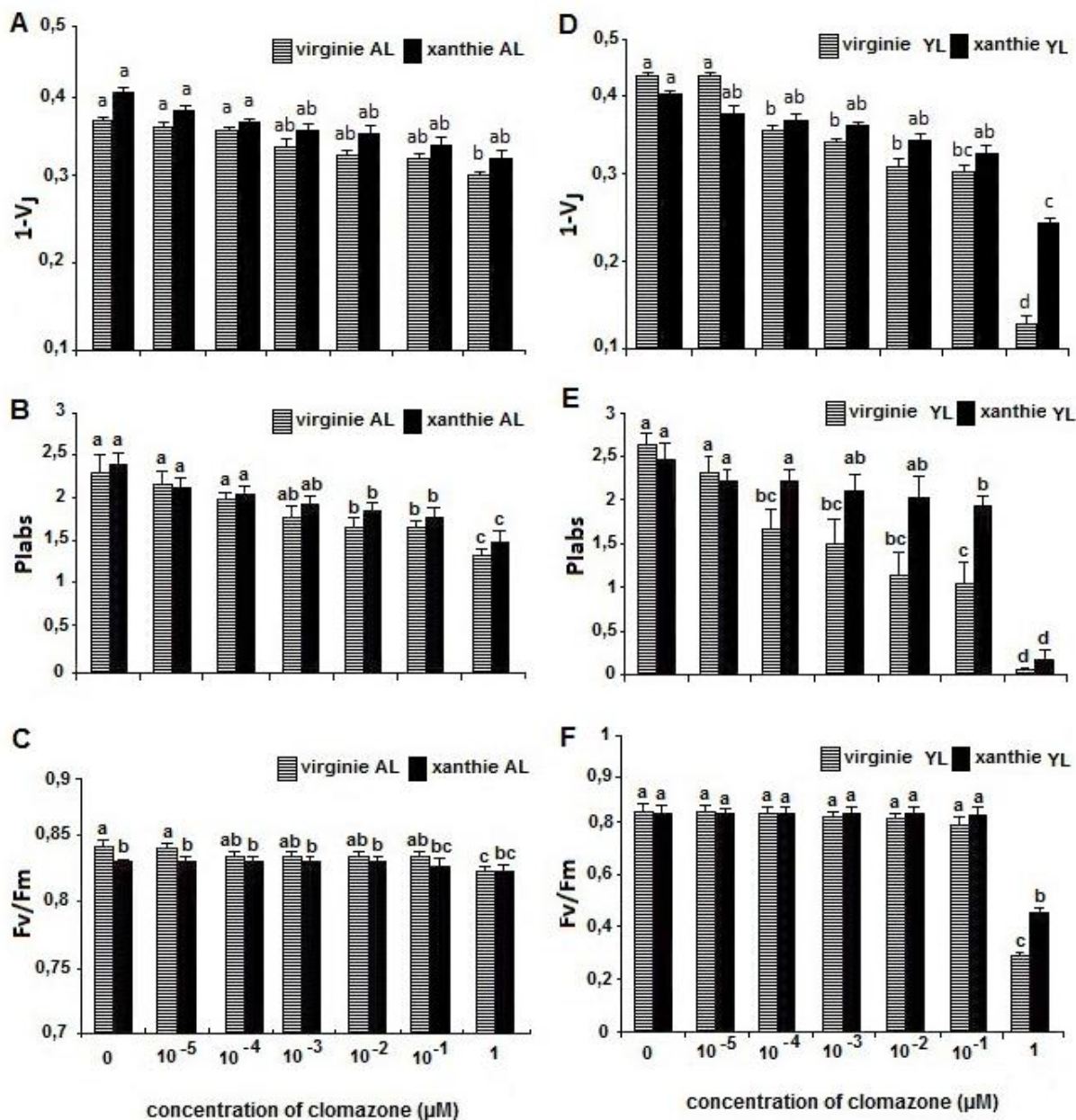


Fig 2. Effect of clomazone treatments in leaves of two varieties of tobacco on Chl fluorescence intensity (F_v/F_m , maximal efficiency photochemical of PSII) and on the performance index (PI_{abs}) in the J step of fluorescence rise.

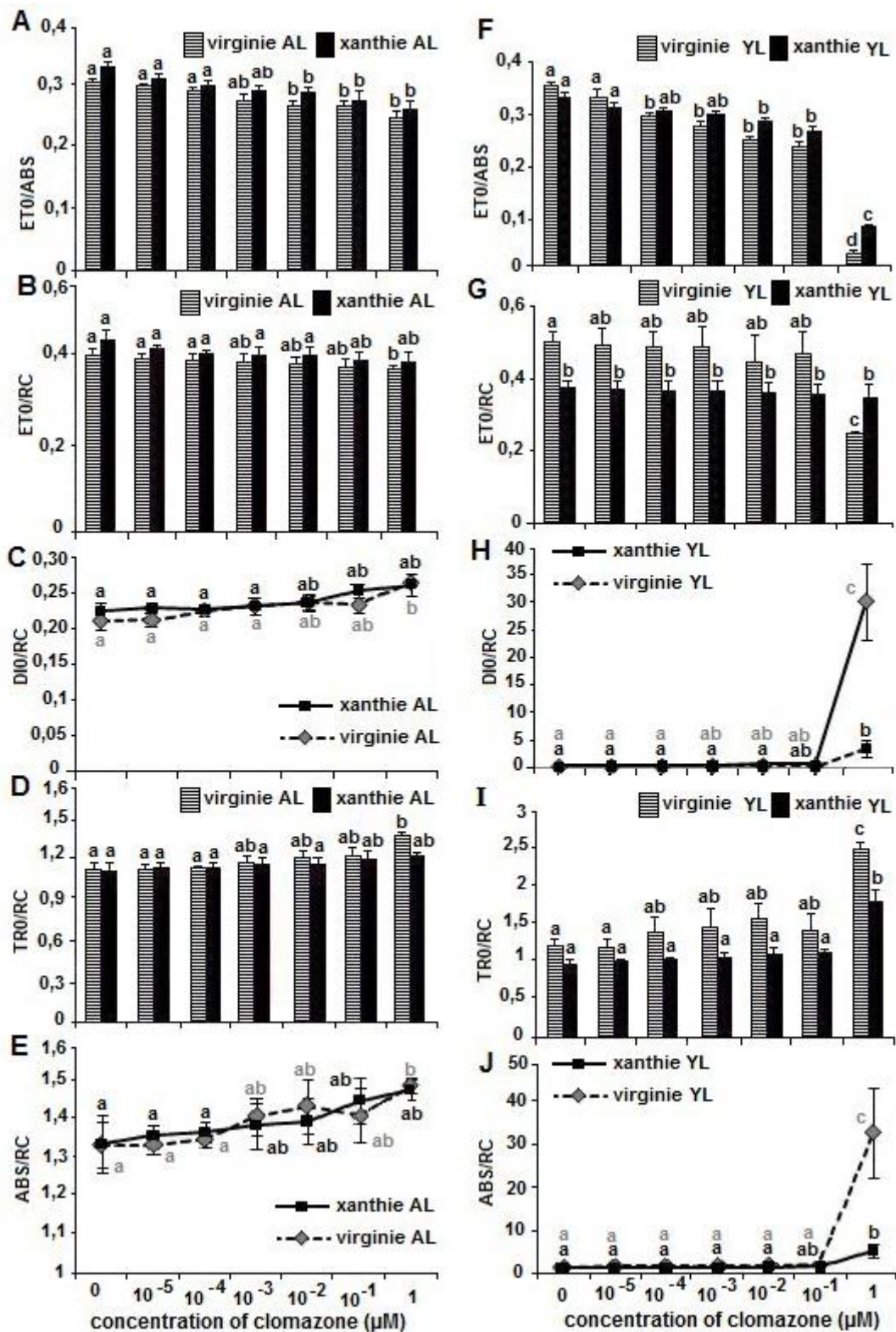


Fig 3. ABS/RC, TR0/RC, DI0/RC, ET0/RC and ET0/RC in the seedlings leaves of two varieties of tobacco, which are treated by several low concentrations of clomazone. All data represent means, SE for n= 8 and different letters (a, b, c, d) to determine significant differences between the treatments.

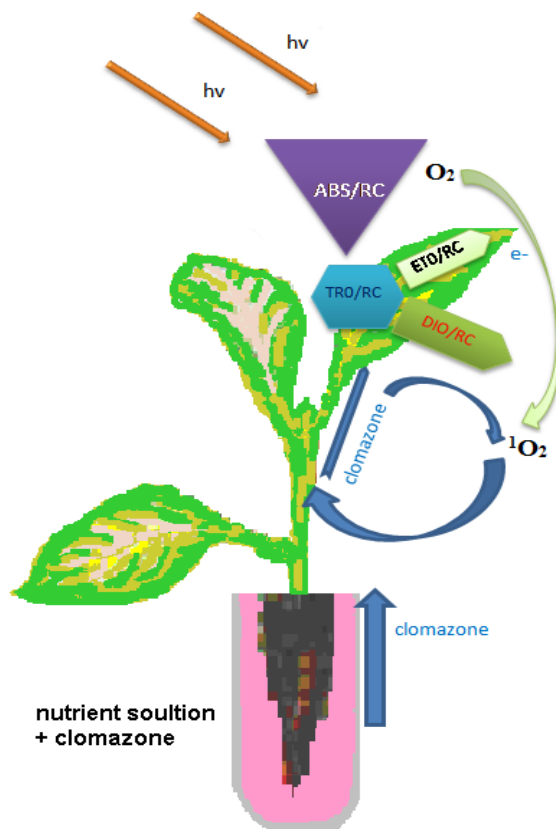


Fig 4. Energy pipeline models of the performance of tobacco seedlings treated with clomazone herbicide. The leaf models show the phenomenological fluctuations which are expressed as total absorption flux of PSII antenna chlorophyll (ABS), energy flux trapping (TR0), energy dissipated into heat (DIO) and electron transport flux (ET0) divided by the number of active reaction centers (RCs) (in the sense of Q_A reduction).

Even though, there is a good capture of energy excited by the reaction center (TR0/RC was increased), but still the number of electrons transported by the reaction center has been reduced, according to [Hermans et al. \(2003\)](#) who showed that the parameter (ET0/RC) was decreased in the leaves of plants that have a low performance (PI_{abs}).

In addition, the large excited energy dissipation heat can explain the reduction in the transfer of electrons from the reaction center (ET0/RC). The electrons transported (ET0) beyond the Q_A^- by photons flux (ABS absorbed by photosynthetic pigments antenna Chls) were reduced more significantly in young leaves than adults leaves. This decrease was found at clomazone treatments (1, 0.1, and 0.01) μ M in both *Virginie* and *Xanthi* varieties ([Fig. 3A](#)). In the young leaves, *Virginie* was affected more than *Xanthi* with the concentration (1 μ M) of clomazone, and there is a significant difference between the two varieties with this treatment ([Fig. 3F](#)). As (ET0/ABS) is related to the density of chlorophyll per reaction center (RC/ABS) and the electrons transported by the reaction center (ET0/RC). It is normal that the number of

electrons transported (ET0) by the flux of photons absorbed (ABS) decrease, with a decrease found in number of electrons transported (ET0), the increase in the dissipation into heat (DI0/RC) (Appenorth et al., 2001), and the decrease in total chlorophyll. Hermans et al. (2003) found a good relationship between the relative performance of the electron transferred (ET0/ABS) and the amount of chlorophyll in the leaves of plants selected.

4. Discussion

The effect of clomazone herbicide on the process of photosynthesis and photosynthetic pigments content has already been studied in barley seedlings by Kaňa et al. (2004), who measured several fluorescence's parameters of chlorophyll *a* (F_0 , F_m , F_v/F_m , V_J , $1-qP$, qn , Rfd , $TR0/RC$). In this work, we used the content of pigments (carotenoids, chlorophyll ($a+b$), chl a/b , chl ($a+b$)), the parameters of the fluorescence of chlorophyll *a* (F_0 , F_m , F_v/F_m) and the parameters of the JIP-test (PI_{abs} , $1-V_J$, ABS/RC , $TR0/RC$, $DI0/RC$, $ET0/RC$, $ET0/ABS$) as highly relevant to well determine the effect of clomazone on photosynthesis in two varieties of tobacco. For this, all measurements were performed on an adult and a young leaves. Chlorophyll and carotenoids are strictly correlated with each other, because carotenoids have an important role in protecting the chlorophyll from photooxidation during the growth (Biswall 1995).

Our work confirms that clomazone reduces the content in pigments of the leaves (total chlorophyll, carotenoids) with the highest concentration used (1 μ M) in young leaves for both varieties and in adult leaves for *Virginie* variety. A similar decrease was obtained with the high concentration of clomazone in adult leaves of tomato and tobacco (Scott et al., 1994) and seedlings' adult leaves of barley (Kaňa et al., 2004). But in our case, the difference between the two types of leaves means that clomazone probably affects photosynthesis. Especially we observed in *Xanthi* variety that clomazone had not any effect significant to decrease the pigments content in adult leaves, and its effect was significant in young leaves. It gives us an indication that clomazone probably retards the kinetics of photosynthesis, thus the biosynthesis of pigments in young leaves. The behavior of *Virginie* variety which more sensitive support this idea, there is an effect on adult leaves and the effect was multiplied on young leaves. It means that the efficiency of photosynthesis is reduced more with a first influence on photosynthesis. The second influence comes from the reduction in the biosynthesis of photosynthetic pigments, and this probably related to the inhibition of enzymes, which synthesize the chlorophyll and carotenoids. After reduced the levels of

pigments in the leaves, the efficiency of photosynthesis decreases through the reduction of photons absorbed. The correlation between changes in the ability to absorb photons and parameters of photosynthesis was also observed for leaves growing with different irradiation conditions (Kurasová et al., 2002). Although the parameters of chlorophyll *a* fluorescence, as F_0 , F_m , F_v/F_m , none gives often satisfactory results. The F_v/F_m is often not correlated with the chlorophyll content of leaves (Maxwell and Johnson 2000; Lazár 2006). This parameter is an indicator of stress (Maxwell and Johnson 2000). A decrease in F_v/F_m could be due to an increase in protection by increasing non-radiative energy dissipation or damages of photoinhibition of the reaction center of PSII (Maxwell and Johnson 2000). In our work, the F_v/F_m is a good indicator that the seedlings are under stress. Especially, to follow this parameter in an adult and a young leaves, where we find that *Virginie* was more affected for both type of leaves. But the decline in F_v/F_m was higher in young leaves. This also supports our idea, that the effect of clomazone is not limited to its toxic effect, but also it has another function, which affects the PSII reaction center.

In addition, to study the effect of clomazone on the transfer of electrons from the acceptor side of PSII, the JIP-test was used to explain the progressive flux of energy through the reaction center's level of PSII. This test was used for a wide range of physiological processes, such as evaluation of the quality of urban trees in a comparative study of physiological processes by following the flux of energy by the JIP-test (Hermans et al., 2003), the quantification of photosynthetic performance of phosphorus deficiency with the kinetics of fluorescence of chlorophyll *a* in sorghum (Ripley et al., 2004), and measurements of chlorophyll fluorescence to evaluate the time and storage temperature of the leaves of vegetables *Valeriana* (Ferrante and Magiore 2007). Among several indices that can be calculated with JIP-test, PI_{abs} , $1-V_j$, ABS/RC , $TR0/RC$, $DI0/RC$, $ET0/RC$, $ET0/ABS$, they are the best parameters that showed differences between tobacco's seedlings for the two varieties (*Virginie* and *Xanthi*) and both types of leaves (Fig. 2,3).

The PI_{abs} encompasses fluorescence transient changes associated with changes in antenna conformation and energy fluctuations, therefore PI_{abs} helps to estimate plant vitality with high resolution (Hermans et al., 2003). The PI_{abs} indicated a difference response of PSII in the adult and the young leaves treated with clomazone (1, 0.1, and 0.01) μM . The *Virginie* variety was the most affected according to this parameter, and the decline in the PI_{abs} was higher in young leaves than adult leaves, but for the another variety *Xanthi*, this parameter was reduced only in young leaves. This gives an indicator that the seedlings of tobacco were in stressed state.

In addition, it is normal to find the PI_{abs} decreases as a result of the reduction in the maximum efficiency of PSII ($F_v/F_m = TR0/ABS$) and efficiency with which a trapped exciton can move an electron into the electron transport chain further than Q_A^- ($1-V_j$). The flux of absorbance energy (ABS) and energy dissipation (DI0) by the reaction center increased at the concentration (1 μ M) in both types of leaves in *Virginie* variety and in young leaves in *Xanthi* variety. These results suggest that Chl antenna size of PSII might decreased by clomazone treatments, agrees with [Kaňa et al. \(2004\)](#), who confirmed that clomazone reduced the formation of pigment-protein complexes in the thylakoid membrane, and [Din et al. \(2012\)](#) reported that reduction of antenna size led to a lower chlorophyll content and the chlorophyll loss had little effect on the antenna size. Although, there is an increase in (TR0/RC), and reduction in (ET0/RC) and (ET0/TR0) in clomazone treatment (1 μ M), that may be a result of the inactivation of reaction centers (RCs), conversion of excitation energy absorbed into heat (DI0), and partially to the transfer of excitation energy with the PSII antenna. [Din et al. \(2012\)](#) indicated that the transfer excitation energy with the antenna does not impose a rate limitation on the trapping of energy (TR0).

5. Conclusion

Chlorophyll *a* fluorescence parameters, followed by the JIP-test can be very useful in detecting the effects on the plant physiological processes caused by low concentration of clomazone (1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M), and its gave us an alternative view on the action mechanism of clomazone on photosynthesis in seedlings of tobacco treated. Our work showed that there is a difference between the two varieties treated with clomazone, and *Virginie* variety was more sensitive than *Xanthi* variety. We find that the difference between the two types of leaves in response to clomazone treatments is probably due to effect of two functions of clomazone: the first function on the kinetics of photosynthesis and in particular the reaction center of PSII. It is probable that the clomazone blocks electron transfer beyond Q_A^- (see [Fig. 2A](#) and [D](#)), hence the formation of chlorophyll triple state ($^3Chl^*$) is expected, leading to formation of singlet oxygen (1O_2). The accumulation of (1O_2) increasingly contributes to oxidative stress that touches photosynthesis and the biosynthesis of photosynthetic pigments, the adult leaves response in presence of clomazone supports this idea. In addition, through the time, accumulation of (1O_2) and the other (ROS) may help trigger the second toxic function of the herbicide. [Ferhatoglu and Barrett \(2006\)](#) observed that clomazone was metabolized and oxidized in plants (clomazone \rightarrow clomazone-OH \rightarrow keto-clomazone), then ketoclomazone

inhibits DXP synthase, the first enzyme in the chain of the isoprenoid biosynthesis of chloroplast, which can also confirm our idea Fig.4.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Syrian Ministry of Education and Research, and by laboratory of fruits and vegetables of university of Avignon and Vaucluse countries.

7. References

- Anderson, J.M., Chow, W.S and Goodchild, D.J (1998). Thylakoid membrane organization in sun shade acclimation. *Aust. J. Plant. Physiol.* **15**, 11-26.
- Appenorth, K.J., Stockel, J., Srivastava, A and Strasser, R.J (2001). Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. *Environ. Pollut.* **115**, 49-64.
- Bartley, G.E and Scolnik, P.A (1995). Plant carotenoids: pigment for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7**, 1027-1038.
- Biswall, B (1995). Carotenoids catabolism during leaf senescence and its control by light. *Photochem. Photobiol.* **30**, 3-14.
- Bussotti, F., Strasser, R.J and Schaub, M (2007). Photosynthetic behavior of weedy species under high ozone exposure probed with the JIP-test: A review. *Environ. Pollut.* **147**, 439-437.
- Chang, J.H and Konz, M.J (1984). 3-Isoxazolidinones. A new class of herbicides, ACS Abstract, 187th National Meeting. Pest. Chemistry Div 22.
- Chang, J.H., Konz, M.J., Aly, E.A., Sticker, R.E., Wilson, K.R., Korg, N.E and Dickson, P.E (1997). 3-Isoxalidones and related compounds a new class of herbicides, in: Baker D.R., Fenyves J.G., Moberg W.K., Cross B. (eds.), *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*, ACS Symposium series 355, American chemical society, Washington, pp 10-23.
- Cogdell, R.J., Andersson, P.O and Gillbro, T (1992). Singlet states of carotenoids and their involvement in photosynthesis and as pigments collectors of light. *Photochem. Photobiol.* **15**, 105-12.
- Dekker, J.P and Boekema, E.J (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**, 12-39.
- Duke, S.O and Kenyon, W.H (1986). Pigment synthesis and photosynthetic function in leaves of cowpea primary (*Vigna unguiculata* L). *Pest. Biochem. Phys.* **25**, 11-18.
- Dinç, E., Ceppi, G.M., Tóth, S.Z., Bottka, S and Schansker, G (2012). The chl a fluorescence intensity is remarkably insensitive to changes in the chlorophyll content of the leaf as long as the chl a/b ratio remains unaffected, *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 770-779.
- Ferhatoglu, Y., Barret, M and Chapell, J (2001). 5-Ketoclozomazone Inhibits 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase of non-melavonate pathway of isoprenoids biosynthesis, In Proceeding of 2001 National Meeting Expert Committee on Weeds, Quebec City, Canada, pp 52-53.
- Ferhatoglu, Y., Barret, M and Avduishko, S (2005). The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. *Pestic. Biochem. Physiol.* **81**, 59-70.
- Ferrante, A and Maggiore, T (2007). Chlorophyll a fluorescence measurements to evaluate storage time and temperature of Valeriana leafy vegetables. *Postharvest Biol. Tec.* **45**, 73-80.
- Frankart, C., Eullaffory, P and Vernet, G (2003). Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lema minor*. *Environ. Exp. Bot.* **49**, 159-168.
- Fufezan, C., Rutherford, A.W and Krieger-Liszkay, A (2002). Singlet oxygen production in herbicide treated photosystem II. *FEBS Lett.* **532**, 407-410.
- Heerden, P.D.R., Strasser, R.J and Stress, G.H.J (2004). Reduction in dark chilling N₂-fixation in soybean by nitrate indicated by the kinetics of the fluorescence of chlorophyll a. *Physiol. Plant.* **121**, 239-249.
- Hermans, C., Smeyers, M., Rodriguez R.M., Eyletters, M., Strasser, R.J and Delhaye, J.P (2003). Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological processes by following the website of the fluorescence by the test-OJIP. *Plant Physiol.* **160**, 81-90.

- Kaňa, R., Šponduva, M., Ilik, P., Lazar, D., Klem, K., Tomek, P., Nauš, J and Prašil, O (2004). Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum Vulgare*). *Pestic. Biochem. Physiol.* **78**, 161-170.
- Khamis, S., Lamaze, T., Lemoine, Y and Foyer, C (1990). Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. *Plant Physiol.* **94**, 1436-1443.
- Kitajama, M and Butler, W.L (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim. Biophys. Acta* **376**, 105-115.
- Kloeppe, H., Koerdel, W and Stein, B (1997). Transport of herbicides in runoff and retention of herbicides in a band filter rainfall and runoff simulation studies. *Chemosphere* **35**, 129-141.
- Kruger, G.H.J., Tsimilli-Michael, M and Strasser, R.J (1997). Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiol. Plant.* **101**, 65-277.
- Kurasová, I., Čajánek, M., Kalina, J., Urban, O and Špunda, V (2002). Characterization of acclimation of *Hordeum vulgare* to high irradiation based on different responses of photosynthetic activity and pigment composition. *Photosynth.* **72**, 71-83.
- Lazár, D (2006). The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* **133**, 9-30.
- Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Prenzel, U., Buschmann, C and Meier, D. (1982). Adaptation of chloroplast ultrastructure and of chlorophyll protein levels to high light and low light growth conditions. *Z. Naturforsch.* **37**, 464-475.
- Lichtenthaler, H.K (1987). Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthesis biembranes, in: Colowick S.P., Kaplan, N.O. (eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol **148**, pp 350-382.
- Lutzow, M., Beyer, P., and Kleinig, H. (1990). The herbicide command does not inhibit the prenyl diphosphate-forming enzymes in plastids, *Z. Naturforsch.* **45**, 856-858.
- Maxwell, K and Johnson, G.N (2000). Fluorescence of chlorophyll-a, a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**, 659-668.
- Mueller, C., Schwender, J., Zeidler, J and Lichtenthaler, H.K (2000). Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochem. Soc.* **28**, 792-793.
- Ripley, B.S., Redfern, S.P and Dames, J (2004). Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll *a* fluorescence kinetics. *S. AFR. J. Sci.* **100**, 615-618.
- Rosso, J.A., Mártire D.O., Gonzalez, M.C and Diaz Kirmser, E.M (2010). Degradation of the herbicides clomazone, paraquat, and glyphosate by thermally activated peroxydisulfate. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12858-12862.
- Rutherford, A.W and Krieger-Liszka, A (2001). Oxidative stress induced by herbicides in the photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 648-653.
- Saldain, N and Deambrosi, E (2009). Selectividad del Command en preemergencia en El Paso 144, in: Alvarez O. (ed.), *Arroz Resultados Experimentales 2008-2009-Instituto Nacional de Investigacion Agropecuaria*, INIA; Treinta y Tres, Uruguay, pp 7-12.
- Scott, J.E., Weston L.A., Chappell, J and Hanley, K (1994). Effect of clomazone on IPP isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledons of solanaceous species, *Weed Sci.* **42**, 509-516.
- Senseman, S.A (2007). *Herbicide Handbook*, Ed 9, Weed Science Society of America, Lawrence, KS, pp 224-226.
- Souza, R.C., Rocha Gomes Ferreira D.T., Vitorino H.S., Souza Barbosa G.V., Endres, L and Ferreira, V.M (2012). Oxidative stress in Emilia coccinea (Asteraceae) caused by a mixture of Clomazone+ Ametryn. *IRJPS.* **3**, 80-87.
- Strauss, A.J., Kruger, G.H.J., Strasser, R.J and Van Heerden, P.D.R (2006). Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. *Environ. Exp. Bot.* **56**, 147-157.
- Strasser, B.J and Strasser, R.J (1995). Rapid measurement of the fluorescence transient in response to environmental questions: the JIP test, in: Mathis P. (ed.), *the Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 977-980.
- Strasser, R.J., Srivastava, A and Tsimilli-Michael, M (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize the situation photosynthetic samples, in: Yunus M., Pathre U., Mohanty P. (eds.), *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, Taylor & Francis, London, UK, pp 445-483.
- Telfer, A., Dhimi, S., Bishop, S.M., Phillips, D and Barber, J (1994). Beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated Photosystem II reaction centers. *Biochemistry* **33**, 14469-14474.
- Tsimilli-Michael, M., Kruger, G.H.J and Strasser, R.J (1995). Suboptimality as driving force for adaptation: a study about the correlation of excitation light intensity and the dynamic fluorescence emission in plants, in: Mathis P. (ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 981-984.

- Vaillant-Gaveau, N., Bigot, A., Fontaine, F and Clement, C (2007). Effect of the herbicide grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Chemosphere* **67**, 1243–1251.
- Verhoeven, A.S., Demming-Adams, B and Adams, W.W (1997). Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol.* **113**, 817-824.
- Waldhoff, D., Furch, B and Junk, W.J (2002). Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia: *Symmeria paniculata*. *Environ. Exp. Bot.* **48**, 225-235.
- Walters, S.A and Young, B.G (2010). Effect of herbicide and cover crop on weed control in no-tillage jack-o-lantern pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) production. *Crop Prot.* **29**, 30-33.
- Warfield, T.R., Carlson, D.B; Bellmann, S.K and Guscar, H.L (1985). Weed control in soybeans using command, *Weed Sci. Abstr.* **25**, 105.
- Weimer, M.R., Balke, N.E and Buhler, D.D (1992). Herbicide clomazone does not inhibit in vitro geranylgeranyl synthesis from mevalonates. *Plant Physiol.* **98**, 427-432.
- Whitmarsh, J and Govindjee (1999) The Photosynthetic Process, in: Singhal G.S., Renger G., Irrgang K.D., Sopory S and Govindjee (eds.), Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis, Narosa Publishers. Kluwer Academic, pp 11-51.
- Wong, P.K (2000). Effect of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda*. *Herb. 614. Chemosphere* **41**, 177-182.
- Xia, J and Tian, Q (2009). Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa*-OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. *J. Environ. Sci.* **21**, 1569-1574.
- Zeidler, J., Schwender, J., Mueller, C and Lichtenthaler, H.K (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 796-797.

Publication 2

Tolerance to Clomazone Herbicide is linked to the state of LHC, PQ-Pool and ROS Detoxification in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Majd Darwish*, Osama Alnaser, Sanders Junglee, Félicie Lopez-Lauri, Mohamed El Maataoui, Huguette Sallanon

Nous avons observ e précédemment que bien que plus riche en caroténoïdes, la variété *Virginie* est plus sensible au clomazone que la variété *Xanthi*. Le clomazone est connu pour inhiber la première voie de synthèse des isoprénoïdes et donc des caroténoïdes. Par ailleurs, le rôle important des caroténoïdes dans les mécanismes de photoprotection a été largement décrit. Il semble donc que le stress photooxydatif du clomazone n'est pas directement et seulement li e à son action sur la synthèse des caroténoïdes.

L'objectif des travaux pr esent es dans ce chapitre a donc été d'approfondir les effets du clomazone et d'identifier les mécanismes liés à la tolérance de la variété *Xanthi*.

Le fonctionnement de la cha ene de transport des électrons a été  etudi e:

- au niveau du PSII et de l'émission des électrons jusqu'aux plastoquinones, par les mesures de la fluorescence et le test *OJIP*.
- au niveau de la cha ene de transport du PSII au PSI par des mesures d'évolution d'O₂ par des chloroplastes isolés.

Les activités antioxydantes des enzymes impliqu es dans la protection contre le stress oxydatif au clomazone ont également été mesur es. Enfin, des analyses cytohistologiques ont été effectu es pour visualiser dans les tissus l'impact du clomazone chez les deux variétés.

Expérimentation

Deux variétés de tabac *Nicotiana tabacum* L. ont été utilis es: la variété *Xanthi* plus tolérante au clomazone et la variété *Virginie vk 51* plus sensible. Les plantules de chaque variété au stade trois feuilles ont été trait es par une faible concentration de clomazone (1  μM) pendant 14 jours. Le clomazone est ajout e à la solution nutritive qui est renouvelée tous les deux jours. L'expérimentation a été effectuée dans une chambre de culture avec un cycle jour/nuit est de 16 h/8 h, une température de 22  C pendant le jour et 17  C la nuit, une humidité relative de 60 % et une intensité lumineuse de 50  μmol photons m⁻² s⁻¹. Le prélèvement de feuilles a été

effectué avant et après traitement par le clomazone pour isoler les chloroplastes et mesurer l'évolution d'oxygène, et après le traitement par le clomazone pour les analyses cytohistologiques.

Principaux résultats

Les résultats confirment que le clomazone réduit la teneur en pigments chlorophylliens (Chl + Car) et le ratio Chl *a/b* chez la variété *Virginie* alors qu'il n'a pas d'effet chez la variété *Xanthi*, chez laquelle les teneurs en pigments sont de 1,5 à 2 fois inférieures en présence ou non de clomazone.

Les mesures de fluorescence (test *OJIP*) et d'évolution d'O₂ des chloroplastes isolés ont montré que la variété *Virginie* en présence de clomazone montre des signes de photoinhibition du PSII dus à une accumulation de Q_A⁻ et du pool de plastoquinones réduites.

L'activité de transport des électrons par le PSI n'est pas affectée par le clomazone.

Chez la variété *Virginie*, le clomazone entraîne une forte accumulation de H₂O₂, tandis que le fonctionnement des enzymes antioxydantes APX, DHAR, CAT, et SOD est significativement plus faible que chez la variété *Xanthi*. Des symptômes de mort cellulaire sont visibles lors des observations microscopiques chez la variété *Virginie* traitée par le clomazone.

Conclusion

La tolérance face au stress photooxydatif induit par le clomazone semble être indépendante de la teneur en pigments chlorophylliens et en particulier des caroténoïdes.

La différence de sensibilité entre les deux variétés paraît être liée à l'état de LHC, à l'état rédox du pool de plastoquinones et aux activités des enzymes antioxydantes impliquées dans la détoxification de H₂O₂.

Tolerance to Clomazone Herbicide is linked to the state of LHC, PQ-Pool and ROS Detoxification in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Majd Darwish*, Osama Alnaser, Sanders Junglee, F  licie Lopez-Lauri, Mohamed El Maataoui, Huguette Sallanon

Laboratoire Physiologie des Fruits et L  gumes (EA 4279), Universit   d'Avignon et des Pays de Vaucluse, B  t Agrosociences, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, F-84916 Avignon cedex 9, France

ABSTRACT

In this study, plantlets of two tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties that are clomazone-tolerant (cv. *Xanthi*) and clomazone-sensitive (cv. *Virginie vk51*) were subjected to low concentration of clomazone herbicide. The oxygen-evolving rate of isolated chloroplasts, chlorophyll *a* fluorescence transients, JIP-test responses, hydrogen peroxide contents, antioxidant enzyme activities, cytohistological results and photosynthetic pigment contents were recorded. The results indicated that the carotenoid content was 2-fold higher in *Virginie*, which had greater clomazone sensitivity than *Xanthi*. *Virginie* exhibited noticeable decreases in the LHC content (Chl *a/b* ratio), the maximum photochemical quantum efficiency of PSII (F_v/F_m), the performance index on the absorption basis (PI_{abs}), and the electron flux beyond the first PSII Q_A evaluated as $(1-V_j)$ with $V_j = (F_j - F_0) / (F_m - F_0)$ as well as increases in the rate of photon absorption (ABS/RC) and the energy dissipation as heat (DI0/RC). These results suggest that PSII photoinhibition occurred as a consequence of more accumulated Q_A^- and reduced PQ-pool. The oxygen evolution measurements indicate that PSI electron transport activity was not affected by clomazone. The more significant accumulation of H_2O_2 in *Virginie* compared to *Xanthi* was due to the absence of ROS-scavenging enzymes, and presumably induced programmed cell death (PCD). The symptoms of PCD were observed by cytohistological analysis, which also indicated that the leaf tissues of clomazone-treated *Virginie* exhibited significant starch accumulation compared to *Xanthi*. Taken together, these results indicate that the variable tolerance to clomazone observed between *Virginie* and *Xanthi* is independent of the carotenoid content and could be related to the state of the LHC, the redox state of the PQ-pool, and the activity of detoxification enzymes.

Keywords: Chlorophyll *a* fluorescence transients; Chloroplast oxygen evolution; Clomazone; *Nicotiana tabacum*; Photosystem II; Tolerance

Abbreviations: ABS, PSII light absorption flux; BQ, benzoquinone; CAT, catalase; $^3\text{Chl}^*$, chlorophyll triplet state; DCPIP, dichlorophenolindophenol; DHA, dehydroascorbate; DHAR, dehydroascorbate reductase; DI0, PSII excitation dissipation flux; ET0, electron transport flux; F_0 , F_v , F_m , minimal, variable, maximal chlorophyll fluorescence; F_v/F_m , maximum photochemical efficiency of PSII; H_2O_2 , hydrogen peroxide; $^1\text{O}_2$, singlet oxygen; $^3\text{O}_2$, oxygen triplet state; O_2^- , superoxide radical; OEC, oxygen evolving complex; PAR, photosynthetically active radiation; LHCs, light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein complexes; MV, methylviologen; PCD, programmed cell death; PI_{abs} , performance index on absorption basis; PQ, plastoquinone; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; Q_A , primary quinone electron acceptor of PSII; Q_B , secondary quinone electron acceptor of PSII; RC, reaction center; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TR0, PSII light energy flux trapping; $1-V_J$, a measure of the electron flux beyond Q_A .

1. Introduction

The environmental fate of herbicides is a matter of concern, given that only a small fraction of these herbicides reaches the target plants (Pimentel, 1995). Investigations of the effects induced by such toxic products are of great interest, not only for a better understanding of the interactions and involved mechanisms, but also with respect to the tolerance of non-target plants to chemical residues in the environment.

Photosynthesis is, in fact, a sensitive process that can be easily perturbed by several toxic species of herbicides, pesticides and heavy metals. Herbicides as one of these species can induce noxious effects, ranging from slowing oxygen emission rates and photosynthetic electron transport, to changes in the structure of the photosynthetic apparatus (Walters, 2005). The photosynthetic reactions in higher plants take place through the cooperation of two photosystems, PSI and PSII, in the thylakoid membrane (Whitmarsh and Govindjee, 1999; Dekker and Boekema, 2005). Light energy is collected by the antenna of PSII and PSI (LHCs) and is channeled to the reaction centers (RCs) where a charge separation occurs. Two quinones are located on the acceptor side of PSII RC: the primary acceptor Q_A receives the electron from the reduced pheophytin $Pheo^-$ (the primary PSII electron acceptor), after which the electron is transferred to the secondary acceptor Q_B by Q_A^- ; the plastoquinol (PQH_2) is formed *via* double reduction of Q_B . PQH_2 is then exchanged for a PQ molecule in the thylakoid membrane (Petrouleas and Crofts, 2005). On the donor side, the oxygen-evolving complex (OEC) goes through four successive oxidation steps (called S states) in order to split 2 H_2O into O_2 and 4 H^+ (Gauthier et al., 2010).

In most cases in which plants are exposed to the herbicides, the charge recombination in PSII can result in the formation of a chlorophyll triplet state ($3Chl^*$), which can react with 3O_2 to form 1O_2 (Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001; Fufezan et al., 2002). 1O_2 contributes to photodamages at PSII RCs (Trebst et al., 2002), leading to the formation of other ROS, such O_2^- and H_2O_2 (Ledford and Niyogi, 2005; Vass, 2012). This formation of ROS inhibits photosynthesis as the result of photoinhibitory damage or photosynthetic electron transport. However, the presence of 1O_2 and H_2O_2 which inhibit the repair of photodamaged PSII RCs during the photoinhibition (Nishiyama et al., 2006) seems to be responsible for programmed cell death (PCD) initiation and tissue damage (Dat et al., 2003; Gechev and Hille, 2005; Gechev et al., 2006).

The herbicide clomazone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one] (labeled CL) is widely used in agriculture to control annual weeds in soybean, cotton, sugar cane,

maize, rice and tobacco crops (Chang et al., 1997). Clomazone treatment can lead to decreased carotenoid biosynthesis, which leads to chlorophyll bleaching (Duke and Kenyon, 1986; Norman et al., 1990; Souza et al., 2012). In a previous study using photosynthetic pigment content, chlorophyll *a* fluorescence parameters and JIP-test results, we compared the effects of low concentrations of clomazone on photosynthesis in *Xanthi* and *Virginie* varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Darwish et al., 2013). This study demonstrated that *Xanthi* was more tolerant, despite the typical difference in the total chlorophyll and carotenoid contents between the two varieties (i.e., approximately 2-fold higher in *Virginie* than in *Xanthi*).

Carotenoids are involved in the photoprotection mechanism in plants; scavenging 3Ch^* and $^1\text{O}_2$ is one of their major roles (Biswall, 1995). This role of carotenoids is important when plants are exposed to herbicides that inhibit photosynthetic electron transport. Thus, it is surprising that the *Virginie* variety, having double the amount of carotenoids, is more sensitive to clomazone compared to *Xanthi*. To better understand this conflicting issue, and to determine the parameters that are involved in the herbicide tolerance of the *Xanthi* and *Virginie* varieties, it is necessary to study the electron transport chain in the presence of clomazone. Therefore, Clark-type electrodes and chlorophyll *a* fluorescence analysis were used as sensitive and effective methods.

Clark-type electrode has been used to measure electron transport chain activity of the photosynthetic apparatus in many previous studies, especially in algae and higher plants (Samuel and Bose, 1987; Koblížek, 1998; Croisetièrè et al., 2001; Kroger et al., 2002). Using this technique, oxygen evolution measurements coupled with fluorescence emission analysis has been used to detect the effect of a low concentration (less than 10^{-7} M) of herbicides on electron transfer activity of spinach chloroplasts, thylakoid membranes and isolated PSII membranes (Ventrella et al., 2010).

Chlorophyll *a* fluorescence can provide detailed information on the function of the photosynthetic apparatus, especially on PSII (Strasser et al., 2004). Fluorescence measurements have been used to investigate electron transport processes on the acceptor and donor sides of PSII, as well to study antenna states of PSII and many properties of the electron transport chain as a whole (see, Van Gorkom, 1986; Papageorgiou and Govindjee, 2004, and reviews therein). The JIP-test has been used to assess the sensitivity of plants to different environmental conditions (Tsimilli-Michael et al., 1995; Krüger, 1997; Ripley et al., 2004; Gauthier et al., 2010; Kalaji et al., 2012; Darwish et al., 2013, 2014). The JIP-test is based on the energy flux theory in the thylakoid membrane that was developed by Strasser

and co-workers (Strasser et al., 2000; Strasser et al., 2004; Stirbet and Govindjee, 2011). In this test, the fluorescence signals at the O, J, I, and P steps are used to calculate different parameters that are related to the energy and electron fluxes in PSII.

