

L'autofluorescence des végétaux :
De la cellule au couvert végétal, une sonde pour le suivi
non-destructif

14 octobre 2010

Yves Goulas

Laboratoire de Météorologie Dynamique
UMR8539
Ecole Polytechnique
91128 PALAISEAU



Laboratoire de Météorologie Dynamique

Présentation

Objet de recherche : mécanismes, évolution, prévision des phénomènes météorologiques et du climat, pollution atmosphérique, atmosphères planétaires.

3 sites : Ecole Normale Supérieure, Université Paris 6, Ecole Polytechnique

Membre de l'Institut Pierre Simon Laplace, regroupe 6 laboratoires de recherche en sciences de l'environnement situés en Ile de France

Approches théoriques, Développements instrumentaux pour l'observation, modélisations numériques

200 personnes (y compris doctorants, post-docs), 7 équipes



Sciences de
l'environnement

Institut
Pierre
Simon
Laplace



Equipe ABC(t) : Atmosphère – Biosphère - Climat - Télédétection

Etude des processus climatiques, dans l'atmosphère, et aux interfaces
Observation et développement instrumental

thèmes de recherches principaux :

- Nuages et vapeur d'eau
- Gaz à effet de serre (CO₂, CO, CH₄)
- Aérosols
- Végétation : fluorescence, propriétés radiatives
- Feux de biomasse

Groupe Fluorescence : 6 personnes (*I. Moya, Y. Goulas, A. Ounis, S. Champagne, F. Daumard (postdoc), A. Fournier(doc)*)

Objectif des recherches : Etude des signaux optiques des plantes pour caractériser l'état physiologique : fluorescence, réflectance visible

Bilan énergétique de la feuille

Photosynthetic Active Radiation

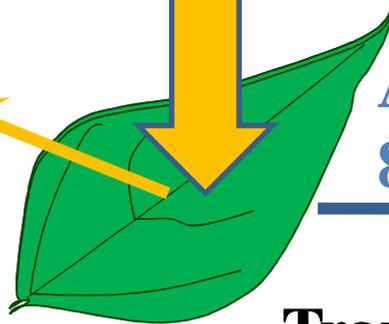
(PAR : 400-700 nm)

2000 $\mu\text{moles photons/m}^2/\text{s}$

($\sim 450 \text{ W/m}^2/\text{s}$)

Reflected

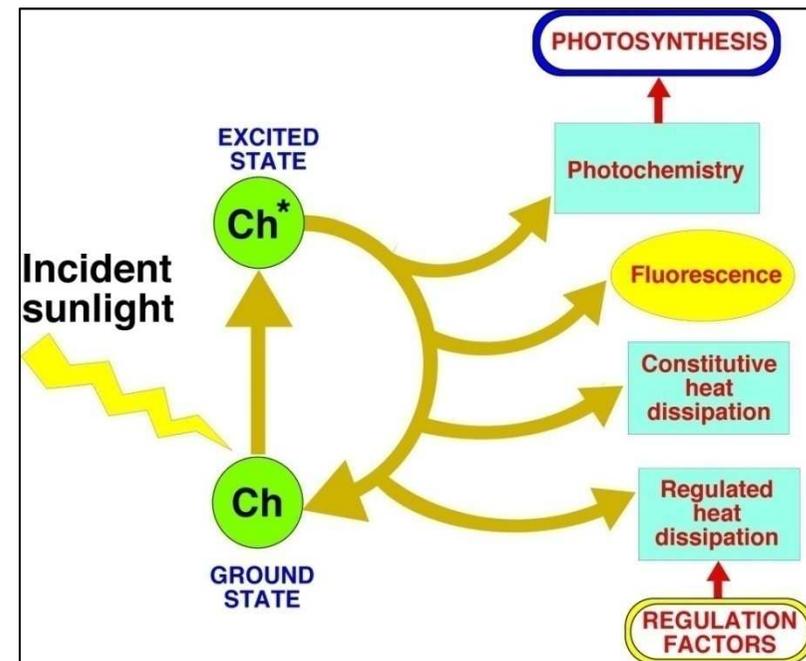
6-10%



Absorbed
80-90%

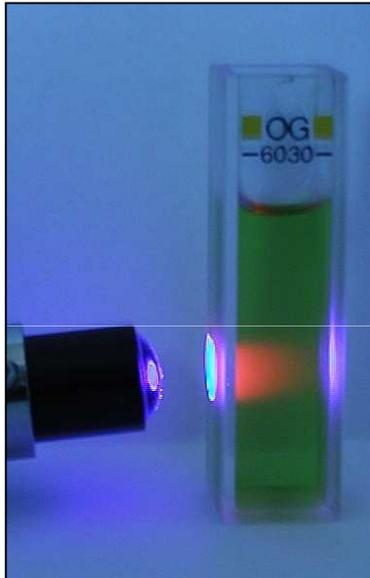
Transmitted

3-10%

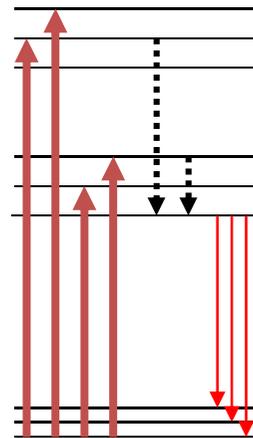


Fluorescence de la chlorophylle a

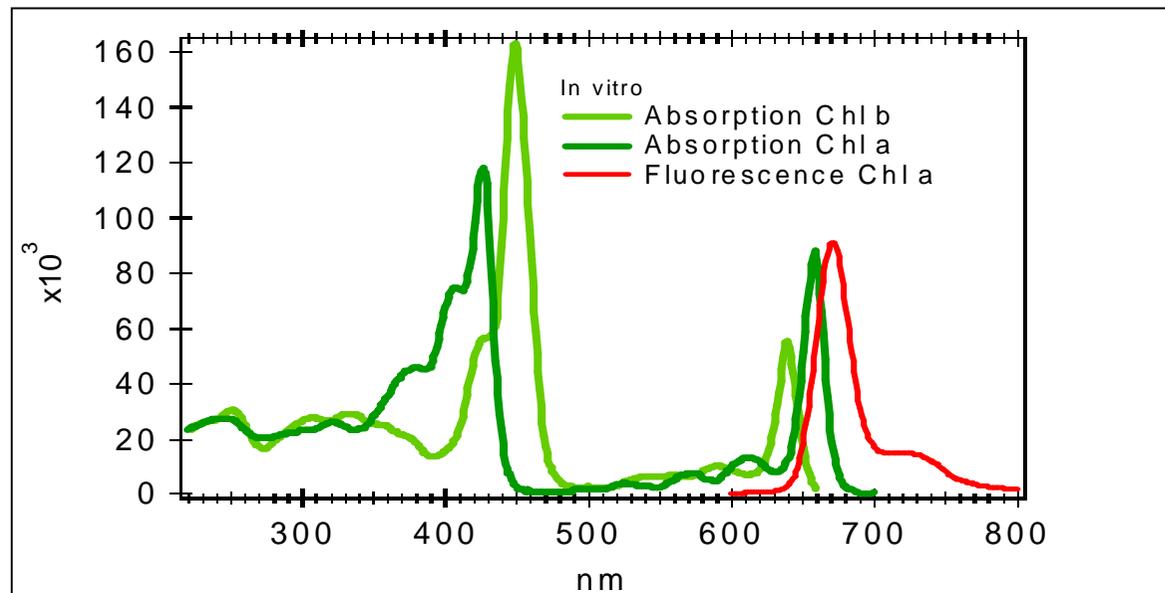
In vitro



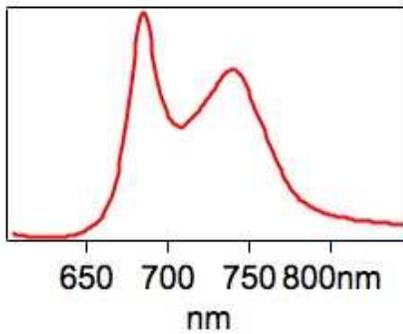
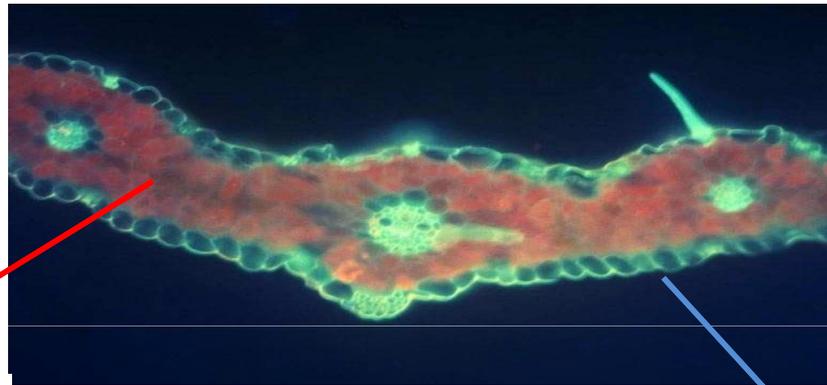
Observation de la fluorescence de la chlorophylle



- Excitation
- Conversion interne
- Fluorescence

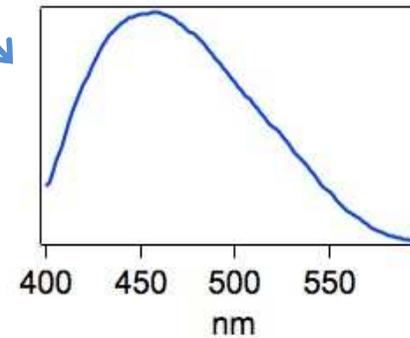


Fluorescence in vivo



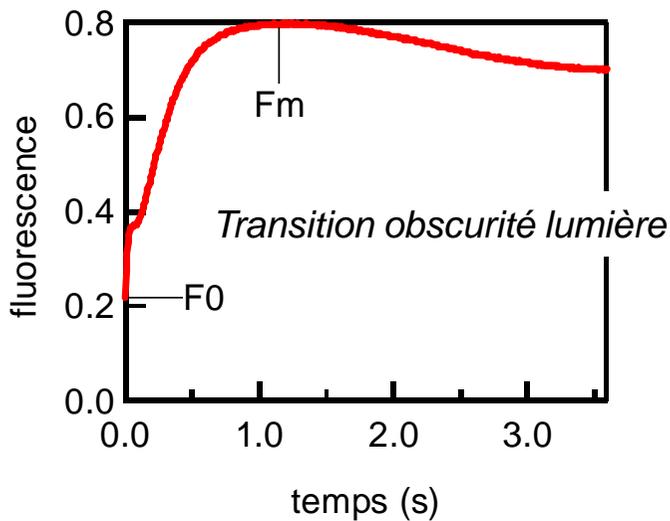
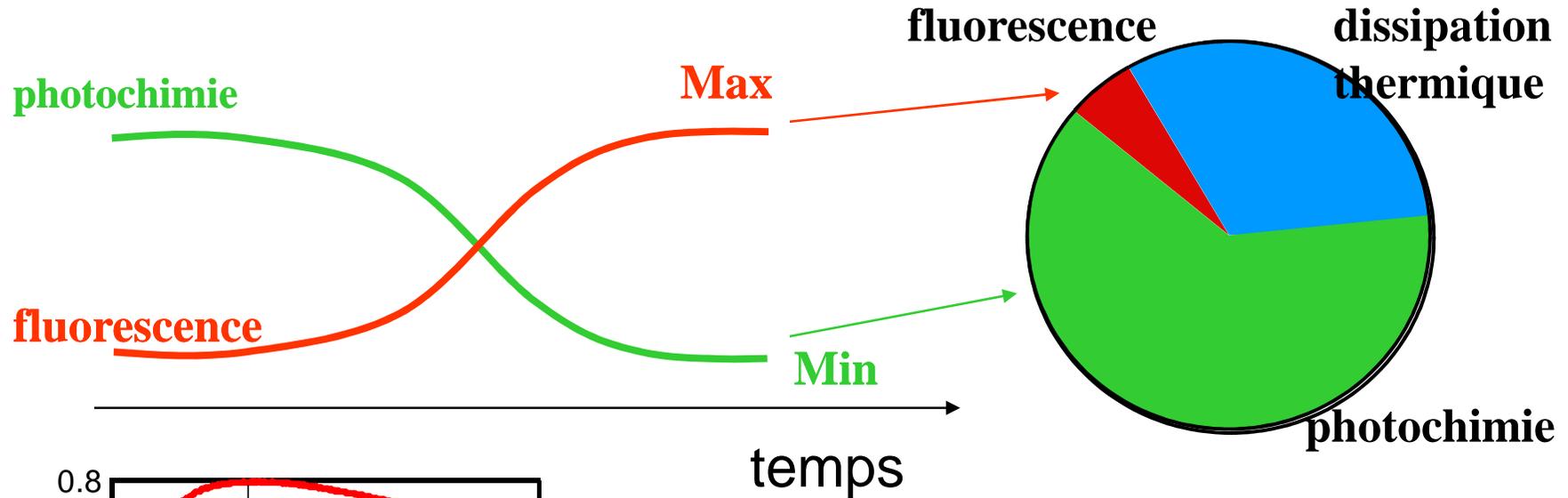
chlorophylle a
variable
photostynthèse