The aim of this work was: (i) to clarify the mechanisms involved in the tolerance of *Xanthi* and *Virginie* tobacco varieties to clomazone; and (ii) to determine whether these mechanisms are linked to the inhibition of carotenoid biosynthesis. The effects of low concentration of clomazone on the function of the photosynthetic apparatus were analyzed using oxygen evolution measurements, chlorophyll *a* fluorescence and JIP-test parameters, antioxidant activities and cytohistological analyses.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials, growth conditions and chemical treatments

The tobacco seeds of two varieties (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*) were germinated in a plastic container with sterilized potting soil for two weeks at 22/17 °C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle and photon flux (PAR) of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The germination was took place under sterile conditions, and in the growth chamber configured according to Darwish et al. (2013, 2014). After 5 weeks of germination, the plantlets were transferred to a hydroponic system containing Auckland's nutrient solution (1 M KNO₃; 1 M Ca(NO₃)₂.H₂O; 1 M MgSO₄.7H₂O; 1 M KH₂PO₄ and 0.01 M FeEDDHA) under the same conditions as those used during the germination. This nutrient solution was refreshed twice weekly. The plantlets were used for two experiments:

- Experiment A: The effect of clomazone (CL) (Sigma-Aldrich, USA) on oxygen evolution was studied in chloroplasts that were isolated from control plantlets of both varieties. Clomazone at 0-1 μM was directly added to the isolated chloroplasts during the measurement.
- Experiment B: CL was added to the nutrient solution at concentrations of 0-1 μM for 14 days. The leaves were then collected for various analyses. Fresh leaves were used for chloroplast isolation and cytohistological analysis, and the remaining leaves were stored at -80 °C for biochemical analysis.

2.2. Determination of photosynthetic pigments

The total chlorophyll and carotenoid contents were determined according to Lichtenthaler (1987) using pure acetone as the extraction solvent. The absorbance at 662, 645 and 470 nm was measured immediately after extraction.

2.3. Chloroplast preparation

The chloroplasts were isolated from the fresh leaves of tobacco plantlets as described by [Joly and Carpentier \(2011\)](#) with certain modifications. Briefly, 5 g of dark green leaves was harvested and rinsed with distilled water. The leaves were then ground for 20-30 seconds in 30 mL of buffer A (grinding buffer) containing 660 mM sorbitol, 20 mM KCl, 2 mM EDTANa₂ and 100 mM HEPES-KOH (pH 7.9). After grinding, the homogenate was filtered twice through five layers of Miracloth tissue, and the filtrate was quickly centrifuged (1500 × g, 2 min, at 4 °C). The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1.5 mL of buffer B (resuspension buffer) containing 10 mL of buffer A, 100 μM MgCl₂, and 100 μM MnCl₂.

The total chlorophyll content of the chloroplast preparation was estimated according to [Porra et al. \(1989\)](#) with some modifications. Briefly, 10 μL of the chloroplast preparation was added to 1 mL of acetone 80% (v:v). The mixture was homogenized and vortexed for 2 min. The absorbance of the supernatant was measured at 645 and 663 nm (A₆₄₅ and A₆₆₃, respectively) using a spectrophotometer (Biochrom Libra S22, Biochrom Ltd., UK). The chlorophyll concentration was calculated using the following equation:

$$\mu\text{g Chl mL}^{-1} = [(12.7 A_{663} - 2.69 A_{645}) + (22.9 A_{645} - 4.68 A_{663})]$$

2.4. Measurement of oxygen evolution

The evolution of oxygen by a suspension of chloroplasts that were broken in hypotonic medium to allow the compounds used as electron acceptors to have access into thylakoid membranes was measured. The oxygen evolution measurements were performed polarographically using a Clark-type oxygen electrode (DW1, Oxygraph system, Hansatech Instruments, UK) at 25 °C under saturating light intensity on chloroplast particles equivalent to 80 μg Chl mL⁻¹.

The photosynthetic electron transport of the entire chain was determined as the oxygen evolution using potassium ferricyanide K₃Fe(CN)₆ (99% pure, Sigma-Aldrich, USA) as an electron acceptor. The reaction mixture in a final volume of 1 mL contained 2 mM K₃Fe(CN)₆ and chloroplast particles equivalent to 80 μg Chl mL⁻¹.

The PSII [H₂O → benzoquinone (BQ)] rates were measured using BQ (98% pure, Sigma-Aldrich, USA) as an electron acceptor according to [Samuel and Bose \(1987\)](#). The rate of PSII electron transport was measured in terms of oxygen evolution in the presence of BQ (2 mM).

The reaction mixture in a final volume of 1 mL contained 100 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 20 mM KCl, 2 mM EDTANa₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM MnCl₂, 2 mM BQ and chloroplast particles equivalent to 80 µg Chl mL⁻¹.

The PSI [plastoquinone pool→ PSI acceptor side] rates were determined in terms of oxygen uptake in the presence of methylviologen (MV) (98% pure, Sigma-Aldrich, USA) as an exogenous electron acceptor substituting for ferredoxin in PSI, according to [Samuel and Bose \(1987\)](#) with some modifications. Here, dichlorophenolindophenol (DCPIP) was used as an artificial electron donor to PSI ([Michelet and Krieger-Liszkay., 2012](#)). The reaction mixture in a final volume of 1 mL contained 5 mM ascorbate, 100 µM DCPIP, 0.1 mM MV and chloroplast particles equivalent to 80 µg Chl mL⁻¹.

All activities were measured in the presence of 1 µM nigericin (98% pure, Sigma-Aldrich, USA) as an uncoupler. This compound dissipates the proton gradient that occurs between the lumen and the stroma during illumination ([Farineau et al., 2011](#)).

2.5. Measurement of fast chlorophyll *a* fluorescence transients

The behavior of photosystem II (PSII) can be evaluated based on the fast chlorophyll *a* fluorescence emitted by leaves of plantlets that are adapted to darkness. After fourteen days of treatment with clomazone, fast chlorophyll *a* fluorescence transients were measured on 8 leaves of tobacco plantlets (experiment B). Prior to any measurement, the leaves were dark-adapted for 20 min. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence (expressed in relative units) was measured using a portable Handy-PEA (Hansatech, Kings Lynn, UK) under illumination with a light intensity of 3,000 µmol photons m⁻² s⁻¹. The fluorescence parameter $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ represents the maximum photochemical quantum yield of PSII ([Kitajama and Butler, 1975](#)). The JIP-test is based on the energy flux theory of the thylakoid membrane ([Strasser et al., 2004](#); [Stirbet and Govindjee, 2011](#)). This model describes how the energy of photons that are absorbed by the photosynthetic pigments in the PSII antenna (ABS) is dissipated as heat and fluorescence (DI), trapped by PSII reactions centers (RCs) (leading to Q_A reduction), and converted into electron transport flux (ET). The appendix shows some JIP-test parameters, their biophysical or biochemical meanings and how they are calculated from the original data (F₀, F₃₀₀, F_J, F_m) derived from fast chlorophyll *a* fluorescence transients.

2.6. Determination of the H₂O₂ contents

The hydrogen peroxide levels were determined as described by [Murshed et al. \(2013\)](#) with some modifications. Briefly, 250 mg of tobacco leaves from clomazone treated or untreated plantlets were homogenized in 1 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. Aliquots of 100 µL from each tube were placed in 96-well plates and 50 µL of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 100 µL of 1 M KI were added to each well. Control samples were prepared using water instead of KI to remove the color background of the extract at 390 nm. Each plate also contained commercial H₂O₂ to generate a standard curve. The plate was briefly vortexed and the absorbance readings were collected at 390 nm in a micro-plate reader. The concentrations of H₂O₂ were determined using a standard curve.

2.7. Determination of the ascorbate contents

The assay of the total and reduced AsA contents was performed according to a modified version of the method of [Murshed et al. \(2014\)](#) using leaf material that was stored at -80 °C. Briefly, 100 mg of tobacco leaf powder was homogenized with 1 mL of ice-cold 6% trichloroacetic acid (TCA). The samples were centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min at 4 °C, and 10 µL of the supernatant was used in each assay. The total AsA (addition of 20 µM dithiothreitol (DTT)) and reduced AsA (without DTT) in each sample were measured. Aliquots of 10 µL of each sample or a standard were distributed into two wells (in triplicate) of a 96-well microplate and mixed with 10 µL of 20 mM DTT (total AsA assay) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) (reduced AsA assay). The plate was incubated at 42 °C for 15 min. Then, 10 µL of *N*-ethyl maleimide (NEM) (total AsA assay) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) (reduced AsA assay) was added and mixed followed by the addition of 150 µL of color reagent (containing H₃PO₄, FeCl₃ and dipyrityl). After incubation at 42 °C for 40 min, the plate was briefly vortexed, and the absorbance was read at 525 nm using a micro-plate reader (Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France). The AsA concentrations of the samples were calculated using a standard curve.

2.8. Antioxidative enzyme activities*Extraction of enzyme:*

Proteins were extracted according to [Murshed et al. \(2008\)](#). Frozen leaf powder (150 mg) was homogenized in 1 mL of 50 mM MES/KOH buffer (pH 6.0) containing 40 mM KCl, 2 mM

CaCl₂, and 1 mM AsA. The solutions were centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were analyzed immediately to determine the enzyme activities.

Enzyme assays:

All enzyme assays were performed in 0.2-mL kinetic reactions at 25 °C using a micro-plate reader (Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France). The APX, DHAR and MDHAR activities were measured using the method of [Murshed et al. \(2008\)](#). The APX activity was spectrophotometrically determined by measuring the decrease in absorbance at 290 nm ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) due to ascorbate oxidation. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.25 mM AsA, 5 μL of extract and 5 mM H₂O₂. The reaction was started by adding H₂O₂ (200 mM). DHAR was assayed in a reaction mixture consisting of 50 mM HEPES buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 0.2 mM DHA and 5 μL of extract; the activity was determined by measuring the increase in the reaction rate at A₂₆₅ ($\epsilon=14.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The MDHAR activity was determined in a reaction mixture consisting of 100 mM HEPES buffer (pH 7.6), 2.5 mM AsA, 0.25 mM NADH, 5 μL of extract and 0.4 units of ascorbate oxidase. The activity was determined by measuring the decrease in the reaction rate at A₃₄₀ ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). The CAT activity was measured according to [Chance and Maehly \(1955\)](#) in a reaction mixture containing 50 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.0), 15 mM H₂O₂ and 5 μL of extract to initiate the reaction. The activity was described in terms of the change in absorbance at 240 nm ($\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) as the H₂O₂ level decreased. The SOD activity was determined using the modified method of [Dhindsa et al. \(1981\)](#). The SOD activity was assayed in a 0.1 mL reaction mixture containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 13 mM methionine, 75 μM nitro blue tetrazolium (NBT), 0.1 mM EDTA, 10 μM enzyme extract, and 2 μM riboflavin. The absorbance at 560 nm was measured immediately after 5 min of illumination with a light intensity of 100 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 25 °C. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme that was required to inhibit the NBT photoreduction by 50%.

2.9. Cytohistological analyses

To assess the effects of clomazone at the cytological level, leaf fragments were collected from each treatment and prepared for cytohistology as previously described ([El Maataoui and Pichot, 1999](#)). Briefly, the tissue samples (approximately 5 mm square) were excised from the middle parts of the leaves and immediately fixed at 4 °C in 4% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.2. To promote good penetration of the fixative, the samples were placed under vacuum for 20 min. After 48 h of fixation at 4 °C, the specimens were rinsed in

distilled water and stored in 70% alcohol at 4 °C until required. The samples were then dehydrated in an alcohol series and embedded in methacrylate resin (Kit Technovit 7100, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Transverse sections (3- μ m thickness) were serially cut using a retraction microtome (Reichert-Young Supercut 2065, Wien, Austria), collected on microscope slides, allowed to dry and stored in dust-proof containers. The slides were hydrated in distilled water before staining to visualize insoluble carbohydrates (cellulose, pectin and starch) using the periodic acid-Schiff's reagent (PAS) technique and proteins using naphthol blue black (for details and references, see [El Maataoui and Pichot, 1999](#)). Observations and imaging were performed using a Leica DM 2000 photomicroscope (Leica Instruments, Nussloch, Germany) equipped for bright field and UV illumination. The images were captured using Leica DFC 300 FX digital camera (Leica) and analyzed with LAS software (Leica). Approximately 5 leaf fragments were examined for each treatment. Particular attention was paid to structural alterations affecting the photosynthetic mesophyll cells.

2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the R statistical software using an ANOVA with Tukey's test. The results are displayed as means \pm SE and were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids)

In the *Virginie* variety, the clomazone treatment decreased the total chlorophyll and carotenoid contents by approximately 22% and 17%, respectively, compared to the control. However, in the *Xanthi* variety, clomazone had no effect on the total chlorophyll and carotenoid contents compared to those of the control ([Table 1](#)).

The clomazone treatment significantly decreased ($P < 0.05$) LHC contents (Chl *a/b* ratio, for details and references, see [Björkman, 1973](#); [Anderson, 1986](#); [Yang et al., 2001](#)) in the thylakoid membrane of *Virginie* leaves by approximately 21% compared to those of the control. However, in the *Xanthi* variety, LHC contents (Chl *a/b* ratio) were not significantly different ($P > 0.05$) between the clomazone and control treatments ([Table 1](#)).

The control in the two varieties showed a difference concerning the photosynthetic pigment contents, as the chlorophyll and carotenoids levels were approximately 2-fold higher in *Virginie* compared to *Xanthi*.

Table 1. Chlorophyll (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*) and carotenoid (Car) contents per fresh weight in the control (Con) and clomazone (CL) treatments of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, $n=8$.

Variety	Treatment	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	Chl <i>b</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	Chl <i>a+b</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	Car ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW)	Chl <i>a/b</i>
Xanthi	Con	363 \pm 14 c	269 \pm 23 b	632 \pm 25 c	53 \pm 8 c	1.34 \pm 0.04 c
	CL	382 \pm 27 c	265 \pm 11 bc	647 \pm 26 bc	47 \pm 7 c	1.44 \pm 0.04 c
Virginie	Con	586 \pm 28 a	375 \pm 42 a	961 \pm 52 a	145 \pm 7 a	1.71 \pm 0.18 bc
	CL	509 \pm 13 b	242 \pm 20 c	751 \pm 32 b	120 \pm 6 b	2.18 \pm 0.12 a

3.2. Chloroplast oxygen evolution

The effect of clomazone on oxygen evolution was measured in chloroplasts that were isolated from the two tobacco varieties in presence of ferricyanide as an electron acceptor and nigericin as an uncoupler.

Several preliminary experiments demonstrated that 5 min of incubation was sufficient to determine the effect of clomazone on the electron flow (not shown). In experiment A, the chloroplasts were incubated with 1 μM clomazone for 5 min before monitoring the oxygen evolution. Clomazone reduced the oxygen evolution by approximately 3% and 4% in the *Xanthi* and *Virginie* varieties, respectively, compared to the control (Table 2). In experiment B, the oxygen evolution of isolated chloroplasts that were treated with clomazone decreased in the two varieties compared to the control, and this decrease was greater in *Virginie* (12%) than in *Xanthi* (9%).

Table 2. Inhibition of oxygen evolution ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) measured in thylakoids ($80 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$) as percent (%) in two tobacco varieties (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Experiment A, chloroplasts isolated from control plantlets and then treated with clomazone; Experiment B, chloroplasts isolated from plantlets treated with clomazone. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, potassium ferricyanide as an electron acceptor; BQ, benzoquinone as an electron acceptor in PSII; DCPIP, dichlorophenolindophenol as an artificial electron donor to PSI; MV, methylviologen as an exogenous electron acceptor which substitutes ferredoxin in PSI. Con, without clomazone; CL, treatment with 1 μM clomazone. Reported data are obtained from four replicates, $n=4$. Different letters denote significant difference within each treatment ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey test).

Variety	Treatment	Experiment A			Experiment B		
		K ₃ Fe(CN) ₆	BQ	DCPP → MV	K ₃ Fe(CN) ₆	BQ	DCPP → MV
	Con						
	CL	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a
Xanthi		3% b	3.5% b	0.5% a	9% b	12.5% b	1.7% a
Virginie	CL	4% b	4.5% b	0.2% a	12% c	16.5% c	2% a

The oxygen evolution in PSII was measured using BQ as an electron acceptor. In experiment A, clomazone reduced the oxygen evolution by approximately 3.5% and 4.5% in *Xanthi* and *Virginie*, respectively, compared to the control (Table 2). In experiment B, more significant decreases of approximately 12.5% and 16.5% were observed for the *Xanthi* and *Virginie* varieties, respectively (Table 2).

The rate of PSI electron transport was analyzed using DCPIP and MV. In both experiments (A and B), clomazone had no significant effect on the electron flow that was mediated by DCPIP and MV in both varieties (Table 2).

3.3. Chlorophyll *a* fluorescence transients

While clomazone induced a significant decrease (approximately 9%) in the F_v/F_m in the leaves of *Virginie* plantlets, it had no significant ($P < 0.05$) effect on the F_v/F_m in the *Xanthi* plantlets (only 2%) compared to that of the control (Table 3).

The performance index on absorption basis (PI_{abs}) decreased in plantlets that were treated with clomazone. Compared to the control, PI_{abs} decreased by approximately 21% and 57% in *Xanthi* and *Virginie* plantlets that were treated with CL, respectively (Table 3). The decrease in $1-V_j$ parameter was more pronounced in *Virginie* than in *Xanthi* plantlets following exposure to clomazone (22% and 6%, respectively) (Table 3).

Table 3. Effect of clomazone on chlorophyll *a* fluorescence intensity (F_0 , minimum fluorescence; F_m , maximum fluorescence; F_v/F_m , maximum photochemical efficiency of PSII); and on the performance index (PI_{abs}) evaluated from the fast chlorophyll fluorescence curves (i.e., OJIP transients) in tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Con, control; CL, treatment with 1 μ M clomazone. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n=8.

Variety	Treatment	F_0	F_m	F_v/F_m	PI_{abs}	$1-V_j$
Xanthi	Con	332 \pm 14 a	1736 \pm 65 b	0.81 \pm 0.002 a	1.41 \pm 0.11 b	0.33 \pm 0.007 b
	CL	361 \pm 19 ab	1753 \pm 38 bc	0.79 \pm 0.009 a	1.11 \pm 0.12 bc	0.31 \pm 0.011 bc
Virginie	Con	347 \pm 5 ab	1912 \pm 40 a	0.82 \pm 0.001 a	2.07 \pm 0.14 a	0.37 \pm 0.007 a
	CL	385 \pm 9 b	1621 \pm 46 c	0.75 \pm 0.013 b	0.89 \pm 0.15 c	0.29 \pm 0.014 c

In the CL treatment, the flux of photons absorbed by PSII antenna per reaction center (ABS/RC) and the excitonic flux trapped per reaction center (leading to Q_A reduction) (TR0/RC) significantly increased ($P < 0.05$) in the *Virginie* plantlets compared to those of the control (Table 4). Similarly, the part of the absorbed energy that was dissipated as heat and fluorescence (DI0/RC) significantly increased ($P < 0.05$) in the *Virginie* plantlets that were treated with clomazone. In the *Xanthi* plantlets, clomazone had no significant effect ($P > 0.05$) on the ABS/RC, TR0/RC or DI0/RC parameters compared to those of the control. In the *Virginie* plantlets treated with CL, although the electron transport beyond Q_A^- per reaction center (ET0/RC) increased, the quantum yield of the electron transport beyond Q_A^- (ET0/ABS) decreased compared to the control (Table 4).

Table 4. Effect of clomazone on ABS/RC, TR0/RC, DI0/RC, ET0/RC and ET0/ABS in tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Con, control; CL, treatment with 1 μ M clomazone. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n=8.

Variety	Treatment	ABS/RC	TR0/RC	DI0/RC	ET0/RC	ET0/ABS
Xanthi	Con	1.51 \pm 0.06 b	1.22 \pm 0.05 b	0.29 \pm 0.01 a	0.39 \pm 0.008 ab	0.26 \pm 0.006 b
	CL	1.71 \pm 0.12 b	1.36 \pm 0.09 bc	0.35 \pm 0.03 a	0.41 \pm 0.013 b	0.24 \pm 0.008 bc
Virginie	Con	1.31 \pm 0.06 a	1.06 \pm 0.05 a	0.28 \pm 0.01 a	0.39 \pm 0.009 a	0.30 \pm 0.005 a
	CL	2.12 \pm 0.16 c	1.57 \pm 0.09 c	0.55 \pm 0.07 b	0.45 \pm 0.008 c	0.22 \pm 0.014 c

3.4. H₂O₂ and ascorbate contents

The H₂O₂ contents (Fig. 1A) increased in the tobacco plantlets that were treated with clomazone in the two varieties compared to that of the control. After CL treatment, the plantlets of the *Virginie* variety exhibited an accumulation of H₂O₂ approximately five-fold higher than that of the *Xanthi* variety.

In the *Virginie* and *Xanthi* varieties (Fig. 1B), the total ascorbate content decreased in the CL treatment compared to that of the control.

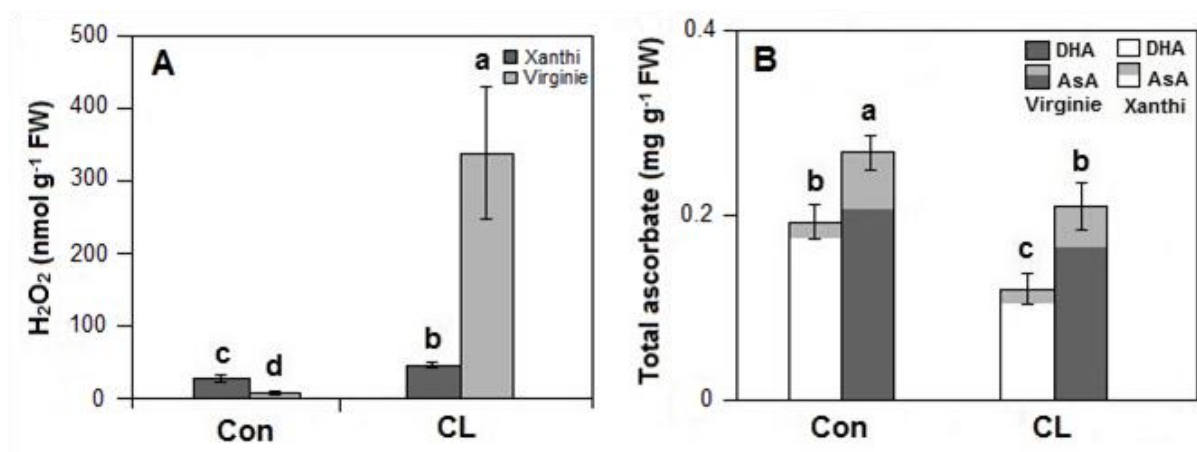


Fig. 1. Effects of clomazone on H₂O₂ content (A) and total ascorbate (B) in two varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Con, without clomazone; CL, treatment with 1μM clomazone. All data represent means, SE for n=8 and different letters to determine the significant difference between means within each treatment ($P<0.05$, ANOVA-Tukey test).

3.5. Antioxidant enzyme activities

There was a difference in both tobacco varieties concerning the response of the antioxidant enzymes to the CL treatment.

In leaves of the *Virginie* variety, the activities of APX (Fig. 2A), MDHAR (Fig. 2B) and DHAR (Fig. 2C) significantly decreased ($P<0.05$) compared to those of the control, whereas the CAT (Fig. 2D) activity did not differ ($P>0.05$) between the CL and Con treatments. The SOD activity (Fig. 2E) was significantly ($P<0.05$) higher than that of the control.

In contrast, the APX (Fig. 2A) and MDHAR (Fig. 2B) activities increased in leaves of the *Xanthi* variety, whereas the CAT (Fig. 2D) activity decreased compared to that of the control. However, the DHAR (Fig. 2C) and SOD (Fig. 2E) activities were not significantly different ($P>0.05$) between the CL treatment and the control.

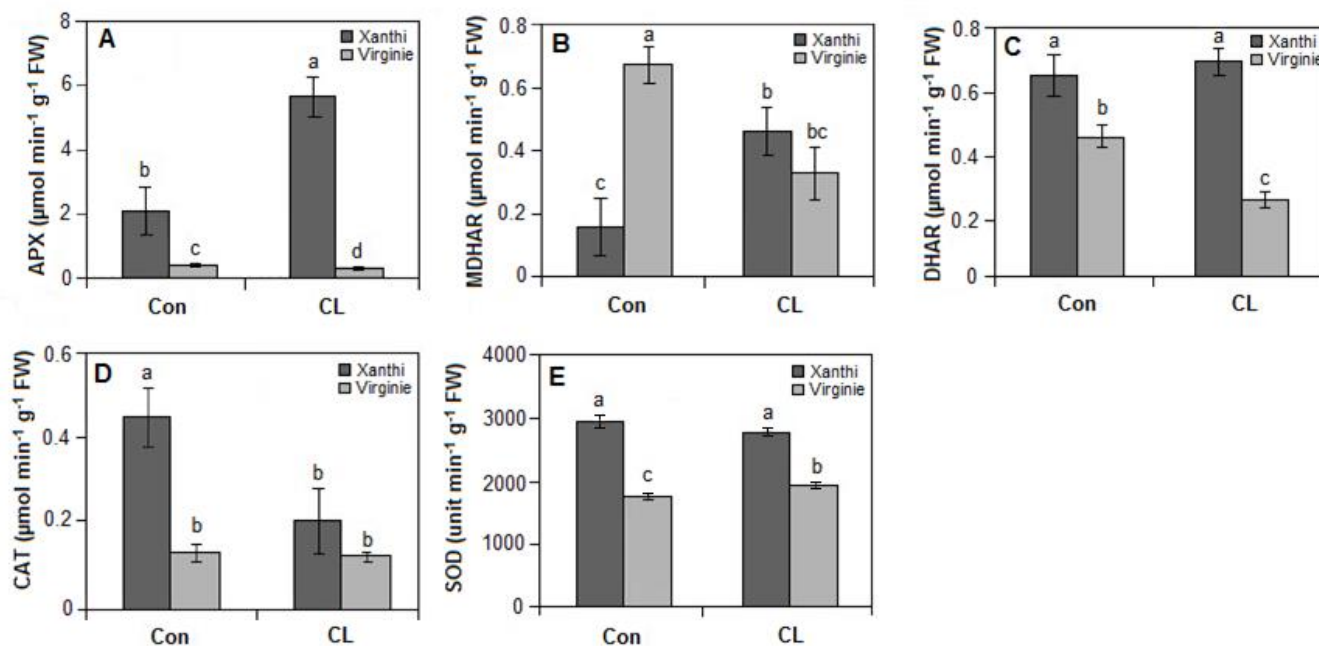


Fig. 2. Effects of clomazone on APX (A), MDHAR (B), DHAR (C), CAT (D) and SOD (E) activities in tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi* and *Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Con, without clomazone; CL, treatment with $1\mu\text{M}$ clomazone. All data represent means, SE for $n=8$ and different letters to determine the significant difference between means within each treatment ($P<0.05$, ANOVA-Tukey test).

3.6. Cytohistological analyses

A microscopic study of sections from the control plantlets showed that in both varieties, the leaf structure was similar and typical of dicotyledonous plants. The photosynthetic mesophyll consisted of thin-walled parenchymatous cells that were filled with numerous starch-containing chloroplasts (Fig. 3A and C). These cells were cytoplasm-rich due to the presence of highly invaginated vacuoles, and there were no obvious cytomorphological differences between the palisade and spongy parenchyma. Stomata were present in the both adaxial and abaxial epidermises.

Sections of the leaves of clomazone-treated plantlets displayed mesophyll cells with a large, well-structured vacuole occupying the majority of cell volume in the two varieties (Fig. 3B and D). In presence of clomazone, the chloroplasts of both tobacco varieties appeared to have deposited more starch than did the controls, as evidenced by the prominence of starch grains, particularly in *Virginie* (compare Fig. 3A to Fig. 3B and Fig. 3C to Fig. 3D). A thorough study of the sections from clomazone-treated plantlets of *Virginie* revealed the presence of numerous mesophyll cells exhibiting cytological alterations that are characteristic of programmed cell death (PCD). These alterations consisted of cell wall lysis (Fig. 3D), vacuole

regression, nuclear and cytoplasm condensation and cell shrinkage. The mesophyll in clomazone-treated *Xanthi* leaves appeared to be composed of cells that maintained their morphological integrity (Fig. 3B).

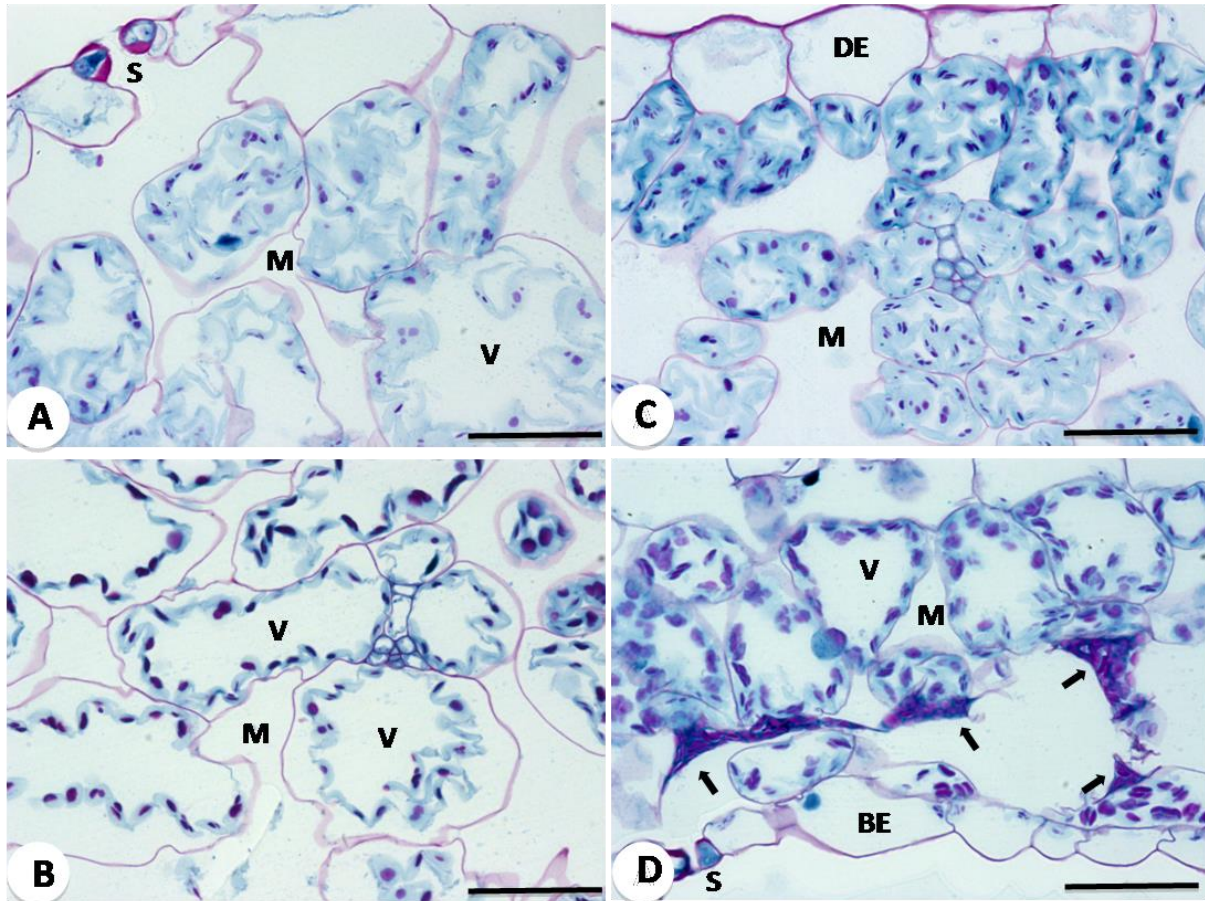


Fig. 3. Cytohistological effects of clomazone on *Xanthi* and *Virginie* varieties of tobacco. A and B, sections from control and clomazone-treated *Xanthi*, respectively. C and D, sections from control and clomazone-treated *Virginie*, respectively. The mesophyll of controls displays structurally similar parenchyma cells in both varieties (Figs A and C). Note the presence of sinuous vacuoles (V) and starchy chloroplasts (pink granules). In general, clomazone increased starch accumulation in chloroplasts of both varieties (Figs B and D) with a remarkable importance in *Virginie*. In addition, the mesophyll of this variety showed cytological alterations resembling those described for programmed cell death (Fig. D, arrows). All scale bars: 50 μm . BE, abaxial epidermis; DE, adaxial epidermis; M, mesophyll; S, stomata; V, vacuole.

4. Discussion

In our previous work, we demonstrated that clomazone differently affected the *Virginie* and *Xanthi* varieties of tobacco based on chlorophyll *a* fluorescence and JIP-test responses (Darwish et al., 2013). In this study, we also used measurements of the O_2 evolution of

isolated chloroplasts, antioxidant systems assessments and cytohistological analyses to elucidate the involved mechanisms. The results confirm that clomazone reduced the pigment contents (total chlorophyll and carotenoid contents) and the LHC content (Chl *a/b* ratio) of *Virginie* leaves compared to those of the control. This negative effect of clomazone in *Virginie* is more pronounced compared to *Xanthi*, where clomazone had no significant effect on the pigment and LHC contents (Table 1).

The PSI [plastoquinone pool→ PSI acceptor side] rates of isolated chloroplasts from both of the varieties demonstrated that clomazone had no effect on the electron transport through the cytochrome *b₆f* complex and PSI. When chloroplasts were isolated from the control plantlets (experiment A), the observed reduction in the oxygen evolution in presence of BQ and clomazone suggested that clomazone had a direct effect on PSII function by decreasing of electron transport (Table 2). However, in the experiment B, in which chloroplasts were isolated from clomazone-treated plantlets, the more significant reduction in the oxygen evolution resulted from the effect of clomazone during plantlet growth, which could be due to its effect on the alteration of the stoichiometry of the photosynthetic electron transport chain (Table 2). This alteration is presumably linked to the decrease in the level of LHC content (Chl *a/b* ratio) as induced by clomazone treatment (Kaňa et al., 2004; Darwish et al., 2013). This decrease in LHC content could induce a decrease in F_m values (Dinç et al., 2012), and could thereby explain a significant reduction of the parameter F_v/F_m . This interpretation is supported by the observation of Kaňa et al. (2004) that CL-treated leaves have properties similar to leaves in the early stages of greening. This result agrees with the findings of Darwish et al. (2013), who reported that clomazone more significantly affects the function of the PSII reaction center (F_v/F_m parameter) in *Virginie* than in *Xanthi*. However, the decrease in F_v/F_m could be due as well to PSII photoinhibition (Krause et al., 1990; Osmond et al., 1993; Maxwell and Johnson, 2000; Poiroux-Gonord et al., 2013; Darwish et al., 2014).

The JIP-test was used to study the effect of clomazone on the electron transport from the acceptor side of PSII in two tobacco varieties. The performance index parameter (PI_{abs}) was noticeably decreased in *Virginie* plantlets compared to those in the control and *Xanthi* plantlets (Table 3), indicating that *Virginie* plantlets are more affected by clomazone than are *Xanthi* plantlets. This parameter is related to the number of active PSII reaction centers per total PSII antenna chlorophyll (RC/ABS), the maximum quantum yield ($TR_0/ABS = F_v/F_m$) and the electron flux beyond Q_A ($1-V_J = ET_0/TR_0$) (Strasser et al., 2000).

Due the effect of clomazone on the redox state of PQ-pool (see the reduction of $1-V_J$, Table 3), an excessive influx of excitations is transferred into the active RC of PSII despite the

observed reduction of LHC contents (see the Chl *a/b* ratio, [Table 1](#)). This influx of excitations is indicated by an increase in the photon absorption (ABS), photon capture (TR0) and electron transport (ET0) by the active (Q_A^- reducing) reaction center (RC) ([Table 4](#)). This induces a more reduced PQ-pool ([Tóth et al., 2007](#)) and modifies the functioning of the Q_B and Q_A acceptors ([Kyle et al., 1984](#); [Vass et al., 1992](#)). These alterations causes a reduction of electron transport *via* increasing the energy dissipation as heat (see the increase of DI0/RC, [Table 4](#)) as a protection mechanism which contributes to photoinhibition on the acceptor side of PSII (see the reduction in F_v/F_m , PI_{abs} and ET0/ABS, [Tables 3, 4](#)) ([Niyogi, 1999](#); [Raven, 2011](#); [Kalaji et al., 2012](#)). This photoinhibition indicates that the carotenoid content is not a main factor in protecting tobacco plantlets from PSII photoinhibition induced by clomazone (see the carotenoid contents in *Virginie* and *Xanthi*, [Table 1](#)); the state of LHC antenna (reflected in changes of Chl *a/b* ratio, ABS/RC and ET0/ABS) is more important in this case. During the PSII photoinhibition process, the reduction in the pool of plastoquinone contributes to the recombination of the charge separated state $P680^+Pheo^-$, consequently the formation of the reactive singlet oxygen 1O_2 *via* $3Chl^*$ is expected according to [Fufezan et al. \(2002\)](#). In turn, the PQ-pool in a very reduced state favors the formation of 1O_2 in relation with recombination reactions in PSII RC ([Adir et al., 2003](#)). The formed 1O_2 can damage the active RC of PSII (see the reduction in F_v/F_m and ET0/ABS in *Virginie*, [Tables 3, 4](#)) ([Krieger-Liszkay, 2004](#)), which could lead: (i) to the formation of H_2O_2 *via* the modification of the water-oxidizing complex ([Fig. 1A](#)) ([Vass, 2012](#)); and (ii) to the production of O_2^- at the level of PSI ([Ledford and Niyogi, 2005](#)). This O_2^- can be dismutated into H_2O_2 ([Fig. 1A](#)) by SOD activity (see SOD activity, [Fig. 2E](#)) ([Bowler et al., 1992](#)). H_2O_2 ([Fig. 1A](#)) at high concentrations becomes cytotoxic, inducing programmed death cell ([Foyer et al., 1997](#); [Gechev et al., 2005](#)). To evaluate the H_2O_2 status and its scavenging, we analyzed the activities of the antioxidant enzymes APX, MDHAR, DHAR, CAT and SOD. There was a difference in the response of antioxidant enzymes activities to clomazone between the varieties. In the *Virginie* variety, the SOD activity increased ([Fig. 2E](#)), and considering the decrease in the APX and CAT activities ([Fig. 2A and D](#)), this increase can partially explain the high accumulation of H_2O_2 ([Fig. 1A](#)) in the clomazone treatment. Moreover, this accumulation was also supported by the low activities of MDHAR and DHAR enzymes ([Fig. 2B, C and D](#)) and the low content of AsA ([Fig. 1B](#)).

Concerning the *Xanthi* variety under CL treatment, despite the decreased CAT activity ([Fig. 3D and E](#)), the increased APX and MDHAR activities ([Fig. 3A and B](#)) caused low H_2O_2

accumulation (Fig. 1A) and thus, less stress. This antioxidant defense can partially explain the *Xanthi* tolerance to clomazone.

Microscopic analyses allowed us to investigate the effect of clomazone in the two tobacco varieties. The accumulation of starch grains and vacuolization in the sections from the clomazone-treated plantlets could be due to specific cellular response mechanisms to clomazone stress (Fig. 3B and D). Indeed, plant cells have developed mechanisms to exclude and isolate herbicides, and increased vacuolization is one of these mechanisms (Dixon et al., 1998; Jamers and De Coen, 2010; Romero et al., 2011). The data of Ackerson and Hebert (1981) showed large starch granules in stress-adapted plants. Moreover, greater starch accumulation in plants cells was associated with the greater resistance of their photosynthetic apparatus to oxidative stress (Muneer et al., 2014). Compared to those in *Xanthi*, the symptoms of programmed cell death (PCD) that were observed in sections from the clomazone-treated *Virginie* plantlets (Fig. 3D) can be related to the toxic effects of the high accumulation of H₂O₂ (Fig. 1A), which was accompanied by the inactivation of antioxidant enzymes that scavenge H₂O₂.

In summary, we conclude that clomazone has a direct effect on the function of PSII and thus on the photosynthetic electron transport. This effect of clomazone appears to be independent of its influence on the carotenoid contents and could be related to the photooxidative stress and the efficiency of the detoxification mechanisms during plantlet growth. Moreover, this work showed a variable tolerance in both tobacco varieties as a typical response to clomazone; *Virginie* variety was more sensitive than *Xanthi* variety. Furthermore, the sole protective mechanism of heat dissipation after excess photon absorption in *Virginie* could not prevent the accumulation of H₂O₂ in the absence of ROS-scavenging enzymes (APX, CAT, and SOD). In contrast, the efficient activity of antioxidant enzymes (see APX and MDHAR, Fig. 2A and B) in *Xanthi* led to a greater tolerance to clomazone herbicide.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Syrian Ministry of Education and Research, and by laboratory of fruits and vegetables of university of Avignon and Vaucluse countries.