Section d'un feuille de blé en autofluorescence UV



polyphénols
métabolisme secondaire

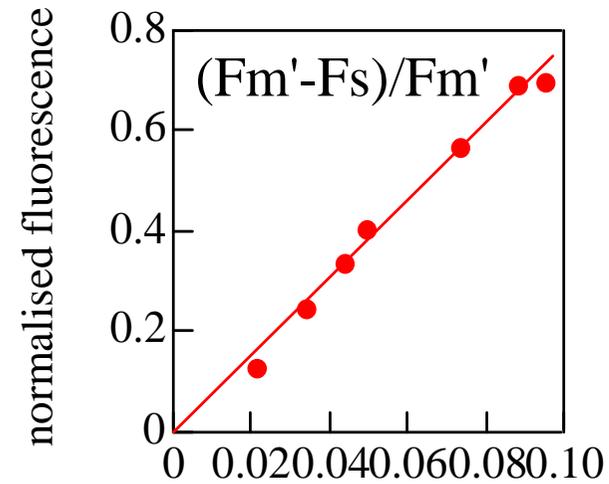
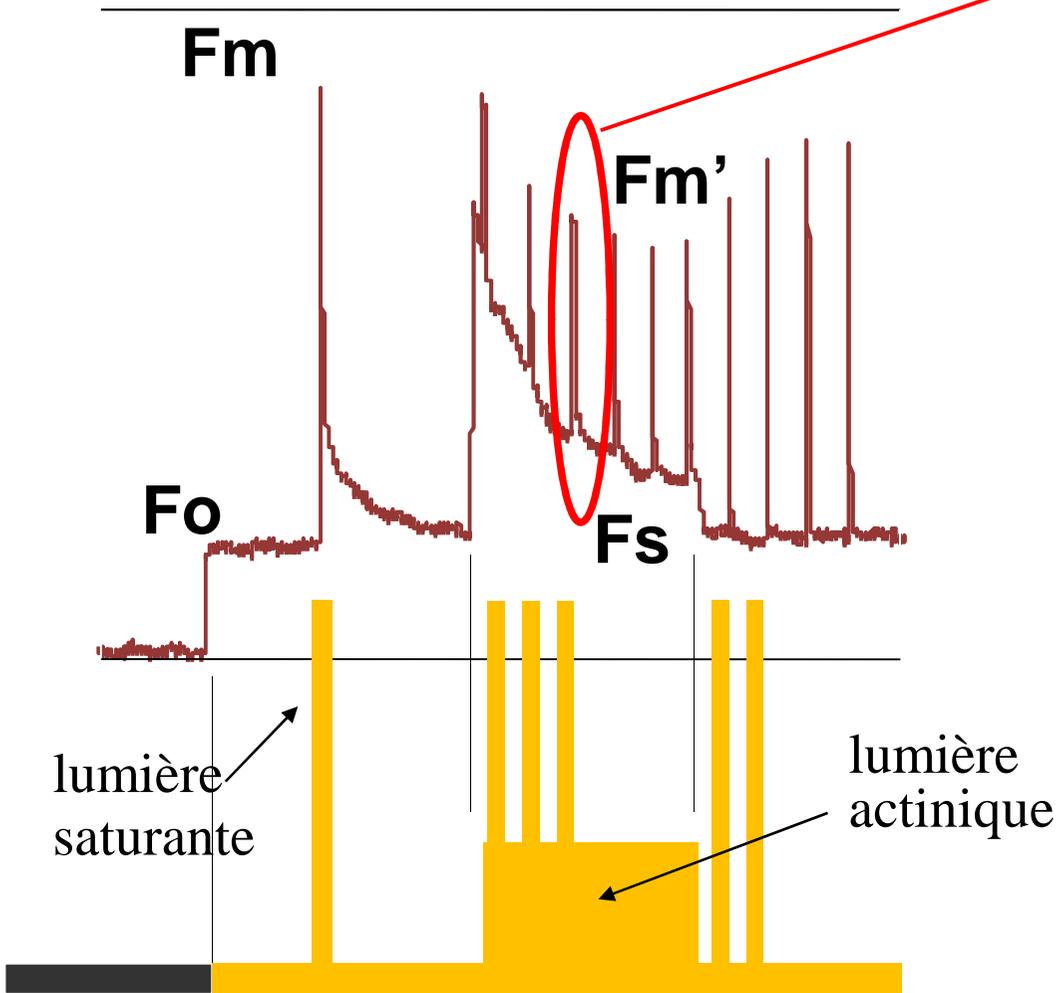
La fluorescence de la chlorophylle est variable :



Répartition de l'énergie absorbée :
La fluorescence reflète la compétition
entre les voies d'utilisation

Technique du « light-doubling »

$$\Delta F = F_m' - F_s$$



photosynthetic quantum yield

Genty B. et al. (1990) *Photosynth. Res.* 26, 133-139

Fluorimètres de terrain

PAM-2000 Portable Chlorophyll Fluorometer

for investigating photosynthesis in the field, greenhouse and laboratory

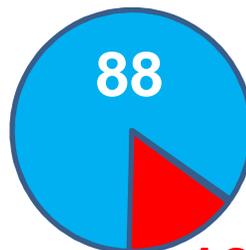


MINI-PAM Photosynthesis Yield Analyzer

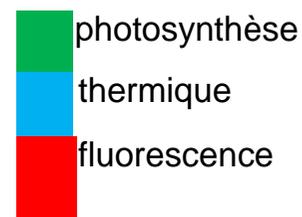
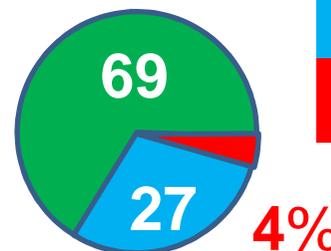
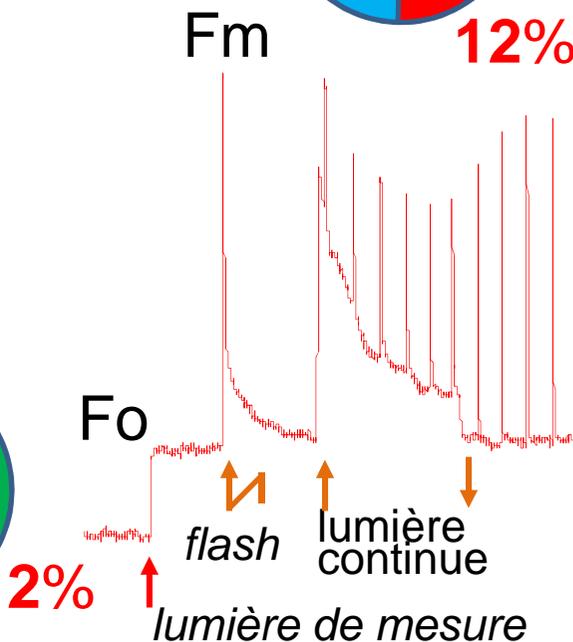
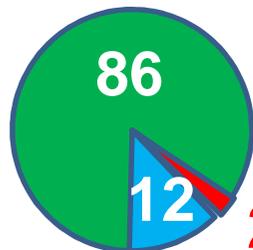
the ultimate answer to portability and ease of operation



EARS-PPM, Netherlands



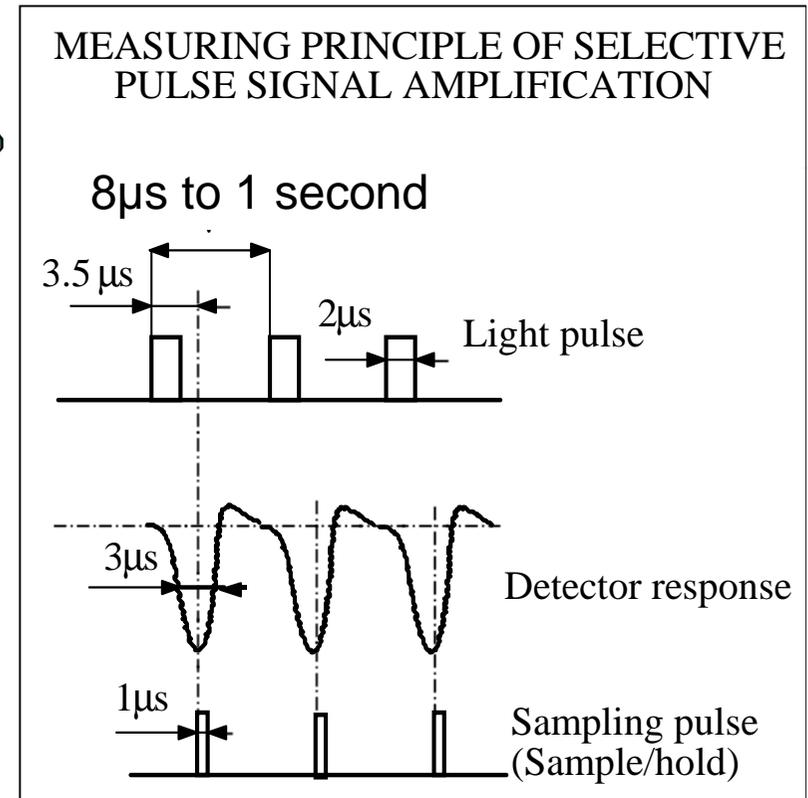
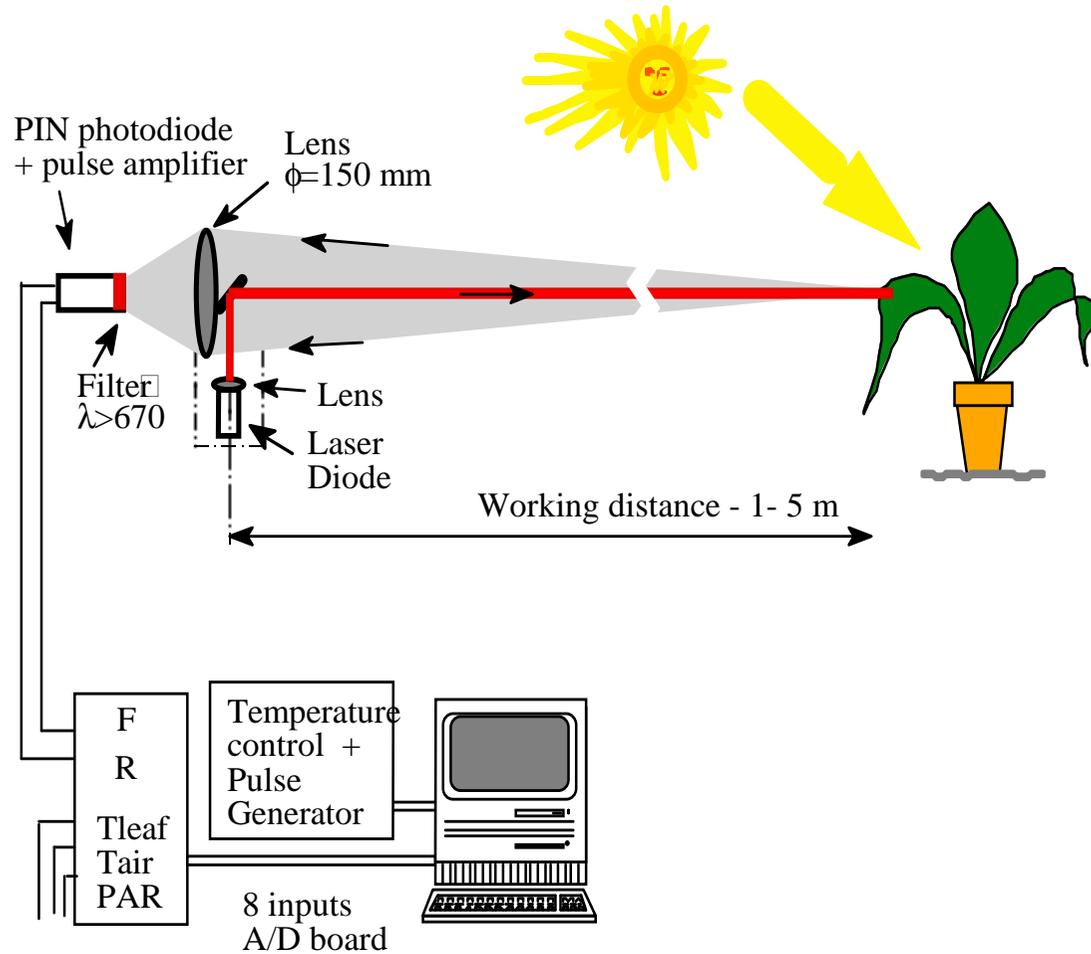
PEA, Hansatech, UK



Mesures de contact

Mesures à distance : Micro-Lidar de fluorescence

En utilisant une diode laser, on peut mesurer la fluorescence et saturer la photosynthèse avec la même source



Mesures avec FIPAM

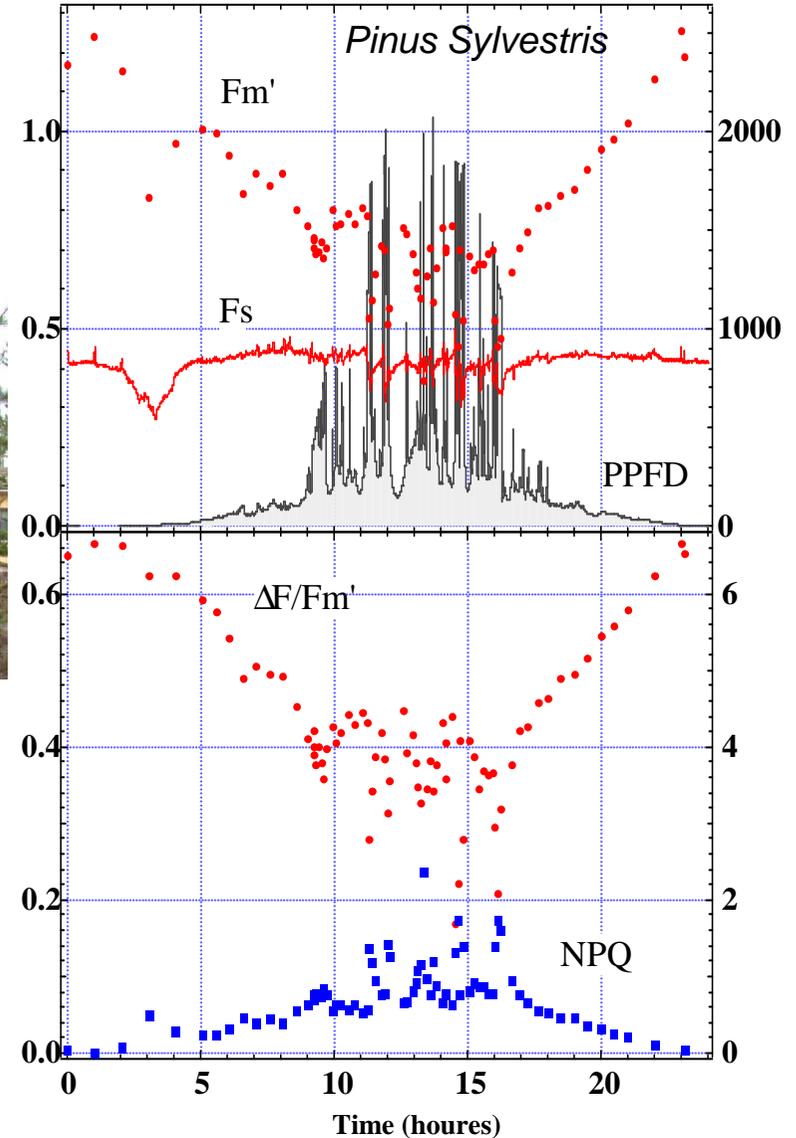
- source Diode-laser cw 656 nm 300 mW
- détecteur impulsif développé par l'équipe insensible à la lumière ambiante
- distance opération : 5 m



obscurité : F_0 (1 Hz)

lumière naturelle : niveau stationnaire F_s (100Hz)

lumière saturante : F_m (100 000 Hz)