6. References

- Anderson JM. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes, *Annu Rev Plant Physiol* 1986;37:93–136.
Ackerson RC, Hebert RR. Osmoregulation in cotton in response to water stress. *Plant Physiol* 1981;67:484–8.

- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I. Photoinhibition- a historical perspective. *Photosynth Res* 2003;76:343–70.
- Biswall B. Carotenoids catabolism during leaf senescence and its control by light. *J Photochem Photobiol* 1995;30:3–14.
- Björkman O. Comparative studies on photosynthesis in higher plants. In: Giese AC, editor. *Photophysiology*. New York: Academic Publishers; 1973. p. 1–63.
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 1992;43:83–116.
- Chance B, Maehly AC. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol* 1955;2:764–75.
- Chang HJ, Konz MJ, Aly EA, Sticker RE, Wilson KR, Korg NE, Dickson PE. 3-Isoxalidones and related compounds a new class of herbicides. In: Baker DR, Fenyes JG, Moberg WK, Cross B, editors. *Synthesis and chemistry of agrochemicals*. Washington: American chemical society; 1997. p. 10–23.
- Croisetiere L, Rouillon R, Carpentier R. A simple mediator less amperometric method using the *cyanobacterium Synechococcus leopoliensis* for the detection of phytotoxic pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:261–4.
- Darwish M, Lopez-Lauri F, Sallanon H. Study of photosynthesis process in the presence of low concentration of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *J Stress Physiol Biochem* 2013;9: 229–45.
- Darwish M, Lopez-Lauri F, El Maataoui M, Urban L, Sallanon H. Pretreatment with alternation of light/dark periods improves the tolerance of tobacco (*Nicotiana tabacum*) to clomazone herbicide. *J Photochem Photobiol* 2014;134:49–56.
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, van de Cotte B, Langebartels C, Kangasjärvi J, Inzé D, Van Breusegem F. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* 2003;33:621–32.
- Dekker PJ, Boekema EJ. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 2005;1706:12–39.
- Dixon DP, Cummins I, Cole DJ, Edwards R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1998;1:258–66.
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescent correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot* 1981;32:93–101.
- Duke SO, Kenyon WH. Effects of dimethazone (FMC-57020) on chloroplast development. 2. Pigment synthesis and photosynthetic function in cowpea (*Vigna unguiculata L*) primary leaves. *Pest Biochem Phys* 1986;25:11–8.
- El Maataoui M, Pichot C. Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens L.* *Planta* 1999;208:345–51.
- Farineau J, Gaudry JFM. Transferts d'électrons dans les thylacoïdes. In: Gaudry JFM, Farineau J, editors. *Processus physiques, moléculaires et physiologiques*. Paris: Versailles; 2011. p. 141–5.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 1997;100:241–54.
- Fufezan C, Rutherford AW, Krieger-Liszakay A. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters* 2002;532:407–10.
- Gauthier A, Joly D, Biosvert S, Carpentier R. Period-four Modulation of Photosystem II Primary Quinone Acceptor (Q_A) Reduction/Oxidation Kinetics in Thylakoid Membranes. *Photochem Photobiol* 2010;86:1064–70.
- Gechev TS, Hille J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* 2005;168:17–20.
- Gechev TS, Minkov IN, Hille J. Hydrogen peroxide-induced cell death in Arabidopsis: Transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life* 2005;57:181–8.
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 2006;28:1091–101.
- Jamers A, De Coen W. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:893–901.
- Joly D, Carpentier R. Rapid isolation of intact chloroplasts from spinach leaves. In: Carpentier R, editor. *Photosynthesis Research Protocols*. New York: Springer; 2011. p. 321–5.
- Kalaji MH, Carpentier R, Allakhverdiev IS, Bosa K. Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. *J Photochem Photobiol* 2012;112:1–6.
- Kaňa R, Šponduvá M, Ilík P, Lazár D, Klem K, Tomek P, Nauš J, Prášil O. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare L.*). *Pestic Biochem Physiol* 2004;78:161–70.
- Kitajama M, Butler WL. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochim Biophys Acta* 1975;376:105–15.

- Koblizek M. A sensitive photosystem II-based biosensor for detection of a class of herbicides. *Biotechnol Bioeng* 1998;60:664–9.
- Krause GH, Somersald S, Zumbusch E, Weyres B, Laasch H. On the Mechanism of Photoinhibition in Chloroplasts. Relationship Between Changes in Fluorescence and Activity of Photosystem II. *J Plant Physiol* 1990;136:472–9.
- Krieger-Liszkay A. Singlet oxygen production in the photosynthesis. *J Exp Bot* 2004;56:337–46.
- Kroger S, Piletsky S, Turner APF. Biosensors for marine pollution research, monitoring and control. *Mar Pollut Bull* 2002;45:24–34.
- Krüger GHJ, Tsimilli-Michael M, Strasser RJ. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves. *Physiol Plant* 1997;101:65–277.
- Kyle DJ, Ohad I, Arntzen CJ. Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone–protein function in chloroplast membranes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1984;81:4070–4.
- Ledford HK, Niyogi KK. Singlet oxygen and photooxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ* 2005;28:1037–45.
- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthesis biembranes. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1987. p. 350–82.
- Maxwell K, Johnson GN. Fluorescence of chlorophyll-a, a practical guide. *J Exp Bot* 2000;51:659–68.
- Michelet L, Krieger-Liszkay A. Reactive oxygen intermediates produced by photosynthetic electron transport are enhanced in short-day grown plants. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:1306–13.
- Muneer S, HwanKim T, ChulChoi B, SeonLee B, HyunLee J. Effect of CO, NO_x and SO₂ on ROS production, photosynthesis and ascorbate–glutathione pathway to induce *Fragaria × annasa* as a hyperaccumulator. *Redox Biol* 2014;2:91–8.
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum Lycopersicon* L, cv Micro-tom). *Physiol Mol Biol Plants* 2013;19:363–78.
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H. Effect of salt stress on antioxidant systems depends on fruit development stage. *Physiol Mol Biol Plants* 2014;20:15–29.
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Anal Biochem* 2008;383:320–2.
- Niyogi KK. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999;50:333–59.
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:742–9.
- Norman MA, Liebl RA, Widholm JM. Uptake and metabolism of clomazone in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. *Plant Physiol* 1990;92:777–84.
- Osmond CB, Ramus J, Levavasseur G, Franklin LA, Henley WJ. Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid. *Planta* 1993;190:79–106.
- Papageorgiou GC, Govindjee. Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer; 2004. p. 1–795.
- Petrouleas V, Crofts AR. The iron–quinone acceptor complex. In: Wydrzynski T, Satoh K, editors. *Photosystem II: The Light-driven Water Plastoquinone Oxido-reductase in Photosynthesis*. Dordrecht: Springer; 2005. p. 177–206.
- Pimentel D. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *J Agr Environ Ethic* 1995;8:17–29.
- Poiroux-Gonord F, Santini J, Fanciullino AL, Lopez-Lauri F, Giannettini J, Sallanon H, Berti L, Urban L. Metabolism in orange fruits is driven by photooxidative stress in the leaves. *Physiol Plant* 2013;149:175–87.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents–Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1989;975:384–94.
- Ripley BS, Redfern SP, Dames J. Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll-a fluorescence kinetics. *South African J Sci* 2004;100: 615–8.
- Raven JA. The cost of photoinhibition. *Physiol Plant* 2011;142:87–104.
- Romero DM, Ríos de Molina MC, Juárez AB. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol Environ Safe* 2011;74:741–7.
- Rutherford WA, Krieger-Liszkay A. Oxidative stress induced by herbicides in the photosystem II. *Trends Biochem Sci* 2001;26:648–53.
- Samuel K, Bose S. Immediate effects of pyridazinone herbicides on photosynthetic electron transport in algal systems. *J Biosci* 1987;12:211–8.
- Souza RC, Rocha Gomes Ferreira DT, Vitorino HS, Souza Barbosa GV, Endres L, Ferreira VM. Oxidative stress in *Emilia coccinea* (Asteraceae) caused by a mixture of Clomazone+ Ametryn IRJPS 2012;5:80–7.

- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. The fluorescence transient as a tool to characterize the situation photosynthetic samples. In: Yunus M, Pathre U, Mohanty P, editors. Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. London: Taylor & Francis; 2000. p. 445–83.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. Analysis of the chlorophyll fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee, editors. Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer; 2004. p. 321–62.
- Stirbet A, Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol* 2011;104:236–57.
- Tóth SZ, Schansker G, Strasser RJ. Anon-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynth Res* 2007;93:193–203.
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 2002;516:156–60.
- Tsimilli-Michael M, Kruger GHJ, Strasser RJ. Suboptimality as driving force for adaptation: a study about the correlation of excitation light intensity and the dynamic fluorescence emission in plants. In: Mathis P, editor. Photosynthesis: From Light to Biosphere. Dordrecht: Kluwer; 1995. p. 981–4.
- Van Gorkom HJ. Fluorescence measurements in the study of photosystem II electron transport. In: Govindjee, Amez J, Fork DC, editors. Light Emission by Plants and Bacteria. Ontario: Academic Press; 1986. p. 267–89.
- Vass I. Molecular mechanisms of photodamage in the photosystem II complex. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:209–17.
- Vass I, Styring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro EM, Andersson B. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of Photosystem II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:1408–12.
- Ventrella A, Catucci L, Agostiano A. Herbicides affect fluorescence and electron transfer activity of spinach chloroplasts, thylakoid membranes and isolated Photosystem II. *Bioelectrochemistry* 2010;79:43–9.
- Walters RG. Towards understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot* 2005;56:435–47.
- Whitmarsh J, Govindjee. The photosynthetic process. In: Singhal GS, Renger G, Irrgang KD, Sopory S, Govindjee, editors. Concepts in Photobiology and Photomorphogenesis. Dordrecht: Kluwer; 1999. p. 11–51.
- Yang DH, Andersson B, Aro EM, Ohad I. The redox state of the plastoquinone pool controls the level of the light-harvesting chlorophyll bindings protein complex II (LHCII) during photoacclimation. *Photosynth Res* 2001;68:163–74.

**Chapitre IV: Effet d'un prétraitement par
une alternance de cycles courts
lumière/obscurité sur la tolérance du tabac
(*Nicotiana tabacum* L.) vis-à-vis du
clomazone**

Effet d'un prétraitement par une alternance de cycles courts de lumière/obscurité sur la tolérance du tabac (*Nicotiana tabacum* L.) vis-à-vis du clomazone

Ce chapitre est divisé à deux parties:

La première partie est présentée sous la forme d'un article publié dans *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (Darwish et al., 2014).

La deuxième partie est présentée sous la forme d'un article soumis à *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.

Publication 3**Pretreatment with Alternation of Light/Dark Periods Improves the Tolerance of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to Clomazone Herbicide**

M. Darwish, F. Lopez-Lauri, M. El Maataoui, L. Urban, H. Sallanon, Pretreatment with Alternation of Light/Dark Periods Improves the Tolerance of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) to Clomazone Herbicide, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 134 (2014) 49-56

Dans le chapitre précédent, il a été montré que le clomazone induit un stress photooxydatif chez la variété la plus sensible *Virginie*.

Des données bibliographiques ont décrit des effets stimulant la croissance et les mécanismes antioxydants chez des algues lors d'application de lumière intermittente ([Sharkey et al., 1986](#); [Nedbal et al., 1996](#); [Merchuk et al., 1998](#)).

Dans ce travail nous avons appliqué à la variété *Virginie* un prétraitement de 3 jours pendant lesquels la durée de l'alternance lumière/obscurité était de 16 min/ 8 min, une semaine avant le traitement avec l'herbicide.

Comme dans les chapitres précédents, ont été suivi les teneurs en pigments, l'efficacité du PSII *via* les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne et le test *OJIP*, les teneurs en H₂O₂ et les activités antioxydantes des enzymes du cycle Asada-Halliwel.

Expérimentation

La variété de tabac *Nicotiana tabacum* L. *Virginie vk 51* a été utilisée. Une partie des plantules au stade trois feuilles a été exposée à une alternance lumière/obscurité de 16 min/8 min sous une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant 3 jours. L'autre partie des plantules est cultivée sous une alternance lumière/obscurité de 16 h/ 8h. Après une semaine de croissance à 22 °C le jour et 17 °C la nuit, avec une humidité relative de 60 %, des cycles jour/nuit de 16 h/8 h et une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les plantules ont été traitées avec 1 μM de clomazone pendant 14 jours.

Principaux résultats

Le prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité a amélioré la tolérance des plantules de tabac face au stress photooxydatif induit par le clomazone. Ce prétraitement a

augmenté la surface foliaire de la plante, l'efficacité photochimique maximale du PSII (F_v/F_m), l'efficacité réelle du PSII (Φ_{PSII}), l'indice de performance (PI_{abs}), le flux d'électrons au-delà de Q_A ($1-V_j$), et a également diminué la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (DI0/RC).

De plus, ce prétraitement a conduit à une diminution de l'accumulation d' H_2O_2 et une augmentation de l'activité des enzymes de détoxification (APX, MDHAR, SOD, GR et DHAR).

Conclusion

Le prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière et d'obscurité améliore la tolérance des plantules de *Nicotiana tabacum* L. *Virginie vk 51* au clomazone. Cette amélioration semble provenir de la stimulation de l'activité des enzymes antioxydante dans le chloroplaste qui protège l'appareil photosynthétique des effets directs des ERO et élimine des électrons en excès dans la chaîne de transport.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Pretreatment with alternation of light/dark periods improves the tolerance of tobacco (*Nicotiana tabacum*) to clomazone herbicide



Majd Darwish*, Félicie Lopez-Lauri, Mohamed El Maataoui, Laurent Urban, Huguette Sallanon

EA 4279, Laboratoire de Physiologie des Fruits et Légumes, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, 301, rue Baruch de Spinoza, BP 21239, 84916 Avignon cedex 9, France

ABSTRACT

This work analyses the effects of alternation of light/dark periods pretreatment (AL) in tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*) growing in solution with low concentration of the clomazone herbicide. The experimentation has been carried out by exposing the plantlets to successive and regulated periods of light (16min light/8min dark cycles, PAR $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for three days. The photosynthesis efficiency was determined by mean of the chlorophyll fluorescence and JIP-test. The AL pretreatment improved the clomazone tolerance; this has been observed by the increase in the leaf area of the plant, the maximal photochemical quantum efficiency of PSII (F_v/F_m), the actual PSII efficiency (ΦPSII), the performance index (PI_{abs}), the electron flux beyond Quinone A ($1-V_j$), and also by the diminution of the energy dissipating into heat (DI0/RC). Furthermore, AL pretreatment led to low accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) which proves that the scavenging enzymatic system have been activated before clomazone treatment. In the plantlets pretreated with AL, with regard to the ascorbate content, some of antioxidant enzyme whose function is associated with it have continued to scavenge reactive oxygen species (ROS) induced by clomazone, such as ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and glutathione reductase (GR). So, the observed photooxidative damages induced by clomazone herbicide were noticeably reduced.

Keywords: Light; Chlorophyll fluorescence; JIP-test; Photosynthesis; Photosystem II; *Nicotiana tabacum*; Tolerance

Abbreviations: ABS absorption flux.- APX ascorbate peroxidase.- AsA ascorbate.- Chls chlorophyll (a+b).- DIO dissipation flux.- DHA dehydroascorbate.- DHAR dehydroascorbate reductase.- ET0 electron Transport flux.- F_0 , F_v , F_m minimal, variable, maximal chlorophyll fluorescence.- F_v/F_m maximal photochemical efficiency of PSII.- GR glutathione reductase.- H_2O_2 hydrogen peroxide.- LHCs light harvesting complex of photosystem I (II).- MDHAR monodehydroascorbate reductase.- 1O_2 singlet oxygen.- PAR photosynthetic active radiance.- PI_{abs} performance index.- PSI photosystem I.- PSII photosystem II.- $\Phi PSII$ actual PSII efficiency.- Q_A Quinone A, primary quinone electron acceptor of PSII.- qP photochemical quenching.- RC reaction center.- ROS reactive oxygen species.- SOD superoxide dismutase.- TR0 energy flux trapping.

1. Introduction

The photosynthetic reactions in higher plants are piloted through the cooperation of the two photosystems, PSI and PSII [1,2]. Light energy is collected by the antenna of PSII and PSI (LHCs) and is channeled to the reaction centers (RC). In most of the cases, where plants are exposed to herbicides, the electron transport will be blocked and the Q_A will stay in a reduced state, thus promoting the formation of reactive oxygen species, such as singlet oxygen (1O_2), *via* the chlorophyll triplet $^3Ch^*$ [3,4]. 1O_2 is an active form of the reactive oxygen species (ROS); it can provoke to not only the destruction of plastidial structure, but also the formation of the other ROS, such as superoxide (O_2^-), peroxide hydrogen (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^\cdot). However, 1O_2 seem to be the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plant [5]. The herbicide clomazone belongs to the class isoxazolidinone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one]. It is a pre-emergence herbicide, widely used in agriculture for the control of annual weeds in soybean, cotton, sugar cane, maize, rice and tobacco [6]. Clomazone treatment can lead to decrease in the antenna pigments of the photosynthetic apparatus; consequently, it leads to photooxidative stress which can inhibit the PSII [7].

It is important to know that the variation of intensity and duration of light may produce modulation of the response of plants to biotic and abiotic stress, this in turn can be explained by the accumulation of ROS [8-10]. These ROS are thought to be one of the primary causes of the irreversible loss of photosynthetic activity, which is observed in the plant leaves exposed to light in combination with the environmental stresses [11-13]. However, plants have developed numerous mechanisms to protect the photosynthetic apparatus against photooxidative damages. This involves modifications in the amount of the soluble enzymes, the components of the electrons-transport, and the pigment-protein complexes which are effective mechanisms to match the available amount of light with the very capacity of the plant itself to absorb it for carbohydrate synthesis [14]. Moreover, antioxidant systems are considered as another mechanism by which the photooxidative damage induced by the herbicides is considerably reduced. Indeed, plants have two antioxidant defense systems: enzymatic and non-enzymatic scavenging systems. Enzymatic antioxidants system includes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the enzymes belonging to Ascorbate-glutathione cycle such as ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), glutathione reductase (GR), whereas non-enzymatic antioxidant system includes some compounds such as ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH), α -tocopherol, and

carotenoids [9,15,16]. SOD activity can transmute O_2^- into H_2O_2 [17]. The H_2O_2 generated by the SOD activity is scavenged by APX; this enzyme is also involved in the oxidation of ascorbate to monodehydroascorbate (MDHA), which itself can be converted back to ascorbate *via* the MDHAR. In addition, MDHA can be converted rapidly to dehydroascorbate (DHA) that is converted back to ascorbate by DHAR [9]. Then, the ascorbate-glutathione cycle needs the regeneration of the AsA that relies on GR (a key enzyme in GSH regeneration cycle) [9]. CAT is also a main enzyme used to eliminate the H_2O_2 in the peroxisome [18]. Ascorbate (AsA) is a major antioxidant in plants scavenging the reactive oxygen species [19].

The alternation of light/dark periods has been suggested beneficial to the photosynthetic efficiency by reducing photoinhibitory damage [20-22]. In a recent study, Gergoff Grozeff et al [23] have demonstrated that short light pulses can improve the antioxidant capacity in post-harvested leaves of spinach. More, Kreslavski et al [24] showed that red light preillumination increased the antioxidant enzymes, by consequent the resistance of the Arabidopsis photosynthetic apparatus to the oxidative stress caused by UV irradiation. In our work presented here, we will suppose that the pretreatment with the alternation of light/dark periods can moderate the photosynthetic efficiency and protect the plants from the clomazone stress.

In the present study, tobacco plantlets were pretreated with repetition of light/dark cycles for a limited and regulated periods, and then they were grown in the same light intensity before applying the herbicide. The objective was to investigate whether or not the pretreatment with the alternation of light/dark periods is involved in the protection of tobacco plantlets against the observed photooxidative stress provoked by clomazone; special attention has been paid to modifications in the growth parameters, photosynthetic pigments, H_2O_2 , ascorbate content, antioxidant activities, parameters of chlorophyll fluorescence JIP-test as a quick and effective method to evaluate the photosynthetic activity.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material, growth conditions and chemical treatments

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*) seeds were germinated in a plastic container with sterilized potting soil for two weeks at 22/17 °C, 16h/8h of light/dark cycle and flux of photons (PAR) $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Germination was carried out in sterile conditions and in compliance with the growth chamber conditions, according to Darwish et al. [7]. After 5 weeks, plantlets (three leaves stage) were exposed or not to an alternation of light/dark periods (AL) (16min/8min of light/dark cycle, PAR $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in a

growth chamber for three days; the other part remained without an AL to be used as a control. Plantlets were transferred into a hydroponic system containing the nutrient solution of Auckland (1 M KNO₃; 1 M Ca(NO₃)₂.H₂O; 1 M MgSO₄.7H₂O; 1 M KH₂PO₄; 0.01 M FeEDDHA) in the same environmental conditions of germination phase. Then, clomazone (CL) (Sigma-Aldrich, USA) was added to treated plantlets at the concentrations of 1 μM for 14 days, (Fig. A). The solutions of such a treatments were refreshed twice a week. After 14 days, growth and fluorescence parameters are determined in leaves of the four treatments ((1) Con (Control, without alternation of light/dark periods or clomazone); (2) CL (1 μM clomazone); (3) AL (alternation of light/dark periods); (4) AL+CL (alternation of light/dark periods+ 1 μM clomazone)). Then, leaves are harvested and stored at -80°C for analysis.

2.2. Determination of growth parameters

Fourteen days after the beginning of CL treatment, plant growth was determined by several parameters: leaf area, plant height, length and the fresh weight of the leaves and roots. The leaf area was measured by using image J software.

2.3. Determination of photosynthetic pigments

Total chlorophyll and carotenoids were determined according to Lichtenthaler [25] using pure acetone as extraction solvent. Absorbance at 662, 645 and 470 nm was measured immediately after extraction. Chlorophyll and carotenoids contents were calculated according to Lichtenthaler [25].

2.4. Determination of H₂O₂ content

The hydrogen peroxide levels were determined as described by Murshed et al [26] with some modifications: 250 mg of sample was homogenized in 1 ml 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at 12,000 × g for 15 min at 4 °C. Aliquots of 100 μl from each tube were placed in 96-well plates and 50 μl of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 100 μl of 1 M KI were added in each well. Control sample were made with water instead of KI to remove the color background of extract at 390 nm. Each plate also contained commercial H₂O₂ to generate a standard curve. Plate was briefly vortexed and the absorbance

readings were taken at 390 nm in a micro-plate reader. The concentration of H₂O₂ was given on a standard curve.

2.5. Determination of the ascorbate content

The assay of the total and reduced AsA contents were carried out on a material stored at -80 °C according to Murshed et al [27] with some modifications. Briefly, 100 mg of tobacco leaf powder was homogenized with 1 ml of ice cold 6% trichloroacetic acid (TCA). Samples were centrifuged at 15,000 × g for 10 min at 4 °C and the 10 µl of supernatant used in each assay. The total AsA (addition of 20 µM of dithiothreitol (DTT)) and reduced AsA (without (DTT)) were measured on each sample. 10 µl of each sample or standard were distributed into two wells (for three repetitions) of a 96-well microplate and mixed with 10 µl of 20 mM DTT (total AsA assay) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) (reduced AsA assay). The plate was incubated at 42 °C for 15 min. Then, 10 µl of *N*-ethyl maleimide (NEM) (total AsA assay) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) (reduced AsA assay) were added and mixed, followed by 150 µl of colour reagent (containing H₃PO₄ ; FeCl₃ and dipyrilidil). After incubation at 42 °C for 40 min, the plate was briefly vortexed and the absorbance readings were taken at 525 nm in a micro-plate reader (Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France). The AsA concentration of the samples was calculated from a standard curve.

2.6. Anti-oxidative enzymes activities:

Extraction of enzymes:

Protein extraction was performed according to Murshed et al [28]. Frozen leaf powder (150 mg) was homogenized in 1 ml of 50 mM MES/KOH buffer (pH 6.0), containing: 40 mM KCl, 2 mM CaCl₂, and 1 mM AsA. Solutions were centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were analyzed immediately for measuring enzyme activities.

Enzymes assays:

All enzymes assays are performed in a final volume of 0.2 ml volume kinetic reactions at 25 °C, using a micro-plate reader (Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France). APX, DHAR, MDHAR and GR activities were measured by the method of Murshed et al [28]. APX activity was determined spectrophotometrically following the decrease in absorbance at 290 nm ($\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to ascorbate oxidation. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.25 mM AsA, 5 µl extract and 5

mM H₂O₂. The reaction was started by adding H₂O₂ (200 mM). DHAR was assayed in a reaction mixture consisting of 50 mM HEPES buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 0.2 mM DHA and 5 µl extract; activity was determined by measuring the increase in the reaction rate at A265 and was calculated from the 14.0 mM⁻¹ extraction coefficient. MDHAR was determined in a reaction mixture consisting of 100 mM HEPES buffer (pH 7.6), 2.5 mM AsA, 0.25 mM NADH, 5 µl extract and 0.4 units ascorbate oxidase. Activity was determined by measuring the decrease in reaction rate at A340 and calculated from the 6.22 mM⁻¹ extraction coefficient. GR activity was assayed in a reaction mixture consisting of 50 mM HEPES buffer (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 0.25 mM NADPH, 5 µl extract and 0.5 mM GSSG. Activity was determined by measuring the decrease in the reaction rate at 340 nm and was calculated from the coefficient 6.22 mM⁻¹cm⁻¹. CAT activity was measured according to Chance and Maehly [29] in a reaction mixture containing 50 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.0), 15 mM H₂O₂ and 5 µl extract to initiate the reaction. Activity is described in terms of the change in absorbance at 240 nm as the H₂O₂ was lowered. SOD activity was determined using the modified method of Dhindsa et al [30]. SOD activity was assayed in a 0.1 ml reaction mixture containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 13 mM methionine, 75 µM nitro blue tetrazolium (NBT), 0.1 mM EDTA, 10 µM enzyme extract, and 2 µM riboflavin. Absorbance at 560 nm was measured immediately, after 5 min illumination, with a light intensity of 1 µmol. m⁻¹ s⁻¹ at 25 °C. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme required to inhibit the NBT photoreduction by 50%.

2.7. Determination of the chlorophyll fluorescence transients

The behavior of the photosystem II (PSII) can be evaluated using the rapid kinetics of the fluorescence of chlorophyll *a* emitted by the leaves of plants adapted to darkness and light with a light saturation. Before any measurement takes place, leaves were dark-adapted for 20 min. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence (expressed in relative units) was measured using a portable Handy-PEA (Hansatech, Kings Lynn, UK). The fluorescence of leaves was determined after an illumination with a light intensity of 3,000 µmol photons m⁻¹ s⁻¹. The fluorescence parameters were calculated automatically $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, which represents the maximal quantum photochemical yield of PSII [31] and the quantum yield of the open centers of PSII [32]. The JIP-test is based on the energy flux theory in bio membranes developed by Strasser et al [33]. This model describes how the flux of photons absorbed by the photosynthetic pigments antenna ABS is dissipated as heat (DI) and fluorescence or

transported as the trapped flux (TR) of the reaction centers to be converted into energy redox by reducing plastoquinone Q_A to Q_A^- . Then Q_A^- is reoxidized to Q_A , and therefore the creation of an electron transport (ET) ensues which leads to CO_2 fixation [34]. These fluxes are described in terms of a specific energy flux (per RC) or as proportions of other fluxes (ratios or yields). The calculation of the energy flux and ratios of a specific flux was fully explained by Strasser and his coworkers [35-37]. The actual PSII efficiency $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$ and photochemical quenching coefficient $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ [37] were measured using a pulse-modulated fluorimeter system (FMS1, Hansatech, Kings Lynn, UK); the steady-state fluorescence level F_s and the maximum chlorophyll fluorescence level F_m' were measured using an actinic light $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a saturating light pulses of $6,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with 1 s duration, respectively according to Pompelli et al [38]. The actinic light was removed and the minimal fluorescence in the light-adapted state (F_0') was determined.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with R statistical software using an ANNOVA with Tukey test. Results were displayed by means of 8 replicates \pm SE. Results were considered significant at the $P < 0.05$.



Fig. A. The experimental protocol showing the preparation of tobacco plantlets and chemical treatment by herbicide clomazone

3. Results

3.1. Plant growth

The negative effect of clomazone on the fresh weight of the roots and plants was shown by a significant decrease about 50% and 38% as compared to the control, respectively. In contrast, the fresh weight of the roots and plants was significantly increased in plantlets of the AL+CL treatment. Moreover, the AL pretreatment enhanced the growth of plantlets in AL+CL treatment to the extent that its fresh weight has increased about (32%) as compared to the control (Table 1).

Table 1. Measure of fresh weight, length and plant leaf area of tobacco plantlets grown under alternation of light/dark periods and clomazone treatments. **Con** without alternating of light/dark periods, or clomazone; **CL** treatment with 1 µM clomazone; **AL** alternation of light/dark periods; **AL+CL** pretreatment of alternation of light/dark periods+ 1 µM clomazone treatment. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P<0.05$, ANNOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n= 8.

Treatment	Fresh weight (g)		Length (cm)		plant leaf area (cm ²)
	root	plant	root	plant	
Con	0,40 \pm 0,04 b	1,4 \pm 0,17 b	10,6 \pm 0,7 a	1,9 \pm 0,2 a	79 \pm 10 a
CL	0,20 \pm 0,04 c	0,8 \pm 0,19 c	8,6 \pm 0,9 b	1,4 \pm 0,1 b	50 \pm 9 b
AL	0,57 \pm 0,09 a	1,6 \pm 0,21 b	9,5 \pm 0,4 ab	1,9 \pm 0,2 a	81 \pm 9 a
AL+CL	0,44 \pm 0,07 b	2 \pm 0,20 a	10,6 \pm 0,8 a	1,9 \pm 0,2 a	94 \pm 6 a

The roots and the plantlets length in the CL treatment has already decreased as compared to the control (19% ; 28%), respectively. However, the AL pretreatment was able to regulate the plant growth with no negative effects of clomazone to be found on roots or plantlets length (Table 1). Similarly, the leaf area of plantlets has considerably increased in the AL+CL treatment as compared to CL treatment (47%) (Table 1).

3.2. Photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids)

Clomazone reduced the total chlorophyll content in the plantlets about (22%) as compared to the control. The plantlets of AL+CL treatment showed an increase in the total chlorophyll which was about (40%) as compared to CL treatment alone (Table 2).

The level of carotenoids was also reduced in the CL treatment. However, the herbicide had no effect on the carotenoids content in the case of plantlets pretreated with AL (Table 2).

Moreover, a significant increase in Chl *a/b* ratio was found in the CL treatment as compared to the control. However, this increase was removed in AL+CL, which had no significant difference as compared to the control (Table 2).

Table 2. Chlorophyll (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*) and carotenoides (Car) contents per fresh weight in the control (Con), clomazone (CL), alternation of light/dark periods (AL) and alternation of light/dark periods+ clomazone (AL+CL) leaves. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P<0.05$, ANNOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n= 8.

Treatment	Chl <i>a</i> ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	Chl <i>b</i> ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	Chl <i>a+b</i> ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)	Chl <i>a/b</i>	Car ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW)
Con	586 \pm 28 a	375 \pm 42 b	962 \pm 52 b	1,71 \pm 0,18 b	145 \pm 7 a
CL	509 \pm 13 b	242 \pm 20 c	750 \pm 32 c	2,18 \pm 0,12 a	120 \pm 6 b
AL	602 \pm 33 a	535 \pm 39 a	1136 \pm 51 a	1,30 \pm 0,13 c	152 \pm 10 a
AL+CL	581 \pm 27 a	476 \pm 62 ab	1157 \pm 51 ab	1,43 \pm 0,24 bc	142 \pm 11 a

3.3. H₂O₂ and antioxidant systems

H₂O₂ content (Fig. 1A) increased in the tobacco plantlets treated with clomazone as compared to the control, AL pretreatment was also able to protect the tobacco plantlets from the large accumulation of H₂O₂. Similarly, AL+CL treatment has shown a high decrease in the H₂O₂ content (61%) as compared to the CL treatment.

The total ascorbate (Fig. 1B) decreased in the CL treatment as compared to the control: about 19%, while in the AL and AL+CL treatments, the total ascorbate increased about (16%; 26%) as compared to the control, respectively. This has been observed by the higher content of oxidized ascorbate (DHA) with the AL pretreatment, and the reduced (AsA) and oxidized (DHA) ascorbate with the AL+CL treatment.

In the CL treated leaves, the activities of the DHAR (Fig. 2B), MDHAR (Fig. 2C) and GR (Fig. 2D) were significantly decreased ($P<0.05$) in comparison with the control, while the activities of APX (Fig. 2A) and CAT (Fig. 2E) seem to have had no difference. The SOD (Fig. 2F) activity was significantly higher than the one found in the control.

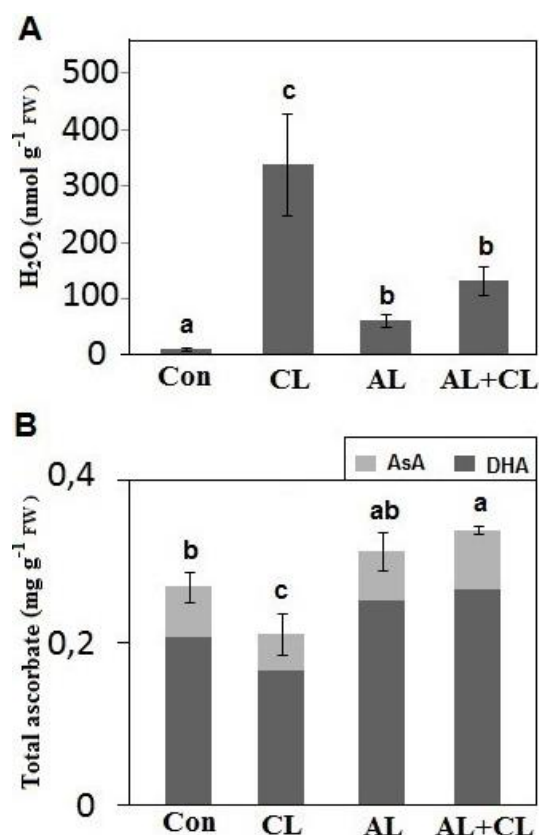


Fig. 1. Effects of clomazone and alternation of light/dark periods on H_2O_2 content and total ascorbate in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). **Con** without alternating of light/dark periods, or clomazone; **CL** treatment with 1 μ M clomazone; **AL** alternation of light/dark periods; **AL+CL** pretreatment of alternation of light/dark periods+ 1 μ M clomazone treatment. All data represent means, SE for n= 8 and different letters to determine the significant difference between means within each treatment ($P<0.05$, ANNOVA-Tukey test).

In the AL+CL treatment, the APX activity has shown a significant increase as compared to the Con and CL treatments. Moreover, the activities of DHAR, MDHAR and GR were enhanced in this treatment as compared to the CL treatment.

AL treatment seems to have improved the APX, MDHAR and CAT activities as compared to the control, while the activities of DHAR, GR and SOD prove to have had no significant differences between the AL and Con treatments.

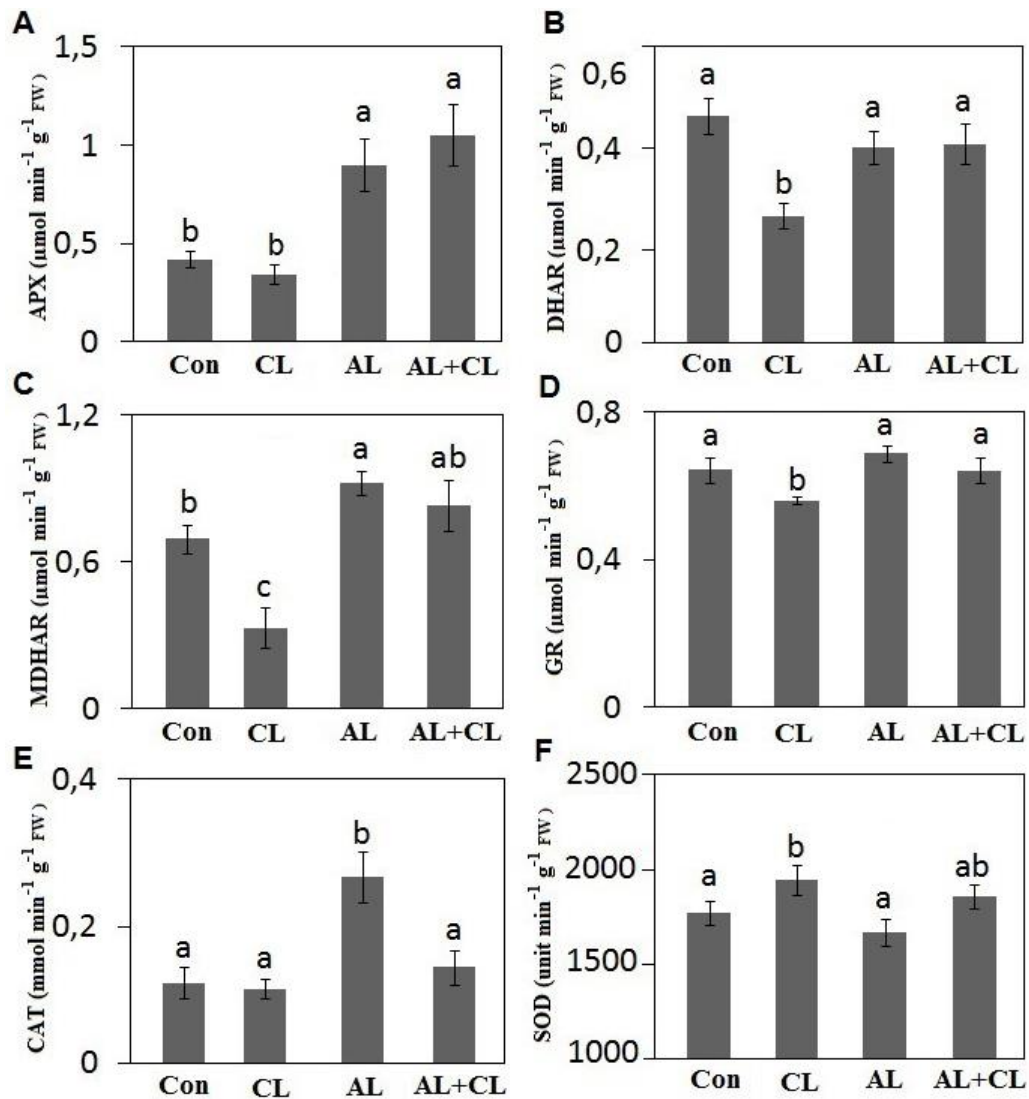


Fig. 2. Effects of clomazone and alternation of light/dark periods on **APX** (A), **DHAR** (B), **MDHAR** (C), **GR** (D), **CAT** (E) and **SOD** (F) activities in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). **Con** without alternating of light/dark periods, or clomazone; **CL** treatment with 1 µM clomazone; **AL** alternation of light/dark periods; **AL+CL** pretreatment of alternation of light/dark periods+ 1 µM clomazone treatment. All data represent means, SE for n= 8 and different letters to determine the significant difference between means within each treatment ($P < 0.05$, ANNOVA-Tukey test).

3.4. Chlorophyll fluorescence transients

A considerable decrease of the maximal quantum of the photochemical yield of PSII (F_v/F_m) was found in plantlets treated with CL as compared to the Con treatment. In contrast, the plantlets of the AL+CL treatment have shown a significant increase ($P < 0.05$) in F_v/F_m as compared to the plantlets treated with clomazone alone (Table 3).

Table.3. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods treatments on Chl fluorescence intensity (F_0 , minimal fluorescence; F_m , maximal fluorescence; F_v/F_m , maximal efficiency photochemical of PSII) and on the performance index (PI_{abs}) in the J step of fluorescence rise. **Con** without alternating of light/dark periods, or clomazone; **CL** treatment with 1 μ M clomazone; **AL** alternation of light/dark periods; **AL+CL** pretreatment of alternation of light/dark periods+ 1 μ M clomazone treatment. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P<0.05$, ANNOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n= 8.