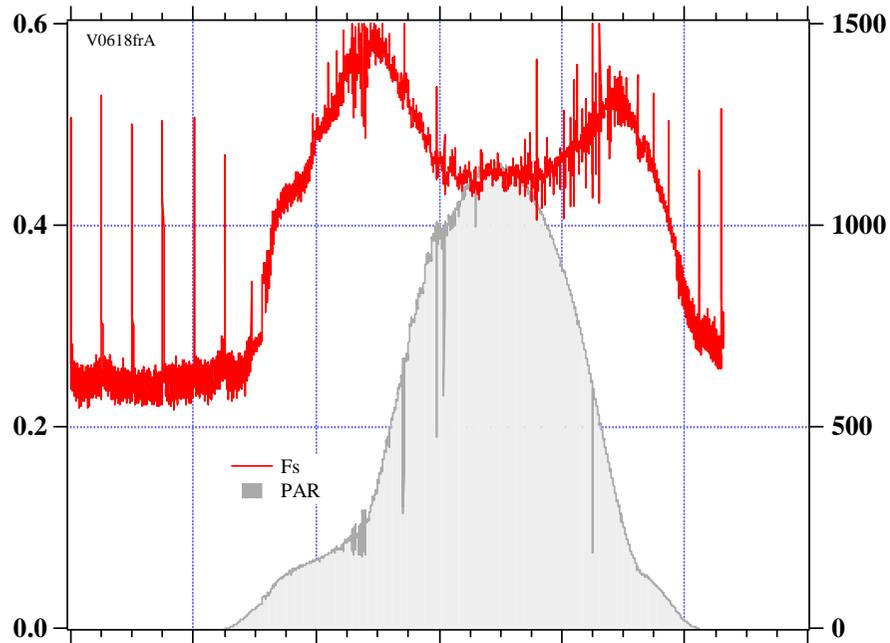


Distance de mesure : quelques mètres

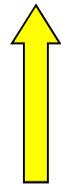
Augmenter la distance : oui, si on renonce à saturer la photosynthèse. Mesure de F_s uniquement, mais obtient-on encore une information sur la photochimie ?

Cycle diurne de fluorescence

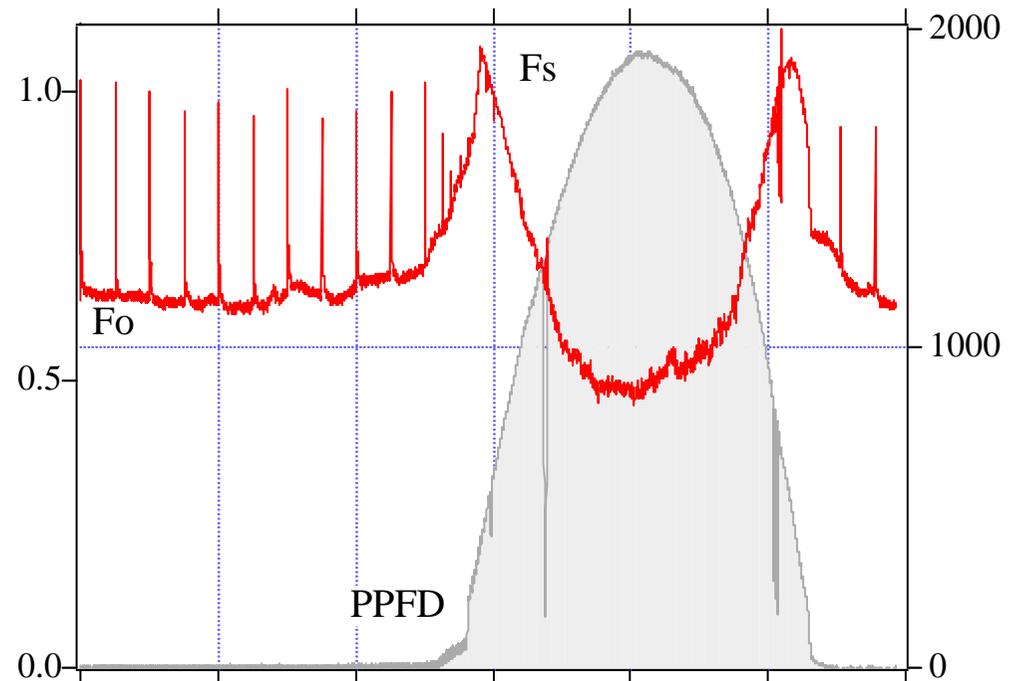
Niveau stationnaire (F_s) chez la vigne (plante en pot)



Well watered



Water-stressed

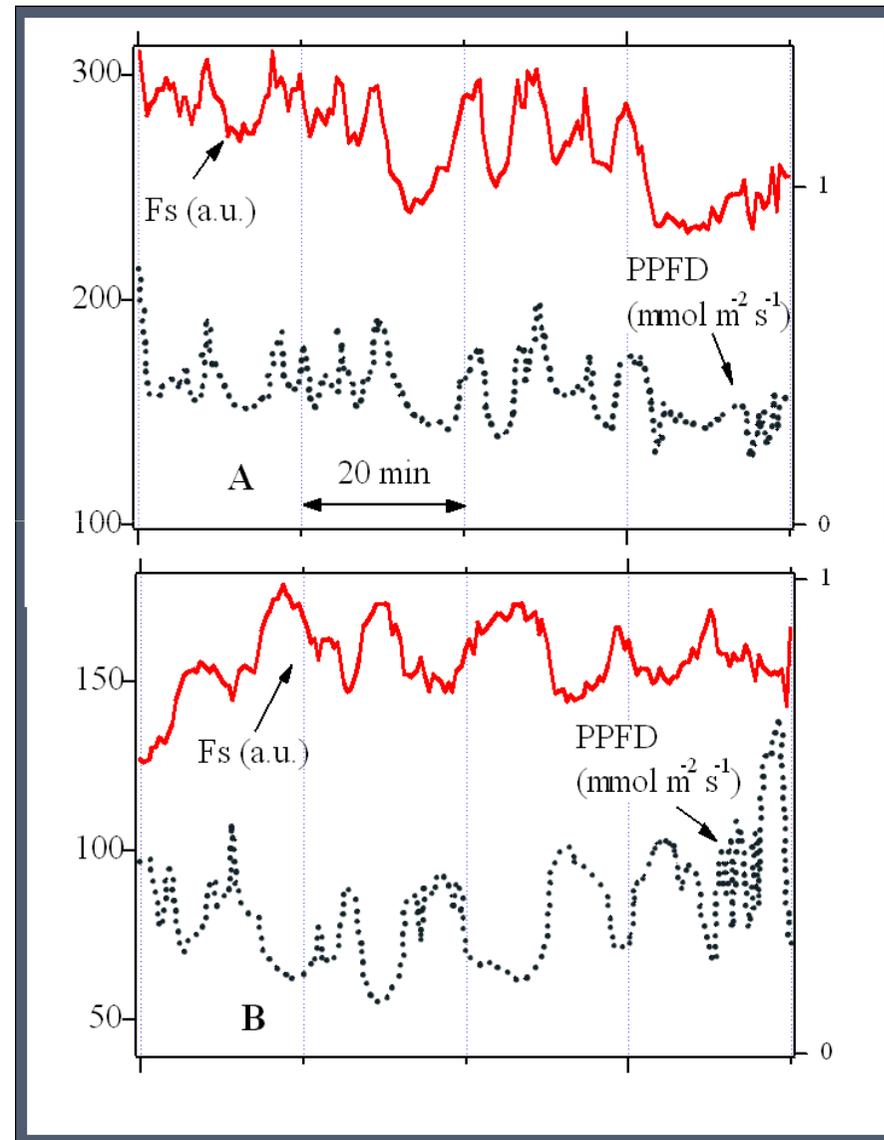


Corrélation de la fluorescence avec les changements lumineux

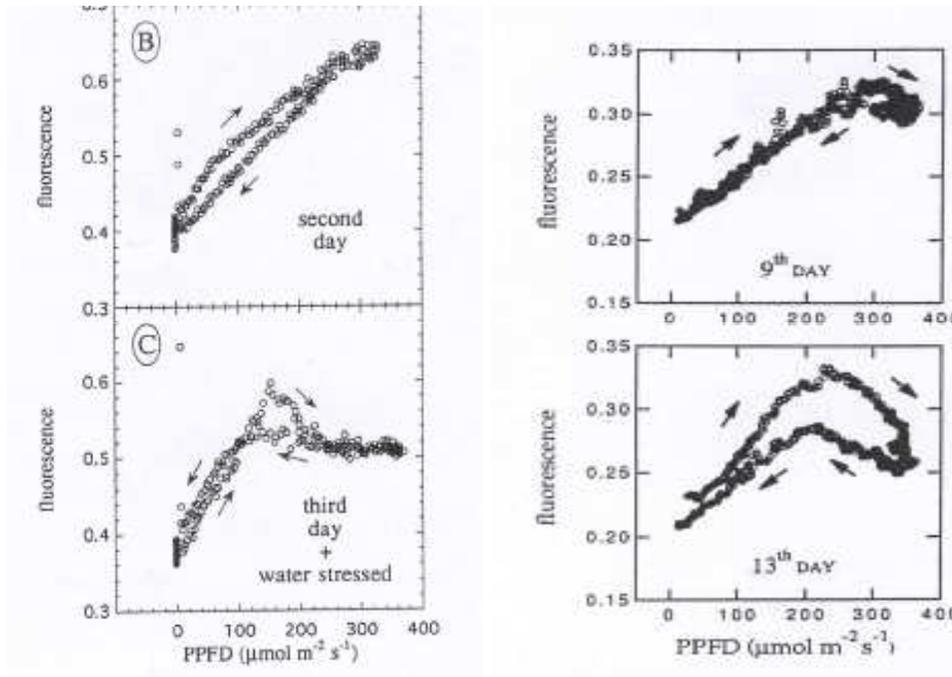
A. Well watered potted vine plant (*Vitis vinifera* L.)

B. Same plant after several days of withholding watering.

Note the anti-parallel correlation between *F_s* and PPFD



Variations of F_s with irradiance show a biphasic pattern



C3 plant : sugar beet

C4 plant : maize

Cerovic Z.G., Goulas Y., Gorbunov M., Briantais J.-M., Camenen L., Moya I. (1996) *Remote Sens. Environ.* 58:311-321.

Top : **Control**

- Positive correlation between F_s and PAR
- Or homeostasis of F_s level
- Dissipation of excess energy by photorespiration (C3), Mehler reaction, cyclic electron flow, non photochemical quenching

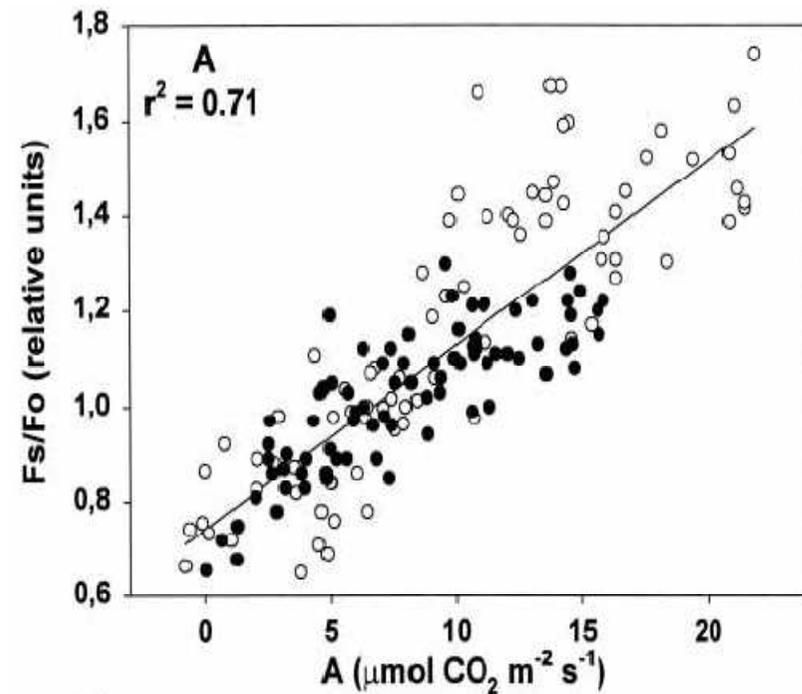
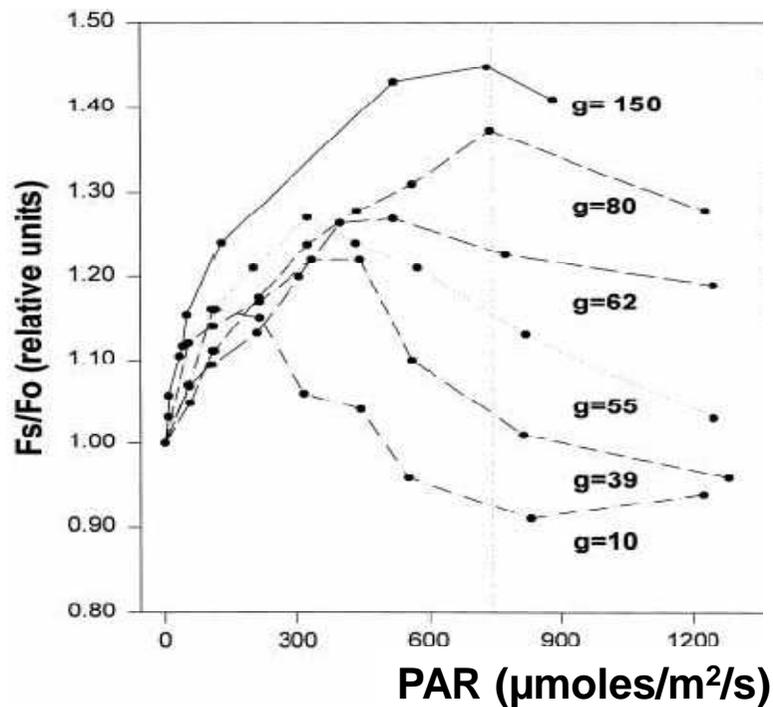
Bottom : **Water stressed**

- Negative correlation between F_s and PAR at high irradiance
- Stomatal closure
- Limited CO_2 availability in chloroplasts
- CO_2 assimilation almost zero
- increase photorespiration (C3)
- increase ΔpH
- xanthophyll de-epoxidation
- large thermal dissipation in antennae (NPQ)
- PRI changes

Relation fluorescence stationnaire (Fs) et photosynthèse

The biphasic pattern of the **F_s** vs **PAR** relationship is a function of water stress stage as measured by leaf conductance **g**.

F_s at saturating irradiance is positively correlated to CO₂ assimilation **A**.



Flexas J., Escalona J.M., Evain S., Gulias J., Moya I., Osmond C.B., Medrano H. (2002) *Physiologia Plantarum* 114:231-240.

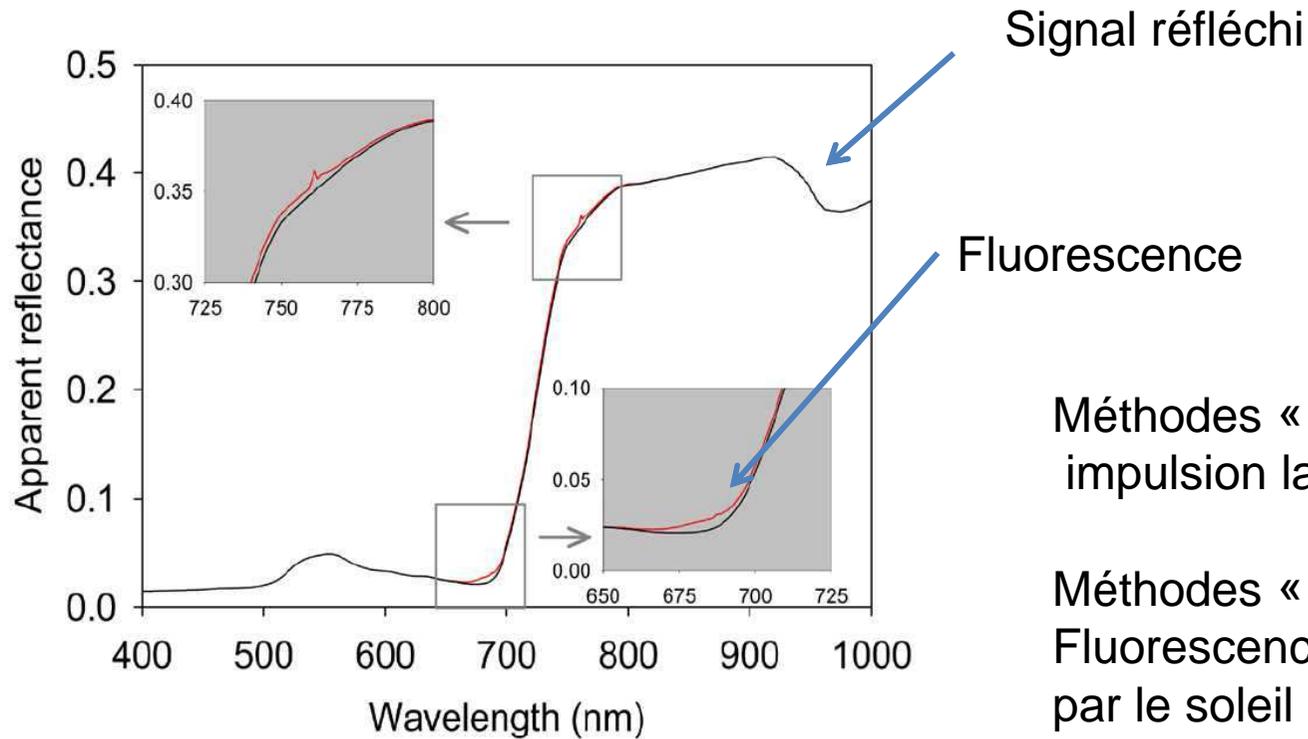


Pour mesurer à plus grande distance (avion, satellite), il faut :

- Soit augmenter la puissance du laser (limité)
- Soit se tourner vers d'autres méthodes...

Téledétection de la fluorescence de la chlorophylle

A cause de son faible niveau, la fluorescence de la chlorophylle est difficile à détecter à distance et dans les conditions naturelles



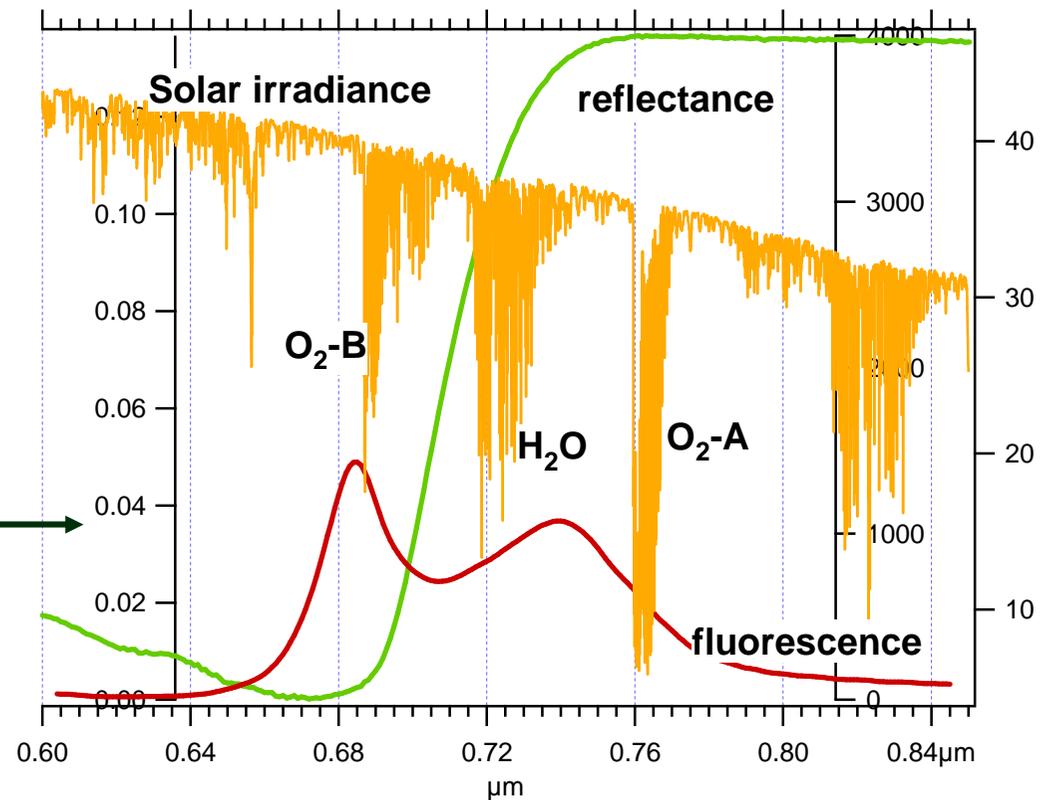
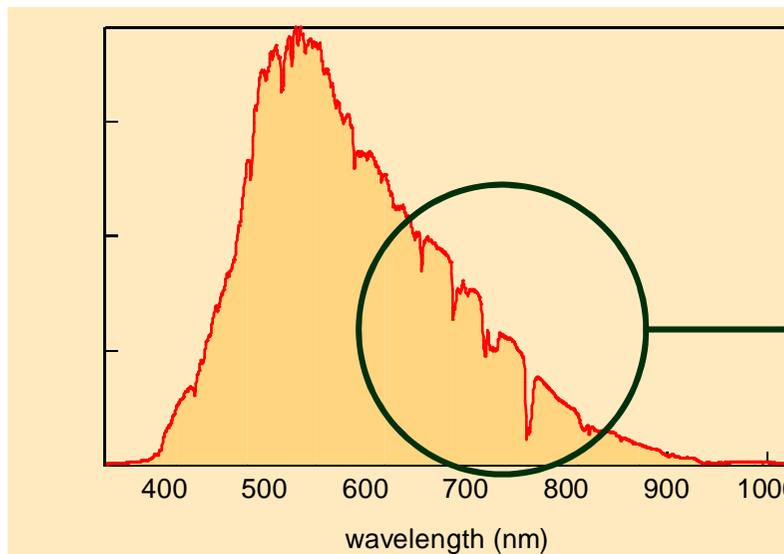
Méthodes « actives » :
impulsion laser

Méthodes « passives » :
Fluorescence induite
par le soleil

Mesure passive de la fluorescence induite par le soleil

Utilisation des bandes d'absorption du rayonnement solaire

Irradiance solaire

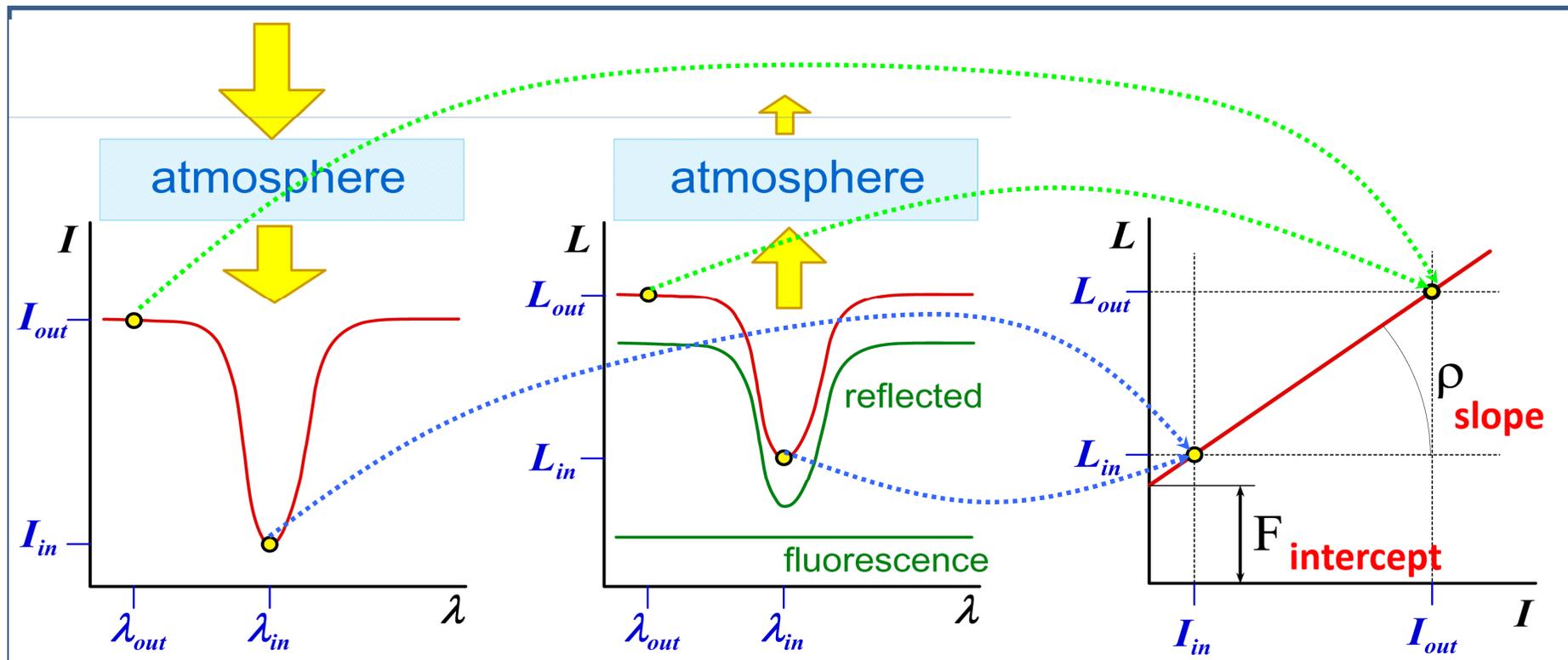


Principe de la mesure de la fluorescence induite par le soleil

Si la réflectance ρ et la fluorescence F de la végétation sont constants dans l'intervalle spectral autour de la bande d'absorption, on a :