Treatment	F_0	F_m	F_v/F_m	PI_{abs}	$1-V_J$
Con	347 \pm 5 b	1912 \pm 40 a	0,818 \pm 0,001 ab	2,07 \pm 0,13 a	0,37 \pm 0,007 a
CL	385 \pm 10 a	1621 \pm 49 c	0,75 \pm 0,01 c	0,89 \pm 0,15 c	0,29 \pm 0,01 c
AL	327 \pm 5 bc	1929 \pm 37 a	0,830 \pm 0,002 a	2,10 \pm 0,15 a	0,36 \pm 0,004 a
AL+CL	352 \pm 10 b	1770 \pm 62 b	0,79 \pm 0,01 b	1,48 \pm 0,20 b	0,33 \pm 0,01 b

In comparison with the control, we have noticed that the CL treatment has considerably decreased the PI_{abs} value, which was about ($PI_{abs}= 0,9$). In contrast, PI_{abs} value has increased in the plantlets of AL+CL treatment ($PI_{abs}= 1,481$) as compared with CL treatment (Table 3). In fact, the JIP-test has been used to assess the sensitivity of plants towards different environmental conditions [7,37,39,40,41]. It is considered that the J step is associated with an accumulation of $Q_A^-Q_B$ which has been demonstrated by the experimental results and the theoretical simulations. The results have shown that the electron transport at the PSII acceptor side was a clomazone-induced inhibitory site when the tobacco plantlets were exposed to clomazone [7]. A low value in the efficiency $1-V_J$ was found in the case of an exposure to clomazone. However, the AL pretreatment proves to have reduced the negative effect of clomazone, and the value of $1-V_J$ parameter in the AL+CL treatment was more important as compared to CL treatment (Table 3).

In the plantlets of the CL treatment, the total flux of the photons absorbed by the reaction center ABS/RC and the excitation flux trapped by the reaction center TR0/RC have significantly increased ($P<0.05$) as compared to the other treatments (Fig. 3A and B).

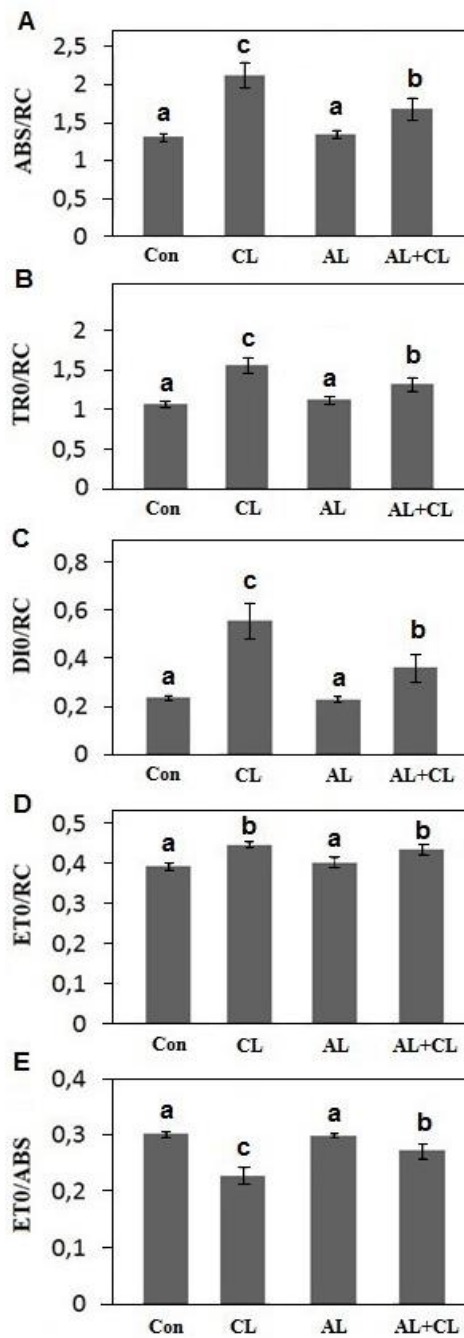


Fig. 3. Effects of clomazone and alternation of light/dark periods on **ABS/RC**, **TR0/RC**, **DI0/RC**, **ET0/RC** and **ET0/ABS** in leaves of tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). **Con** without alternation of light/dark periods, or clomazone; **CL** treatment with 1 μ M clomazone; **AL** alternation of light/dark periods; **AL+CL** pretreatment of alternation of light/dark periods+ 1 μ M clomazone treatment. All data represent means, SE for n= 8 and different letters to determine the significant difference between means within each treatment ($P < 0.05$, ANNOVA-Tukey test).

The energy dissipated into heat (DI0/RC) has significantly increased ($P < 0.05$) in the plantlets treated with clomazone. In comparison with the CL treatment, the AL+CL treatment has shown a significant decrease ($P < 0.05$) in the rate of heat dissipation (DI0/RC= 0,558 ;

DI0/RC= 0,361), respectively (Fig. 3C). The electrons transport beyond Q_A^- per the reaction centre (ET0/RC) had no significant difference ($P>0.05$) in the CL treatment as compared to the AL+CL treatment (Fig. 3D). In addition, the transferred electrons ET0 beyond Q_A^- per flux of the photons absorbed by the photosynthetic pigments antenna ABS have decreased in the CL treatment, while they have remarkably increased in the AL+CL treatment (Fig.3E).

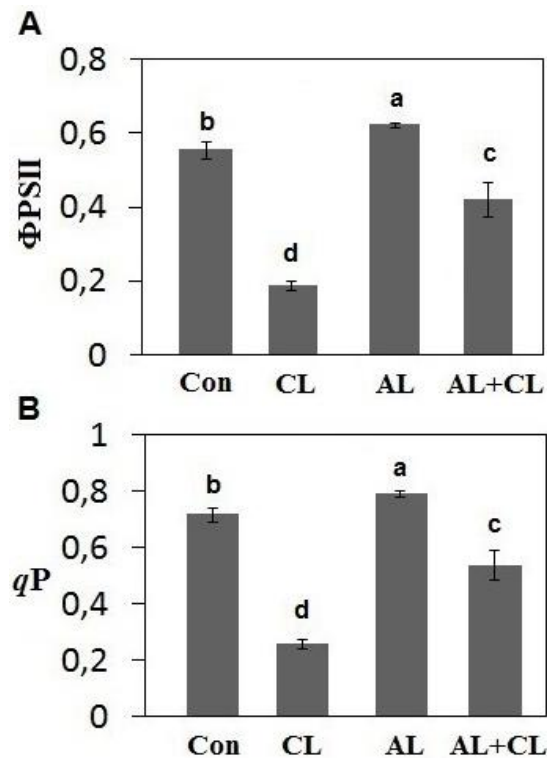


Fig. 4. The actual PSII efficiency (Φ_{PSII}) and photochemical quenching coefficient (qP) in the control, alternation of light/dark periods and clomazone treatments of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). All data represent means, SE for n= 8 and different letters to determine the significant difference between means within each treatment ($P<0.05$, ANNOVA-Tukey test).

The actual photochemical efficiency of the PSII (Φ_{PSII}) and the photochemical quenching of the varying chlorophyll fluorescence (qP) (Fig. 4A and B) have noticeably decreased in the CL as compared to the other treatments. In contrast, Φ_{PSII} and qP increased in the AL+CL treatment as compared to the CL treatment.

4. Discussion

The tobacco plantlets were subjected to cycle of an alternation of light/dark periods followed or not by herbicide treatment. To determine the effect of the light/dark alternative periods pretreatment on clomazone treatment in tobacco plantlets, we have used the following

parameters: the plant growth, the pigments content, the fluorescence parameters of the chlorophyll *a* (F_v/F_m , qP , $\Phi PSII$), the JIP-test parameters (PI_{abs} , $1-V_J$, ABS/RC , $TR0/RC$, $DI0/RC$, $ET0/RC$, $ET0/ABS$), the H_2O_2 and AsA contents, and the antioxidant activities.

Our experiment shows that clomazone caused not only a reduction in chlorophyll and carotenoid levels but also a decline in the content of LHCII (Chl *a/b* ratio) in tobacco plantlets (Table 2). A similar decrease was observed in the case of a higher concentration of clomazone in the adult leaves of tobacco and tomato [7,42], and the adult leaves of barley seedlings [43]. Due to the effect of clomazone in the reduction of the antenna pigments (LHCII), an excessive influx of the excitation ABS is transferred into the active reaction centre (RC) of the photosystem II according to Kaňa et al [43]. During this process, the formation of the reactive singlet oxygen 1O_2 via the $^3Chl^*$ was expected according to Fufezan et al [4], especially with the reduction of the carotenoids which have an important role in protecting the chlorophyll from photooxidation during the plant growth [44]. The singlet oxygen 1O_2 can be considered as an important species, which causes damages in the reaction center during the photoinhibition [45]. The inactivation of some RCs led to the increase in trapping rate TR0 and electrons transport ET0 by the active reaction center (RC) (Fig. 3A, B and D). This in turn has caused a more reduced PQ pool as a result of the absence of active acceptor of electrons further than Q_A^- (see the reduction of $1-V_J$) (Table 3), and consequently increased the energy dissipating into heat DI0/RC (Fig. 3C) as a protection mechanism which causes photoinhibition at the acceptor side of PSII (see the reduction in F_v/F_m , PI_{abs} , qP , $\Phi PSII$ and $ET0/ABS$) [46]. In turn, the PQ pool in a very reduced state is a favorable condition to the formation of 1O_2 by the recombination reactions in PSII [47].

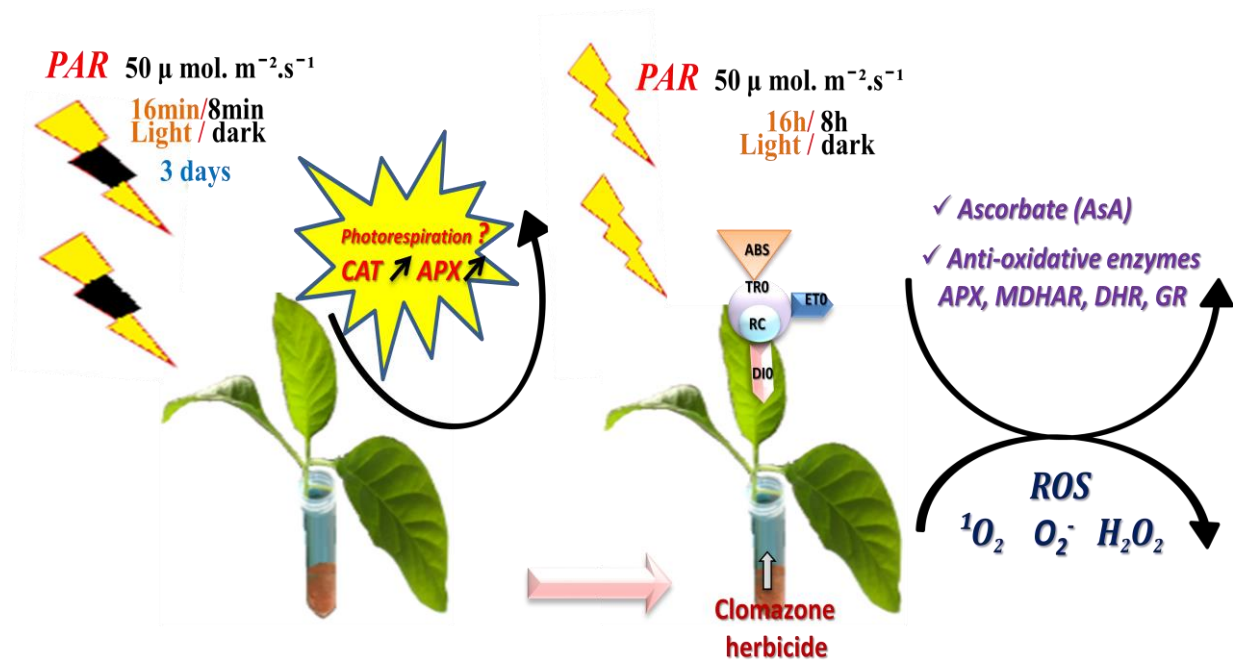
These processes lead to decrease the formation of reduced NADPH and consequently to accumulate of O_2^- as result of the reduction of O_2 by ferredoxin (Fd) [48]. SOD activity was noticed to have increased in the clomazone treatment (Fig. 2F); and considering the decrease in the APX and CAT activities (Fig. 2A and E), this can partially explain the high accumulation of H_2O_2 (Fig. 1A) which may be also able to attack the protein D1 and destroy it, and to induce cell death [46]. This was also supported by the low content of total ascorbate which itself is accompanied by a considerable decline in the activities of its recycling enzymes, including the DHAR, MDHAR and GR enzymes (Fig. 2B, C and D).

Considering the ability of clomazone to reduce the PSII activity (see above) and to produce ROS, the parameters of growth have decreased in the tobacco plantlets (Table 1). It has been confirmed that clomazone leads to decrease the growth of both corn and pea seedlings [49,50].

In contrast, the AL pretreatment has enhanced the growth of the plantlets treated with clomazone, which was observed in all the parameters used (Table 1), especially the leaf area of the plant which increased about (47%) in the plantlets of the AL+CL treatment as compared to the CL treatment. At this point, these positive changes in the growth parameters were partially related to the efficiency of CO₂ fixing in the photosynthesis process. More clearly, the capacity of the AL+CL plantlets to benefit from the absorbed photons by antenna pigments (Table 2) can be confirmed by the increase of F_v/F_m , PI_{abs} (Table 3), qP and Φ_{PSII} (Fig. 4A and B), and consequently, by the decrease of energy dissipating into heat DIO/RC (Fig. 3C). Moreover, the AL+CL treatment has shown an enhancement in the electron flux beyond Q_A^- and a regulation of the plastoquinone function (see the increase in $1-V_j$) (Table 3), especially in the presence of a high electrons flux beyond Q_A^- (ET_0/RC) (Fig. 3D).

We can say that the positive effect of the AL pretreatment on the photosynthesis apparatus is due to the systemic capacity of the plantlets to avoid the stress state. With regard to the antioxidant activities, the ascorbate (Fig. 1B) contributes to reducing the photooxidative stress induced by the high accumulation of H₂O₂. This was observed in the AL+CL plantlets in the light of the increase in the APX activity (Fig. 2A) and the recycling enzymes of the ascorbate such as the DHAR, MDHAR and GR (Fig. 2B, C and D). In consequence, the plantlets were more able to scavenge H₂O₂, and thus, a low content of H₂O₂ was found in the plantlets of the AL+CL treatment as compared to the CL treatment alone (Fig. 1A). Considering both the H₂O₂ content and the antioxidant system in the AL pretreatment, we can say that H₂O₂ content induced by the AL was might due to its effect in stimulation the photorespiration, according to Igamberdiev et al [51] which reported photorespiratory flux and mitochondrial contribution to energy and redox balance in the light and during light-dark transitions. This was able to motivate the antioxidant enzymes at the level of chloroplast and peroxisome (see APX, MDHAR and CAT activities). Some of the enzymes activated in the AL pretreatment have continued to scavenge H₂O₂ after the treatment with clomazone such as APX and MDHAR, while the CAT activity was of little importance during clomazone treatment. This also confirms that scavenging H₂O₂ mainly relates to the activity of the ascorbate and antioxidant enzymes whose function is associated with the ascorbate content; thus, the plantlets were well protected to reduce the photooxidative damages induced by clomazone, the herbicide.

In summary, AL pretreatment through the stimulation of antioxidant activities not only protects the photosynthetic apparatus from direct effect of ROS, but also relax the photon (electron) excess stress.



The possible effect of the pretreatment with alternation of light/dark periods to reduce the photooxidative stress induced by clomazone.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Syrian Ministry of Education and Research, and by laboratory of fruits and vegetables of university of Avignon and Vaucluse countries.

6. References

- [1] J. Whitmarsh, Govindjee, in: G.S. Singhal, G. Renger, K.D. Irrgang, S. Sopory, Govindjee (Eds.), The photosynthetic: Concept in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis, Narosa Publishers, Kluwer Academic Publishers, New Delhi, 1999, pp. 11–51.
- [2] P.J. Dekker, E.J. Boekema, Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta* 1706 (2005) 12–39.
- [3] W.A. Rutherford, A. Krieger-Liszky, Oxidative stress induced by herbicides in the photosystem II, *Trends Biochem Sci.* 26 (2001) 648–653.
- [4] C. Fufezan, A.W. Rutherford, A. Krieger-Liszky, Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II, *FEBS Lett.* 532 (2002) 407–410.
- [5] C. Triantaphylidès, M. Krischke, F.A. Hoeberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. Van Breusegem, M.J. Mueller, Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants. *Plant Physiol.* 148 (2008) 960–968.
- [6] H.J. Chang, M.J. Konz, E.A. Aly, R.E. Sticker, K.R. Wilson, N.E. Korg, P.E. Dickson, in: D.R. Baker, J.G. Fenyès, W.K. Moberg, B. Cross (Eds.), 3-Isoxalidones and related compounds a new class of herbicides, *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*, American chemical society, Washington, 1997, pp. 10–23.
- [7] M. Darwish, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Study of photosynthesis process in the presence of low concentration of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*), *JSPB* 9 (2013) 229–245.
- [8] B.C. Osmond, in: N.R. Baker, J.R. Bowyer (Eds.), What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants, *Photoinhibition of Photosynthesis—from Molecular Mechanisms to the Field*, Bioscientific Publishers, Oxford, 1994, pp. 1–24.

- [9] K. Asada, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 601–639.
- [10] P. Müller, X.P. Li, K.K. Niyogi, Non-photochemical quenching: a response to excess light energy, *Plant Physiol.* 125 (2001) 1558-1566.
- [11] R. Allen, Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants, *Plant Physiol.* 107 (1995) 1049-1054.
- [12] K.K. Niyogi, Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 333-359.
- [13] J. Kruk, R. Szymańska, Singlet oxygen and non-photochemical quenching contribute to oxidation of the plastoquinone-pool under high light stress in *Arabidopsis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (2012) 705-710.
- [14] E.H. Murchie, K.K. Niyogi, Manipulation of Photoprotection to Improve Plant Photosynthesis, *Plant Physiol.* 155 (2011) 86-92.
- [15] H.C. Foyer, A. Trebst, G. Noctor, in: B. Demmig-Adams, W.W. Adams (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*, Springer Science Publishers, Netherlands, 2005, 241–268.
- [16] A. B. Logan, D. Korniyev, J. Hardison, A.S. Holaday, The role of antioxidant enzymes in photoprotection, *Photosynth. Res.* 88 (2006) 119–32.
- [17] C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 (1992) 83–116.
- [18] S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, Y. Kazuya, Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1305 – 1319.
- [19] C. Massot, Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de la tomate fruit en rôle de l'environnement lumineuse. PhD-thesis: Biology and Agronomy, Aix-marseille Academic, France, 2010, pp. 24-25.
- [20] U.J. Grobbelaar, Microalgal biomass production: challenges and realities, *Photosynth. Res.* 106 (2010) 135-144.
- [21] C. Vejrazka, M. Janssen, M. Streefland, R.H. Wijffels, Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 2905-2913.
- [22] J.C. Merchuk, M. Ronen, S. Giris, S.M. Arad, Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium sp.*, *Biotechnol. Bioeng.* 59 (1998) 705-713.
- [23] E.G. Gergoff Grozeff, A.R. Chaves, C.G. Bartoli, Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinacia oleraceae* L. cv Bison), *Postharvest Biol. Tec.* 77 (2013) 35-42.
- [24] V.D. Kreslavski, G.N. Shirshikova, V.Y. Lyubimov, A.N. Shmarev, A.M. Boutanaev, A.A. Kosobryukhov, F-J Schmitt, T. Friedrich, S.I. Allakhverdiev, Effect of preillumination with red light on photosynthetic parameters and oxidant-/antioxidant balance in *Arabidopsis thaliana* in response to UV-A, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 127 (2013) 229–236.
- [25] H.K. Lichtenthaler, in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan (Eds.), *Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthesis biomesbranes*, *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1987, pp. 350–382.
- [26] R. Murshed, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum Lycopersicon* L, cv Micro-tom), *Physiol. Mol. Biol. Plants* (2013) (doi: 10.1007/s12298-013-0173-7).
- [27] R. Murshed, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Effect of salt stress on antioxidant systems depends on fruit development stage, *Physiol. Mol. Biol. Plants* (2013) (doi: 10.1007/s12298-013-0209-z).
- [28] R. Murshed, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle, *Anal. Biochem.* 383 (2008) 320-322.
- [29] B. Chance, A.C. Maehly, Assay of catalase and peroxidase, *Methods Enzymol.* 2 (1955) 764-775.
- [30] R.S. Dhindsa, P. Plumb-Dhindsa, T.A. Thorpe, Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, *J. Exp. Bot.* 32 (1981) 93-101.
- [31] M. Kitajama, W.L. Butler, Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone, *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975) 105-115.
- [32] K. Maxwell, G.N. Johnson, Fluorescence of chlorophyll-a, a practical guide, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 659–668.
- [33] R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, in: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), *The fluorescence transient as a tool to characterize the situation photosynthetic samples*, *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, Taylor & Francis, London, 2000, pp. 445–483.
- [34] P.D.R. Heerden, R.J. Strasser, G.H.J. Stress, Reduction in dark chilling N₂-fixation in soybean by nitrate indicated by the kinetics of the fluorescence of chlorophyll-a, *Physiol. Plant.* 121 (2004) 239–249.
- [35] B.J. Strasser, R.J. Strasser, in: P. Mathis (Ed.), *Measuring fast fluorescence of the fluorescence transient in response to environmental questions: the JIP-test*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1995, pp. 977-980.

- [36] M. Tsimilli-Michael, G.H.J. Kruger, R.J. Strasser, in: P. Mathis (Ed.), Suboptimality as driving force for adaptation: a study about the correlation of excitation light intensity and the dynamic fluorescence emission in plants, Kluwer Academic, Netherlands, 1995, 981–984.
- [37] B. Genty, J. M. Briantais, N.R. Baker, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990 (1989) 87-92.
- [38] M.F. Pompelli, S.C. Martins, W.C. Antunes, A.R. Chaves, F.M. DaMatta, Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions, *J. Plant Physiol.* 167 (2010) 1052-1060.
- [39] G.H.J. Krüger, M. Tsimilli-Michael, R.J. Strasser, Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves, *Physiol. Plant.* 101 (1997) 65–277.
- [40] B.S. Ripley, S.P. Redfern, J. Dames, Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll-a fluorescence kinetics, *South African J. Sci.* 100 (2004) 615-618.
- [41] M.H. Kalaji, R. Carpentier, I.S. Allakhverdiev, K. Bosa, Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 112 (2012) 1-6.
- [42] J.E. Scott, L.A. Weston, J. Chappell, K. Hanley, Effect of clomazone on IPP isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledons of solanaceous Species, *Weed Sci.* 42 (1994) 509–516.
- [43] R. Kaňa, M. Šponduvá, P. Ilik, D. Lazár, K. Klem, P. Tomek, J. Nauš, O. Prášil, Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare L.*), *Pestic. Biochem. Physiol.* 78 (2004) 161-170.
- [44] B. Biswall, Carotenoids catabolism during leaf senescence and its control by light, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 30 (1995) 3–14.
- [45] A. Trebst, B. Depka, H. Holländer-Czytko, A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* 516 (2002) 156–160.
- [46] F. Poiroux-Gonord, J. Santini, A.L. Fanciullino, F. Lopez-Lauri, J. Giannettini, H. Sallanon, L. Berti, L. Urban, Metabolism in orange fruits is driven by photooxidative stress in the leaves, *Physiol. Plant.* 149 (2013) 175–187.
- [47] N. Adir, H. Zer, S. Shokhat, I. Ohad, Photoinhibition- a historical perspective, *Photosynth. Res.* 76 (2003) 343-370.
- [48] N. Murata, S. Takahashi, Y. Nishiyama, S.I. Allakhverdiev, Photoinhibition of photosystem II under environmental stress, *Biochim. Biophys. Acta* 1767 (2007) 414-421.
- [49] K.W. Vencill, K.K. Hatzios, H.P. Wilson, Growth and physiological responses of normal, dwarf, and albino corn (*Zea mays L.*) to clomazone treatments, *Pestic. Biochem. Physiol.* 35 (1989) 81-88.
- [50] G. Sandman, P. Boger, Interference of dimethazone with formation of terpenoid compounds, *Z. Naturforsch* 41 (1986) 729-732.
- [51] A.U. Igamberdiev, E. Romanowska, P. Gardeström, Photorespiratory flux and mitochondrial contribution to energy and redox balance of barley leaf protoplasts in the light and during light-dark transitions, *J. Plant Physiol.* 158 (2001) 1325- 1332.

Publication 4

Alternation of light/dark periods priming enhances clomazone tolerance *via* improving ascorbate and phenol compounds accumulation, and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plantlets

Majd Darwish*, Félicie Lopez-Lauri, Veronique Vidal, Mohamed El Maataoui, Huguette Sallanon

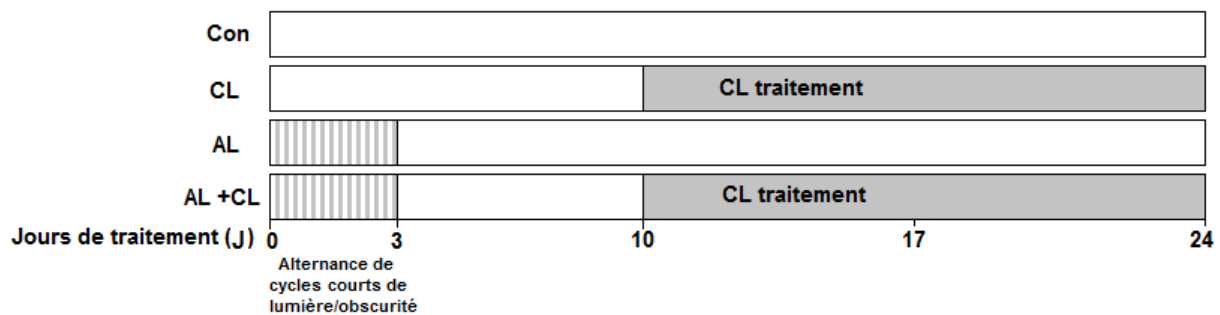
La deuxième partie de ce chapitre est un projet d'article soumis dans *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Nous avons rapporté précédemment que le prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité améliore la tolérance du tabac face au stress photooxydatif induit par le clomazone. Cet effet pourrait être lié à une stimulation des activités des enzymes antioxydantes (APX, DHAR, MDHAR et GR). En particulier, des augmentations plus importantes des activités des enzymes APX et MDHAR et de la teneur en ascorbate ont été observées chez les plantules de tabac prétraitées par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité et ensuite traitées par le clomazone.

L'objectif de ce travail a été d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance des plantules du tabac prétraités par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité face au stress photooxydatif induit par le clomazone. Pour cela, nous avons étudié le comportement des plantules prétraitées par l'alternance de cycles lumière/obscurité à plusieurs stades (J₀, J₃, J₁₀, J₁₇ et J₂₄) en mesurant: (i) les paramètres liés au transport d'électrons photosynthétiques en présence de clomazone au niveau du donneur d'électrons (l'évolution d'oxygène par chloroplastes isolés) et au niveau accepteur d'électrons (la fluorescence chlorophyllienne et test *OJIP*), (ii) les analyses des échanges gazeux et, (iii) les teneurs en H₂O₂, ascorbate et polyphénols. En complément, des études cytohistologiques ont été effectuées à ces différents stades.

Expérimentation

La variété de tabac *Nicotiana tabacum* L. *Virginie vk 51* sensible au clomazone a été utilisée. Une partie des plantules au stade trois feuilles a été exposée à des alternances de cycles courtes de lumière/obscurité (16min jour/8min nuit) avec une densité de flux de photons photosynthétiques (PPFD) de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dans une chambre de culture pendant trois

jours. L'autre partie est utilisée comme contrôle. Après une semaine de croissance dans la chambre de culture contrôlée à 22/17 °C, humidité 60 %, 16 h/8 h d'un cycle lumière/obscurité et PPFD de 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les plantules ont été traitées par du clomazone à 1 μM pendant 14 jours. Le clomazone est ajouté dans la solution nutritive renouvelée tous les deux jours. Le prélèvement des feuilles a été effectué à 0 (J_0), 3 (J_3), 10 (J_{10}), 17 (J_{17}) et 24 (J_{24}) jours de traitement pour les études cytohistologiques, et à 10 (J_{10}) et 24 (J_{24}) jours afin de mesurer l'évolution d'oxygène des chloroplastes isolés.



Représentation schématique du protocole expérimental et des traitements. 0 (J_0), 3 (J_3), 10 (J_{10}), 17 (J_{17}) et 24 (J_{24}) se réfèrent au nombre de jours après le traitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité. Con, sans alternance de cycles courts de lumière/obscurité et clomazone; CL, le traitement par 1 μM de clomazone; AL, le traitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité; AL + CL, le prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité et le traitement par 1 μM de clomazone.

Principaux résultats

Le clomazone induit une diminution de l'efficacité photosynthétique du PSII à la lumière, de la photosynthèse nette et des teneurs en ascorbate et polyphénols ainsi qu'une augmentation de l'accumulation d'amidon et d' H_2O_2 .

Le prétraitement par l'alternance induit un stress modéré révélé par une diminution de l'efficacité photochimique du PSII, et de la photosynthèse nette, ainsi qu'une augmentation de l'accumulation d'amidon et de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Ce stress peut stimuler les enzymes de détoxification et la biosynthèse d'antioxydants.

Il est proposé que l'effet protecteur de l'alternance vis-à-vis au stress photooxydatif est principalement lié à la stimulation post-illuminatoire de la photorespiration. En effet, en présence d'alternance, un grand nombre de passage lumière/obscurité, conduit à une augmentation de l'activité photorespiratoire (PIB) (Post-illumination burst) qui agit comme

voie alternative de consommation des électrons. Les effets antioxydants des polyphénols dont la synthèse stimulée en présence de l'alternance sont également discutés.

Conclusion

Les mécanismes par lesquels le prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité agit sur la tolérance, sont complexes. Indépendamment de la stimulation des activités antioxydantes enzymatique, les teneurs en phénols ainsi que la stimulation de l'activité photorespiratoire semblent impliquée dans la protection de l'appareil photosynthétique.

Alternation of light/dark periods priming enhances clomazone tolerance by increasing ascorbate and phenol compounds levels, and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plantlets

Majd Darwish*, Félicie Lopez-Lauri, Veronique Vidal, Mohamed El Maataoui, Huguette Sallanon

Laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes (EA 4279), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Bât Agrosociences, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, F-84916 Avignon cedex 9, France

ABSTRACT

The effect of the alternation of light/dark periods (AL) (16/8 min of light/dark cycles and PPFD of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for three days) on activity of PSII and photosynthesis, the content of H_2O_2 , ascorbate and phenols compounds, and at the cytological level to clarify the involved mechanisms in clomazone tolerance of tobacco plantlets primed with AL was studied. Clomazone induced decreases in the PSII activity, the net photosynthetic rate (P_n), the ascorbate and total polyphenols contents as well as increases in the H_2O_2 and starch-grains accumulation, and the level of the cells that underwent programmed cell death (PCD). The pretreatment with AL reduced the inhibitory effect of clomazone on the PSII activity and photosynthesis, indicated by the decrease in the H_2O_2 , the starch-grains accumulation and the PCD levels, as well as increased the content of the ascorbate and some of phenol compounds such as the chlorogenic acid, the neochlorogenic acid and the rutin. The AL treatment could promoted photorespiration *via* post-illumination burst (PIB) possess effects. This alternative electron pathway photorespiratory could reduce the H_2O_2 generation *via* consumption photochemical energy, such as ATP and NADPH. Furthermore, this process proves to induce a moderate stress at 10 days (D_{10}) of the treatment with AL, which appears to be revealed by decreases in the maximum photochemical quantum efficiency of PSII (F_v/F_m) and the P_n as well as increases in the energy dissipation as heat (DI_0/RC) and the starch-grains accumulation. This moderate stress proves to stimulate H_2O_2 detoxification systems *via* increasing the activity of antioxidant enzymes and the biosynthesis of antioxidant components, such as ascorbate acid and some phenolic compounds. So, the PCD levels,

induced by the photooxidative stress provoked by clomazone, at 24 days (D₂₄) of the treatment with AL were noticeably decreased.

Keywords: Light; *Nicotiana tabacum* L.; Photosynthesis; Programmed cell death; PSII efficiency; ROS detoxification; Tolerance

Abbreviations: ABS PSII light absorption flux.- APX ascorbate peroxidase.- AsA ascorbate.- ³Chl* chlorophyll triplet state.- C_i intercellular CO₂ concentration.- DI0 PSII excitation dissipation flux.- DHA dehydroascorbate.- DHAR dehydroascorbate reductase.- ET0 electron transport flux.- ETR photosynthetic electron transport rate.- F₀, F_v, F_m minimal, variable and maximal chlorophyll fluorescence.- F_v/F_m maximum photochemical efficiency of PSII.- GR glutathione reductase.- g_s stomatal conductance.- H₂O₂ hydrogen peroxide.- LHC light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein complex II.- MDHAR monodehydroascorbate reductase.- ¹O₂ singlet oxygen.- O₂⁻ superoxide radical.- OH⁻ hydroxyl radical.- PFDD photosynthetic photon flux density.- PCD programmed cell death.- PI_{abs} performance index on absorption basis.- P_n net photosynthetic rate.- PQ plastoquinone.- PSI, PSII photosystem I(II).- Φ_{PSII} actual PSII efficiency.- Q_A primary quinone electron acceptor of PSII.- RC reaction center.- ROS reactive oxygen species.- RuBP ribulose-1,5-bisphosphate.- R_s dark respiration.- SOD superoxyde dismutase.- T transpiration rate.- TR0 PSII light energy flux trapping.- 1-V_J a measure of the electron flux beyond Q_A.

1. Introduction

In higher plants, the light energy is absorbed by the antenna pigments of the photosynthetic apparatus, and then transferred to the reaction centers (RCs) of the two photosystems, PSI and PSII, to be converted into chemical energy, which can be used in the assimilation of CO₂ and organic matter. When plants are exposed to herbicides inducing photooxidative stress, the light energy absorbed will not be fully used in photosynthesis. In this case, the excess excitation of chlorophyll conducts to the formation of singlet oxygen (¹O₂) leading to destruction of the D1 protein and to blockage of the ability of PSII to repair [1]. In addition, ¹O₂ induces the formation of other ROS such as superoxide (O₂⁻), peroxide hydrogen (H₂O₂) and hydroxyl radical (OH⁻), which can damage proteins, lipids and DNA [2]. Depending of level of H₂O₂, this later may behave as signaling molecule capable of inducing stress tolerance or leading to damages in cells and programmed cell death (PCD) in a very narrow concentration range [3,4].

The herbicide clomazone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one] leads to PSII photoinhibition damages and high H₂O₂ accumulation in leaves of tobacco [5].

The reduction of even small amounts of H₂O₂ may help maintain the ROS concentration, at the level of the whole cell, within a sub-lethal range. In this way, the plant has developed several mechanisms to protect the photosynthetic apparatus to avoid the massive accumulation of ROS and reduce its oxidative damages. This involves antioxidant systems that are considered as a mechanism by which the photooxidative damage induced by the herbicides is considerably reduced. The enzymatic antioxidants system, such as SOD, CAT, APX, DHAR, MDHAR and GR is one of these mechanisms. Moreover, some of phenolic compounds are considered as one of the non-enzymatic antioxidants system. In turn, the accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates as phenolic antioxidant compounds and its role to protect the plants against excess light damages has been suggested by several studies [6-10]. The flavonoids have been suggested to perform the inhibition of ROS generation and then scavenge ROS once they are formed [9]. Flavonoids located within or close proximity of centers of ROS generation in stressed plants can constitute a 'secondary' antioxidant system that complements the function of antioxidant enzyme activities to scavenge ROS [9,11-13]. The flavonoids in the vacuole indeed have been considered as co-substrates for vacuolar peroxidases that can be in addition of ascorbate peroxidase activity (APX) a potential to reduce H₂O₂ level from the chloroplast [14]. A system constituted by the flavonoids is primarily involved in detoxifying vacuolar H₂O₂ and then flavonoid radicals are

recycled back to their original form by ascorbate acid [15]. Chloroplast envelope-located flavonoids can also, under excess excitation conditions, protect cells plant from photooxidative stress, by limiting the exit of $^1\text{O}_2$ involved in the programmed cell death (PCD) [9,16,17]. Quercetin a chloroplast flavonol was suggested to have an antioxidant function at the oxidizing side of the PSII [18]. Rutin (quercetin 3-O-rutinoside) is a flavone derivative, considered as one of the most promising quercetin derivatives. In addition, chlorogenic acid is a major hydroxycinnamic exhibiting antioxidant activity to scavenging ROS [19].

Priming process that involves a temporally limited experience of an environmental stimulus to prepare the plant to more successfully cope with a future environmental stimulus, has been suggested as a potential to increase the plant tolerance under several abiotic stress, including UV-A [20], oxidative stress of cadmium [21], temperature stress in *Triticum aestivum* [22,23] and salt stress in *Lactuca sativa* [24]. The alternation of light/dark periods is thought to be beneficial in algae by exerting various biological effects such as ROS scavenging [25-27]. By influencing the circadian clock of plant, the transient light/dark cycles could lead to a dynamic control of a host of physiological processes, including the determination of the levels of primary and secondary metabolites, and the anticipation of future environmental constraints [28]. The recent work of Darwish et al. [5], reports that alternation of light/dark periods pretreatment improves tobacco tolerance to clomazone through the stimulation of antioxidant activities enzymes (APX, DHAR, MDHAR and GR) and relaxes the excess photon stress. In this report, more important increases in APX and MDHAR activities and ascorbate content were observed in tobacco plantlets pretreated with alternation and afterwards treated with CL compared to those of the control. Nevertheless, it remains unclear how AL pretreatment induced a greater tobacco tolerance to clomazone herbicide. So, intensive research efforts are still needed to elucidate the involved mechanisms.

The main focus of present work therefore is to better understand the mechanisms involved in the tolerance of tobacco plantlets pretreated with alternation of light/dark periods to clomazone. For this purpose, we measured parameters related to modifications in the H_2O_2 , ascorbate and polyphenols contents, chloroplast oxygen-evolving rate, chlorophyll *a* fluorescence and JIP-test, and gas exchanges analysis. Additionally, cytohistological analyses were carried out on the leaves treated by light/dark periods alternation and clomazone.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material, growth conditions and chemical treatments

The tobacco seeds of the variety (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*) were germinated in a plastic container with sterilized potting soil for two weeks at 22/17 °C day/night temperature, 16/8 h light/dark cycle and photosynthetic photon flux density (PPFD) of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The germination was carried out in sterile conditions and in compliance with the growth chamber conditions, according to Darwish et al. [29]. The experimental design is shown in Fig. 1.

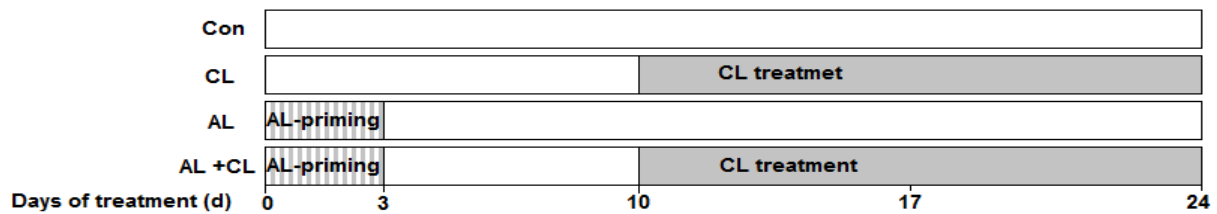


Fig.1. Schematic representation of experimental design and treatments. 0 (D₀), 3 (D₃), 10 (D₁₀), 17 (D₁₇) and 24 (D₂₄) refer to days after the treatment with the alternation of light/dark periods. Con, without alternation of light/dark periods and without clomazone; CL, treatment with 1 μM clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 μM clomazone.

In brief, after 5 weeks of germination, the plantlets (three leaf stage) were exposed or not to an alternation of light/dark periods (AL priming) (16/8 min of light/dark cycle, PPFD of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in a growth chamber for three days; the other part remained without an AL to be used as a control, as described by Darwish et al. [5]. Then, the plantlets were transferred into a hydroponic system containing Auckland’s nutrient solution (1 M KNO₃; 1 M Ca(NO₃)₂.H₂O; 1 M MgSO₄.7H₂O; 1 M KH₂PO₄ and 0.01 M FeEDDHA) under the same conditions as those used during the germination. After 10 days of the pretreatment with AL, clomazone (CL) (Sigma-Aldrich, USA) was added at the concentrations of 0 or 1 μM for 14 days. The solutions of such a treatments were refreshed twice weekly. At 0 (D₀), 3 (D₃), 10 (D₁₀) and 24 (D₂₄) days of the treatment with AL, chlorophyll a fluorescence parameters and gas exchanges are determined in leaves of the four treatments ((i) Con (Control, without alternation of light/dark periods or clomazone); (ii) CL (1 μM clomazone); (iii) AL (alternation of light/dark periods); (iv) AL+CL (alternation of light/dark periods and treatment with 1 μM clomazone)). Additionally, gas exchanges analysis are also recorded during two cycles of AL treatment, fresh leaves are collected to be used for chloroplast isolation (at D₁₀ and D₂₄) and cytohistological

observations (at D₃, D₁₀, D₁₇ and D₂₄), and the remaining leaves were stored at -80 °C for biochemical analysis.