$$L(\lambda) = \rho I(\lambda) + F$$

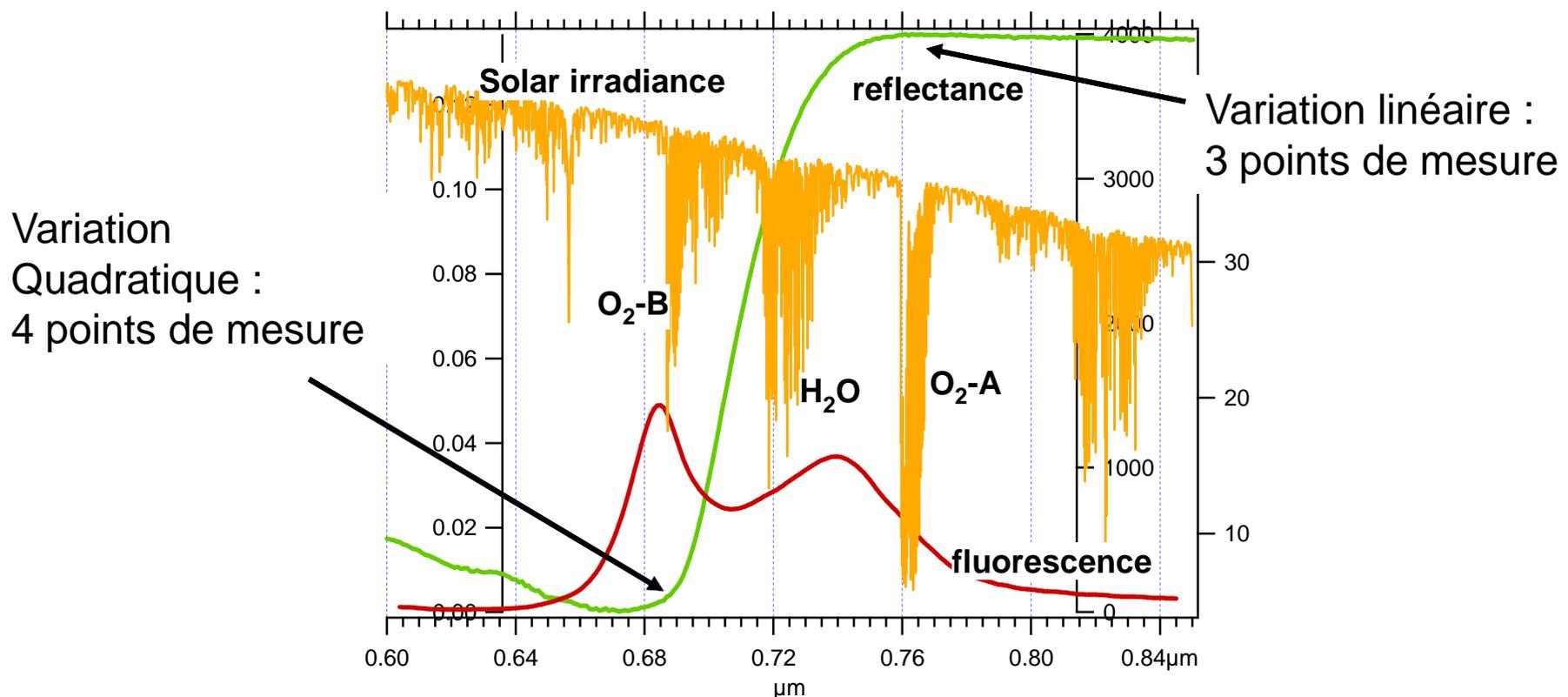
Lorsque λ varie, le point de coordonnées $(I(\lambda), L(\lambda))$ décrit une droite de pente ρ et qui intercepte l'axe des y en F . Deux mesures suffisent pour déterminer ρ et F , l'une au fond de la bande, l'autre au bord.



Principe de la mesure de la fluorescence induite par le soleil (2)

Dans la pratique, ρ et F ne sont pas constants mais varient lentement en fonction de λ . Par exemple, si ρ et F varient linéairement en fonction de λ , on aura :

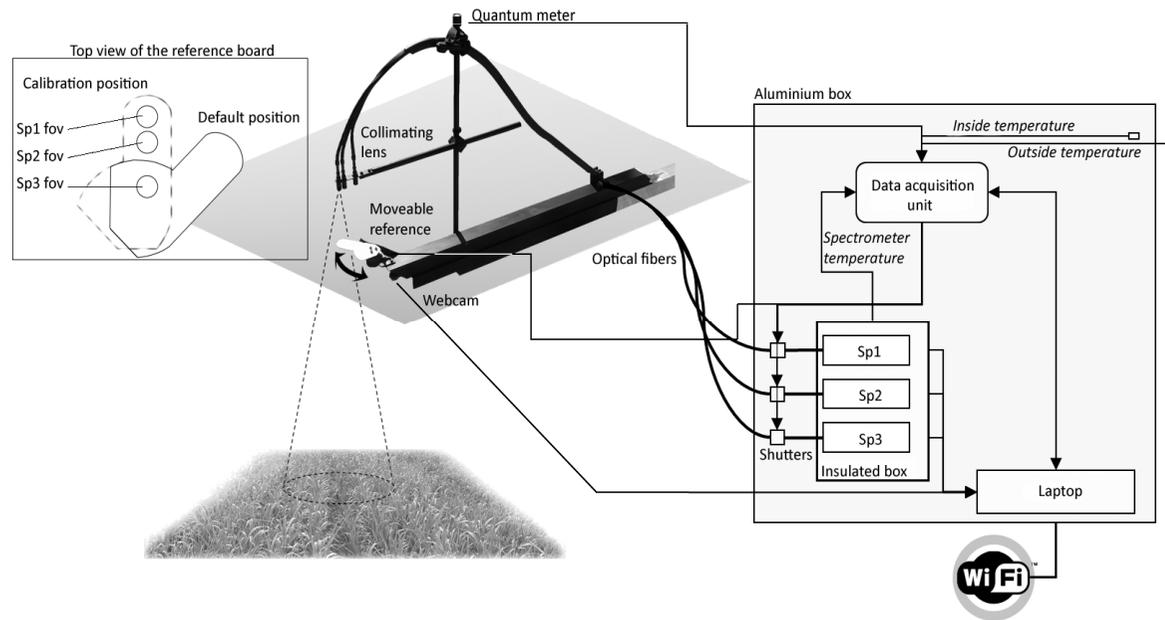
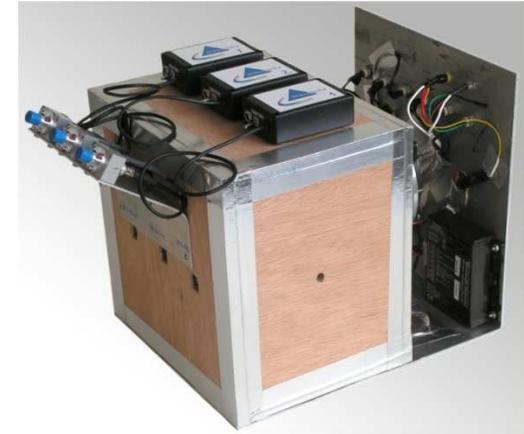
Le nombre d'inconnues augmente, il est nécessaire d'avoir plus de points de mesure.



TriFLEX : Un instrument de mesure passive de la fluorescence

TriFLEX est bati autour de 3 spectromètres :

- 1 spectromètre dédié à la végétation (**F**luorescence, **N**DVI)
- 1 spectromètre dédié à la mesure de l'irradiance
- 1 spectromètre large bande dédié a la végétation (**P**RI)



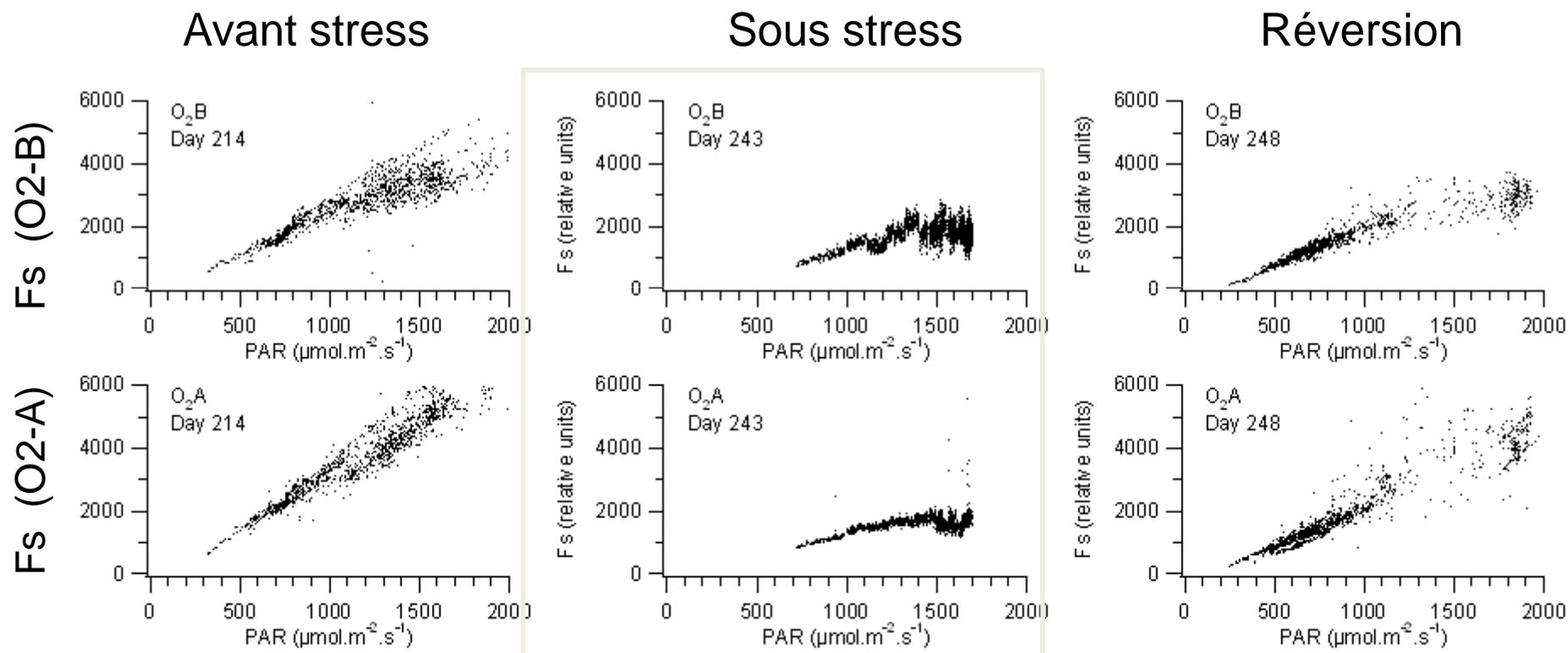
Plateforme de mesure passive de la fluorescence des couverts sur le site INRA d'Avignon-Montfavet



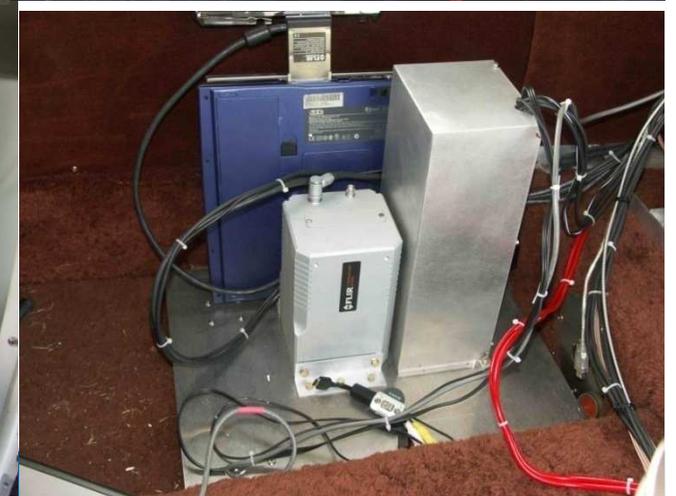
- Fluorescence stationnaire F_s à 687 nm et 760 nm
- spectre de réflectance 400-800 nm
- Photochemical Reflectance Index (PRI)
- NDVI (Normalized Difference Index)
- Dispositif de culture contrôlée
- Mesures flux (CO_2 , H_2O , énergie), météo, biophysiques (biomasse, LAI, fAPAR)

Mesure passive de fluorescence: Stress hydrique et réversion chez le sorgho

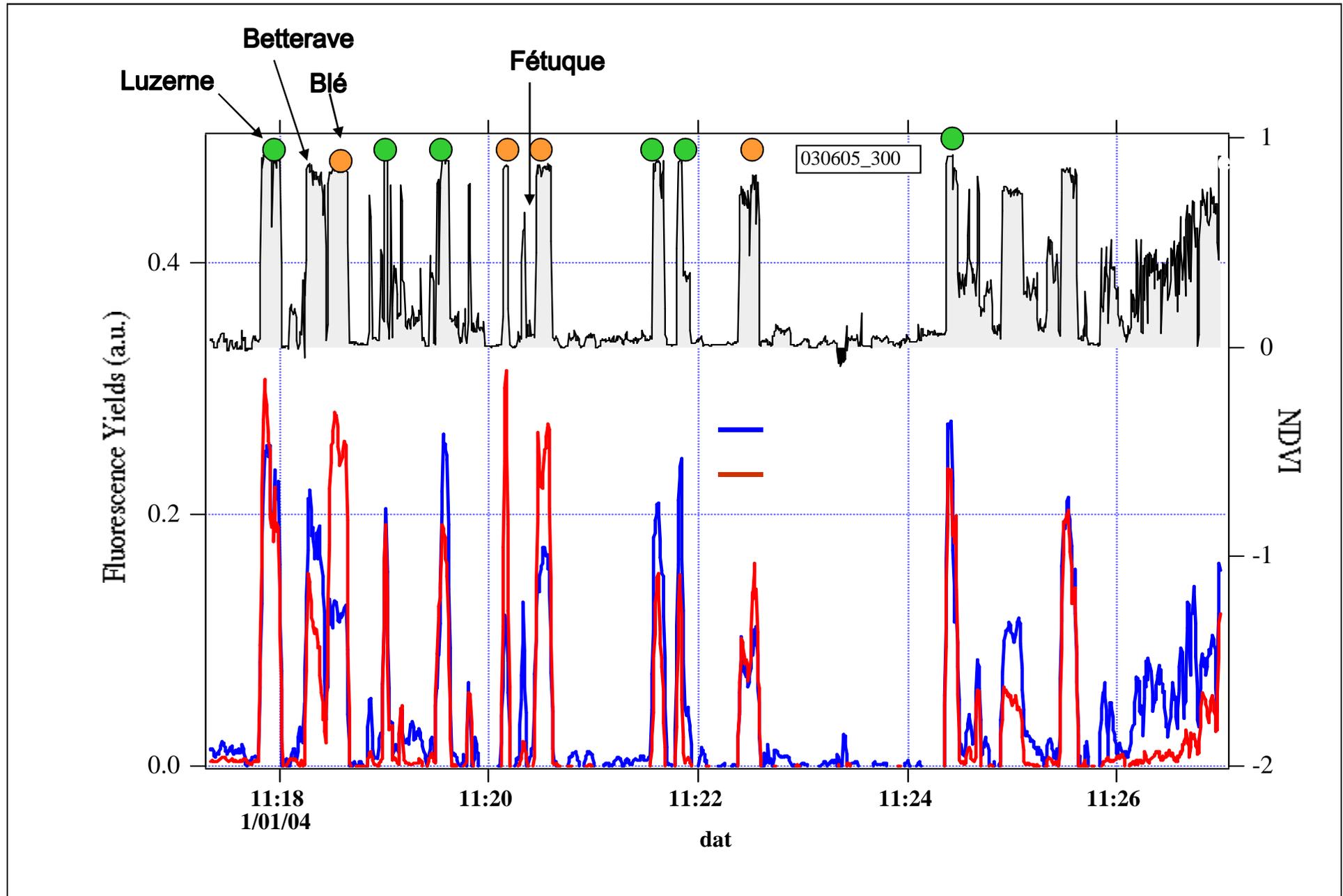
Les mesures ont commencé 13 jours après le dernier arrosage (jour 200, 2008)



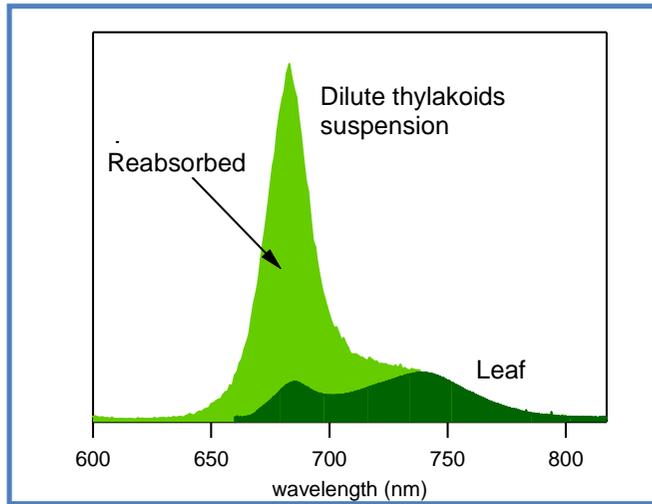
Daumard F., Champagne S., Fournier A., Goulas Y., Ounis A., Hanocq J.F. and Moya I. A field-platform for continuous measurement of canopy fluorescence. *IEEE Transactions on Geoscience and remote sensing*.



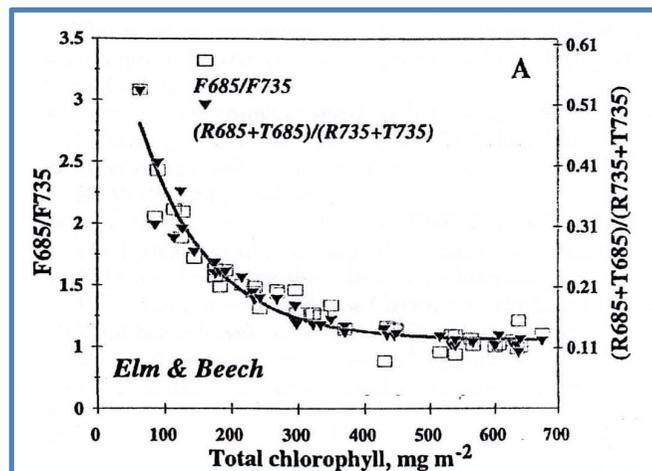
La fluorescence est plus discriminative que la réflectance



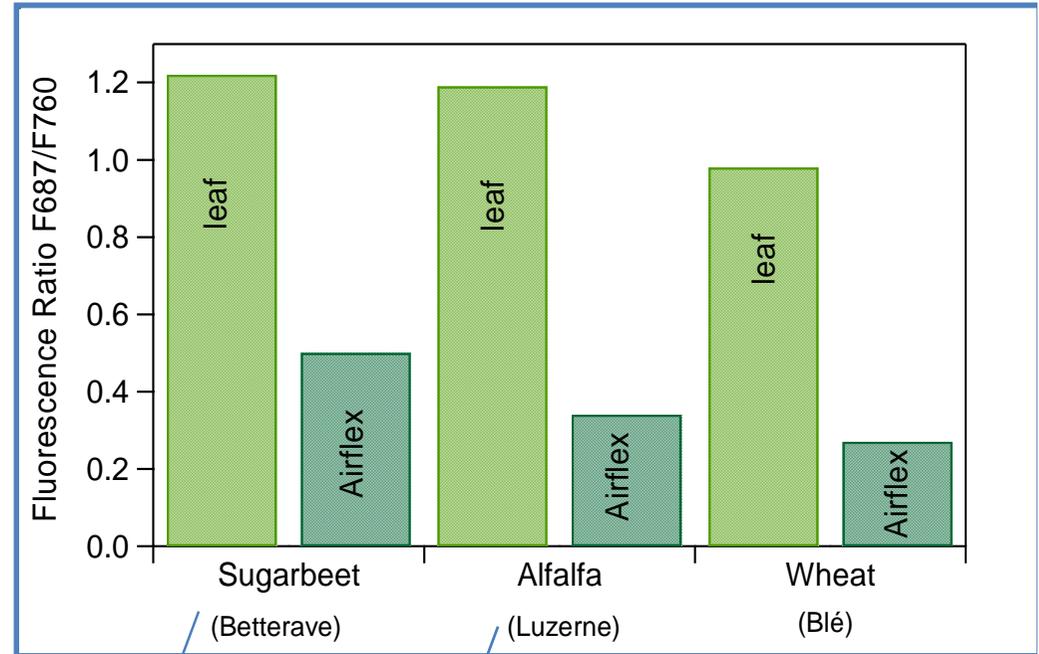
Spectre de fluorescence au niveau du couvert



Dans les feuilles, la fluorescence dans le rouge est fortement réabsorbée par la chlorophylle en fonction de sa concentration



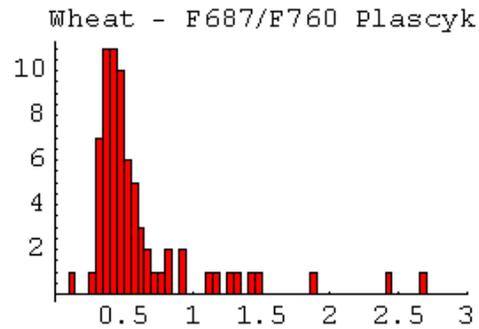
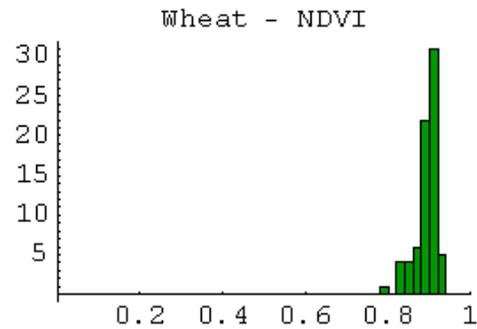
Comme dans la feuille, la fluorescence rouge est réabsorbée par le couvert, ce qui diminue encore le rapport d'émission F687/F760



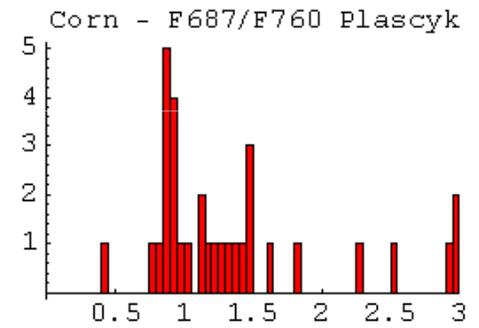
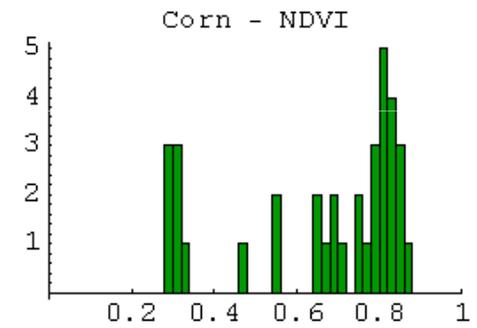
Rapport d'émission F687/F760 suivant les espèces

NDVI

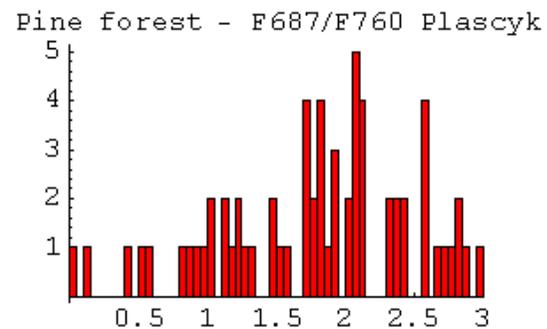
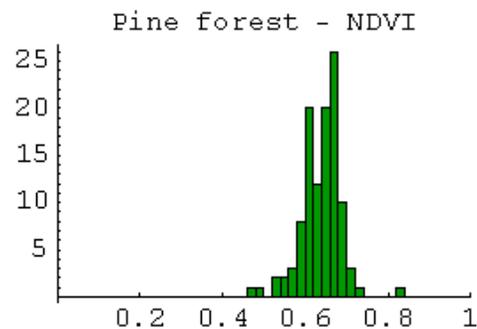
F687 / F760



Wheat



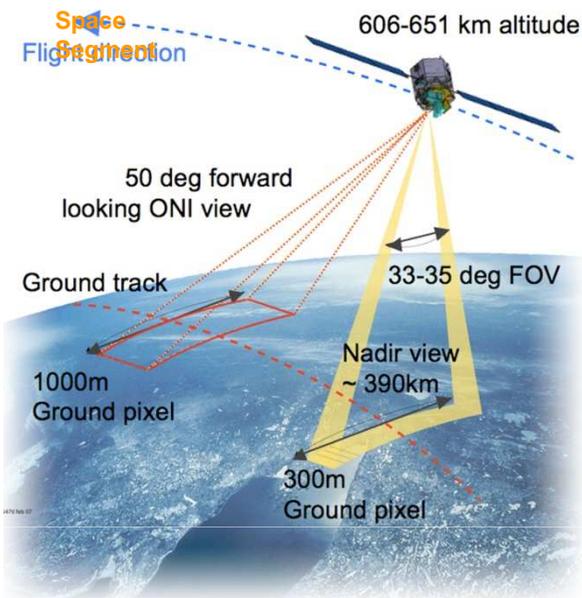
Corn



Pine

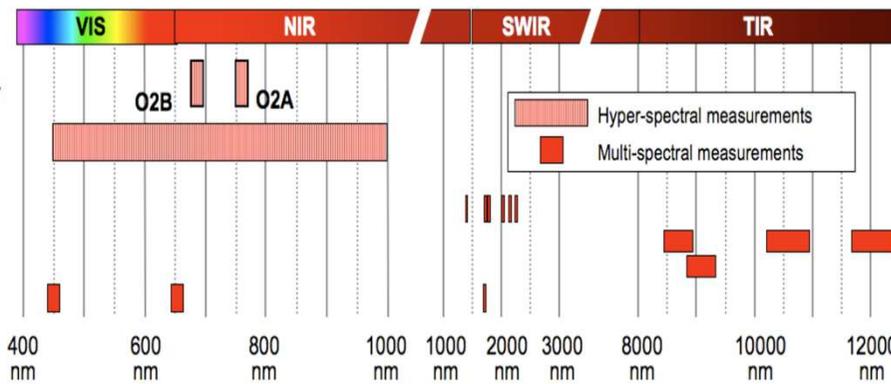


FLuorescence EXplorer (FLEX) : observation spatiale de la fluorescence

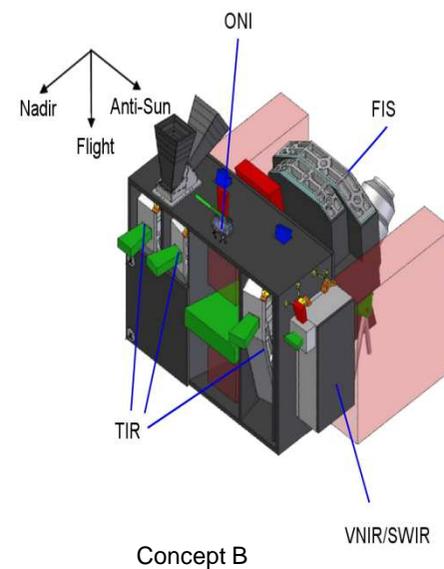
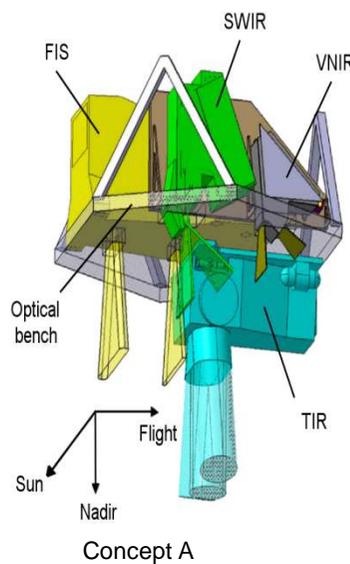
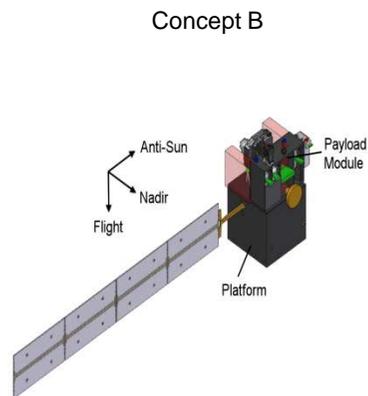
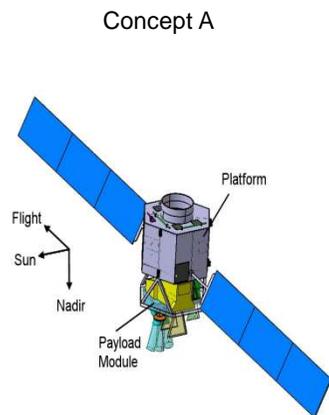