2.3. Determination of the H₂O₂ contents

The hydrogen peroxide levels were determined as described by Murshed et al. [30] with some modifications. Briefly, 250 mg of tobacco leaves from plantlets treated or untreated with AL and CL were homogenized in 1 mL of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. Aliquots of 100 μ L from each tube were placed in 96-well plates and 50 μ L of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 100 μ L of 1 M KI were added to each well. Control samples were prepared using water instead of KI to remove the color background of the extract at 390 nm. Each plate also contained commercial H₂O₂ to generate a standard curve. The plate was briefly vortexed and the absorbance readings were collected at 390 nm in a micro-plate reader. The concentrations of H₂O₂ were determined using a standard curve and expressed as nmol g⁻¹ dry weight (DW).

2.3. Determination of the ascorbate contents

The assay of the total and reduced AsA contents was performed according to a modified version of the method of Murshed et al. [31] using leaf material that was stored at -80 °C. Briefly, 100 mg of tobacco leaf powder was homogenized with 1 mL of ice-cold 6% trichloroacetic acid (TCA). The samples were centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min at 4 °C, and 10 μ L of the supernatant was used in each assay. The total AsA (addition of 20 μ M dithiothreitol (DTT)) and reduced AsA (without DTT) in each sample were measured. Aliquots of 10 μ L of each sample or a standard were distributed into two wells (in triplicate) of a 96-well microplate and mixed with 10 μ L of 20 mM DTT (total AsA assay) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) (reduced AsA assay). The plate was incubated at 42 °C for 15 min. Then, 10 μ L of *N*-ethyl maleimide (NEM) (total AsA assay) or 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) (reduced AsA assay) was added and mixed followed by the addition of 150 μ L of color reagent (containing H₃PO₄, FeCl₃ and dipyrityl). After incubation at 42 °C for 40 min, the plate was briefly vortexed, and the absorbance was read at 525 nm using a micro-plate reader (Power Wave, HT microplate spectrophotometer, BioTek, France). The AsA concentrations of the samples were calculated using a standard curve and expressed as mg g⁻¹ dry weight (DW).

2.4. Extraction and analysis of phenolic compounds

The quantification and identification of phenolic compounds were determined as described by Charles et al. [32] with some modifications. Briefly, 200 mg of lyophilized tobacco leaves were extracted in 2 mL of 80% methanol, containing 0.1% (v:v) hydrochloric acid and methoxyflavone, as internal standard. The extraction tubes were vortexed for 30 s, sonicated for 5 min, incubated in liquid nitrogen 1 min, vortexed and sonicated again for another 30 s and 5 min, respectively. The tubes were centrifuged ($14,000 \times g$, 15 min, at 4 °C). The supernatants were transferred to a microfuge tube and the sample was centrifuged once more ($14,000 \times g$, 15 min, at 4 °C). Extracts were filtered through a 0.45 μm RC membrane.

The chromatographic separation of phenolic compounds was performed with a Waters (Milford, MA) Alliance chromatography system equipped with a Waters 600 Pump, a Waters 2996 PDA detector and a Waters 717 plus autosampler. The HPLC system was monitored and controlled by Water Empower software version 2. The chromatographic separation was carried out on a Waters SunFire™ C18 column (250×4.6 mm I.D; 5 μm particle size) with a C18 guard column (4×4.6 mm I.D; 5 μm particle size). Mobile phases consisted of phase A (acetonitrile) and phase B (water) acidified with 0.5% formic acid run at 1 mL min⁻¹. Polyphenolics were separated using a gradient elution system that kept mobile phase A at 5% for 1 min and then changed phase A from 5% to 25% in 30 min, 25% to 100% in 2 min, remained at 100% for 3 min and returned to original conditions in 5 min for the next injection. The injection volume was 10 μL and all analyses were performed three times. Phenolic compounds, namely chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic), neochlorogenic (3-O-caffeoylquinic) and rutin (quercetin-3-rutinoside) were identified by comparison of their retention times and UV spectra with those of authentic standards (Extrasynthèse, Genay, France) and quantified at 280 nm using individual calibration curve. Polyphenolics content was expressed as mg g⁻¹ dry weight (DW).

2.5. Chloroplast preparation

The chloroplasts were isolated from the fresh leaves of tobacco plantlets as described by Joly and Carpentier [33] with certain modifications. Briefly, 5 g of dark green leaves was harvested and rinsed with distilled water. The leaves were then ground for 20-30 seconds in 30 mL of buffer A (grinding buffer) containing 660 mM sorbitol, 20 mM KCl, 2 mM EDTANa₂ and 100 mM HEPES-KOH (pH 7.9). After grinding, the homogenate was filtered twice through five layers of Miracloth tissue, and the filtrate was quickly centrifuged ($1500 \times$

g, 2 min, at 4 °C). The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1.5 mL of buffer B (resuspension buffer) containing 10 mL of buffer A, 100 µM MgCl₂, and 100 µM MnCl₂.

The total chlorophyll content of the chloroplast preparation was estimated according to Porra et al. [34] with some modifications. Briefly, 10 µL of the chloroplast preparation was added to 1 mL of acetone 80% (v:v). The mixture was homogenized and vortexed for 2 min. The absorbance of the supernatant was measured at 645 and 663 nm (A_{645} and A_{663} , respectively) using a spectrophotometer (Biochrom Libra S22, Biochrom Ltd., UK). The chlorophyll concentration was calculated using the following equation:

$$\mu\text{g Chl mL}^{-1} = [(12.7 A_{663} - 2.69 A_{645}) + (22.9 A_{645} - 4.68 A_{663})]$$

2.6. Measurement of oxygen-evolving rate

The oxygen-evolving rate by a suspension of chloroplasts that were broken in hypotonic medium to allow the compounds used as electron acceptors to access into thylakoid membranes was measured. Oxygen evolution measurements were performed polarographically using a Clark-type oxygen electrode (DW1, Oxygraph system, Hansatech Instruments, UK) at 25 °C under saturating light intensity on chloroplast particles equivalent to 80 µg Chl mL⁻¹.

The photosynthetic electron transport of the entire chain was determined as the oxygen evolution using potassium ferricyanide K₃Fe(CN)₆ (99% pure, Sigma-Aldrich, USA) as an electron acceptor. The reaction mixture in a final volume of 1 mL contained 2 mM K₃Fe(CN)₆ and chloroplast particles equivalent to 80 µg Chl mL⁻¹.

The PSII [H₂O → benzoquinone (BQ)] rates were measured using BQ (98% pure, Sigma-Aldrich, USA) as an electron acceptor according to Samuel and Bose [35]. The rate of PSII electron transport was measured in terms of oxygen evolution in the presence of BQ (2 mM). The reaction mixture in a final volume of 1 mL contained 100 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 20 mM KCl, 2 mM EDTANa₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM MnCl₂, 2 mM BQ and chloroplast particles equivalent to 80 µg Chl mL⁻¹.

All activities were measured in the presence of 1 µM nigericin (98% pure, Sigma-Aldrich, USA) a potent uncoupler of photophosphorylation in isolated chloroplasts. This compound dissipates the proton gradient that occurs between the lumen and the stroma during illumination [36].

All the experiments were independently performed and the presented data were expressed as percent (%) of the inhibition of oxygen evolution as compared with the control.

2.7. Measurement of fast chlorophyll *a* fluorescence transients

The behavior of photosystem II (PSII) can be evaluated based on the fast kinetics of chlorophyll *a* fluorescence emitted by leaves of plantlets that are adapted to darkness. At 0 (D_0), 3 (D_3), 10 (D_{10}) and 24 (D_{24}) days of the treatment with AL, fast chlorophyll *a* fluorescence transients were measured on 8 leaves of tobacco plantlets. Prior to any measurement, the leaves were dark-adapted for 20 min. The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence (expressed in relative units) was measured using a portable Handy-PEA (Hansatech, Kings Lynn, UK) under illumination with a light intensity of 3,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The fluorescence parameter $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ represents the maximum photochemical quantum yield of PSII [37]. In turn, the JIP-test has been found as a potential to be very sensitive to stress caused by changes in different environmental conditions [5,29,38-41]. The JIP-test is based on the energy flux theory of the thylakoid membrane. This model describes how the energy of the flux of photons that are absorbed by the photosynthetic pigments in the PSII antenna (ABS) is dissipated as heat and fluorescence (DI), trapped by PSII reactions centers (RCs) (leading to Q_A reduction), and converted into electron transport flux (ET). These fluxes are described in terms of a specific energy flux (per RC) or as proportions of other fluxes (ratios or yields). The calculation of the energy flux and ratios of a specific flux was fully explained by Strasser and his coworkers [38,40,42-46]. The appendix shows some JIP-test parameters, their biophysical or biochemical meanings and how they are calculated from the original data (F_0 , F_{300} , F_J , F_m) derived from fast chlorophyll *a* fluorescence transients. The effective quantum yield of PSII ($\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$) [47,48] was measured using a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF, LI-Cor, Lincoln NE, USA), and PPFD of 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The rate of light-saturated electron transport through PSII was calculated as $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times A \times 0.5$ [49], where A was the proportion of incident PPFD absorbed by the sample and the factor 0.5 accounted for the presence of two photosystems, assuming equal involvement in linear electron flow.

2.8. Determination of gas exchanges

The net photosynthetic rate (P_n), the stomatal conductance (g_s), the intercellular CO_2 concentration (C_i) and the transpiration rate (T) were measured at D_0 , D_3 , D_{10} and D_{24} using a

portable photosynthetic analyzer (LI-Cor, Lincoln, Nebr. USA) which was equipped with a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF). The sample leaf was placed in the cuvette that was maintained at ambient temperature and humidity, and exposed or not to PPFD of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient concentration CO_2 of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ using a LI-6400-01 CO_2 injector with a high-pressure liquid CO_2 cartridge source. Additionally, gas exchanges analysis (P_n , g_s , C_i , T and the dark respiration rate (R_s)) are recorded by LI-COR for 2 cycles of alternation of light/dark at D_3 in the Con and AL plantlets using PPFD of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient concentration CO_2 of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

2.9. Cytohistological analyses

To evaluate the effects of clomazone at the cytological level, leaf fragments were collected from each treatment and prepared for cytohistology as previously described [50]. Briefly, the tissue samples (approximately 5 mm square) were excised from the middle parts of the leaves and immediately fixed at 4 °C in 4% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2). To promote penetration of the fixative, the samples were placed under vacuum for 20 min. After 48 h of fixation at 4 °C, the specimens were rinsed in distilled water and stored in 70% ethanol at 4 °C until required. The samples were then dehydrated in an alcohol series and embedded in methacrylate resin (Kit Technovit 7100, Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Transverse sections (3- μm thickness) were serially cut using a retraction microtome (Reichert-Young Supercut 2065, Wien, Austria), collected on microscope slides, allowed to dry and stored in dust-proof containers. The slides were hydrated in distilled water before staining to visualize insoluble carbohydrates (cellulose, pectin and starch) using the periodic acid-Schiff's reagent (PAS) technique and proteins using naphthol blue black (for details and references, see [50]). Observations and imaging were performed using a Leica DM 2000 photomicroscope (Leica Instruments, Nussloch, Germany) equipped for bright field and UV illumination. The images were captured using Leica DFC 300 FX digital camera (Leica) and analyzed with LAS software (Leica). Approximately 5 leaf fragments were examined for each treatment. Particular attention was paid to structural alterations affecting the photosynthetic mesophyll cells.

2.10. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with the R statistical software using an ANOVA with Tukey's test. The results are displayed as means \pm SE and were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. H₂O₂ and ascorbate contents

The tobacco plantlets that were treated with clomazone exhibited a higher H₂O₂ level (Fig. 2A) than control. We also note that AL+CL-treated plantlets showed significant decrease ($P < 0.05$) in the H₂O₂ content by approximately 55% compared to that of the CL treatment alone.

Total ascorbate (Fig. 2B) significantly decreased ($P < 0.05$) in the CL treatment by approximately 15% compared to that of the control, while in the AL and AL+CL treated plants, total ascorbate significantly increased by approximately 51% and 50% compared to those of the control. In addition, the AL+CL treatment showed a high increase in the total ascorbate by approximately 78% compared to that of the CL treatment alone.

3.2. Phenolic compounds

The total polyphenols (Fig. 2C) decreased in the CL treatment by approximately 17% compared to that of the control, while in the AL+CL treatment, the total polyphenols increased by approximately 37% compared to that of the CL treatment alone. However, the AL and AL+CL treatments had no difference significant ($P > 0.05$) compared to the control.

Specifically, the chlorogenic acid content (Fig. 2D) decreased in the CL treatment by approximately 29% compared to that of the control, while the AL+CL-treated plantlets showed significant increase ($P < 0.05$) in the chlorogenic acid content by approximately 23%, 40% and 75% compared to those of the control, AL and CL treatments, respectively.

The neochlorogenic acid content (Fig. 2E) increased in the AL+CL treatment by approximately 30%, 40% and 45% compared to those of the control, AL and CL treatments, respectively.

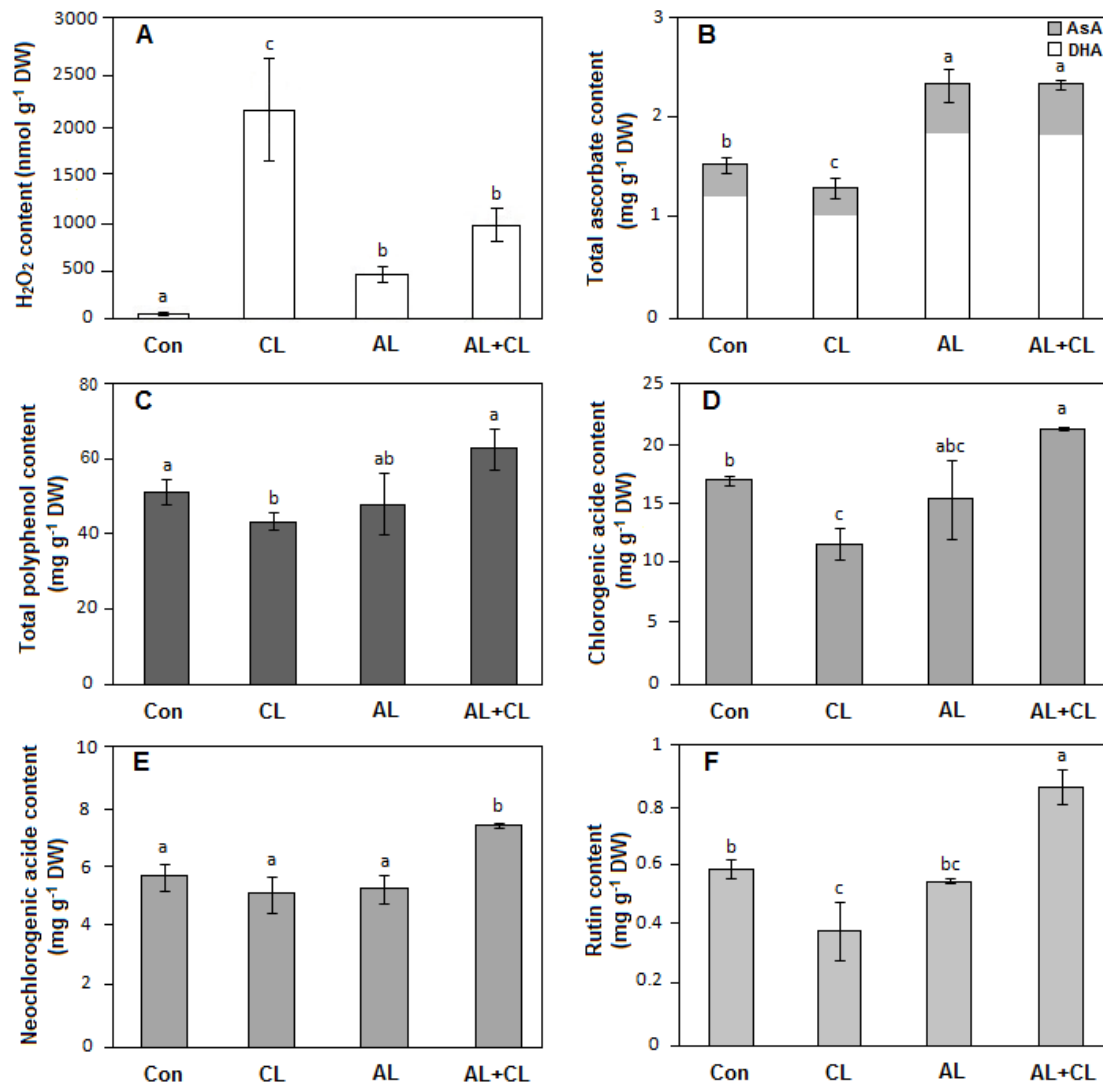


Fig.2. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods treatments on H₂O₂, ascorbate and phenolic compounds contents in tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Con, without alternation of light/dark periods and without clomazone; CL, treatment with 1 μM clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 μM clomazone. Measurements were performed at 24 (D₂₄) days after the treatment with AL. Reported data are obtained from eight replicates, n= 8. Different letters indicate significant difference within each treatment according to an ANOVA-Tukey test at the 95% confidence level.

Similarly, the rutin content (Fig. 2F) showed significant decrease ($P<0.05$) in the CL treatment by approximately 36% compared to that of the control, while it significantly increased ($P<0.05$) in the AL+CL treatment by approximately 45%, 56% and 126% compared to those of the control, AL and CL treatments, respectively.

3.3. Chloroplast oxygen evolution

At D₁₀, the AL treatment decreased chloroplast oxygen-evolving rate by approximately 6% in the presence of ferricyanide compared to that of the control. Similarly in presence of benzoquinone, the AL treatment reduced chloroplast oxygen evolution [H₂O→ BQ] by approximately 5% compared to that of the control. While at D₂₄, the AL pretreatment had no significant effects on chloroplast oxygen-evolving rate using either ferricyanide or benzoquinone as electron acceptors compared to the control. In comparison with the control, the CL treatment significantly decreased ($P<0.05$) chloroplast oxygen-evolving rate in presence of benzoquinone or ferricyanide at D₂₄ (Table 1).

Table 1. Inhibition of chloroplast oxygen-evolving rate (nmol mg⁻¹ min⁻¹) measured in thylakoids (80 µg Chl mL⁻¹) as percent (%) compared to the control. CL, treatment with 1 µM clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 µM clomazone. D₁₀, after 10 days of the treatment with AL, chloroplasts were isolated from the Con and AL plantlets and then treated with clomazone; D₂₄, after 24 days of the treatment with AL or 14 days of the treatment with CL, chloroplasts were isolated from the Con, CL, AL and AL+CL plantlets. K₃Fe(CN)₆, potassium ferricyanide as an electron acceptor; BQ, benzoquinone as an electron acceptor in the PSII. Reported data are obtained from four replicates, n= 4. Different letters indicate significant difference within each treatment according to an ANOVA-Tukey test at the 95% confidence level.

Treatment	D ₁₀		D ₂₄	
	K ₃ Fe(CN) ₆	BQ	K ₃ Fe(CN) ₆	BQ
CL			12% c	16.5% c
AL	6% b	5% b	0.5% a	0.5% a
AL+CL			6% b	6.5% b

At D₂₄, chloroplast oxygen-evolving rate showed significant increases ($P<0.05$) by approximately 6% (using ferricyanide) and 6.5% (using benzoquinon) in the AL+CL-treated plantlets compared to those of the CL-treated plantlets, respectively (Table 1).

3.4. Chlorophyll *a* fluorescence transients

Compared to the control, the F_v/F_m of the AL-treated plantlets significantly decreased ($P<0.05$) at D₁₀, after the F_v/F_m value enhanced and no significant deference ($P>0.05$) was found at D₂₄. The results showed a significant decrease ($P<0.05$) in the F_v/F_m of the CL-treated plantlets at D₂₄, while the F_v/F_m value of the AL+CL-treated plantlets increased by approximately 5% compared to that of the CL-treated plantlets (Table 2).

The performance index on absorption basis (PI_{abs}) of the AL treatment significantly decreased ($P<0.05$) at D₁₀ and then it showed an enhancement compared to the control. The CL

treatment considerably lowered ($P<0.05$) the PI_{abs} at D_{24} by approximately 34% and 66% compared to those of the control, respectively. In contrast, the AL pretreatment increased the PI_{abs} value in the AL+CL-treated plantlets by approximately 73% compared to that of the CL-treated plantlets at D_{24} (Table 2).

Table 2. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods treatments on chlorophyll *a* fluorescence intensity (F_0 , minimum fluorescence; F_m , maximum fluorescence; F_v/F_m , maximum photochemical efficiency of PSII) and on the performance index (PI_{abs}) evaluated from the fast chlorophyll fluorescence curves (i.e., OJIP transients). Con, without alternation of light/dark periods and without clomazone; CL, treatment with 1 μ M clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 μ M clomazone. Measurements were performed at 0 (D_0), 3 (D_3), 10 (D_{10}) and 24 (D_{24}) days after the treatment with AL. Reported data are obtained from eight replicates, $n=8$. Different letters indicate significant difference within each treatment according to an ANOVA-Tukey test at the 95% confidence level.

Treatment	Time	F_0	F_m	F_v/F_m	PI_{abs}	$1-V_J$
Con	D_0	458 ± 11 b	2251 ± 51 a	0.79 ± 0.008 a	1.9 ± 0.09 b	0.38 ± 0.002 a
	D_3	466 ± 20 b	2319 ± 40 a	0.80 ± 0.011 a	1.8 ± 0.18 b	0.37 ± 0.003 ab
	D_{10}	379 ± 10 a	2078 ± 58 b	0.81 ± 0.009 a	1.9 ± 0.07 b	0.36 ± 0.005 b
	D_{24}	368 ± 13 a	2043 ± 15 b	0.81 ± 0.006 a	2.2 ± 0.19 ab	0.38 ± 0.003 b
CL	D_{24}	565 ± 26 c	1865 ± 50 c	0.69 ± 0.015 d	0.75 ± 0.11 d	0.34 ± 0.002 c
AL	D_3	360 ± 18 a	2076 ± 50 b	0.82 ± 0.01 a	1.7 ± 0.21 b	0.34 ± 0.004 c
	D_{10}	427 ± 9 b	1891 ± 64 c	0.77 ± 0.007 b	1.6 ± 0.18 bc	0.37 ± 0.004 ab
	D_{24}	369 ± 10 a	2091 ± 54 b	0.82 ± 0.004 a	2.4 ± 0.13 a	0.36 ± 0.009 b
AL+CL	D_{24}	539 ± 22 bc	2033 ± 114 bc	0.74 ± 0.01 c	1.3 ± 0.01 c	0.39 ± 0.003 a

The $1-V_J$ parameter of the AL-treated plantlets decreased at D_3 and it increased in the following stages. The CL treatment significantly decreased ($P<0.05$) the $1-V_J$ parameter at D_{24} compared to the control. However, the AL pretreatment proves to have reduced the negative effect of clomazone, and the increases in the $1-V_J$ values in the AL+CL-treated plantlets were significant ($P<0.05$) at D_{24} compared to those of the CL-treated plantlets (Table 2).

In the CL-treated plantlets, the flux of photons absorbed by PSII antenna per reaction center (ABS/RC) and the excitonic flux trapped per reaction center (leading to Q_A reduction) (TR0/RC) increased compared to those of the control. Similarly, the part of the absorbed energy that was dissipated as heat and fluorescence (DI0/RC) significantly increased ($P<0.05$) in the CL-treated plantlets. In contrast, the AL+CL-treated plantlets showed significant decreases ($P<0.05$) in the ABS/RC, TR0/RC and DI0/RC parameters. The electrons transporting beyond Q_A^- per the active reaction centre (ET0/RC) significantly decreased ($P<0.05$) in the AL+CL-treated plantlets compared to that of the CL-treated plantlets. In

addition, the quantum yield of the electron transport beyond Q_A^- (ET0/ABS) significantly decreased ($P<0.05$) in the CL-treated plantlets, while it has remarkably increased in the AL+CL-treated plantlets compared to that of the CL-treated plantlets (Table 3).

Table 3. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods treatments on the ABS/RC, TR0/RC, DI0/RC, ET0/RC and ET0/ABS. Con, without alternation of light/dark periods and without clomazone; CL, treatment with 1 μ M clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 μ M clomazone. Measurements were performed at 0 (D₀), 3 (D₃), 10 (D₁₀) and 24 (D₂₄) days after the treatment with AL. Reported data are obtained from eight replicates, n= 8. Different letters indicate significant difference within each treatment according to an ANOVA-Tukey test at the 95% confidence level.

Treatment	Time	ABS/RC	TR0/RC	DI0/RC	ET0/RC	ET0/ABS
Con	D ₀	1.2 ± 0.01 a	1 ± 0.01 a	0.25 ± 0.011 b	0.37 ± 0.005 b	0.30 ± 0.001 a
	D ₃	1.3 ± 0.05 b	1 ± 0.03 a	0.27 ± 0.023 bc	0.39 ± 0.007 b	0.29 ± 0.005 a
	D ₁₀	1.3 ± 0.03 b	1.1 ± 0.04 a	0.24 ± 0.009 ab	0.39 ± 0.008 b	0.30 ± 0.003 a
	D ₂₄	1.3 ± 0.07 b	1 ± 0.05 a	0.23 ± 0.021 ab	0.39 ± 0.02 bc	0.31 ± 0.003 a
CL	D ₂₄	1.8 ± 0.19 d	1.2 ± 0.15 ab	0.54 ± 0.057 e	0.43 ± 0.023 c	0.25 ± 0.011 b
AL	D ₃	1.5 ± 0.07 c	1.2 ± 0.05 b	0.26 ± 0.025 b	0.42 ± 0.011 c	0.28 ± 0.006 a
	D ₁₀	1.3 ± 0.08 b	1 ± 0.05 a	0.30 ± 0.026 c	0.37 ± 0.017 b	0.29 ± 0.005 a
	D ₂₄	1.1 ± 0.03 a	1 ± 0.03 a	0.19 ± 0.002 a	0.32 ± 0.017 a	0.30 ± 0.009 a
AL+CL	D ₂₄	1.4 ± 0.04 bc	1 ± 0.03 a	0.37 ± 0.021 d	0.39 ± 0.009 b	0.29 ± 0.004 a

The actual photochemical efficiency of the PSII (Φ_{PSII}) and the photosynthetic electron transport rate (ETR) (Fig. 3 A and B) noticeably decreased ($P<0.05$) in the CL treatment at D₂₄ compared to the other treatments. These parameters showed significant increases ($P<0.05$) in the AL-treated plantlets especially at D₃ and D₂₄, while at T₁₀ these parameters were decreased compared to the control. In the AL+CL treatment, the Φ_{PSII} and ETR prove to have increased compared to those of the CL treatment alone.

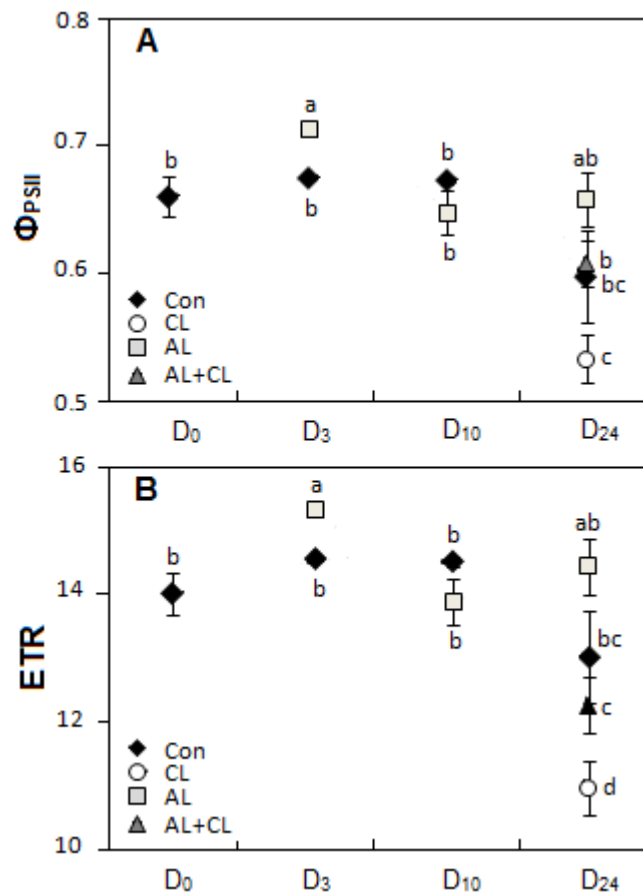


Fig.3. The actual photochemical efficiency of the PSII (Φ_{PSII}) and the photosynthetic electron transport rate (ETR) in the control, alternation of light/dark periods and clomazone treatments of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). Con, without alternation of light/dark periods and without clomazone; CL, treatment with 1 μ M clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 μ M clomazone. Measurements were performed at 0 (D₀), 3 (D₃), 10 (D₁₀) and 24 (D₂₄) days after the treatment with AL. Reported data are obtained from eight replicates, n= 8. Different letters indicate significant difference within each treatment according to an ANOVA-Tukey test at the 95% confidence level.

3.5. Gas exchanges

Effect of treatment with alternation and clomazone on gas exchanges

At D₂₄, the net CO₂ assimilation (P_n) (Fig. 4A) significantly decreased ($P<0.05$) in the CL-treated plantlets by approximately 70% compared to those of the control, respectively. In contrast, the AL pretreatment increased the net photosynthesis (P_n) in the CL-treated plantlets by approximately 104% at D₂₄ compared to those of the CL treatment alone. However, the AL-treated plantlets showed a significant decrease ($P<0.05$) in the P_n at D₁₀ compared to the control.

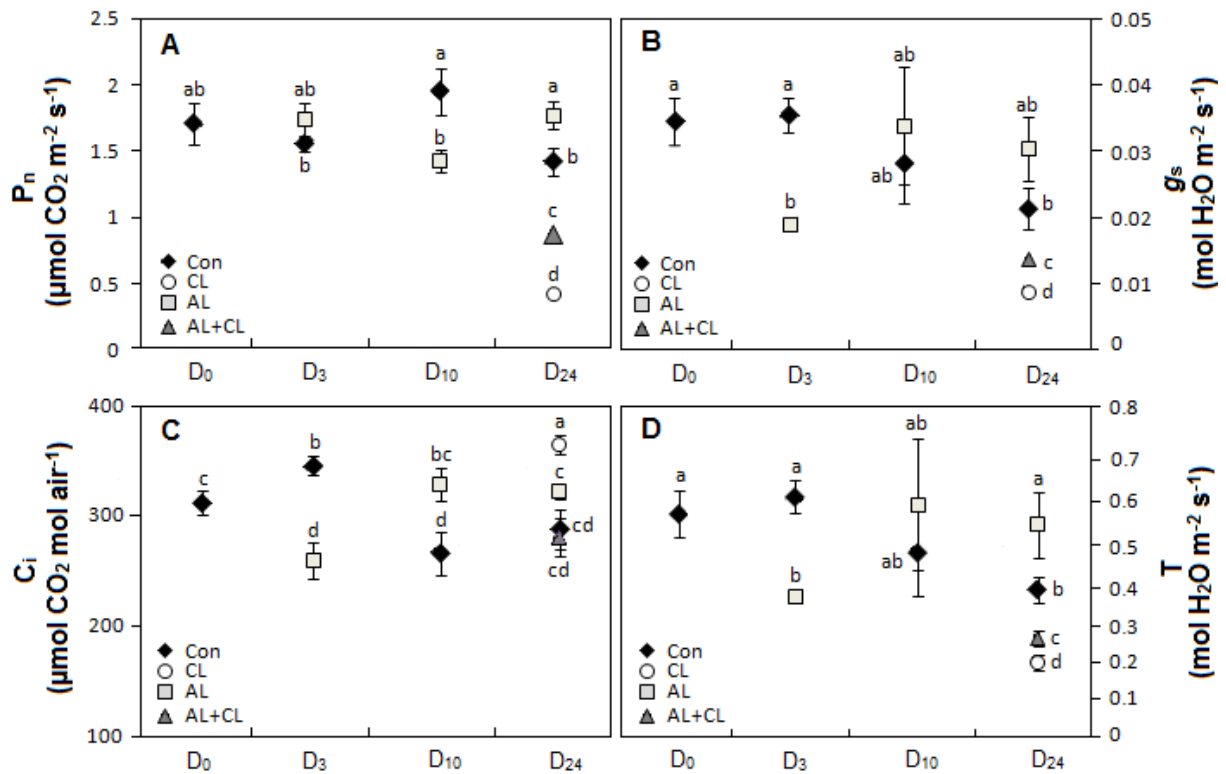


Fig.4. The net CO₂ assimilation (P_n), the stomatal conductance (g_s), the intercellular CO₂ concentration (C_i) and the transpiration rate (T) in the control, alternation of light/dark periods and clomazone treatments of tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). Con, without alternation of light/dark periods, or clomazone; CL, treatment with 1 μM clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods and treatment with 1 μM clomazone. Mesaurments were performed at 0 (D₀), 3 (D₃), 10 (D₁₀) and 24 (D₂₄) days after the treatment with AL. Reported data are obtained from eight replicates, n= 8. Different letters indicate significant difference within each treatment according to an ANOVA-Tukey test at the 95% confidence level.

In the AL-treated plantlets, the stomatal conductance (g_s) and the transpiration rate (T) (Fig. 4B and D) showed significant decreases (P<0.05) at D₃, while they were maximal at D₂₄. In the CL-treated plantlets, the g_s and T showed significant declines (P<0.05) at D₂₄. At D₂₄, AL pretreatment effects to increase the g_s and T in the AL+CL-treated plantlets were more significant to the extent that the g_s and T have increased by approximately 52% compared to those of the CL-treated plantlets.

At D₂₄, the CL treatment increased the intercellular CO₂ concentration (C_i) (Fig. 4C) by approximately 27% compared to that of the control. In contrast, the C_i of the AL+CL-treated plantlets had no significant difference (P>0.05) compared to that of the control. In the AL-treated plantlets, the C_i showed a significant decrease (P<0.05) at D₃, while at D₁₀ and D₂₄ it significantly increased (P<0.05) compared to that of the control.

Effect of short light/dark cycles on gas exchanges of plantlets treated or not with alternation

During the two cycles of AL (Fig. 5A), the levels of P_n increased in the control plantlets at the second cycle of AL, these increases is more pronounced when compared to those of the control plantlets and the AL-treated plantlets at the first and the second cycles of AL, respectively. The levels of P_n had no changes in the AL-treated plantlets between the first and the second cycles of AL (Fig. 5A).

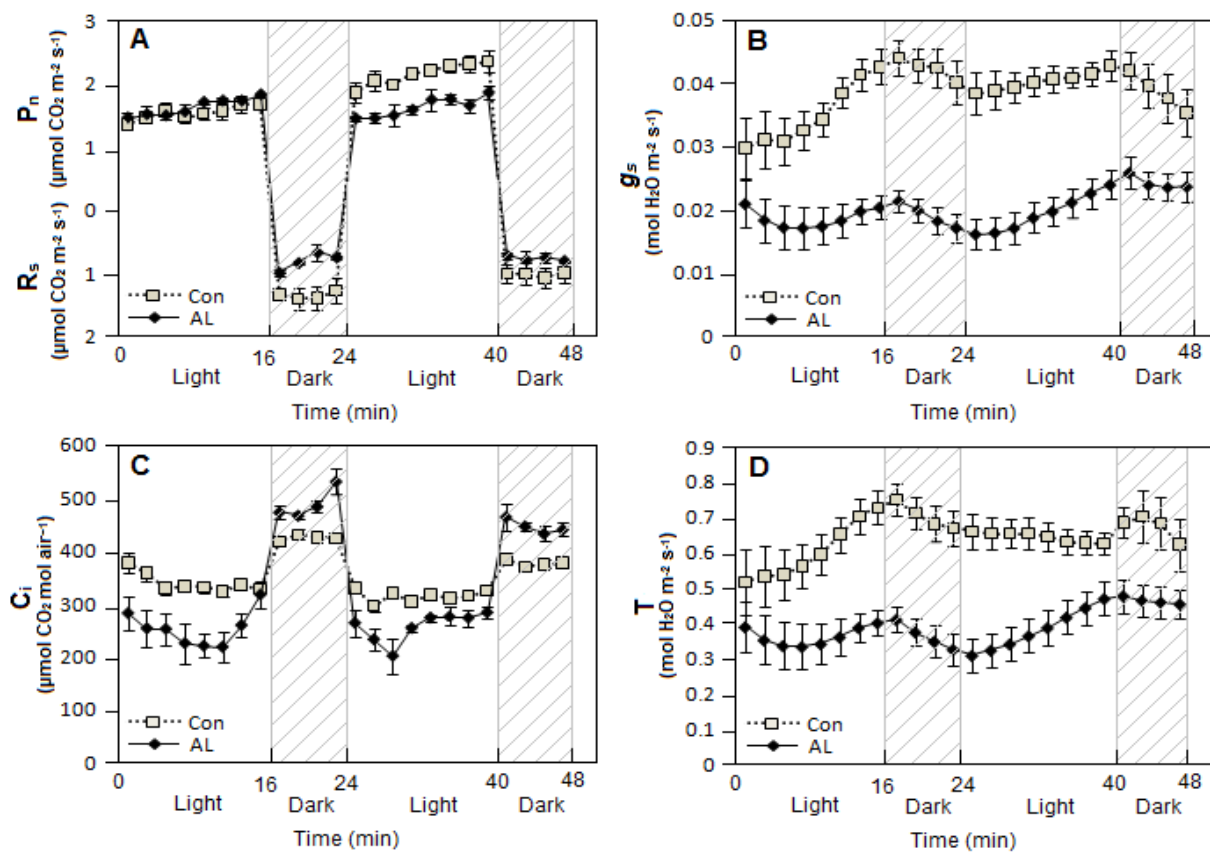


Fig.5. The net CO₂ assimilation (P_n), the stomatal conductance (g_s), the intercellular CO₂ concentration (C_i), the transpiration rate (T) and the dark respiration rate (R_s) recorded for 2 cycles of alternation of light/dark periods (AL) in tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). Con, without alternation of light/dark periods; AL, alternation of light/dark periods. Mesaurments were performed at 3 (D₃) days after the treatment with AL. Data are expressed as mean ± SE.

The stomatal conductance (g_s) and the transpiration rate (T) (Fig. 5B and D) showed significant decreases ($P<0.05$) in the AL plantlets compared to those of the control at the two cycles of AL.

The levels of C_i (Fig. 5C) showed significant decreases ($P<0.05$) in the light periods and significant increases ($P<0.05$) in the dark periods compared to those of the control.

The levels of the dark respiration rate (R_s) (Fig. 5A) in the AL-treated plantlets decreased compared to those of the control.

3.6. Cytohistological analyses

A microscopic study of sections from the AL-treated plantlets showed that the photosynthetic mesophyll cells not only were in well morphological integrity, but also filled with numerous starch-containing chloroplasts. The chloroplasts appeared to have deposited more starch than did the controls, as evidenced by the prominence of starch grains. These starch grains seems to be visible at D_3 and clearly visible at the beginning of D_{10} when compared to those of the control (Fig. 6A and B). At D_{24} , the vacuole cells revealed small components, which are may be secondary metabolites (Fig. 6D).

The sections from CL-treated plantlets revealed the presence numerous mesophyll cells exhibiting cytological alterations that are characteristic of programmed cell death (PCD). These alterations consisted of cell wall lysis, vacuole regression, nuclear and cytoplasm condensation and cell shrinkage. These alterations were noticeably at D_{24} when compared to the control and the other treatments (Fig. 6D).

The mesophyll of AL+CL-treated leaves in contrast appeared to be composed of cells that underwent to less changes and maintained their morphological integrity, when compared to the control. Compared to the sections from CL-treated plantlets, the mesophyll cells of AL+CL-treated leaves showed well-visible differences: the starch grains presence was less pronounced and the symptoms of PCD apparently were not observed in the sections (Fig. 6C and D).