Instruments

- Fluorescence spectrometer
- VNIR spectrometer
- SWIR channels
- TIR channels
- Off-nadir channels

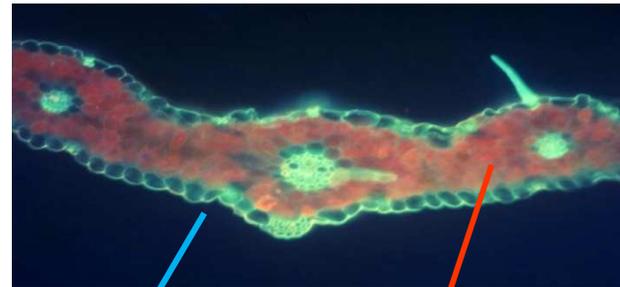


Satellite

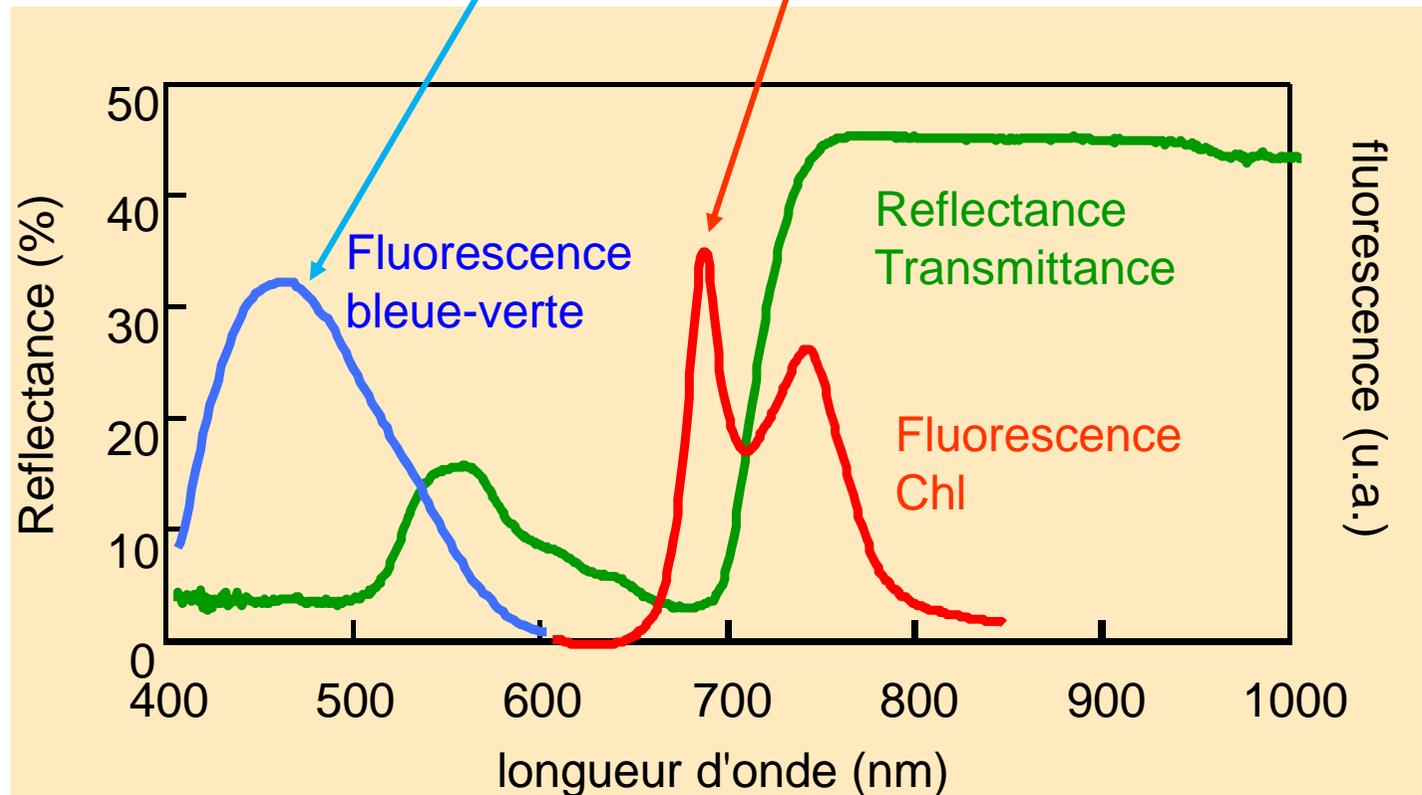


Excitation sous UV : une autre vision de la fluorescence

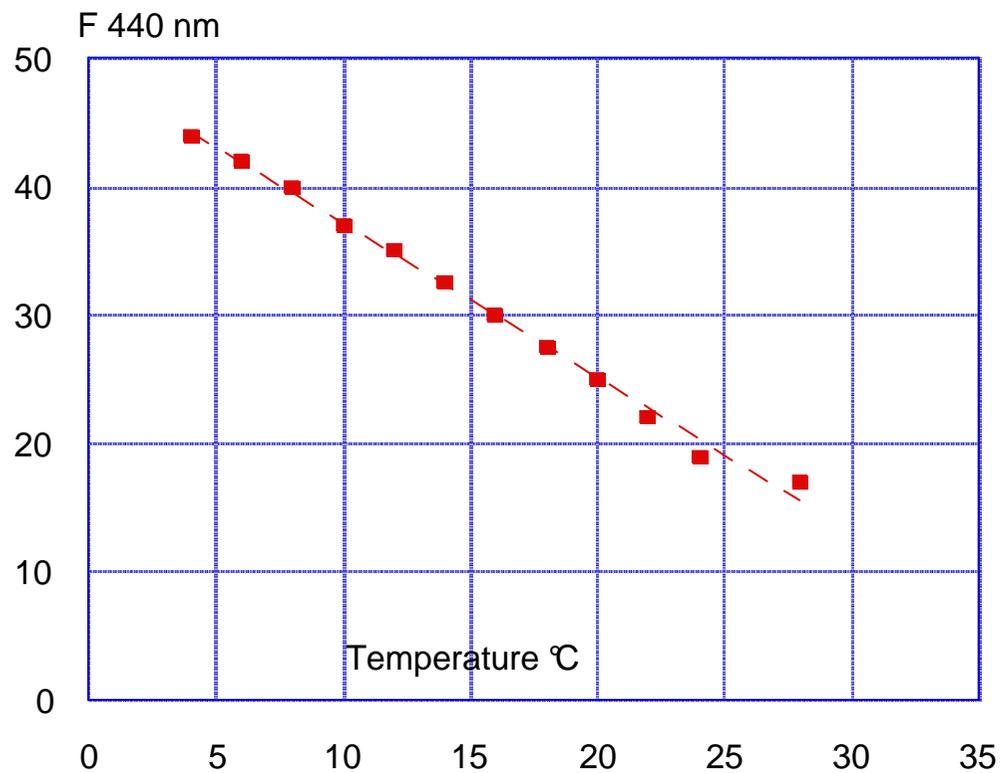
Epifluorescence
d'une coupe d'une
feuille de blé



Epiderme
Mésophylle
Epiderme



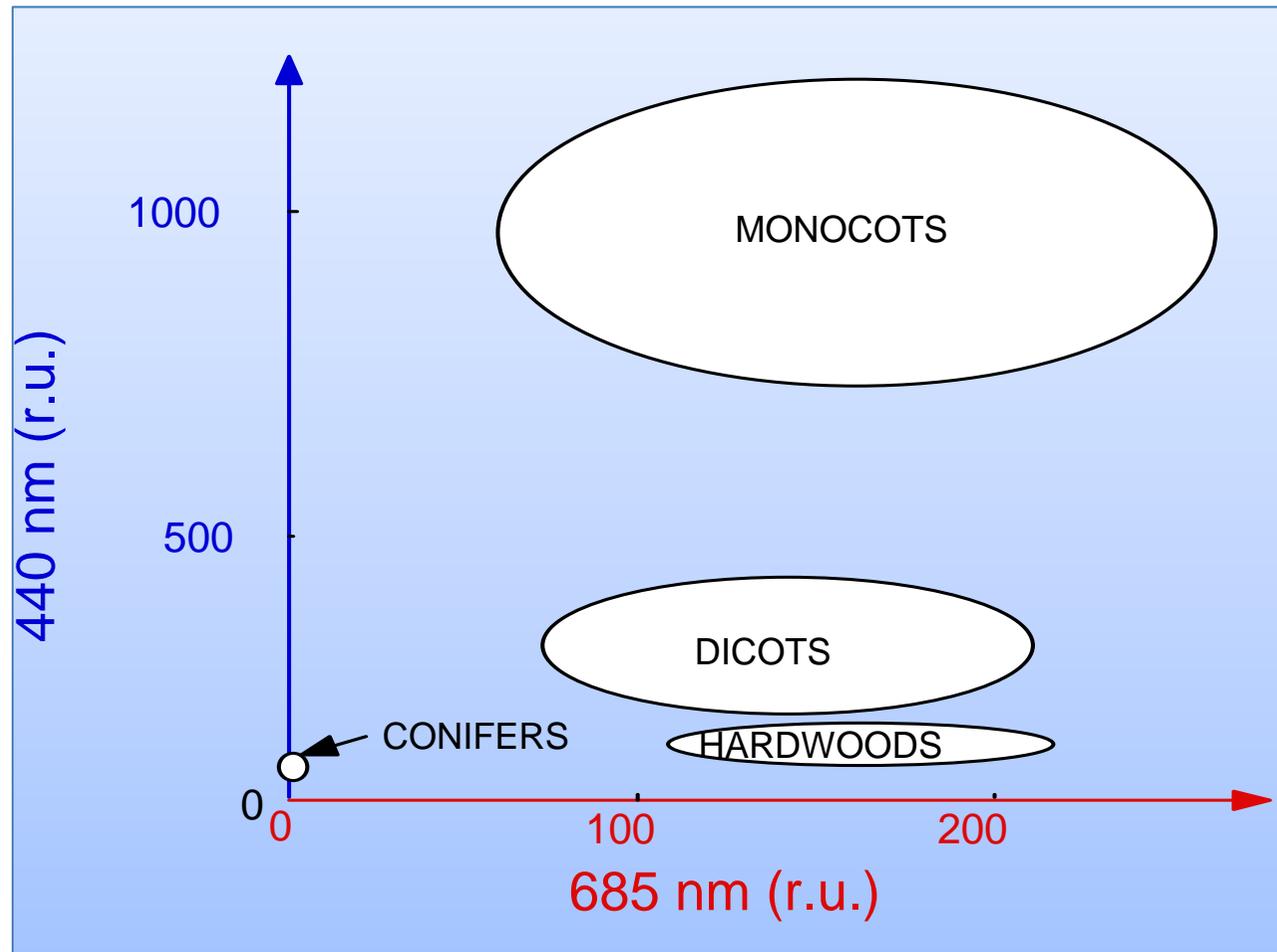
Variation of Blue Fluorescence vs Temperature Monocot (*Lolium perenne*)



Bongi, G., Palliotti, A., Rocchi, P., Moya, I., & Goulas, Y. (1994).
Plant Cell Environ, 17(6), 777-780.

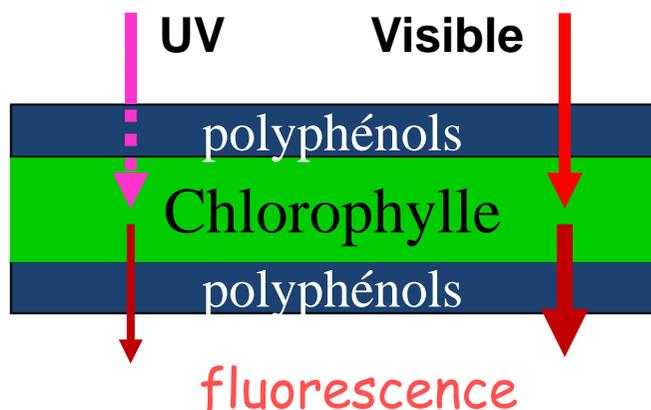
Species specific blue-green fluorescence

(After Chappelle et al. (1985))



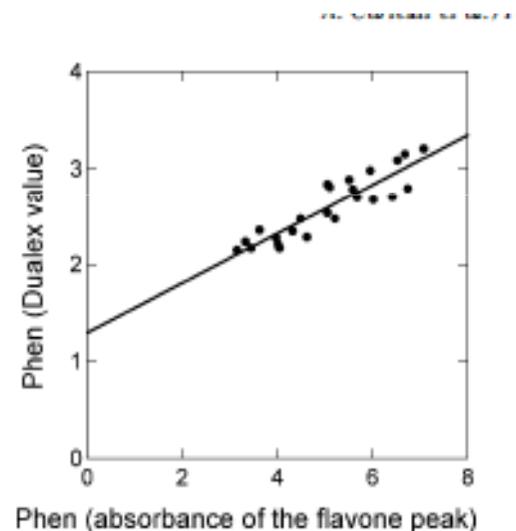
Mesure des polyphénols par effet d'écran sur la fluorescence chlorophyllienne excitée à 657 nm et 375 nm

Les flavonoïdes de l'épiderme des feuilles absorbent l'UV et font ainsi écran à la chlorophylle.



La chlorophylle du mésophylle émet de la fluorescence dans le proche Infra-rouge après excitation UV et rouge.

Absorbance UV épiderme



Contenu polyphénols

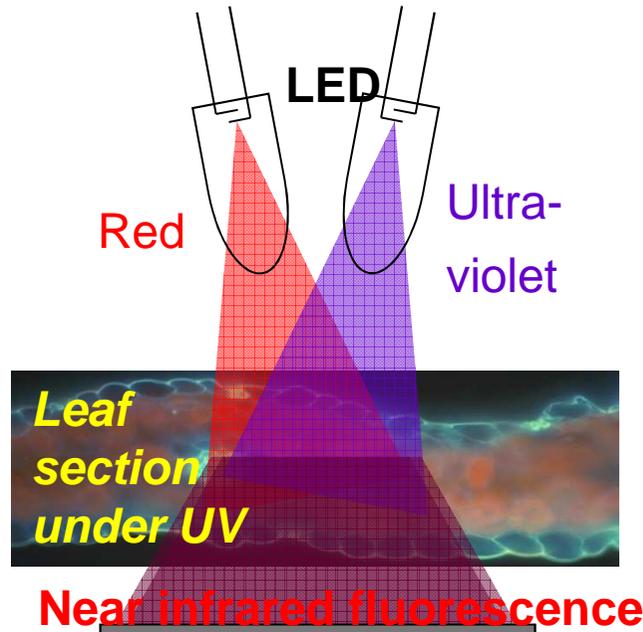
Cartelat, A., Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J.-L., Barbottin, A., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Agati, G., & Moya, I. (2005). *Field Crops Res.*, 91, 35-49.

$$\frac{F_{UV}}{F_R} = \frac{T_{UV} I_{UV}}{I_R} ; a = -\log(T_{UV}) = -\log\left(\frac{F_{UV}}{F_R}\right) + cste$$

Dualex : un instrument portable dédié à la mesure du contenu en polyphénols des feuilles

 Dualex

2000



Une pince à feuilles pour déterminer le contenu de l'épiderme en absorbeurs UV et visible suivant la longueur d'onde d'analyse utilisée :

- 330 nm : acides hydroxycinnamiques
- 370 nm : flavonoïdes
- 530 nm : anthocyanes



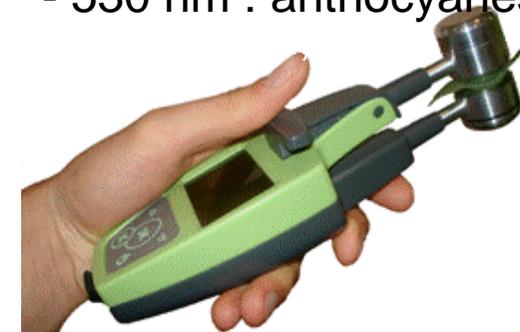
2003

Création

 FORCE-A®



2006



2009

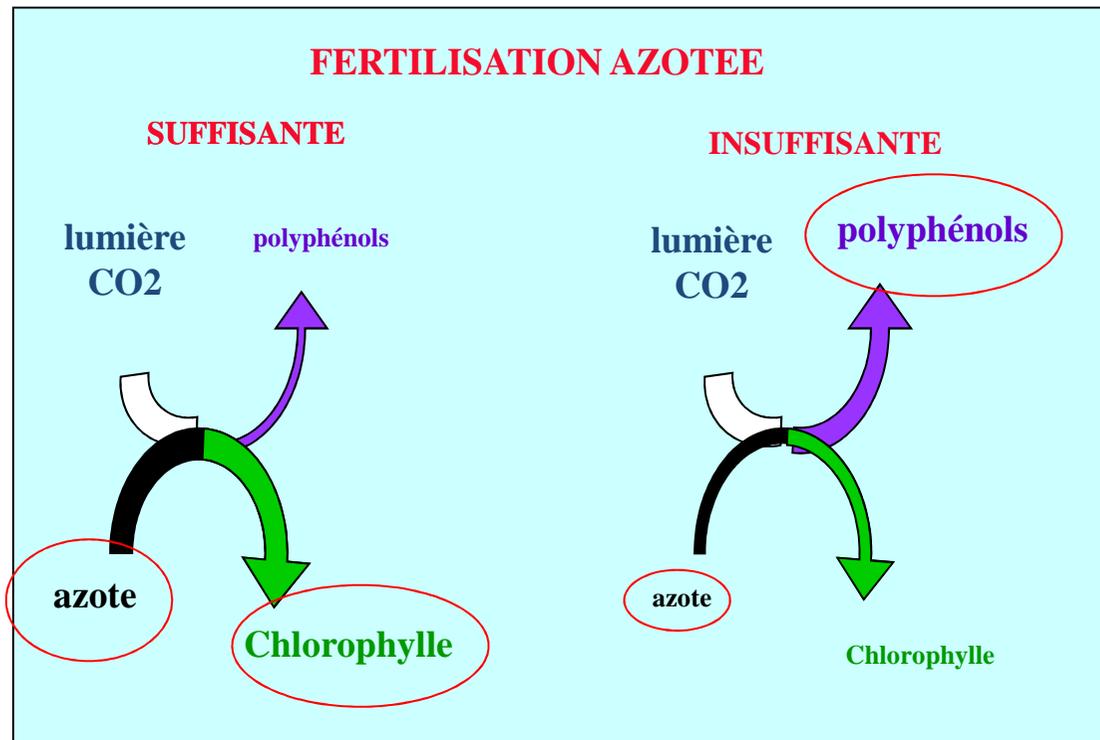


Multiplex : multiparamétrique

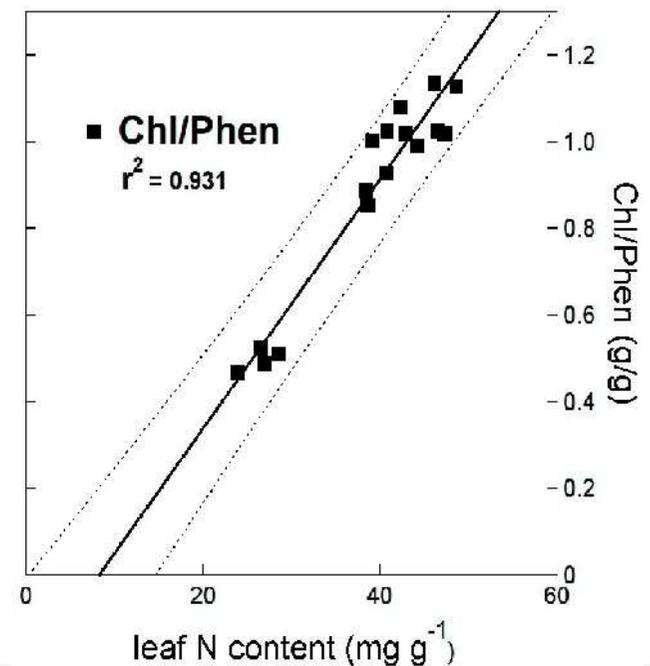
L'équilibre Carbone-Azote

L'allocation des produits de la photosynthèse dépend de la disponibilité en azote. Lorsque l'azote est en quantité suffisante, la plante peut synthétiser la chlorophylle. Si l'azote manque, les produits de la photosynthèse sont redirigés vers la synthèse des polyphénols. On introduit ainsi le rapport chlorophylle/polyphénols (NBI Nitrogen Balance Index) comme indicateur du statut azoté.

-> Applications contrôle nutrition azotée

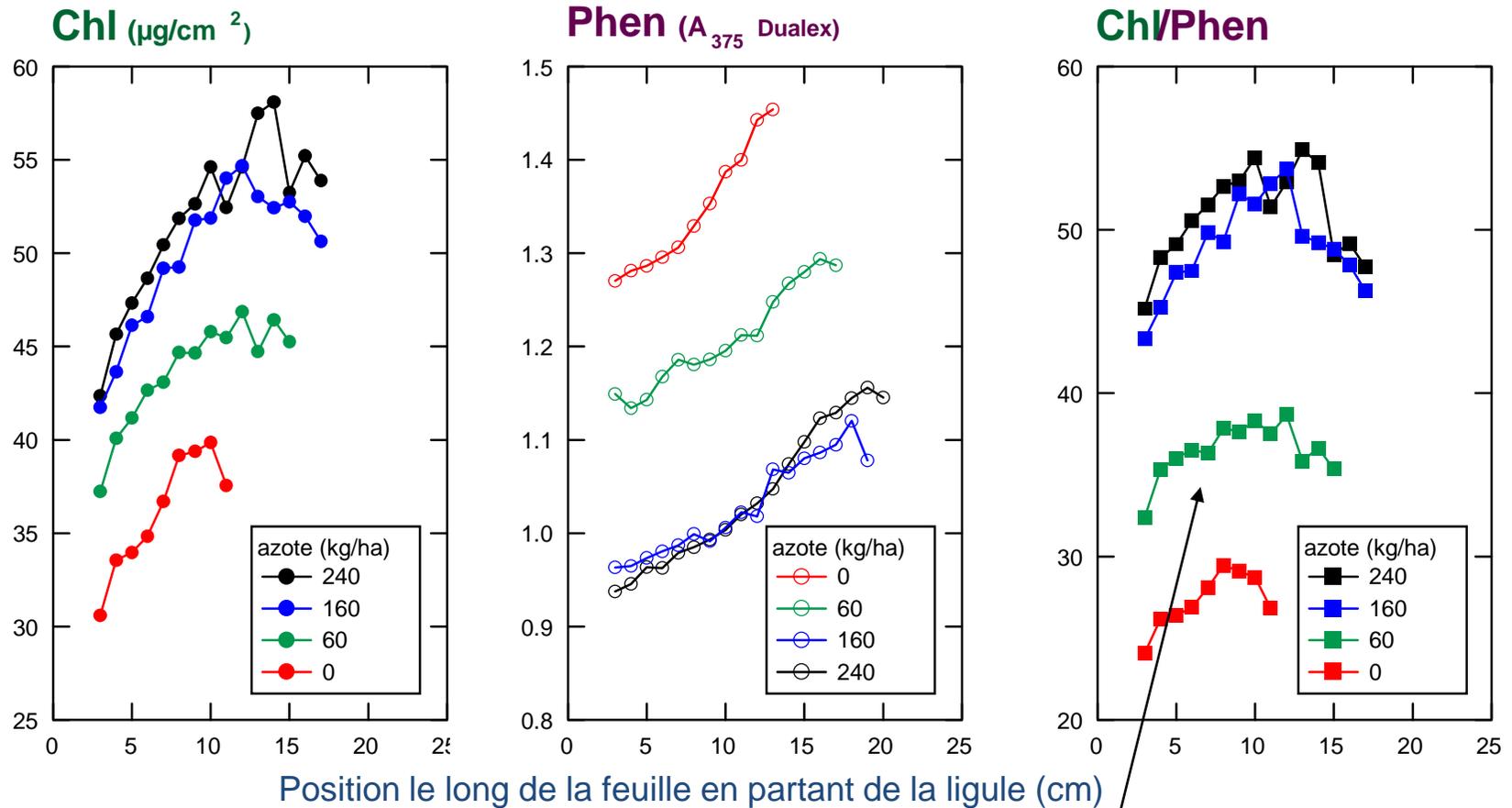


The Carbon Nutrient Balance Hypothesis (Bryant et al. 1983) (Coley et al. 1985) (Herms & Mattson 1992)



Fertilisation Azotée

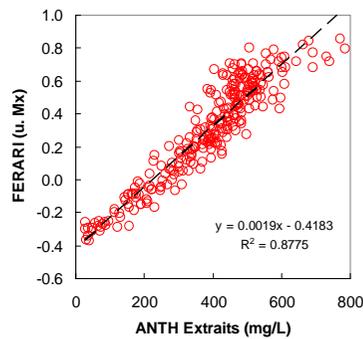
Blé tendre (variété Isengrain) au stade épisaison (17.05.2001)



Le rapport **Chlorophylle sur Polyphénols** augmente en fonction de la dose d'azote.

Applications agronomiques de la fluorescence

Création en 2004 d'une société de fabrications de capteurs : Force-A



- Fertilisation (N)
- Suivi maturité (vigne)
- Détection pathogènes
- Qualité pulvérisation



Gestion des apports d'azote dans la culture du blé



- Préconisation initiale X calculée en fonction du bilan de l'année passée.
- Mise en place bande témoin sur-fertilisée à X+40
- Calcul en temps réel du rapport

$$r = \frac{NBI(t)}{NBI(X + 40)}$$

- Si $r > \text{valeur seuil} = 0.8$
pas d'apport d'azote
- Si $r < 0.8$
Déclenchement 3e apport d'azote suivant valeur de r

Sans pilotage

Avec pilotage par Dualex

X (kg N/ha)	Rend	Proteines (%)	Préconisation Dualex (kg N/ha)	Rend	Proteines (%)
120	77	10.9	160	83.4	12.3
160	91.9	12.8	120	90.6	12.3
185	92.9	11.3	185 +précoce	103.3	11.6

Utilisation de la fluorescence dans les conditions naturelles

Passage feuille -> couvert :

- Niveau stationnaire Fs fournit encore une information liée à la physiologie, bien que les variations soient faibles
- La fluorescence de la végétation peut être mesurée en télédétection en utilisant les bandes d'absorption atmosphériques
- La structure du couvert intervient dans le signal de fluorescence (rapport rouge/proche infrarouge)

- La fluorescence peut être utilisée comme indicateur de l'absorption de l'épiderme (applications agronomiques)