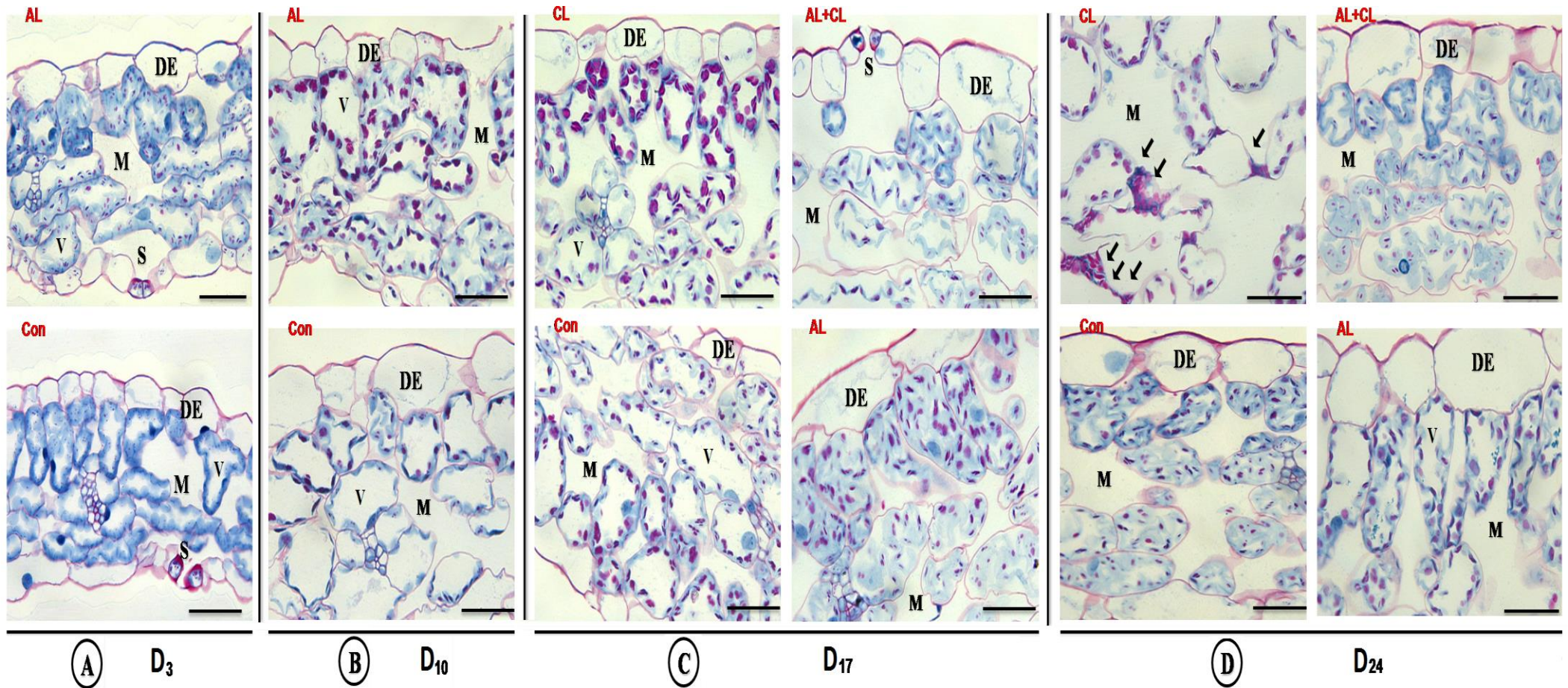


Fig.6. Cytohistological effects of clomazone (CL) and alternation of light/dark periods (AL) treatments on tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virginie vk51*). A, sections from control and AL-treated plantlets at 3 (D₃) days after the treatment with AL; B, sections from control and AL-treated plantlets at 10 (D₁₀) days after the treatment with AL; C, sections from control and the plantlets of CL, AL and AL+CL treatments at 17 (D₁₇) days after the treatment with AL; D, sections from control and the plantlets of CL, AL and AL+CL treatments at 24 (D₂₄) days after the treatment with AL. Note the presence of sinuous vacuoles (V) and starchy chloroplasts (pink granules). In general, clomazone increased grains-starch accumulation in chloroplasts. In addition, the mesophyll cells showed cytological alterations resembling those described for programmed cell death (PCD) at D₂₄ (Fig. D, arrows). These alterations in contrast appear to not be found in the AL+CL plantlets. All scale bars: 50 µm. DE, adaxial epidermis; M, mesophyll; S, stomata; V, vacuole.

4. Discussion

Alternation of light/dark periods (AL) to improve clomazone tolerance has already been studied in tobacco plantlets by [Darwish et al. \[5\]](#), who reported that this pretreatment could be responsible for the protection against the oxidative stress induced by clomazone by stimulation of APX, DHAR, MDHAR and GR activities. The objective of the present work was to investigate whether or not other mechanisms could be involved in the tolerance of tobacco plantlets pretreated with AL to clomazone.

The findings confirm that clomazone induced a photooxidative stress as evidenced by [Darwish et al. \[5\]](#) (see the reduction in the F_v/F_m and PI_{abs} ([Table 2](#)), the Φ_{PSII} ([Fig. 3A](#)), and the $ET0/ABS$ ([Table 3](#))). This stress induced by clomazone results from alterations in the structure of the antenna LHC and its function, the function of reaction centers (RCs) and the redox state of PQ-pool (see ABS/RC , $TR0/RC$, DIO/RC , [Table 2](#), and $1-V_J$, [Table 1](#)). The impaired electron transport capacity (see the decrease in chloroplast oxygen-evolving rate, [Table 1](#), and ETR ([Fig. 3B](#))) consequently outcomes in the formation of H_2O_2 ([Fig. 2A](#)) at the level of PSII [51] and PSI (Mehler reaction). Higher H_2O_2 content in the leaves of the CL-treated plantlets could be toxic for cells, especially in absence of antioxidant system to scavenge the ROS, leading to programmed cell death (PCD). However, the symptoms of the PCD have well been observed in the sections from CL-treated plantlets at D_{24} ([Fig. 6D](#)).

Considering the ability of clomazone to reduce electron transport that limits the re-oxidation of NADPH and by consequent RuBP regeneration capacity, the P_n has decreased in the CL-treated plantlets (see [Fig. 4A](#)). Furthermore, a limitation in the g_s ([Fig. 4B](#)) with no impact on the P_n as well decreases in the Φ_{PSII} and ETR ([Fig. 3A](#) and [B](#)) mean that all final electron acceptors of the photosynthesis and photorespiration processes are affected by clomazone.

In this work, the accumulation of starch grains that showed the level of stress state displaying in the CL-treated plantlets (see [Fig. 6C](#) and [D](#)), maybe results in fewer consumption of triose phosphate that could be as a consequence of the limited growth. Although the production of phosphate trioses is thought to be limited (see the decrease of P_n), the starch accumulates. This could be as a cellular response mechanism to clomazone stress [52,53]. However, this mechanism as a specific cellular response to herbicides stress has been reported by the findings of Kaushik and Inderjit in mung bean [54].

In contrast, AL treatment enhanced the systemic capacity of the plantlets to avoid the photooxidative stress induced by clomazone. The AL treatment induced a moderate stress that is well observed at D_{10} by decreases in the F_v/F_m ([Table 1](#)) and the P_n ([Fig. 4A](#)) as well as

increases in the DI0/RC (Table 2) and the starch-grains accumulation (Fig. 6B). At this point, the decrease of the P_n at D_{10} accompanied by less production of trios phosphate could explain this starch-grains accumulation. In this regard, Graf et al. [55] concluded that the transient light/dark cycles by its effect on circadian clock regulation improves plant fitness and performance *via* adjusting carbon supplies that could cause starch accumulation. The starch-grains accumulation in plants cells was associated with a greater tolerance of their photosynthetic apparatus to oxidative stress [53].

The AL pretreatment proved to protect the plantlets against the photooxidative stress provoked by clomazone. The AL could enhance the electron flux beyond Q_A^- either by improving the PSII efficiency and regulation of the PQ-pool function (see the increase in the F_v/F_m , PI_{abs} , $1-V_J$ (Table 2), the ET0/RC and ET0/ABS (Table 3) and the Φ_{PSII} and ETR (Fig. 2B)) or by stimulating alternative electron pathways. Here, the post-illumination burst (PIB) process proves to be important [56]. At light/night transitions, the photorespiration (PR) is maintained while the continuous of photosynthesis (P). So the PR/P ratio under a large number of light-dark transitions during 24 h is higher. The photorespiration by the consumption photochemical energy, such as ATP and NADPH that limit formation of H_2O_2 is considered as one of protection mechanisms against photooxidative damage to PSII [57-59]. Although the decreases observed in the g_s , the C_i and the T during the two cycles of AL, the levels of P_n in the AL-treated plantlets at the first cycle were still as that of the control (Fig. 5B, C and D). This could be explained by the initiation of the photorespiration process. More, the decrease of R_s in the AL plantlets during the two cycles of AL, as well the increases of P_n in the control plantlets at the second cycle of AL can support our idea (Fig. 5A).

By stimulating the ROS detoxification, the AL pretreatment leads to decrease PSII damages (Fig. 2A). In this context, the findings of Darwish et al. [5] have reported that APX and MDHAR activities were continued to scavenging H_2O_2 in the AL+CL-treated plantlets. It is also well know that the activity of these enzymes is linked to the ascorbate recycling and synthesis as showed in AL-treated plantlets (see the ascorbate content, Fig. 2B). This indicated that the scavenging enzymatic system associated to the ascorbate synthesis and its recycling has been activated before clomazone treatment. In other hand, the AL pretreatment stimulated the synthesis of some phenolic compounds when treatment with clomazone (see the AL+CL treatment, Fig. 2C, D, E and F), such as the chlorogenic acid, neochlorogenic acid and the rutin, which proved to have a secondary role in the ROS detoxification. Considering the high generation of H_2O_2 induced by clomazone (see the H_2O_2 content, Fig. 2A), this has required involvement of secondary ROS-scavenging compounds to remove H_2O_2 , especially

H₂O₂ diffused out of the chloroplast (or the peroxisomes). This could explain the motivated synthesis of such phenolic compounds [60,61].

In conclusion, the effects of AL through the increase of antioxidant activities associated to the ascorbate, and that coupled to the synthesis of phenolic compounds allow not only to detoxify the ROS and therefore to reduce the photooxidative stress provoked by clomazone, but also to prevent the PCD (see Fig. 6D). The alternation of light/dark pretreatment might be considered as an acclimation mechanism to nearest of priming approaches for agricultural applications.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Syrian Ministry of Education and Research, and by laboratory of fruits and vegetables of university of Avignon and Vaucluse countries.

6. References

- [1] A. Krieger-Liszka, Singlet oxygen production in photosynthesis, *J. Exp. Bot.* 411 (2005) 337–346.
- [2] R. Mittler, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 405–410.
- [3] T.S. Gechev, F. Van Breusegem, J.M. Stone, I. Denev, C. Laloi, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, *BioEssays* 28 (2006) 1091–1101.
- [4] J. Cheeseman, Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship, *Plant Stress* 1 (2007) 4–15.
- [5] M. Darwish, F. Lopez-Lauri, M. El Maataoui, L. Urban, H. Sallanon, Pretreatment with alternation of light/dark periods improves the tolerance of tobacco (*Nicotiana tabacum*) to clomazone herbicide, *J. Photochem. Photobiol.* 134 (2014) 49–56.
- [6] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Sci.* 4 (1997) 152–159.
- [7] M. Tattini, C. Galardi, P. Pinelli, R. Massai, D. Remorini, G. Agati, Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress, *New Phytol.* 163 (2004) 547–561.
- [8] M. Galleano, S.V. Verstraeten, P.I. Oteiza, C.G. Fraga, Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis, *Arch. Biochem. Biophys.* 501 (2010) 23–30.
- [9] G. Agati, E. Azzarello, S. Pollastri, M. Tattini, Flavonoids as antioxidants in plants: Location significance, *Plant Sci.* 196 (2012) 67–76.
- [10] C. Brunetti, M. Di Ferdinando, A. Fini, S. Pollastri, M. Tattini, Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 3540–3555.
- [11] D.C. Close, C. McArthur, Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage, not herbivores?, *Oikos* 99 (2002) 166–172.
- [12] S. Pollastri, M. Tattini, Flavonols: old compound for old roles, *Ann. Bot.* 108 (2011) 1225–1233.
- [13] A. Fini, L. Guidi, F. Ferrini, C. Brunetti, M. Di Ferdinando, S. Bircolli, S. Pollastri, L. Calamai, M. Tattini, Drought stress has contrasting effects on antioxidant enzymes activity and phenylpropanoid biosynthesis in *Fraxinus ornus* leaves: an excess light stress affair?, *J. Plant Physiol.* 169 (2012) 929–939.
- [14] G. Agati, C. Brunetti, M. Di Ferdinando, F. Ferrini, S. Pollastri, M. Tattini, Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past, *Plant Physiol. Biochem.* 72 (2013) 35–45.
- [15] Y. Sakihama, J. Mano, S. Sano, K. Asada, Y. Yamasaki, Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 (2000) 949–954.
- [16] D. Wagner, D. Przybyla, R. Op den Camp, C. Kim, F. Landgraf, K.P. Lee, M. Wursch, C. Laloi, M. Nater, E. Hideg, K. Apel, The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*, *Science* 306 (2004) 1183–1185.

- [17] C. Triantaphylides, M. Krischke, F.A. Hoerberichts, B. Ksas, G. Gresser, M. Havaux, F. van Breusegem, M.J. Mueller, Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants, *Plant Physiol.* 148 (2008) 960–968.
- [18] U. Takahama, Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonols by intact spinach chloroplasts, *Plant Physiol.* 74 (1984) 852–855.
- [19] Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara, K. Iseki, In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 136–138.
- [20] V.D. Kreslavski, G.N. Shirshikova, V.Y. Lyubimov, A.N. Shmarev, A.M. Boutanaev, A.A. Kosobryukhov, F.J. Schmitt, T. Friedrich, S.I. Allakhverdiev, Effect of preillumination with red light on photosynthetic parameters and oxidant-/antioxidant balance in *Arabidopsis thaliana* in response to UV-A, *J. Photochem. Photobiol.* 127 (2013) 229–236.
- [21] A. Sebastian, M.N.V. Prasad, Red and blue lights induced oxidative stress tolerance promote cadmium rhizocomplexation in *Oryza sativa*, *J. Photochem. Photobiol.* 137 (2014) 135–143.
- [22] X. Wang, J. Cai, F. Liu, T. Dai, W. Cao, B. Wollenweber, D. Jiang, Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings, *Plant Physiol. Biochem.* 74 (2014) 185–192.
- [23] X. Li, J. Cai, F. Liu, T. Dai, W. Cao, D. Jiang, Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat, *Plant Physiol. Biochem.* 82 (2014) 34–43.
- [24] C. Ouhibi, H. Attia, F. Rebah, N. Msilini, M. Chebbi, J. Aarrouf, L. Urban, M. Lachaal, Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds, *Plant Physiol. Biochem.* 83 (2014) 126–133.
- [25] J.C. Merchuk, M. Ronen, S. Giris, S.M. Arad, Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium sp.*, *Biotechnol. Bioeng.* 59 (1998) 705–713.
- [26] U.J. Grobbelaar, Microalgal biomass production: challenges and realities, *Photosynth. Res.* 106 (2010) 135–144.
- [27] C. Vejrazka, M. Janssen, M. Streefland, R.H. Wijffels, Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 2905–2913.
- [28] A. Sanchez, J. Shin, S.J. Davis, Abiotic stress and the plant circadian clock, *Plant Signal. Behav.* 6 (2011) 223–231.
- [29] M. Darwish, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Study of photosynthesis process in the presence of low concentration of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*), *J. Stress Physiol. Biochem.* 9 (2013) 229–245.
- [30] R. Murshed, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum Lycopersicon L.*, cv Micro-tom), *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19 (2013) 363–378.
- [31] R. Murshed, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Effect of salt stress on antioxidant systems depends on fruit development stage, *Physiol. Mol. Biol. Plants* 20 (2014) 15–29.
- [32] F. Charles, V. Vidal, F. Olive, H. Filgueiras, H. Sallanon, Pulsed light treatment as new method to maintain physical and nutritional quality of fresh-cut mangoes, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 18 (2013) 190–195.
- [33] D. Joly, R. Carpentier, Rapid isolation of intact chloroplasts from spinach leaves, in: R. Carpentier (Ed.), *Photosynthesis Research Protocols*, Springer, New York, 2011, 321–325.
- [34] R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents—Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 975 (1989) 384–394.
- [35] K. Samuel, S. Bose, Immediate effects of pyridazinone herbicides on photosynthetic electron transport in algal systems, *J. Biosci.* 12 (1987) 211–218.
- [36] J. Farineau, J.F.M. Gaudry, in: J.F.M. Gaudry, J. Farineau (Eds.), *Transferts d'électrons dans les thylacoides. Processus physiques, moléculaires et physiologiques*, Versailles, Paris, 2011, 141–145.
- [37] M. Kitajama, W.L. Butler, Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone, *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975) 105–115.
- [38] M. Tsimilli-Michael, G.H.J. Kruger, R.J. Strasser, Suboptimality as driving force for adaptation: A study about the correlation of excitation light intensity and the dynamic fluorescence emission in plants, in: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic, The Netherlands, 1995, pp 981–984.
- [39] C. Hermans, M. Smeyers, R.M. Rodriguez, M. Eyletters, R.J. Strasser, J.P. Delhaye, Quality assessment of urban Trees: A comparative study of physiological processes by following the website of the fluorescence by the test-OJIP, *Plant Physiol.* 160 (2003) 81–90.

- [40] A.J. Strauss, G.H.J. Kruger, R.J. Strasser, P.D.R. Van Heerden, Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P, *Environ. Exp. Bot.* 56 (2006) 147–157.
- [41] M.H. Kalaji, R. Carpentier, I.S. Allakhverdiev, K. Bosa, Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley, *J. Photochem. Photobiol.* 112 (2012) 1–6.
- [42] B.J. Strasser, R.J. Strasser, Measuring fast fluorescence of the fluorescence transient in response to environmental questions: The JIP-test, in: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1995, pp 977–980.
- [43] R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, The fluorescence transient as a tool to characterize the situation photosynthetic samples, in: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, Taylor & Francis, London, UK, 2000, pp 445–483.
- [44] R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava, Analysis of the chlorophyll fluorescence transient, in: G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Springer, Dordrecht, 2004, pp 321–362.
- [45] A. Stirbet, Govindjee, On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient, *J. Photochem. Photobiol.* 104 (2011) 236–257.
- [46] M. Xiang, S. Chen, L. Wang, Z. Dong, J. Huang, Y. Zhang, R.J. Strasser, Effect of vulgolic acid produced by *Nimbya alternantherae* on the photosynthetic apparatus of *Alternanthera philoxeroides*, *Plant Physiol. Biochem.* 65 (2013) 81–88.
- [47] B. Genty, J.M. Briantais, N.R. Baker, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990 (1989) 87–92.
- [48] B. Genty, J. Harbinson, N.R. Baker, Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions, *Plant Physiol. Biochem.* 28 (1990) 1–10.
- [49] J.P. Krall, G.E. Edwards, Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves, *Physiol. Plantarum* 86 (1992) 180–187.
- [50] M. El Maataoui, C. Pichot, Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens L.*, *Planta* 208 (1999) 345–351.
- [51] I. Vass, Molecular mechanisms of photodamage in the photosystem II complex, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (2012) 209–17.
- [52] D.M. Romero, M.C. Ríos de Molina, A.B. Juárez, Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*, *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74 (2011) 741–747.
- [53] S. Muneer, T. HwanKim, B. ChulChoi, B. SeonLee, J. HyunLee, Effect of CO, NO_x and SO₂ on ROS production, photosynthesis and ascorbate–glutathione pathway to induce *Fragaria × annasa* as a hyperaccumulator, *Redox Biol.* 2 (2014) 91–98.
- [54] S. Kaushik, Inderjit, Phytotoxicity of selected herbicides to mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.), *Environ. Exp. Bot.* 55 (2006) 41–48.
- [55] A. Graf, A. Schlereth, M. Stütt, A.M. Smith, Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 9458–63.
- [56] A.U. Igamberdiev, E. Romanowska, P. Gardeström, Photorespiratory flux and mitochondrial contribution to energy and redox balance of barley leaf protoplasts in the light and during light-dark transitions, *J. Plant Physiol.* 158 (2001) 1325–1332.
- [57] B. Osmond, M. Badger, K. Maxwell, O. Björkman, R. Leegood, Too many photos: photorespiration, photoinhibition and photooxidation, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 119–121
- [58] S. Takahashi, H. Bauwe, M. Badger, Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair process and not acceleration of damage process in Arabidopsis thaliana, *Plant Physiol.* 144 (2007) 487–494.
- [59] S. Takahashi, M. Badger, Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage, *Trends Plant Sci.* 16 (2011) (doi:10.1016/j.tplants.2010.10.001).
- [60] P.M. Mullineaux, S. Karpinski, Signal transduction in response to excess light: Getting out of the chloroplast, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2002) 43–48.
- [61] M.M. Mubarakshina, B.N. Ivanov, I.A. Naydov, W. Hillier, M.R. Badger, A. Krieger-Liszkay, Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signaling, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 3577–3587.

**Chapitre V: Effets à long terme du
prétraitement par une alternance de
lumière/obscurité sur la tolérance au
clomazone chez le tabac (*Nicotiana tabacum*
L.)**

Effet à long terme du prétraitement par une alternance de lumière/obscurité sur la tolérance au clomazone chez le tabac (*Nicotiana tabacum* L.)

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis à *Pesticide Physiology and Biochemistry*.

Il a été montré qu'un prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité (16 min/8 min) améliore la tolérance au clomazone de la variété *Virginie*, la variété la plus sensible. Les effets de ce prétraitement ont été évalués trois semaines plus tard et après deux semaines de traitement en présence de clomazone. Le prétraitement améliore le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons, et a donc un effet de limitation du stress photooxydatif, ceci étant lié directement ou non à une stimulation des activités des enzymes antioxydantes.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre a été connaître quelle est la durée de l'effet protecteur de ce prétraitement. Pour cela, des plantes de tabac, ayant ou non subi le prétraitement de lumière alternée, ont été cultivées en serre en présence de clomazone, jusqu'au stade de floraison.

Expérimentation

La variété de tabac *Nicotiana tabacum* L. *Virginie vk 51*, sensible au clomazone, a été utilisée. Une partie des plantules au stade trois feuilles ont été exposées pendant 3 jours à des cycles de lumière/obscurité de 16 min/8 min sous une intensité de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, l'autre partie placée sous une alternance de 16 h/ 8h est utilisée comme contrôle. Après une semaine de croissance, les plantules ont été transférées dans des pots contenant un mélange de terreau et 100 μM de clomazone. Les plantes ont été placées en conditions de serre (à 28/24 ° C, 16 h/ 8 h de cycle jour/nuit et sous éclairage naturel).

Principaux résultats

Les plantes prétraitées par l'alternance manifestent une plus grande tolérance au clomazone et ceci au cours de toute leur croissance jusqu'au stade floraison. Cela se traduit par une augmentation de la taille, de la surface foliaire et de l'accumulation de matière sèche. L'amélioration de la croissance s'accompagne d'une amélioration du taux d'assimilation du CO_2 (P_n et P_{max}) et de l'efficacité photochimique du PSII.

Conclusion

Le prétraitement de trois jours au stade plantule a un effet protecteur à long terme vis-à-vis du clomazone qui perdure tout au long de la vie de la plante. Cet effet dit de "priming" pourrait potentiellement être utilisé pour améliorer la production ou la tolérance à d'autres stress chez d'autres espèces végétales.

Publication 5**Priming Effects of Short Alternating Light/Dark Periods Improve the Tolerance of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to the Herbicide Clomazone in Soil****Majd Darwish*, Félicie Lopez-Lauri, Huguette Sallanon**

Laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes (EA 4279), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Bât Agrosiences, 301 rue Baruch de Spinoza, BP 21239, F-84916 Avignon cedex 9, France

ABSTRACT

Nicotiana tabacum L. cv. *Virginie vk51* plantlets at the three-leaf stage that were grown in a hydroponic culture system were subjected to a photoperiod priming treatment with alternating light/dark periods (AL) (16 min light/8 min dark cycles and a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 3 days. After 2 weeks, the plantlets were transferred to soil treated with 0 (control) or 100 μM clomazone. Compared with the non-primed plants, the AL-primed plants exhibited greater clomazone tolerance with respect to all of the growth parameters and during all of the growth stages. This AL priming effect was demonstrated by increases in plant leaf area and dry and fresh plant weights, which might have been related to increases in the CO_2 assimilation rate (P_n and P_{max}). Furthermore, the reduced photon absorption (ABS/RC) and heat dissipation (DIO/RC) rates as well as the observed increase in photosystem II (PSII) efficiency (the maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m), photochemical quenching (qP), actual PSII efficiency (Φ_{PSII}) and electron transport (the light-saturated electron transport rate (ETR) and electron flux beyond the first quinone electron acceptor of PSII (Q_A) evaluated as $(1-V_J)$) provide strong evidence of a higher tolerance to clomazone. Collectively, these results suggest that AL priming treatment could potentially improve the protection or production of other transplanted species.

Keywords: Clomazone; Chlorophyll *a* fluorescence transients; *Nicotiana tabacum* L.; Photosynthesis; Photoperiod priming; Tolerance

Abbreviations used: ABS, PSII light absorption flux; $^3\text{Chl}^*$, chlorophyll triplet state; DIO, PSII excitation dissipation flux; DXP, 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate; ET0, electron

Transport flux; ETR, photosynthetic electron transport rate; F_0 , F_v , F_m minimal, variable and maximal chlorophyll fluorescence; F_v/F_m maximum photochemical efficiency of PSII; H_2O_2 , hydrogen peroxide; LHCII, light-harvesting complex II; 1O_2 , singlet oxygen; 3O_2 , oxygen triplet state; O_2^- , superoxide radical; PCD, programmed cell death; PI_{abs} , performance index on absorption basis; P_n , net photosynthetic rate; PPF, photosynthetic photon flux density; PQ, plastoquinone; PSII, photosystem II; Φ_{PSII} , actual PSII efficiency; Q_A , primary quinone electron acceptor of PSII; qP , photochemical quenching; RC, reaction center; ROS, reactive oxygen species; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; TR0, PSII light energy flux trapping; $1-V_j$, a measure of electron flux beyond Q_A .

1. Introduction

The use of herbicides is a matter of recent concern because only a small fraction of these chemicals reach the target plants [1], with the remaining herbicide potentially impacting non-target plants. Although herbicides are important in agriculture, they act as chemical pollutants in certain circumstances and can deteriorate soil and threaten non-target plants. Herbicide concentrations may vary from a few μg to mg per kg soil because most of the applied chemicals are retained within the top 5 cm of soil [2]. Herbicides in soil, even at very low concentrations, can affect the physiological and biological processes of non-target plants.

One of the herbicides commonly used in agriculture for weed control is clomazone [2-(2-chlorobenzyl)-4,4-dimethyl-1,2-oxazolidin-3-one] [3]. Its recommended use ranges from 280 to 1100 gha^{-1} for the control of many grass species in crop fields (Brown and Masiunas) [4]. The pretransplant application of clomazone at a rate of 720 gha^{-1} causes transient crop injury [5], and when applied pre-emergence, it causes 5%, 4%, and 1% visual injury at 1116 gha^{-1} and 11%, 10%, and 4% visual injury at 2232 gha^{-1} in dry beans at 7, 14, and 28 days after emergence, respectively [6]. Clomazone can remain for up to 130 days in agricultural water and has been detected in 90% of water samples collected from fields near rice cultivation regions [7]. It has been reported that clomazone reduces photosynthesis rates in soybean and barley seedlings as a result of a reduction in photosynthetic pigment biosynthesis [8,9]. Clomazone is converted to 5-OH clomazone and subsequently to 5-keto clomazone in the soybean [10]. This 5-keto clomazone derived from clomazone oxidation has been reported to inhibit 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase, which is the enzyme catalyzing the first committed step in the chloroplastic isoprenoid pathway [11]. In this context, the decrease in carotenoid synthase represents the diminished activity of the system that protects the structural and functional components of the thylakoids against photooxidative stress. Darwish et al. [12,13] have reported that clomazone leads to photosystem II (PSII) photooxidative damage, which might be caused by a reduction in light-harvesting complex II (LHCII) concentration, the redox state of the plastoquinone (PQ) pool or a decrease in reactive oxygen species (ROS) detoxification in the leaves of tobacco plants. Yasuor et al. [14] have demonstrated that the mechanism underlying clomazone resistance is part of a complex multifactorial process in which the level of oxidative metabolism in conjunction with enzymatic conjugation and photooxidative damage mitigation endow *Echinochloa phyllopogon*, and likely other organisms, with efficient resistance to clomazone herbicides.

Similarly to other herbicides that affect PSII, clomazone induces the generation of ROS by stimulating charge recombinations in PSII. This process promotes the formation of the chlorophyll triplet state ($^3\text{Chl}^*$) and generation of ROS, such as $^1\text{O}_2$, O_2^- and H_2O_2 [13,15,16]. However, the build-up of H_2O_2 as a result of superoxide dismutase (SOD) activity caused by the dismutation of O_2^- generated at the level of PSI is the primary pathway for ROS accumulation, which was described by Darwish et al. [13]. This accumulation of ROS leads to PSII photodamage, inducing programmed cell death (PCD) [17,18]. The ROS generated by the inhibition of photosynthetic electron transport or energy transfer respond primarily to PSII photodamage by inhibiting its repair [19]. In turn, the photodamaged PSII can be detected by chlorophyll *a* fluorescence and JIP-test parameters [13,20,21]. The JIP test has been developed as a sensitive indicator of stress caused by changes in environmental conditions [12,13, 22-26].

Recently, Darwish et al. [13] revealed that an alternating light/dark period pretreatment (AL) (16 min/8 min of light/dark cycles for 3 days) improves tobacco tolerance *via* the stimulation of antioxidant activity that protects the photosynthetic apparatus from the effects of ROS and relieves excess photon stress. A priming process involving temporally limited exposure to an environmental stimulus that can prepare the plant to more successfully cope with future environmental stimuli has been suggested as a potential strategy to increase plant tolerance to several abiotic stresses, including salt stress in *Lactuca sativa* [27] and temperature stress in *Triticum aestivum* [28,29].

In our work presented here, we hypothesized that priming tobacco plantlets by pre-exposure to AL treatments can have long-term effects that improve the growth and tolerance of tobacco plants cultivated in clomazone-treated soil and field conditions.

In this regard, the experiments conducted in this study were designed to simulate AL-pretreated tobacco plant growth (at the 3-leaf stage under growth chamber conditions) following transplantation to fields, which is where the agricultural use of clomazone occurs. For this purpose, we focused on modifications to the growth parameters, gas exchange, and chlorophyll *a* fluorescence in addition to JIP-test responses to investigate (i) whether the AL priming treatment affected the function of the electron transport chain and CO_2 assimilation, and whether these effects resulted in the improvement of tobacco plant growth; and (ii) whether the effects of the AL priming treatment were sustained between the 3-leaf stage and flowering to demonstrate its efficiency.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials, growth conditions and chemical treatment

Nicotiana tabacum L. cv. *Virginie vk51* seeds were used in this study, and they were germinated in a plastic container containing sterilized potting soil for 2 weeks. Germination was conducted under sterile conditions in an environmentally controlled growth chamber at 22/17 °C under a 16 h/8 h light/dark cycle and photosynthetic photon flux density (PPFD) of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, according to the method of Darwish et al. [12]. After 5 weeks of germination, the plantlets (three-leaf stage) growing in a hydroponic system containing Auckland's nutritive solution were exposed [or not] to an AL cycle (16 min/8 min of light/dark and a PPFD of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 3 days; the other plantlets were not treated with AL and were used as controls as described by Darwish et al. [13]. After a week, the plantlets were transferred into pots containing soil treated with clomazone and grown under greenhouse conditions (at 28/24 °C, 16 h/8 h light/dark cycle and PPFD of 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Clomazone (CL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the pots at concentrations of 0-100 μM for the following treatments: (i) Con (Control, without alternating light/dark periods or CL); (ii) CL (100 μM CL); (iii) AL (alternating light/dark periods); and (iv) AL+CL (alternating light/dark periods with 100 μM CL). The irrigation and fertilization systems were applied in accordance with the agronomic characteristics of the tobacco plants.

2.2. Determination of growth parameters

Plant growth was determined by the leaf area, length and fresh and dry plant weights. The leaf area and plant length were measured three times during the tobacco growth period: after 15 days (early stage (ES)), 30 days (intermediate stage (IS)) and 60 days (harvesting stage (HS)) of growth in a greenhouse. The fresh and dry weights of the plant were determined at the beginning of flowering (at the end of tobacco vegetative growth (HS)). The leaf area was calculated using the Image J software.

2.3. Determination of chlorophyll *a* fluorescence transients

The PSII efficiency can be evaluated based on the fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction. Fast chlorophyll *a* fluorescence transients are determined at the ES and IS of tobacco growth. Tobacco leaves with 8 plantlets were dark-adapted for 20 min, and

then chlorophyll *a* fluorescence (expressed in relative units) was measured using a portable Handy-PEA fluorometer (Hansatech Ltd., Kings Lynn, UK). Illumination at a light intensity of $3,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was used to determine the chlorophyll *a* fluorescence in leaves. The maximum photochemical quantum yield of PSII or quantum yield of the open centers of the PSII parameter ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) and performance index based on absorption (PI_{abs}) were calculated automatically [20,30]. The JIP-test developed by Strasser et al. [31] was used for data analysis. This model describes the manner by which the energy produced by the flux of photons that are absorbed by photosynthetic antenna pigments (ABS) is dissipated as heat and fluorescence (DI) or is transported as trapped flux (TR) by PSII reaction centers (RCs) (leading to Q_A reduction) for its conversion to redox energy by reducing plastoquinone Q_A to Q_A^- . Q_A^- is then reoxidized to Q_A , and the generation of electron transport flux (ET) leads to CO_2 fixation [32]. These fluxes are described in terms of a specific energy flux (per RC) or as proportions of other fluxes (ratios or yields). The calculation of the energy flux and ratios of a specific flux have been fully explained by Strasser and his coworkers [22,33,34], see the appendix. The effective quantum yield of PSII ($\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$) and photochemical quenching coefficient of $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$ [35] were measured using a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF, LI-Cor, Lincoln NE, USA) at a PPFD of 500 or 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The light-saturated electron transport rate (ETR) through PSII was calculated as follows: $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times A \times 0.5$ [36], where *A* is the proportion of incident PPFD absorbed by the sample, and the value 0.5 accounts for the presence of two photosystems, assuming their equal involvement in the linear electron flow.

2.4. Determination of gas exchanges

The net and maximum photosynthetic rates (P_n ; P_{max}) were measured using a portable photosynthetic analyzer (LI-Cor, Lincoln, NE, USA) equipped with a leaf chamber fluorometer (LI-6400-40 LCF). The sample leaf was placed in a cuvette that was maintained at an ambient temperature and humidity and exposed to a PPFD of 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient CO_2 concentration of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ for (P_n) or PPFD of 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient CO_2 concentration of 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (P_{max}) when using an LI-6400-01 CO_2 injector with a high-pressure liquid CO_2 cartridge source.

2.5. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with the R statistical software using an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. The results were displayed as the means of 8 replicates \pm standard error (SE). The results were considered significant at a value of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Plant growth

The negative effect of the CL treatment on the leaf area was shown at all stages of plant growth by significant decreases ($P < 0.05$) of approximately 46%, 15% and 26% compared with the leaf area of the control plants. The AL pretreatment was able to improve the plant growth and prevent the negative effects of CL on the plant leaf area in the AL+CL treatment compared to that of the control plants (Fig. 1A).

The CL plant lengths decreased compared to that of the control, and this decrease was greater during the ES (approximately 33%) than the IS and HS of plant growth (approximately 18% and 16%, respectively). The AL pretreatment enhanced the lengths of the AL+CL plants, which were not significantly different ($P > 0.05$) compared with the length of the control plants (Fig. 1B).

The dry and fresh weights of the CL plants significantly decreased ($P < 0.05$) by approximately 33% and 27%, respectively, compared with those of the control plants. These decreases were not observed in the AL+CL plants, which were not significantly different ($P > 0.05$) than the control plants (Fig. 1C and D).

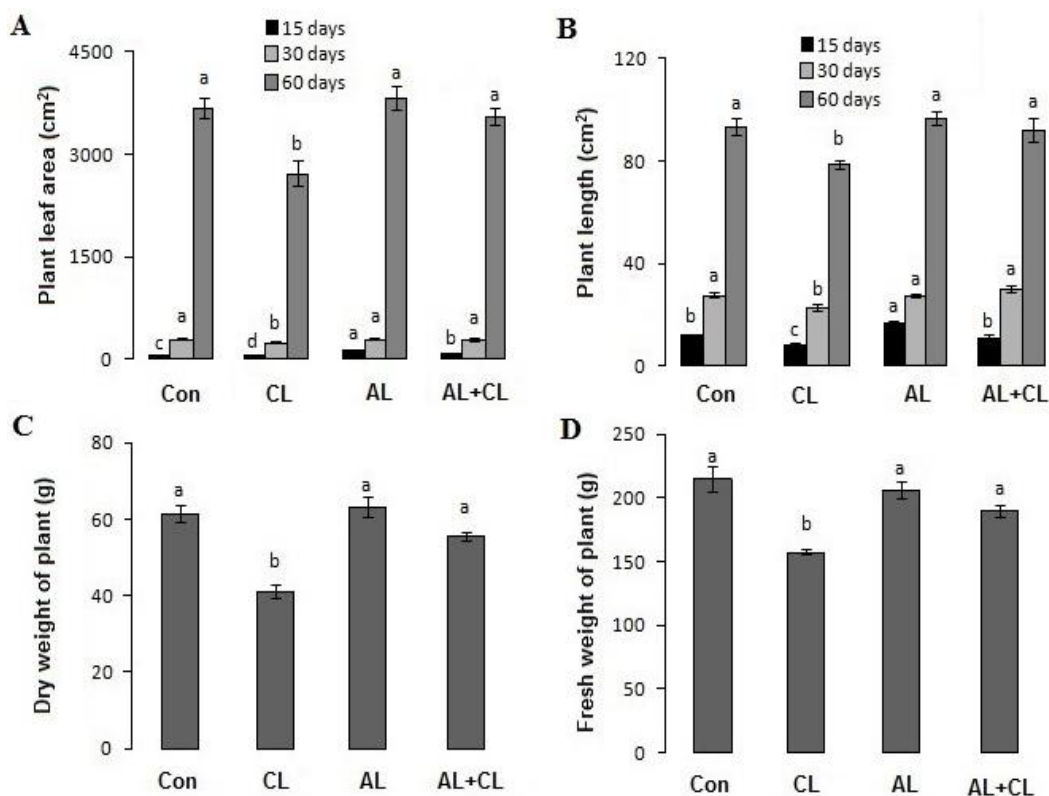


Fig.1. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods on the leaf area, length and fresh and dry tobacco plant weights. Measurements were performed at 15, 30 and 60 days of the plant growth. Con, without alternation of light/dark periods, or clomazone; CL treatment with 100 μ M clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment with alternation of light/dark periods+ 100 μ M clomazone treatment. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P<0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n = 8.

3.2. Chlorophyll *a* fluorescence transients

The maximum photochemical quantum yield of PSII (F_v/F_m) significantly decreased ($P<0.05$) in the CL plants during the ES and IS of plant growth by approximately 3% and 4%, respectively, compared with the yield of the control plants. In contrast, the F_v/F_m parameter of the AL+CL plants showed a significant increase ($P<0.05$) during these stages of approximately 4% compared with that of the CL plants, and no significant differences ($P>0.05$) were observed in this parameter between the AL+CL and control plants (Table 1).

Table 1. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods treatments on chlorophyll *a* fluorescence intensity (F_0 , minimum fluorescence; F_m , maximum fluorescence; F_v/F_m , maximum quantum yield of PSII) and on the performance index (PI_{abs}) evaluated from the fast chlorophyll fluorescence curve (i.e., OJIP transients). Measurements were performed at 15 and 30 days of tobacco plant growth. Con, without alternating of light/dark periods, or clomazone; CL, treatment with 100 μ M clomazone; AL, alternation of light/dark periods; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods+ 100 μ M clomazone treatment. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P<0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, $n = 8$.

Treatment	Growth (days)	F_0	F_m	F_v/F_m	PI_{abs}	$1-V_J$
Con	15	263 \pm 2.7 a	1422 \pm 3.1 a	0.81 \pm 0.001 b	1.5 \pm 0.02 b	0.34 \pm 0.001 a
	30	264 \pm 3.6 a	1715 \pm 18.6 c	0.85 \pm 0.002 a	2.2 \pm 0.13 a	0.34 \pm 0.006 a
CL	15	301 \pm 5.9 b	1576 \pm 10.2 b	0.78 \pm 0.001 c	1.1 \pm 0.05 c	0.31 \pm 0.005 b
	30	303 \pm 8.9 b	1778 \pm 47.6 c	0.82 \pm 0.003 b	1.6 \pm 0.33 b	0.32 \pm 0.005 b
AL	15	278 \pm 5.5 a	1522 \pm 22.5 b	0.82 \pm 0.001 b	1.5 \pm 0.01 b	0.34 \pm 0.001 a
	30	270 \pm 7.3 a	1789 \pm 45.1 c	0.85 \pm 0.001 a	2.5 \pm 0.06 a	0.35 \pm 0.001 a
AL+CL	15	320 \pm 10.5 b	1702 \pm 45.2 bc	0.81 \pm 0.001 b	1.4 \pm 0.04 b	0.33 \pm 0.002 ab
	30	262 \pm 4.5 a	1729 \pm 21.1 c	0.85 \pm 0.001 a	2.1 \pm 0.10 a	0.34 \pm 0.003 a

Compared with the control plants, the CL treatment lowered the performance index (PI_{abs}) that was calculated based on the energy absorption during the ES and IS of plant growth. The AL pretreatment enhanced the PI_{abs} values by approximately 27%, and this value increased by 33% in the AL+CL plants during the same growth stages; however, these values were not significantly different ($P>0.05$) compared with the values of the control plants (Table 1).

The $1-V_J$ parameter was used as an indicator of electron transport at the acceptor side (Q_A) of PSII. The AL pretreatment reduced this negative effect of CL during the ES and IS of plant growth, and the $1-V_J$ values significantly increased ($P<0.05$) in the AL+CL plants compared with that of the CL plants (Table 1).

In the CL plants, the total influx of excitation transferred to the reaction center (ABS/RC) and excitonic flux trapped per reaction center (leading to Q_A reduction) (TR0/RC) significantly increased ($P<0.05$) compared with that of the control plants. These increases were significant ($P<0.05$) during the ES and IS. Similarly, the portion of absorbed energy that was dissipated as heat and fluorescence (DI0/RC) significantly increased ($P<0.05$) in the CL plants (Table 2). In contrast, the AL+CL plants showed significant decreases ($P<0.05$) in the ABS/RC, TR0/RC and DI0/RC parameters during ES and IS compared with that of the CL plants (Table 2). The quantum yield of the electron transport beyond Q_A^- (ET0/ABS) significantly increased ($P<0.05$) in the AL+CL plants during ES compared with that of the CL plants (Table 2). However, the ABS/RC, TR0/RC, DI0/RC, ET0/RC and ET0/ABS parameters

showed no significant differences ($P>0.05$) in the AL+CL plants during the same stages of plant growth compared with that of the control plants (Table 2).

Table 2. Effect of clomazone and alternation of light/dark periods treatments on ABS/RC, TR0/RC, DI0/RC, ET0/RC and ET0/ABS. Measurements were performed at 15 and 30 days of tobacco plant growth. Con, without alternating of light/dark periods, or clomazone; AL, alternation of light/dark periods; CL, treatment with 100 μ M clomazone; AL+CL, pretreatment of alternation of light/dark periods+ 100 μ M clomazone treatment. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P<0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n = 8.

Treatment	Growth (days)	ABS/RC	TR0/RC	DI0/RC	ET0/RC	ET0/ABS
Con	15	1.6 \pm 0.01 b	1.3 \pm 0.01 b	0.29 \pm 0.002 b	0.44 \pm 0.002 b	0.28 \pm 0.001 a
	30	1.3 \pm 0.05 a	1.1 \pm 0.04 a	0.20 \pm 0.008 a	0.37 \pm 0.007 a	0.29 \pm 0.005 a
CL	15	1.9 \pm 0.03 c	1.5 \pm 0.02 c	0.36 \pm 0.012 c	0.47 \pm 0.003 c	0.25 \pm 0.005 c
	30	1.5 \pm 0.02 b	1.2 \pm 0.02 b	0.25 \pm 0.002 b	0.39 \pm 0.004 a	0.27 \pm 0.003 b
AL	15	1.5 \pm 0.01 b	1.3 \pm 0.01 b	0.28 \pm 0.002 b	0.43 \pm 0.001 b	0.28 \pm 0.005 a
	30	1.2 \pm 0.02 a	1 \pm 0.02 a	0.17 \pm 0.003 a	0.35 \pm 0.005 a	0.29 \pm 0.001 a
AL+CL	15	1.5 \pm 0.02 b	1.2 \pm 0.02 b	0.29 \pm 0.004 b	0.41 \pm 0.004 b	0.27 \pm 0.002 b
	30	1.3 \pm 0.03 a	1.1 \pm 0.02 a	0.20 \pm 0.006 a	0.37 \pm 0.004 a	0.28 \pm 0.003 a

At a PPFD of 500 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$, the photosynthetic ETR, photochemical quenching of the variable chlorophyll fluorescence (qP) and actual photochemical efficiency of PSII (Φ_{PSII}) noticeably decreased ($P<0.05$) in the CL plants during the ES and IS compared with the control plants (Fig. 2A, B and C). In contrast, the ETR, qP and Φ_{PSII} values significantly increased ($P<0.05$) in the AL+CL plants at the same stages of the plant growth compared with the CL plants (Fig. 2A, B and C). However, the AL and AL+CL plants showed higher values for these parameters during the IS stage compared with the controls (Fig. 2A, B and C). At a PPFD of 1500 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$, the CL plants showed no significant differences ($P>0.05$) in these parameters during the ES and IS compared with that of the control plants, whereas these parameters increased in the AL plants compared with the control plants at the same stages of growth (Fig. 2A, B and C).

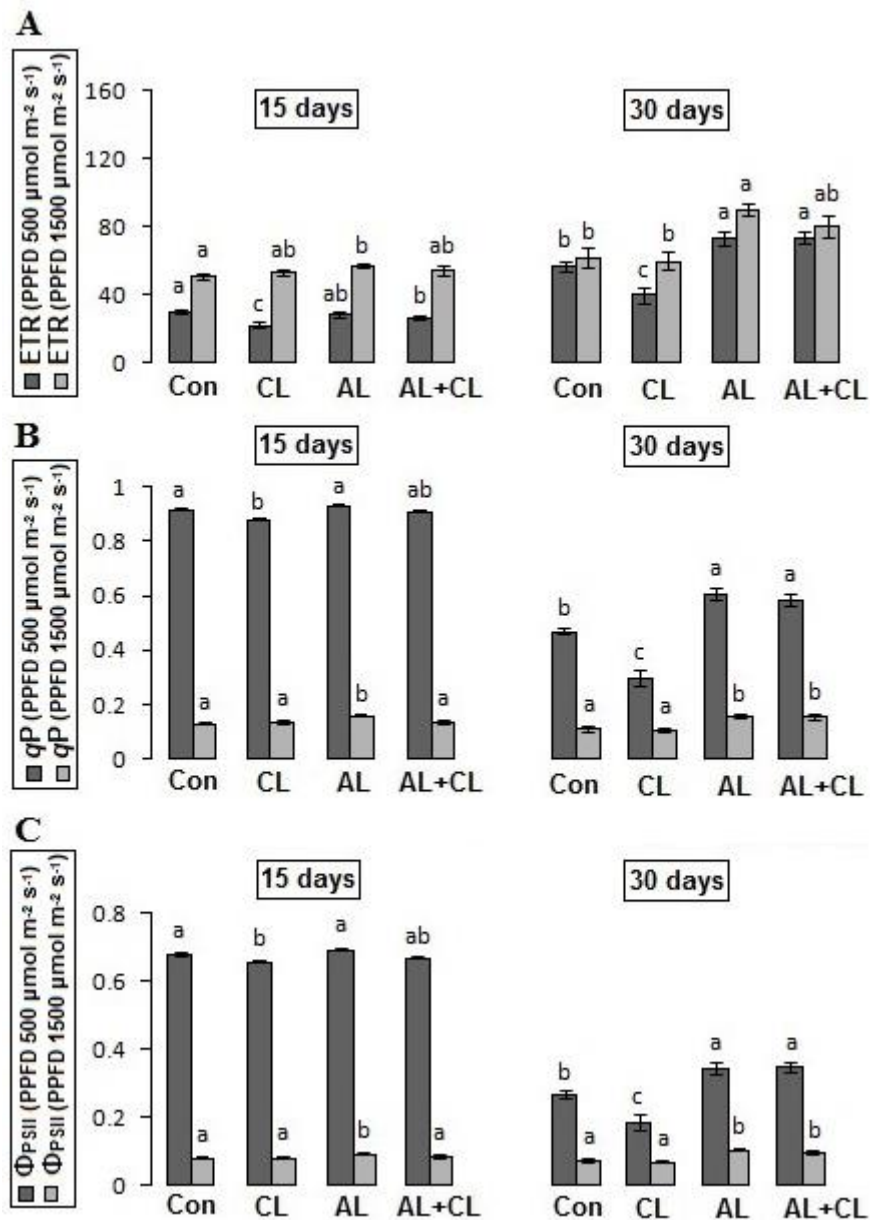


Fig.2. The photosynthetic electron transport rate (ETR), the photochemical quenching coefficient (qP) and the actual PSII efficiency (Φ_{PSII}) in the control, alternation of light/dark periods and clomazone treatments of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). Measurements were performed at 15 and 30 days of the plant growth. For measuring, tobacco leaves were exposed to a PPFD of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or to a PPFD of 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, $n = 8$.

3.3. Gas exchanges

The net CO_2 assimilation (P_n) decreased in the CL plants during the ES and IS (by approximately 26% and 21%, respectively, compared with the control plants). In contrast, the

AL pretreatment led to an increase in the net photosynthesis rate (P_n) of approximately 27% and 43%, respectively, in the AL+CL plants during the same stages of growth compared with the CL plants (Fig. 3).

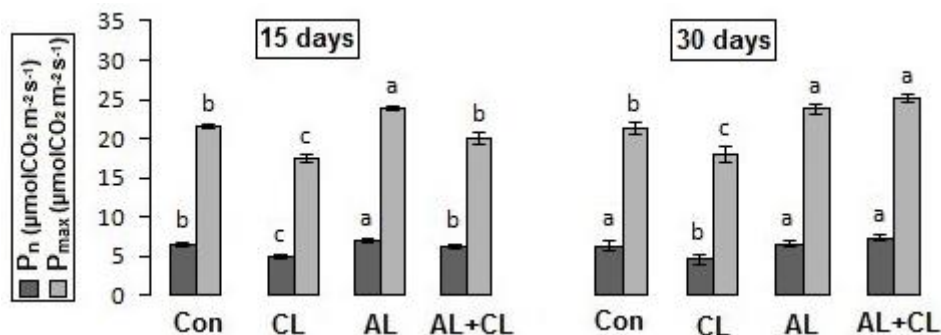


Fig.3. The net and max CO₂ assimilation (P_n ; P_{max}) in the control, alternation of light/dark periods and clomazone treatments of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Virgenie vk51*). Measurements were performed at 15 and 30 days of the plant growth. For measuring, tobacco leaves were exposed to a PPFD of 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient CO₂ concentration of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ for (P_n) or to a PPFD of 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient CO₂ concentration of 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ for (P_{max}). Different letters denote significant differences for each parameter between means within each treatment ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey test). Data are expressed as means \pm SE, n = 8.

The max CO₂ assimilation (P_{max}) was observed at low levels in the CL plants during the ES and IS compared with the control plants (Fig. 3). The AL pretreatment enhanced the P_{max} by approximately 15% and 40% in the AL+CL plants during the ES and IS, respectively, compared with the CL plants (Fig. 3). However, the P_{max} of the AL plants increased by approximately 11% and 10% during the ES and IS, respectively, compared with the control plants (Fig. 3).

4. Discussion

The results showed that the CL treatment reduced the growth parameters during all stages of plant growth. This effect was clearly pronounced during the early stage of growth, with CL inducing noticeable decreases of approximately 46% and 33% in the leaf areas and plant lengths, respectively, compared with the control plants (Fig. 1A and B). These data indicate that CL stress is more potent during the early stages of growth. Although this stress has little effect during the intermediate stage of the growth, the resulting deterioration in the dry and fresh plant weights that occurred during the HS were fairly high, with observed decreases of

approximately of 33% and 27%, respectively, compared with the control plants (Fig. 1C and D).

In contrast, the AL pretreatment induced an improvement in plant growth and inhibited the effects of CL. These priming effects of the AL pretreatment were observed under all growth parameters and during all stages of plant growth and may have been caused by the following factors: (i) the efficiency of the protection of tobacco plants from the excess photon stress induced by CL (see ABC/RC, TR0/RC and DI0/RC (Table 2)); and (ii) the efficiency of CO₂ fixation in the photosynthesis apparatus (see qP and Φ_{PSII} (Fig. 2B and C), and P_n (Fig. 3)). However, a comparison of the IS and ES of plant growth indicated that the decreases in qP and Φ_{PSII} observed for all treatments could have resulted from the effects of the leaf and plant age on the chlorophyll fluorescence kinetics [37], which was not the focus of our work presented here.

The F_v/F_m parameter is used as an indicator of the stress state, and the decrease in F_v/F_m could have resulted from PSII photoinhibition [13,20,38-40]. We believe that the decrease in F_v/F_m in the CL plants (Table 1) was a result of photoinhibitory damage at the acceptor side of PSII [12,13]. In the absence of an active acceptor of electrons further than Q_A^- (see the reduction of $1-V_J$, Table 1) and considering the increases of excitation energy (ABS), the trapped rate (TR0) and electron transport (ET0) by the active (Q_A^- reducing) RC induced the accumulation of Q_A^- and reduction of the PQ pool, consequently increasing the dissipation of energy as heat (DI0/RC) (Table 2). This effect was also demonstrated by the observed decrease in the PI_{abs} , which is considered to be a sensitive indicator of the vitality of plants under stress conditions [12,26,41].

In contrast, the AL pretreatment enhanced the photosynthesis efficiency and systemic capacity of the plants, allowing the plants to avoid the photooxidative stress induced by CL. The results also showed that the AL+CL plants had an increased ability to utilize the absorbed photons, converting them into redox energy and generating the electron transport (ET). This ability in the presence of active electron acceptors in the photosynthetic apparatus leads to increased CO₂ assimilation. This PSII efficiency explains the increases in F_v/F_m , PI_{abs} , qP , Φ_{PSII} , and ET0/ABS and decrease in DI0/RC that were observed. Moreover, enhanced electron flux beyond Q_A^- , reduced accumulation of the Q_A^- pool and regulated redox state of the PQ pool were also observed (see the increase in $1-V_J$ (Table 1), ET0/RC (Table 2) and ETR (Fig. 2A)).

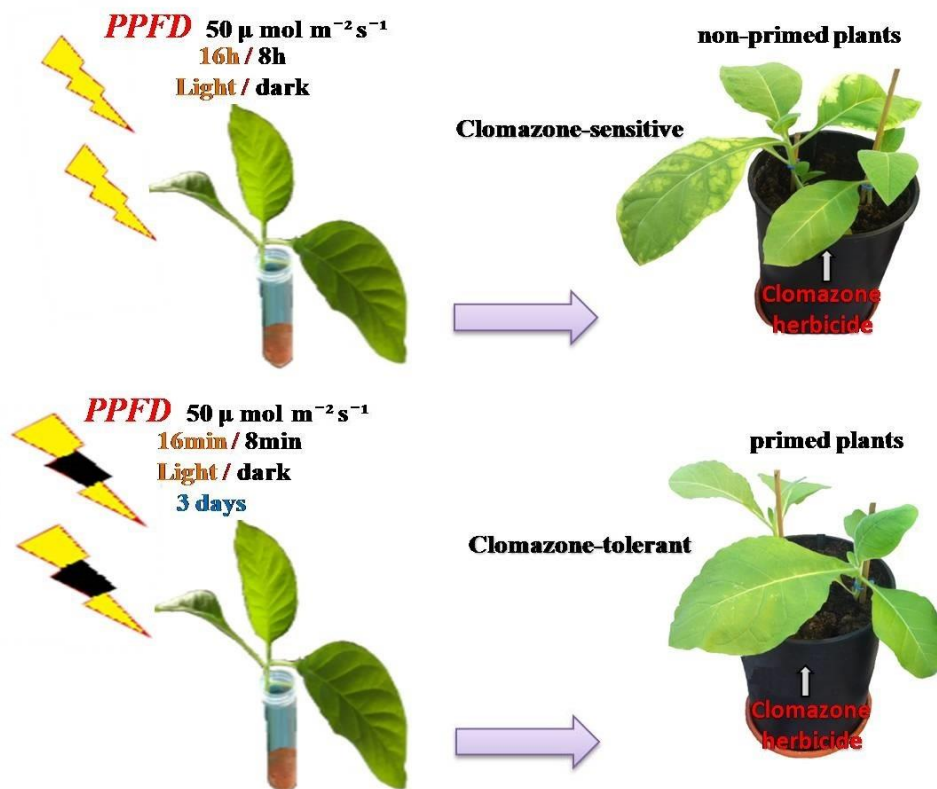
CL induced strong P_n and P_{max} inhibition during the early and intermediate stages of growth (Fig. 3). The decreases in P_n and P_{max} in the CL plants were not linked to stomatal

conductance (g_s), and the CL treatment had no significant effect ($P>0.05$) on the g_s compared with the control plants (data not shown). During these stages, the P_n and P_{max} rates were strongly limited by photosynthetic ET in the treated plants. Furthermore, the decreases in these values may have been caused by the effects of PSII photoinhibition induced by CL (see PI_{abs} , ABS/RC, TR0/RC and DI0/RC, [Tables 1, 2](#)). This photoinhibitory process led to a reduction in photosynthetic ET (see $1-V_J$, [Table 1](#)) and ETR ([Fig. 2A](#)) that decreased the NADPH and ATP concentrations, RuBP regeneration and CO_2 assimilation rates (see the P_n and P_{max} , [Fig. 3](#)) as a result of the inhibition of photodamaged PSII repair [9,42]. A tight correlation between ATP synthesis and PSII repair confirms that the synthesis of ATP might regulate the repair of PSII damage [43].

Considering the positive priming effects of the AL pretreatment on the growth of the CL-treated plants, the improved systemic capacity of the plants to CL tolerance under the AL pretreatment is important. The AL-primed plants may be protected against the CL-induced photooxidative stress through the stimulation of ROS detoxification enzymes, which was reported by Darwish et al. [13]; thus, the damage to the PSII reaction centers is decreased because of the repair process of the photodamaged PSII. Furthermore, the increased rate of CO_2 assimilation might have been caused by an improvement of PSII efficiency (see the increase in ETR and Φ_{PSII} , [Fig. 2A and C](#)) as well as RuBP regeneration and CO_2 fixation rate.

Taken together, these results demonstrate that the AL pretreatment effectively improved the long-term tolerance of the tobacco plants to the herbicide CL during plant growth. In addition, these data showed that the AL plants had a high level of physiological vitality, which was revealed by their greater PSII efficiency and photosynthetic capacity.

In conclusion, the use of AL priming to improve CL tolerance in tobacco is a topic of recent research that should be investigated further using other transplanted species and additional pretransplant-applied herbicides.



The priming effect of short alternation light/dark periods to protect of tobacco plants against the photooxidative stress provoked by clomazone.

5. Acknowledgements

This work was supported by the Syrian Ministry of Education and Research, and by laboratory of fruits and vegetables of university of Avignon and Vaucluse countries.

6. References

- [1] D. Pimentel, Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics, *J. Agr. Environ. Ethic.* 8 (1995) 17–29.
- [2] M.C. Zabaloy, G.P. Zanini, V. Bianchinotti, M.A. Gomez, J.L. Garland, Herbicides in the Soil Environment: Linkage between Bioavailability and Microbial Ecology, in: S. Soloneski, M.L. Larramendy (Eds.), *Herbicides, theory and applications*, Tech publishers, Rijeka, Croatia, 2011, pp. 163–192.
- [3] H.J. Chang, M.J. Konz, E.A. Aly, R.E. Sticker, K.R. Wilson, N.E. Korg, P.E. Dickson, 3-Isoxalidones and related compounds a new class of herbicides, in: D.R. Baker, J.G. Fenyes, W.K. Moberg, B. Cross (Eds.), *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*. American chemical society, Washington, 1997, pp. 10–23.
- [4] D.E. Westberg, L.R. Oliver, R.E. Frans, Weed control with clomazone alone and with other herbicides, *Weed Technol.* 3 (1989) 678–685.
- [5] R.E. Nurse, D.E. Robinson, A.S. Hamill, P.H. Sikkema, Annual broadleaved weed control in transplanted tomato with clomazone in Canada, *Crop Prot.* 25 (2006) 795–799.
- [6] P.H. Sikkema, C. Shropshire, N. Soltani. Effect of clomazone on various market classes of dry beans, *Crop Prot.* 26 (2007) 943–947.

- [7] R. Zanella, E.G. Primel, S.L.O. Machado, F.F. Gonçalves, E. Marchezan, Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Chromatographia* 55 (2002) 573–577.
- [8] L.C. Argenta, N.F. Lopes, Clomazone effects on pigment accumulation, photosynthesis and respiratory rates of greening soybean seedlings, *R. Bras. Fisiol. Veg.* 3 (1991) 69–74.
- [9] R. Kaňa, M. Šponduvá, P. Ilík, D. Lazár, K. Klem, P. Tomek, J. Nauš, O. Prášil, Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare L.*), *Pestic. Biochem. Physiol.* 78 (2004) 161–170.
- [10] S.F. ElNaggar, R.W. Creekmore, M.J. Schocken, R.T. Rosen, R.A. Robinson, Metabolism of clomazone herbicide in soybean, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 880–883.
- [11] Y. Ferhatoglu, M. Barrett, Studies of clomazone mode of action, *Pest. Biochem. Physiol.* 85 (2006) 7–14.
- [12] M. Darwish, F. Lopez-Lauri, H. Sallanon, Study of photosynthesis process in the presence of low concentration of clomazone herbicide in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*), *J. Stress Physiol. Biochem.* 9 (2013) 229–245.
- [13] M. Darwish, F. Lopez-Lauri, M. El Maataoui, L. Urban, H. Sallanon, Pretreatment with alternation of light/dark periods improves the tolerance of tobacco (*Nicotiana tabacum*) to clomazone herbicide, *J. Photochem. Photobiol.* 134 (2014) 49–56.
- [14] H. Yasuor, W. Zou, V.V. Tolstikov, R.S. Tjeerdema, A.J. Fischer, Differential oxidative metabolism and 5-Ketoclomazone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clomazone, *Plant Physiol.* 153 (2010) 319–326.
- [15] W.A. Rutherford, A. Krieger-Liszky, Oxidative stress induced by herbicides in the photosystem II, *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 648–653.
- [16] C. Fufezan, A.W. Rutherford, A. Krieger-Liszky, Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II, *FEBS Lett.* 532 (2002) 407–410.
- [17] J.F. Dat, R. Pellinen, T. Beeckman, B. van de Cotte, C. Langebartels, J. Kangasjärvi, D. Inzé, F. Van Breusegem, Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco, *Plant J.* 33 (2003) 621–632.
- [18] T.S. Gechev, J. Hille, Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death, *J. Cell Biol.* 168 (2005) 17–20.
- [19] Y. Nishiyama, S.I. Allakhverdiev, N. Murata, A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 742–749.
- [20] K. Maxwell, G.N. Johnson, Fluorescence of chlorophyll-a, a practical guide, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 659–668.
- [21] R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava, Analysis of the chlorophyll fluorescence transient, in: C.G. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, Springer, Dordrecht, 2004, pp. 321–362.
- [22] M. Tsimilli-Michael, G.H.J. Kruger, R.J. Strasser, Suboptimality as driving force for adaptation: A study about the correlation of excitation light intensity and the dynamic fluorescence emission in plants, in: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic, The Netherlands, 1995, pp. 981–984.
- [23] G.H.J. Krüger, M. Tsimilli-Michael, R.J. Strasser, Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves, *Physiol. Plantarum* 101 (1997) 65–277.
- [24] B.S. Ripley, S.P. Redfern, J. Dames, Quantification of the photosynthetic performance of phosphorus-deficient Sorghum by means of chlorophyll-a fluorescence kinetics, *S. Afr. J. Sci.* 100 (2004) 615–618.
- [25] A.J. Strauss, G.H.J. Kruger, R.J. Strasser, P.D.R. Van Heerden, Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P, *Environ. Exp. Bot.* 56 (2006) 147–157.
- [26] M.H. Kalaji, R. Carpentier, I.S. Allakhverdiev, K. Bosa, Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley, *J. Photochem. Photobiol.* 112 (2012) 1–6.
- [27] C. Ouhibi, H. Attia, F. Rebah, N. Msilini, M. Chebbi, J. Aarrouf, L. Urban, M. Lachaal, Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds, *Plant Physiol. Biochem.* 83 (2014) 126–133.
- [28] X. Wang, J. Cai, F. Liu, T. Dai, W. Cao, B. Wollenweber, D. Jiang, Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress *via* improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings, *Plant Physiol. Biochem.* 74 (2014) 185–192.
- [29] X. Li, J. Cai, F. Liu, T. Dai, W. Cao, D. Jiang, Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat, *Plant Physiol. Biochem.* 82 (2014) 34–43.
- [30] M. Kitajama, W.L. Butler, Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone, *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975) 105–115.

- [31] R.J. Strasser, A. Srivastava, M. Tsimilli-Michael, The fluorescence transient as a tool to characterize the situation photosynthetic samples, in: M. Yunus, U. Pathre, P. Mohanty (Eds.), *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, Taylor and Francis, New York, 2000, pp. 444–483.
- [32] P.D.R. Heerden, R.J. Strasser, G.H.J. Stress, Reduction in dark chilling N₂-fixation in soybean by nitrate indicated by the kinetics of the fluorescence of chlorophyll-a, *Physiol. Plantarum* 121 (2004) 239–249.
- [33] B.J. Strasser, R.J. Strasser, Measuring fast fluorescence of the fluorescence transient in response to environmental questions: The JIP-test, in: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1995, pp. 977–980.
- [34] B. Genty, J.M. Briantais, N.R. Baker, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990 (1989) 87–92.
- [35] B. Genty, J. Harbinson, N.R. Baker, Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions, *Plant Physiol. Biochem.* 28 (1990) 1–10.
- [36] J.P. Krall, G.E. Edwards, Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation in leaves, *Physiol. Plantarum* 86 (1992) 180–187.
- [37] Z. Šesták, Chlorophyll fluorescence kinetic depends on age of leaves and plants, in: J.H. Argyroudi-Akoyunoglou, H. Senger (Eds.), *The chloroplast: from molecular biology to biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Czech Republic, 1999, pp. 291–296.
- [38] G.H. Krause, S. Somersald, E. Zumbusch, B. Weyres, H. Laasch, On the Mechanism of Photoinhibition in Chloroplasts. Relationship Between Changes in Fluorescence and Activity of Photosystem II, *J. Plant Physiol.* 136 (1990) 472–9.
- [39] C.B. Osmond, J. Ramus, G. Levavasseur, L.A. Franklin, W.J. Henley, Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid, *Planta* 190 (1993) 79–106.
- [40] F. Poiroux-Gonord, J. Santini, A.L. Fanciullino, F. Lopez-Lauri, J. Giannettini, H. Sallanon, L. Berti, L. Urban, Metabolism in orange fruits is driven by photooxidative stress in the leaves, *Physiol. Plant* 149 (2013) 175–87.
- [41] C. Hermans, M. Smeyers, R.M. Rodriguez, M. Eyletters, R.J. Strasser, J.P. Delhaye, Quality assessment of urban Trees: A comparative study of physiological processes by following the website of the fluorescence by the test-OJIP, *Plant Physiol.* 160 (2003) 81–90.
- [42] A.N. Petit, F. Fontaine, C. Clement, N. Vaillant-Gaveau, Gating in grapevine: Relation between application of the fungicide fludioxonil and circadian rhythm on photosynthesis, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 130–134.
- [43] S.I. Allakhverdiev, Y. Nishiyama, S. Takahashi, S. Miyairi, I. Suzuki, N. Murata, Systematic Analysis of the Relation of Electron Transport and ATP Synthesis to the Photodamage and Repair of Photosystem II in *Synechocystis*, *Plant Physiol.* 137 (2005) 263–273.

Discussion générale

Le mode d'action du clomazone a été le sujet de seulement quelques études ces vingt dernières années. Les données disponibles indiquent que la toxicité du clomazone se traduit par l'inhibition de la synthèse du 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) *via* la voie du pyruvate, première voie de synthèse de l'enzyme isopentényl diphosphate plastidique (IPP), voie qui conduit à la synthèse des pigments chlorophylliens, chlorophylle et caroténoïdes (Ferhatoglu and Barrett, 2006). La toxicité du a donc été attribuée à une diminution de la biosynthèse des pigments chlorophylliens et en particulier des caroténoïdes. Cependant, selon certains auteurs tels que Ji and Hatzios (1990), le clomazone n'aurait pas d'effet sur la synthèse de l'enzyme IPP *via* la voie du mévalonate qui permet également une biosynthèse des pigments photosynthétiques. Il était donc nécessaire de poursuivre les études afin d'approfondir la connaissance des mécanismes impliqués dans la toxicité du clomazone.

Pour répondre à cette problématique, l'effet de faibles concentrations de clomazone a été étudié chez deux variétés de tabac (*Xanthi* et *Virginie*). Les concentrations nécessaires, pour obtenir une diminution significative de la teneur en pigments, ont été supérieures à 1 μM , alors que des effets sur les paramètres de fluorescence ont été détectables à partir de très faibles concentrations de clomazone (de 10^{-2} à 10^{-4} μM). La fluorescence de la chlorophylle *a* s'est révélée être une fenêtre ouverte dans le cœur des activités photochimiques, en raison de sa liaison complexe avec les nombreux processus qui ont lieu lors de la conversion de l'énergie lumineuse en forme chimique stable (Stirbet and Govindjee, 2011). Bien que la fluorescence de la chlorophylle *a* soit très utilisée pour détecter des effets de stress, l'interprétation des résultats et la sensibilité des différents paramètres, sont le sujet de nombreuses discussions.

L'efficacité photochimique maximale du PSII, F_v/F_m , apparaît être le paramètre le plus fréquemment utilisé pour évaluer les contraintes environnementales affectant le PSII (Krause and Weis, 1991; Maxwell and Jonson, 2000). Malgré l'importance de ce paramètre comme indicateur approprié de caractérisation de la photoinhibition (He et al., 1996; Basu et al., 1998), celui-ci (représentant aussi TR_0/ABS) est aussi le moins sensible aux modifications apportées par l'application de stress (Force et al., 2003; Kalaji et al., 2012) parmi les paramètres du test *OJIP*. Nos résultats sont tout à fait en accord avec le fait que les paramètres du test *OJIP* sont d'une grande sensibilité. F_v/F_m est bien un indicateur de stress, cependant, la diminution de F_v/F_m précède de peu la diminution de teneurs en pigments. Lorsque les concentrations en clomazone sont très faibles (10^{-4} μM), c'est l'analyse du test *OJIP* qui met en lumière l'effet du clomazone. Les paramètres prioritairement affectés sont PI_{abs} , qui est

l'indice de performance calculé à partir de l'absorption des photons (ABS); $1-V_J$ et ET_0/ABS , qui semblent indiquer que la réoxydation de Q_A et le rapport du nombre d'électrons transmis et du nombre de photons absorbés sont diminués en présence de clomazone. Les autres paramètres relativement sensibles sont: ABS/RC qui informe de la taille des antennes collectrices de lumière du centre réactionnel du PSII; DIO/RC qui représente la dissipation d'énergie lumineuse sous forme de chaleur. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études et notamment celle d'Oliveira et al. (2009), qui a rapporté que le test *OJIP* est plus efficace que F_v/F_m pour discriminer de petites différences dans l'ensemble du PSII en cas de stress environnemental.

L'utilisation du test *OJIP* confirme que le clomazone a un effet photoinhibiteur, indépendant de la teneur en pigments, sur le fonctionnement du PSII. La très forte sensibilité au test *OJIP* peut permettre d'envisager son utilisation dans des programmes de détection des herbicides par des plantes bioindicatrices.

Un effet photoinhibiteur du clomazone a donc été détecté grâce aux paramètres du test *OJIP* (jusqu'à 10^{-4} μM chez *Virginie*), en absence de modification de la teneur en pigments photosynthétiques. Par ailleurs, lorsqu'on compare l'action du clomazone sur les deux variétés sensible (*Virginie*) et tolérante (*Xanthi*), il apparaît que la variété la plus sensible est plus riche en caroténoïdes (1,5 à 2 fois) que la variété la plus tolérante. Les mesures des paramètres de fluorescence et de l'évolution d'oxygène par les chloroplastes isolés ont montré que la sensibilité au clomazone pouvait être liée à une modification de la structure des antennes LHC du PSII et également à une augmentation de l'état redox du pool de plastoquinones, le clomazone n'affectant pas la structure ni le fonctionnement du PSI. Le clomazone *via* l'inhibition de l'enzyme DXS, induit non seulement une diminution des caroténoïdes, mais également une réduction dans le pool de plastoquinones. En cas de faibles doses de clomazone, la réduction du pool de plastoquinones apparaît déterminante. Cette réduction entraîne un blocage direct du transfert des électrons au-delà de Q_A^- et conduit à la formation de la chlorophylle triplet (3Chl^*), puis à la formation de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). $^1\text{O}_2$ est une espèce très active des ERO, provoquant des dommages photooxydatifs dans le centre réactionnel au cours de la photoinhibition (Trebst et al., 2002; Triantaphylidès et al., 2008). Ces processus conduisent à l'accumulation de H_2O_2 , qui peut induire la mort cellulaire programmée (PCD) (Gechev et al., 2006) ce qui a été observé au cours des analyses microscopiques, dans les tissus des plantules de tabac traitées par le clomazone. Généralement, en conditions de photoinhibition, la formation d' H_2O_2 a lieu au niveau du PSI,

lors de la réaction de Mehler. En présence de clomazone, il semble qu'elle se produise également suite à une insuffisance du pool de plastoquinones à capter les électrons et à la formation de l'oxygène singulet (Adir et al., 2003). Les mesures des activités antioxydantes chez les deux variétés ont également montré que la variété la plus sensible avait une capacité de détoxification des ERO, plus faible.

L'alternance de cycles courts de lumière/obscurité, un prétraitement de protection

Un certain nombre de travaux ont proposé de diminuer l'effet des dommages de la lumière induits par les ERO *via* la stimulation des systèmes de défense des plantes. Très peu ont utilisé la lumière comme prétraitement. Il est possible de citer des traitements par des faibles intensités (de l'ordre de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de lumière pulsée ou encore l'effet d'une préillumination de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ qui ont amélioré la tolérance face au stress oxydatif *via* la stimulation des systèmes de détoxification des ERO (Gergoff Grozoff et al., 2013; Kreslavski et al., 2013; Aver'yanov et al., 2014). Il existe plus de travaux sur des traitements par des flashes de lumière (entre 40 μs à 1 s), en particulier chez les algues, utilisés pour améliorer l'efficacité de l'activité photosynthétique. Il a été démontré que cette alternance augmente l'efficacité de la photosynthèse (Kok, 1953; Nedbal et al., 1996) et qu'en condition d'excès de lumière, les photodommages étaient moins prononcés (Merchuk et al., 1998). Cependant, à notre connaissance, l'effet de prétraitement par des alternances de cycles courts de lumière/obscurité de l'ordre de quelques minutes, face au stress photooxydatif, n'a pas été décrit.

L'alternance de cycles courts de lumière/obscurité (16 min/ 8min) a permis d'améliorer très fortement la tolérance de la variété *Virginie* la plus sensible. Cette tolérance s'est manifestée par une meilleure croissance des plantules, une haute efficacité de la gestion de l'énergie lumineuse au niveau du PSII et du transport d'électrons jusqu'au PSI, ainsi qu'une meilleure efficacité du système de détoxification des ERO. Ceci a conduit à une accumulation moindre des ERO, et par conséquent à une diminution des dommages photooxydatifs et à une diminution, voire une disparition du processus de mort cellulaire programmée observée en absence de prétraitement.

Dans la bibliographie, quelques mécanismes ont été proposés pour identifier les effets positifs de l'alternance rapide de cycles de lumière/obscurité "*flashing light effect*" et approcher les mécanismes impliqués. Il a été suggéré que, à des fréquences élevées de cycles

de lumière/obscurité, il y a des effets non linéaires liés à la disponibilité limitée des récepteurs du pool de quinone sous la lumière élevée continue (Kok et al., 1970). Lee et Pirt (1981) considèrent que l'alternance rapide de cycles de lumière/obscurité conduit à un stockage des composants riches en énergie pendant la période de lumière qui vont être utilisés pendant la période d'obscurité. Sharkey et al. (1986) montre que puisque la molécule de CO₂ est fixée et phosphorylée pendant la période de lumière, le triosephosphate dans la période de nuit suivante est plus métabolisée en saccharose conduisant à libérer plus de phosphate inorganique (Pi). A la suite d'une grande disponibilité de Pi, l'activité photosynthétique dans la période lumineuse suivante serait augmentée.

D'après nos résultats l'alternance peut induire la mise en place de deux processus de protection contre le stress photooxydatif:

- limiter le stress à la source (limiter le transfert des électrons)

Il est probable que l'alternance améliore le transport des électrons au-delà de Q_A⁻ par une stimulation des voies alternatives de transport des électrons. L'alternance agit à travers le processus de postillumination burst (PIB) (Igamberdiev et al., 2001). À chaque extinction de la lumière, la photorespiration (P_R) se maintient pendant quelques minutes alors que la photosynthèse (P_n) continue. Donc le rapport P_R/P_n est plus élevé sous alternance puisqu'il y a un très grand nombre de passage lumière-obscurité en 24 heures. Les cycles transitoires de lumière/obscurité stimulent la photorespiration et ce processus a été décrit comme ayant des effets bénéfiques sur la photosynthèse dans les plants de C3 (Zelitch 1992). La photorespiration est en effet considérée comme un des mécanismes majeurs de protection contre le stress oxydatif. Elle permet la réoxydation de NADH dans la mitochondrie. Des échanges de malate et d'oxaloacétate sont possibles entre mitochondrie et chloroplastes qui permettent de transférer le pouvoir réducteur entre organites. Donc la disponibilité en NADPH augmente ce qui limite la formation de H₂O₂. Nos résultats montrent qu'une petite accumulation de H₂O₂, accompagnée par une activité plus importante de la catalase, ont été notées chez les plantules traitées par l'alternance seule. Il est proposé que l'initiation de la photorespiration a conduit à une plus importante formation de glyoxylate *via* le glycolate au niveau du péroxisome, ce qui induit à une plus grande accumulation de H₂O₂ et à une activation de la catalase. De plus, l'augmentation observée de l'activité de l'APX nous indique qu'il est également possible que la voie de la réaction de Mehler soit impliquée pour améliorer la tolérance face à la photoinhibition. A cet effet, Park et al. (1996) a rapporté que la

photorespiration et l'APX ont la même capacité à atténuer la photoinhibition au niveau du PSII et travaille de concert.

Par ailleurs, il a également été montré que les réductions de teneurs en pigments chlorophylliens sont réduites en présence du prétraitement par l'alternance. Il est possible que l'activité photorespiratoire, et notamment la participation des mitochondries, modifient les répartitions entre les voies cytoplasmiques et chloroplastiques impliquées dans la synthèse de l'IPP et améliore ainsi la tolérance en stimulant la voie du mévalonate. (Ji and Hatzios, 1992; Hsieh and Goodman, 2005; Hemmerlin et al., 2012).

- effet de l'alternance sur la modification du fonctionnement du cycle circadien

Le rythme circadien est un mécanisme biologique qui permet une adaptation anticipée aux variations journalières et saisonnières de l'environnement. Ce rythme est un état endogène mais il peut également répondre aux changements externes de cycles lumière/obscurité. Le rythme circadien de la plante a le potentiel pour jouer un rôle important dans la coordination du métabolisme et l'adaptation aux changements environnementaux (Farré and Weise, 2012). De plus, Sanchez et al. (2011) a indiqué que les cycles transitoires de lumière/obscurité pourraient avoir un effet sur l'horloge circadienne de la plante *via* une commande dynamique des processus physiologiques, comprenant la détermination des niveaux des métabolites primaires et secondaires, et l'anticipation de futures contraintes environnementales. Ainsi, une horloge circadienne prévoit en incitant des événements physiologiques selon les changements entre le jour et la nuit. De cette manière, les réponses des plantes aux stress environnementaux à venir peuvent être atténuées d'une manière plus appropriée. Il a été suggéré que le cycle circadien contrôle l'expression des gènes spécifiques qui pourraient atténuer l'effet de l'excès des photons (Beator and Kloppstech, 1996). Il a été décrit qu'une stimulation des enzymes antitoxines (Erdei et al., 1998), une accumulation des composants antioxydants comme l'acide ascorbique (Kiyota et al., 2006) et des hormones majeurs ayant un rôle de défense comme les acides jasmonique (JA) (Kim et al., 2011), salicylique (SA) et abscissique (ABA) (Covington et al., 2008) sont réalisées sous contrôle circadien.

Dans notre étude, l'alternance a conduit à stimuler le système enzymatique et non enzymatique de la détoxification des ERO. Cela s'est traduit par une augmentation des activités de l'APX et de la MDHAR et de la synthèse de l'acide ascorbique et de certaines composées phénoliques comme l'acide chlorogénique et la rutine. L'alternance a un effet sur le rythme circadien qui a également un contrôle sur les fournitures en carbone et en particulier

sur la dégradation de l'amidon (Graf et al., 2010), ce qui peut expliquer l'accumulation de l'amidon qui a été observée au cours des analyses cytohistologiques chez les plantules de tabac traitées par l'alternance seule. Il est important de souligner que les mécanismes impliqués dans la régulation du rythme circadien sont essentiellement liés aux changements dans l'expression des gènes. Chez *Arabidopsis*, il a été rapporté que 36 % de l'expression des gènes sont sous la régulation du rythme circadien (Michael and McClung, 2003). Pour une compréhension approfondie de l'effet probable de l'alternance sur le cycle circadien de la plante, d'études génétiques et des analyses de leurs effets sur la réglementation des taux de protéines, les modifications des protéines et des quantités de métabolites sont nécessaires.

L'alternance de cycles courts de lumière/obscurité: un effet "priming"

L'application, avant émergence ou avant la transplantation, du clomazone peut induire des dommages importants dans les récoltes non ciblées. Nurse et al. (2006) ont montré que l'application de clomazone à une concentration de 720 gha^{-1} avant la transplantation de plants de tomate, a conduit à des dommages visibles à la récolte. Lorsque le clomazone est appliqué avant émergence, à des concentration de 1116 à 2232 gha^{-1} , les dommages observés dans la récolte d'abricot étaient de 5 à 11 % (Sikkema et al., 2007). Après son application, le clomazone se maintient dans le milieu de culture ce qui peut conduire à une perte de la qualité et de la productivité des récoltes suivantes. Par exemple, le clomazone a été détecté après 130 jours de son application dans les champs de riz (Zanella et al., 2002). Pour répondre à cette problématique, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le prétraitement par l'alternance de cycles de lumière/obscurité aurait un effet positif à long terme sur la tolérance des plantes de tabac, lorsqu'elles sont cultivées dans un sol traité par le clomazone en serre.

Nos résultats montrent que le prétraitement par l'alternance a amélioré la capacité systémique des plantes à éviter le stress photooxydatif induit par le clomazone. Cet effet de l'alternance a été observé pour tous les paramètres et les stades de croissance. L'impact protecteur de l'alternance à long terme, semble indiquer que les mécanismes impliqués (augmentation de la capacité antioxydante, amélioration de l'efficacité du transport des électrons, stimulation des voies alternatives de transport des électrons, possible modification de la voie de synthèse de l'IPP) perdurent pendant toute la durée de la vie de plante, alors qu'ils ont été initiés au stade plantule et pendant trois jours seulement.

Cet effet dit de "priming" pourrait être utilisé pour améliorer la production ou la tolérance à d'autres stress et pour d'autres espèces.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude sur les effets de faibles concentrations de clomazone, sur le mode d'action et les éléments impliqués dans la tolérance, ainsi que le mécanisme de protection *via* l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité chez le tabac, s'inscrit dans une optique de développement de la tolérance des plantes face au stress photooxydatif par le phénomène dit de "priming". Elle permet aussi de proposer des protocoles d'usage pour des cultures sur des sols hautement pollués en clomazone par exemple, elle peut servir à améliorer des protocoles d'utilisation des herbicides en agriculture ou encore être utilisée dans des programmes de détection de la présence d'herbicides.

Vers un modèle de l'effet du clomazone et des mécanismes impliqués dans sa tolérance

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence grâce aux mesures des teneurs en pigments photosynthétiques et du rendement de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne (*test OJIP*) que le clomazone avait un effet photoinhibiteur. Ces premiers résultats encourageants nous ont permis de poursuivre notre travail et de prendre en compte l'impact d'autres facteurs impliqués dans la toxicité du clomazone comme dans la tolérance. Pour cela, un suivi du fonctionnement du transport des électrons, au niveau du PSII et du PSI, c'est à dire du côté donneur et du côté accepteur, a été réalisé en présence de clomazone. Ceci a été systématiquement complété par des analyses cytohistologiques des tissus afin de visualiser les dommages sur les structures cellulaires.

Nous avons établi que les effets du clomazone se manifestent principalement *via* la diminution de pool de plastoquinones, responsable de l'inhibition du transport d'électrons à partir du photosystème II et la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que les dommages fonctionnels et structurels au sein des complexes du photosystème II. La tolérance face au clomazone pourrait être liée à l'état de LHC, l'état redox du pool de PQ, et aux activités des enzymes antioxydantes de la détoxification des ERO.

Nos travaux ont mis en lumière un effet dit de "priming" du prétraitement par l'alternance de cycles courts de lumière/obscurité en réponse au stress photooxydatif induit par clomazone. Il est proposé que cet effet se soit manifesté par une amélioration du transport des électrons et de la réoxydation du pool de plastoquinone *via* (i) une initiation des voies alternatives d'électrons, par conséquent une génération moindre des ERO et, (ii) un effet sur le rythme circadien et son rôle stimulateur des systèmes de détoxification des ERO, qui comprend les activités des enzymes antioxydantes (APX, MDHAR, DHAR et GR) et la synthèse des composants antioxydantes (l'ascorbate et certains composés phénoliques).

CONCLUSION GENERAL ET PERSPECTIVES

Compte tenu de la protection initiée par l'alternance au cours de la croissance des plantes de tabac en présence de clomazone, nous soulignons l'efficacité de ce mécanisme comme facteur important dans la résistance des variétés sensibles de tabac au stress photooxydatif. Ce mécanisme pourrait être utilisé dans d'autres travaux visant au maintien de la qualité et à la productivité des variétés.

Ce travail propose également la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne (test *OJIP*) comme outil, non invasif et très simple d'utilisation, pour permettre de détecter de très faibles doses d'herbicides.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives. Dans un premier temps, pour compléter cette étude et confirmer les hypothèses émises sur les variations de tolérance des deux variétés aussi bien que sur les effets de l'alternance, il serait intéressant de caractériser les effets du clomazone et de l'alternance de manière précise sur:

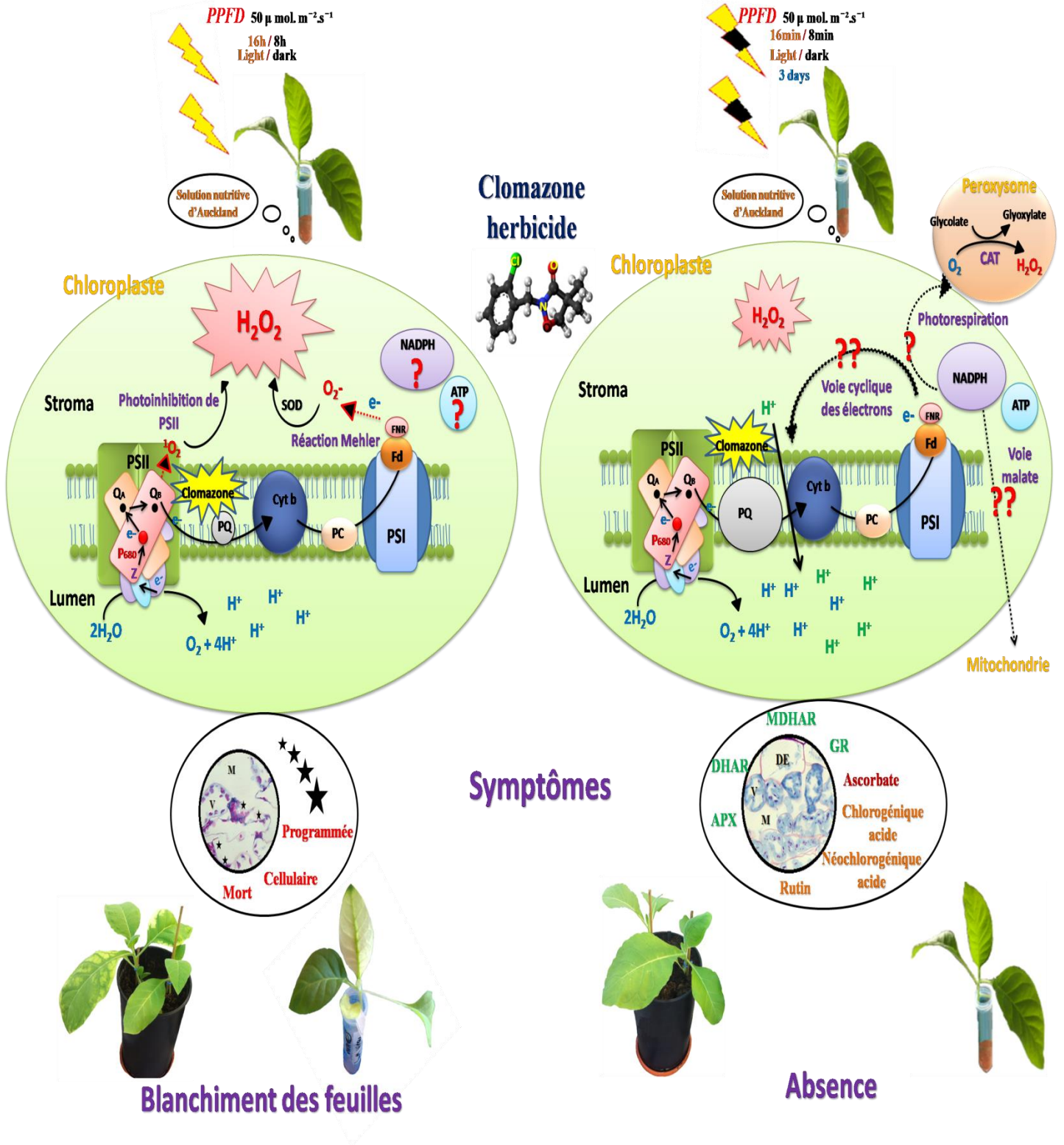
- les voies alternatives de transport des électrons, en particulier la photorespiration et les réactions de Mehler (d'autres voies alternatives comme la chlororespiration également);
- la production des espèces réactives de l'oxygène et leur nature, ce qui permettrait de définir précisément leur origine, PSII ou PSI ?
- les voies de synthèse de l'IPP et de connaître quelle est l'importance de la stimulation de la voie du mévalonate dans la tolérance ou les effets de l'alternance.

Enfin, le rôle de l'accumulation d'amidon en réponse à l'alternance et au clomazone n'a pas clairement été établi. Il est possible qu'il soit impliqué dans la régulation de la voie de synthèse de l'IPP et ceci mériterait également d'être approfondi.

Les effets de l'alternance, à travers les modifications du rythme circadien sont tels que des études plus globales de l'expression des gènes ou de métabolomique, permettraient de mettre en lumière les voies métaboliques les plus impactés et déterminantes.

Il est bien sûr nécessaire d'étudier l'impact de l'alternance et les variations de tolérance du clomazone chez d'autres espèces végétales. Des travaux supplémentaires sur d'autres espèces permettront de valider les hypothèses émises et également de confirmer l'efficacité du prétraitement d'alternance de cycles courts de lumière.

CONCLUSION GENERAL ET PERSPECTIVES



Modèle proposé pour la réponse des plantes de tabac au stress photooxydatif induit par clomazone, et au prétraitement par l'alternance de cycles courts lumière/obscurité.

Références bibliographiques

A

- Adir, N., Zer, H., Shochat, S., Ohad, I. 2003. Photoinhibition- a historical perspective. *Photosynth. Res.* 76, 343–370.
- Agati, G., Tattini, M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* 186, 786–793.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M. 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiol. Biochem.* 72, 35–45.
- Akowauh, G.A., Zhari, I., Norgyati, I., Sadikun, A., Khamsah, S.M. 2004. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chem.* 87, 559–566.
- Allen, J.F. 2003. State transitions-a question of balance. *Science* 299, 1530–1532.
- Arrigoni, O., De Tullio, M.C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta* 1569, 1–9.
- Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141, 391–396.
- Aver'yanov, A.A., Lapikova, V.P., Pasechink, T.D., Abramova, O.S., Gaivoronskaya, L.M., Kuznetsov, V.V., Baker, C.J. 2014. Preillumination of rice blast conidia induces tolerance to subsequent oxidative stress. *Fungal Biol.* 118, 743–753.

B

- Barber, J., Kuhlbrandt, W. 1999. Photo system II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 469–475.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E. 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* 55, 1607–1621.

- Barra, M., Haumann M., Dau., H. 2005. Specific loss of the extrinsic 18 kDa protein from photosystem II upon heating to 47 degrees C causes inactivation of oxygen evolution likely due to Ca release from the Mn-complex. *Photosynth. Res.* 84, 231–237.
- Basu, P.S., Sharma, A., Sukumaran, N.P. 1998. Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress. *Photosynthetica* 35, 13–19.
- Beator, J., Kloppstech, K. 1996. Significance of circadian gene expression in higher plants. *Chronobiol. Int.* 13, 319–339.
- Bennoun, P. 2001. Chlororespiration and the process of carotenoids biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1506, 133–142.
- Böger, P. 1996. Mode of action of herbicides affecting carotenogenesis. *J. Pestic. Sci.* 21, 473–478.
- Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489–504.
- Bowyer, J.R., Camilleri, P., Vermaas, W.F.J. 1991. Photosystem II and its interaction with herbicides. In: Baker, N.R., Percival, M.P., (Eds), *Herbicides, Topics in Photosynthesis*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 10, 27–85.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.
- Bricker, T.M., Frankel, L.K. 2002. The structure and function of CP47 and CP43 in photosystem II. *Photosynth. Res.* 72, 131–146.
- Busch, F.A. 2012. Current methods for estimating the rate of photorespiration in leaves. *Plant Biol.* doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00694.x.

C

- Chang, J.H., Konz, M.J., Aly, E.A., Sticker, R.E., Wilson, K.R., Korg, N.E., Dickson, P.E. 1997. 3-Isoxalidones and related compounds a new class of herbicides, In: Baker, D.R., Fenyes, J.G., Moberg, W.K., Cross, B., (Eds), *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*. ACS Symposium series 355, American chemical society, Washington, pp. 10–23.
- Close, D.C., McArthur, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics – protection from photodamage, not herbivores? *Oikos* 99, 166–172.

- Covington, M.F., Maloof, J.N., Straume, M., Kay, S.A., Harmer, S.L. 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.* 9:130.
- Cumming, J.P., Doyle, R.B., Brown, P.H. 2002. Clomazone dissipation in four Tasmanian top soils. *Weed Sci.* 50, 405–409.

D

- Dall'Osto, L., Lico, C., Alric, J., Giuliano, G., Havaux, M., Bassi, R. 2006. Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. *BMC Plant Biol.* 6, 32.
- Dekker, J.P., Boekema, E.J. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 12–39.
- Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the carotenoid zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 1–24.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W.I.I.I. 1996. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10, 403–12.
- Demmig-Adams, B., Adams, W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21–26.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Duke, S.O., Kenyon, W.H., Paul, R.N. 1986. Effects dimethazone (FMC-57020) on the development of chloroplast in pitted morning-glory (*Ipomoea lacunosa*) cotyledons. *Weed Sci.* 33, 786–794

E

- El Maataoui, M., Pichot, C. 1999. Nuclear and cell fusion cause polyploidy in the megagametophyte of common cypress, *Cupressus sempervirens* L. *Planta* 208, 345–51.
- Erdei, L., Szegletes, Z., Barbarás, K.N., Pestenacs, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth, B., Dér, A. 1998. Changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *J. Plant Physiol.* 152, 265–271.

F

- Farineau, J., Morot-Gaudry, J.F. 2011. La photosynthèse: Processus physiques, moléculaires et physiologiques. Editions Quae, Paris, France, pp. 179–200.
- Farré, E.M., Weis S.E. 2012. The interactions between the circadian clock and primary metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 293–300.
- Ferhatoglu, Y., Barret, M., Chapell, J. 2001. 5-Ketoclomazone Inhibits 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase of non-melavonate pathway of isoprenoids biosynthesis. In: Proceeding of 2001 National Meeting Expert Committee on Weeds, Quebec City, Canada, pp. 52–53.
- Ferhatoglu, Y., Barrett, M. 2006. Studies of clomazone mode of action. *Pestic. Biochem. Physiol.* 85, 7–14.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831–1838.
- Force, L., Critchley, C., van Rensen, J.J.S. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test, *Photosynthesis Res.* 78, 17–33.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21–25.
- Foyer, C.H., Descourvières, P., Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, 507–523.
- Foyer, C., Noctor, G. 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxid. Redox Sign.* 4, 861–905.
- Formaggio, E., Cinque, G., Bassi, R. 2001. Functional architecture of the major light harvesting complex from higher plants. *J. Mol. Biol.* 314, 1157–1166.
- Frank, H.A., Cogdell, R.J. 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63, 257–64.
- Frankart, C., Eullaffroy, P., Vernet, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lema minor*. *Environ. Exp. Bot.* 49, 159–168.
- Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15, 381–392.

G

- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28, 1091–101.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92.
- Gergoff Grozeff, E.G., Chaves, A.R., Bartoli, C.G. 2013. Low irradiance pulses improve postharvest quality of spinach leaves (*Spinacia oleracea* L. cv Bison), *Postharvest Biol. Tec.* 77, 35–42.
- Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Golding, A.J., Johnson, G.N. 2003. Down regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218, 107–114.
- Gonzales-Barreiro, O., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C. 2004. Atrazine induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 301–307.
- Goodspeed T.H. 1954. The genus *Nicotiana*. (éd Waltham, Mass.), USA, pp. 310.
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., Smith, A.M. 2010. Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 9458–63.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., Saenger, W. 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334–342.

H

- Halliwell, B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.
- He, J., Chee, C.W., Goh, C.J. 1996. "Photoinhibition" of Heliconia under natural tropical conditions: the importance of leaf orientation for light interception and leaf temperature, *Plant Cell Environ.* 19, 1238–1248.
- Hemmerlin, A., Harwood, J.L., Thomas, J.B. 2012. A raison *d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 51, 95–148.

- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655–684.
- Horton, P., Wentworth, M., Ruban, A. 2005. Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett.* 579, 4201–4206.
- Hsieh, M.H., Goodman, H.M. 2005. The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 138, 641–653.

I

- Igamberdiev, A.U., Romanowska, E., Gardeström, P. 2001. Photorespiratory flux and mitochondrial contribution to energy and redox balance of barley leaf protoplasts in the light and during light-dark transitions. *J. Plant Physiol.* 158, 1325–1332.

J

- Jahns, P., Latowski, D., Strzalka, K. 2008. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 3–14.
- Ji, W., Hatzios, K.K. 1990. Regulation of HMG-CoA reductase in corn by selected herbicides. *Proc. South. Weed Sci.* 43, 350–354.
- Ji, W., Hatzios, K.K. 1992. Pretreatment with bleaching herbicides alleviates the light-induced inhibition of maize 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 42, 54–63.
- Johnson, G.N. 2011. Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 384–389.
- Joly, D. 2007. Effets des plastoquinones sur la dissipation d'énergie des photosystèmes, Mémoire de maîtrise, Université du Québec a Trois-Rivières.

K

- Kalaji, M.H., Carpentier, R., Allakhverdiev, I.S., Bosa, K. 2012. Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. *J. Photochem. Photobiol.* 112, 1–6.

- Kamiya, N., Shen, J.R. 2003. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 98–103.
- Kaňa, R., Šponduva, M., Ilik, P., Lazar, D., Klem, K., Tomek, P., Nauš, J., Prašil, O. 2004. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum Vulgare* L.). Pestic. Biochem. Physiol. 78, 161–170.
- Kautsky, H., Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensäure assimilation. Naturwissenschaften. 19, pp. 964.
- Kim, J.S., Jung, S., Hwang, I.T., Cho, K.Y. 1999. Characteristics of chlorophyll *a* fluorescence induction in cucumber cotyledons treated with diuron, norflurazon, and sulcotrione. Pestic. Biochem. Phys. 49, 159–168.
- Kim, S.G., Yon, F., Gaquerel, E., Gulati, J., Baldwin, I.T. 2011. Tissue specific diurnal rhythms of metabolites and their regulation during herbivore attack in a native tobacco, *Nicotiana attenuata*., doi: 10.1371/journal.pone.0026214.
- Kitajima, M., Butler, W.L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochim. Biophys. Acta 376, 105–115.
- Kiyota, M., Numayama, N., Goto, K. 2006. Circadian rhythms of the L-ascorbic acid level in *Euglena* and spinach. J. Photochem. Photobiol. 184, 197–203.
- Knapp, S., Chase, M.W., Clarkson, J.J. 2004. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). Taxon. 53, 73–82.
- Kok, B. 1953. Experiments on photosynthesis by *Chlorella* in flashing light. In: Burlew, J.S. (Ed), Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant, Carnegie Institution of Washington 600, Washington, USA, pp. 63–75.
- Kok, B., Forbush, B., McGloin, M. 1970. Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution-1. A linear four step mechanism. Photochem. Photobiol. 11, 467–475.
- Kramarenko, G.G., Hummel, S.G., Martin, S.M., Buettner, G.R. 2006. Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. Photochem. Photobiol. 82, 1634–1637.
- Krause, G.H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313–439.
- Kreslavski, V.D., Shirshikova, G.N., Lyubimov, V.Y., Shmarev, A.N., Boutanaev, A.M., Kosobryukhov, A.A., Schmitt, F.J., Friedrich, T., Allakhverdiev, S.I. 2013. Effect of preillumination with red light on photosynthetic parameters and oxidant-/antioxidant

balance in *Arabidopsis thaliana* in response to UV-A. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 127, 229–236.

L

Lee, Y.K., Pirt, S.J. 1981. Energetics of photosynthetic algal growth: influence of intermittent illumination in short (40s) cycles. *J. Gen. Microbiol.* 124, 43–52.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthesis biomebranes, in: Colowick, S.P., Kaplan, N.O., (Eds), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 1987, pp. 350–382.

Lutzow, M., Beyer, P., Kleinig, H. 1990. The herbicide command does not inhibit the prenyl diphosphate-forming enzymes in plastids. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 45, 856–858.

M

Malkin, R., Niyogi, K. 2000. Photosynthesis. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp. 568–628.

Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence– a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.

Mehler, A.H. 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 65–77.

Merchuk, J.C., Ronen, M., Giris, S., Arad, S.M. 1998. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium sp.* *Biotechnol. Bioeng.* 59, 705–713.

Michael, T.P., McClung, C.R. 2003. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 629–39.

Miyake, C., Asada, K. 1994. Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* 35, 539–549.

Miyake, C. 2010. Alternative Electron Flows (Water–Water Cycle and Cyclic Electron Flow Around PSI) in Photosynthesis: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Plant Cell Physiol.* 51, 1951–1963.

Murchie, E.H., Niyogi, K.K. 2011. Manipulation of photoprotection to improve of the photosynthesis. *Plant physiol.* 155, 86–92.

- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H. 2013. Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum Lycopersicon L. cv Microtom*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19, 363–378.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H. 2014. Effect of salt stress on antioxidant systems depends on fruit development stage. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 20, 15–29.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., Sallanon, H. 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal. Biochem.* 383, 320–322.

N

- Nakano, Y., Asada, K. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.* 21, 1295–1307.
- Nedbal, L., Tichy, V., Xiong, F.H., Grobbelaar, J.U. 1996. Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *J. Appl. Phycol.* 8, 325–333.
- Neubauer, C., Schreiber, U. 1987. The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Zeitschrift fur Naturforschung* 42, 1246–1254.
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Murata, N. 2006. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 742–749.
- Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333–359.
- Noctor, G., Foyer, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Nurse, R.E., Robinson, D.E., Hamill, A.S., Sikkema, P.H. 2006. Annual broadleaved weed control in transplanted tomato with clomazone in Canada. *Crop Prot.* 25, 795–799.

O

- Oliveira, J.G., Costa Aguiar Alves, P.L., Vitória, A.P. 2009. Alterations in chlorophyll *a* fluorescence, pigment concentrations and lipid peroxidation to chilling temperature in coffee seedlings, *Environ. Exp. Bot.* 67, 71–76.
- Ort, R.D., Baker, N.R. 2002. A protective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis?. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 193–198.

P

Park, Y.I., Chow, W.S., Osmond, C.B., Anderson, J.N. 1996. Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of photosystem II in vivo. *Photosynth. Res.* 50, 23–32.

R

Roland, P., Ulrich, S., Manfred, J., Wilfried, F.W., Siegfried, J. 2006. Lateral diffusion of CO₂ from shaded to illuminated leaf parts affects photosynthesis inside homobaric leaves. *New Phytol.* 169, 779–788.

Rohaček, K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40, 13–29.

Roose, J.L., Wegener, K.M., Pakrasi, H.B. 2007. The extrinsic proteins of Photo system II. *Photosynth. Res.* 92, 369–387.

Ruban, A.V., Berera, R., Iliaia, C., Van Stokkum, I.H.M, Kennis, J.T.M., Pascal, A.A., Van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P., Van Grondelle., R. 2007. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* 450, 575–578.

Rutherford, W.A., Krieger-Liszkay, A. 2001. Oxidative stress induced by herbicides in the photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* 26, 648–653.

S

Sanchez, A., Shin, J., Davis, S.J. 2011. Abiotic stress and the plant circadian clock. *Plant Signal. Behav.* 6, 223–231.

Sandona, D., Croce, R., Pagano, A., Crimi, M., Bassi, R. 1998. Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 207–214.

Sano, S., Tao, S., Endo, Y., Inaba, T., Hossain, M.A., Miyake, C., Matsuo, M., Aoki, H., Asada, K., Saito, K. 2005. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 762–772.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403, 136–138.

- Senseman, S.A. 2007. Herbicide Handbook, Ed 9, Weed Science Society of America, Lawrence, KS, pp. 224–226.
- Šetlík, I., Allakhverdiev, S.I., Nedbal, L., Šetlíková, E., Klimov V.V. 1990. Three types of Photosystem II photoinactivation. 1. Damaging processes on the acceptor side. Photosynth. Res. 23, 39–48.
- Scheibe, R. 1987. NADP-malate dehydrogenase in C₃-plants: regulation and role of a light-activated enzyme. Physiol. Plant. 71, 393–400.
- Schreiber, U. 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. Photosynth. Res. 9, 261–272.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynth. Res. 10, 51–62.
- Sharkey, T.D., Stitt, M., Heineke, D., Gerhardt, R., Raschke, K., Heldt, W. 1986. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism II. O₂-Insensitive CO₂ Uptake Results from Limitation Of Triose Phosphate Utilization. Plant Physiol. 81, 1123–1129.
- Sikkema, P.H., Shropshire, C., Soltani, N. 2007. Effect of clomazone on various market classes of dry beans, Crop Prot. 26, 943–947.
- Shimaoka, T., Miyake, C., Yokota, A. 2003. Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. Eur. J. Biochem. 270, 921–928.
- Smirnoff, N. 2000a. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 355, 1455–1464.
- Smirnoff, N. 2000b. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 229–235.
- Song, Y.G., Liu, B., Wang, L.F., Li, M.H., Liu, Y. 2006. Damage to the oxygen evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II. Photosynth. Res. 90, 67–78.
- Souza, R.C., Rocha Gomes Ferreira, D.T., Vitorino, H.S., Souza Barbosa, G.V., Endres, L., Ferreira, V.M. 2012. Oxidative stress in *Emilia coccinea* (Asteraceae) caused by a mixture of Clomazone+ Ametryn. IRJPS. 5, 80–87.
- Stahl, W., Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Mol. Aspects Med. 24, 345–351.
- Staehelin, L.A. 2003. Chloroplast structure: From chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. Photosynth. Res. 76, 185–196.

- Stirbet, A., Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the *OJIP* fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol.* 104, 236–257.
- Strasser, R.J., Govindjee. 1991. The F_0 and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae, in: Akoyunoglou, J.H.A., (Ed), Regulation of chloroplast biogenesis. Plenum Press, New York, USA, pp. 423–426.
- Strasser, B.J., Strasser, R.J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP Test, in: Mathis, P., (Ed), Photosynthesis: From Light to Biosphere. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, pp. 977–980.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 1999. Screening the vitality and photosynthetic activity of plants by fluorescence transient, in: Behl, R.K., Punia, M.S., Lather, B.P.S., (Eds), Crop Improvement for Food Security. SSARM, Hisar, India, pp. 72–115.
- Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, in: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P., (Eds), Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation. Taylor & Francis, London, UK, pp. 443–480.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. 2004. Analysis of the chlorophyll fluorescence transient, in: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds), Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 321–362.
- Szabo, I., Bergantino, E., Giacometi, G.M. 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Report.* 6, 629–634.

T

- Takahashi, S., Badger, M.R. 2011. Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Sci.* 16, 53–60.
- Thomber, J. P., Morishige, D. T., Anadan, S., Peter. G. F. 1991. Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids: Chlorophylls, Scheer. H. CRC Press, Londres, pp. 549–585.
- Tomlin, C.D.S. 2000. The Pesticide Manual, 12th ed. The British Crop Protection Council, Surrey, UK, pp. 417–418.

- Tóth, S.Z. 2006. Analysis and application of the fast Chl *a* fluorescence (*OJIP*) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Thesis: Univ. Genève, no. Sc. 3741.
- Trebst, A., Depka, B., Holländer-Czytko, H. 2002. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 516, 156–160.
- Triantaphylidès, C., Havaux, M. 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.* 14, 219–228.
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoerberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., Mueller, M.J. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol.* 148, 960–968.

W

- Warfield, T.R., Carlson, D.B., Bellmann, S.K., Guscar, H.L. 1985. Weed control in soybeans using command, *Weed Sci. Abstr.* 25, 105.
- Weimer, M.R., Balke, N.E., Buhler, D.D. 1992. Herbicide clomazone does not inhibit in-vitro geranylgeranyl synthesis from mevanolate. *Plant Physiol.* 98, 427–432.

V

- Van Amerongen, H., Dekker J.P. 2003. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis, in: Green, B.R., Parson, W.W., (Eds), *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 219–251.
- Van Kooten, O., Snel, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25, 147–150.

Y

- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plants cells against H₂O₂. *Plant physiol.* 115, 1405-1412.
- Yasuor, H., Zou, W., Tolstikov, V.V., Tjeerdema, R.S., Fischer, A.J. 2010. Differential oxidative metabolism and 5-Ketoclomazone accumulation are involved in *Echinochloa phyllopogon* resistance to clomazone. *Plant Physiol.* 153, 319–326.

Z

- Zanella, R., Primel, E.G., Machado, S.L.O., Gonçalves, F.F., Marchezan, E. 2002. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatographia* 55, 573–577.
- Zelitch, I. 1992. Control of plant productivity by regulation of photorespiration. Regulation of photorespiration can have beneficial effects on net photosynthesis. *BioScience* 42, 510–516.
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 °Å resolution. *Nature* 409, 739–743.

Annexes

Le clomazone

1. Identité

Substance active: clomazone

Source de l'information: INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques), ANITTA (Association Nationale Interprofessionnelle et Technique du Tabac)

Activité biologique principale: herbicide

Dose d'homologation: 1 L/h, soit 360 g/h

Famille chimique: isoxazolidinones

CAS: 81777-89-1

SANDRE: [2017](#)

Dénomination: clomazone (ISO)

Nom commercial:

Clomazone PESTANAL[®], Clomazone[®] 3ME, Clomazin[®] 480 EC, Command[®] 360 ME, Command[®] 36 CS, Command[®] 360 CS, Command[®] CS, Centium[™] 36 CS, Cirrus[™] 36 CS, Cirrus[™] CS, Gamit[®] 36 CS, Gamit[®] 360 CS, Gamit[®] CS, Kozone[®] 480 EC

Nom chimique:

Formule moléculaire: C₁₂ H₁₄ ClNO₂

Synonymes:

FMC 57020;

CA: 2-(2-chlorophényl) méthyl-4,4-diméthyl-3-isoxazolidinone)

IUPAC: 2-(2-chlorobenzyl)-4,4-diméthyl-1,2-oxazolidin-3-one

2-(2-chlorobenzyl)-4,4-diméthylisoxazolidin-3-one

Poids moléculaire : 239.7 g/mol

2. Caractéristiques physico-chimiques

2.1. Etat physique: Liquide brun

2.2. Bioaccumulation BFC: 40

2.3. Constante de Henry: 0,0042 Pa. m³. mol⁻¹

2.4. Pression de vapeur: 0,02 Pa à 25 °C

2.5. Température de fusion: 34 °C

2.6. Solubilité dans l'eau: 1102 mg/L

2.7. Hydrolyse (T1/2 en j): stable

2.8. Photolyse (T1/2 en j): stable

2.9. pH: 6.5 à 20 °C

2.10. Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc): 356 L/kg

2.11. Log du coefficient de partage octanol-eau (log Kow): 2,5

2.12. Persistance dans le sol:

Temps de demi-vie varie de 15 à 47 jours en fonction du type de sol et de la teneur en matière organique.

La biodégradation de 90% de la matière active nécessite 160 à 250 jours.

3. Information toxicologique

Effets sur les yeux: Non irritant

Effets sur la peau: Non irritant

Toxicité aiguë par voie orale DL50: 5 000 mg/kg, (rat)

Toxicité aiguë par voie dermique DL50: > 5 000 mg/kg, (rat)

Toxicité aiguë par l'inhalation CL50: > 5,21 mg/L, 4 heures, (rat)

4. Information écotoxicologique

Poisson d'eau douce: CL50 à 96 h = 34 mg/L (crapet arlequin) (légèrement toxique)

Invertébrés estuariens: CL50 à 96 h = 8,9 mg/L (crevette rose) (modérément toxique)

Poisson d'estuaire: CL50 = 6,3 mg/L (capucette) (modérément toxique)

Poisson d'estuaire: CL50 = 41 mg/L (capucette) (légèrement toxique)

Invertébrés estuariens: CL50 = 0,57 mg/L (Mysidacés) (hautement toxique)

Gibier à plumes d'eau/terrestre sédentaire:

Orale: DL50 > 2510 mg/kg

Alimentaire: CL50 > 5620 ppm (faible toxicité)

Matériels

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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



Figure 2. Spectrophotomètre biochrom Libra S22

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

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

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

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

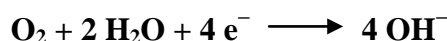


Figure 3. Le lecteur de microplaque PowerWave HT

4. L'électrode de Clark

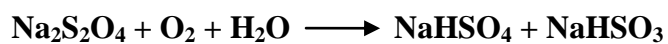
Le taux de transfert des électrons a été déterminé par polarographie à la température de la pièce en mesurant l'oxygène dégagé ou consommé grâce à une électrode de Clark ([Oxygraph système DW1, Hansatech Instruments, Norfolk, UK](#)). Le signal émis lors du changement de la concentration en oxygène dans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

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



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

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



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

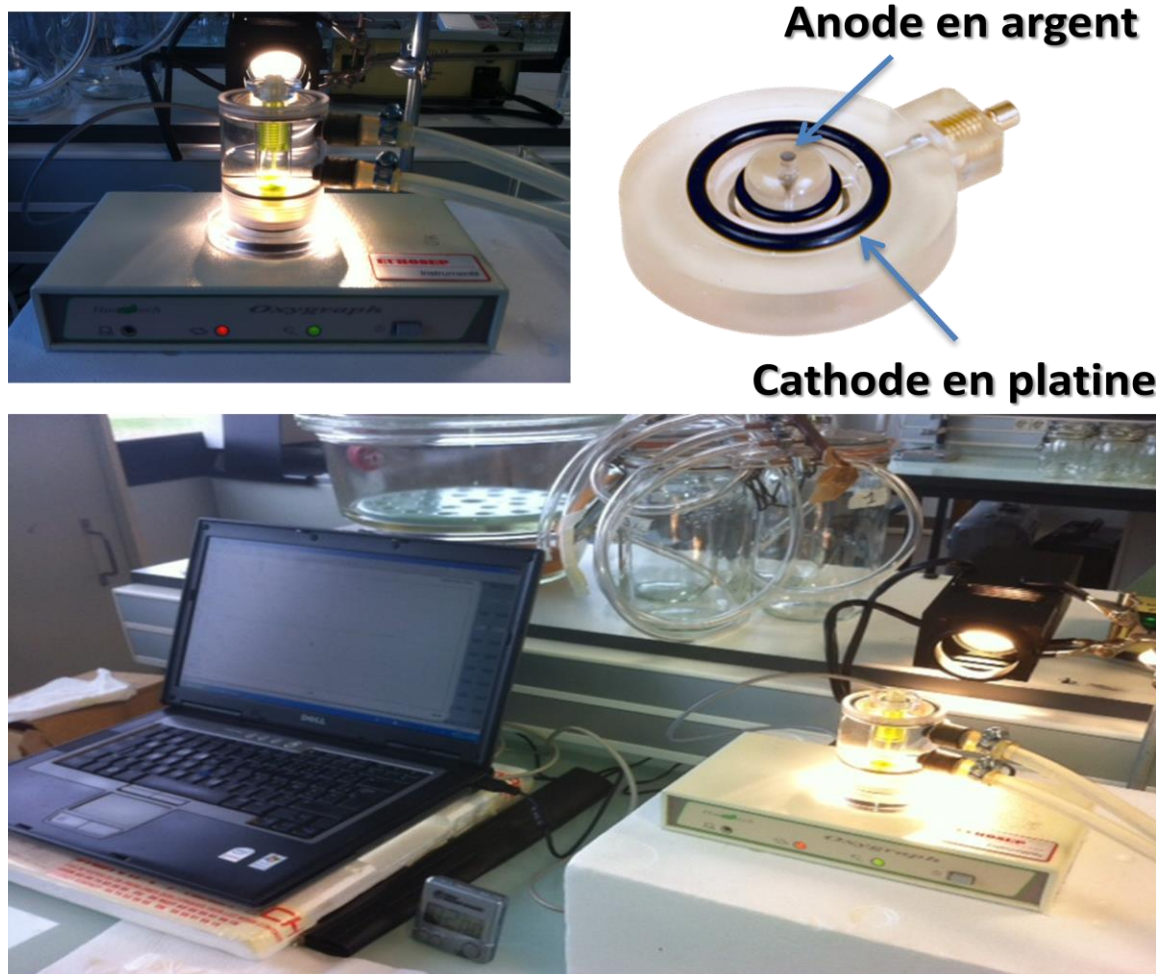


Figure 4. Électrode d'oxygène de Clark

5. Handy-PEA

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

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

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

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

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



Figure 5. Chlorophylle fluorimètre d'Handy-PEA

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

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

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

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

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

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

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

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

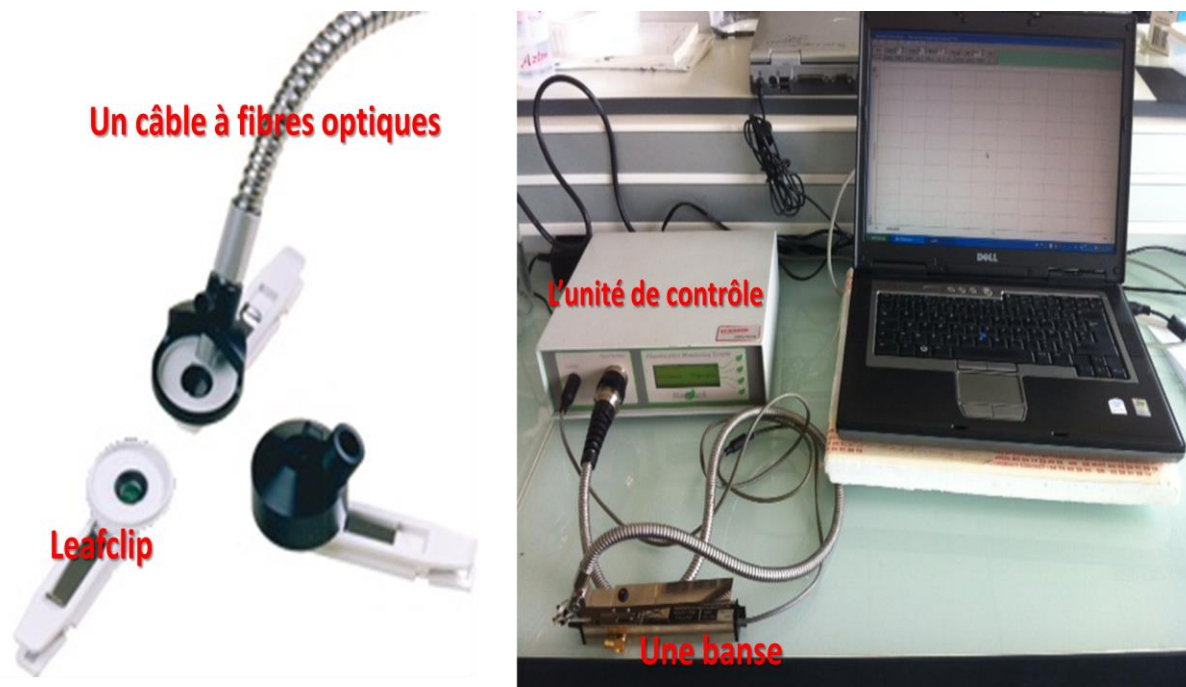


Figure 6. Fluorescence chlorophyllienne fluorimètre FMS1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

S: la surface foliaire, cm²

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

8. Microscope photonique (Leica Digital Microscope 2000)

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

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

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

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



Figure 8. Leica DM 2000

Résumé

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

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

Abstract

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

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

