

Université de Lausanne – Faculté des sciences

Diplôme de biologiste

Influence des champs magnétiques sur le
développement de la mousse
Physcomitrella patens



Travail effectué sous la direction du Prof. J.-P.Zryd,
Laboratoire de Phytogénétique Cellulaire

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près à l'élaboration de ce diplôme, particulièrement Pierre Zweiacker qui m'a continuellement aidée à perfectionner mon français, mes connaissances de la physique ; pour son aide tout au long des expériences et pour l'analyse critique de mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Pierre Zryd qui a suivi mon travail.

J'exprime également mes plus vifs remerciements à tous mes collègues Mikhail Chakhparonian, Pierre-François Perroud, Murielle Uzé, Didier Schaefer, Andrija Finka, Ursula Hinz, Bertrand Ménard, Delia Boccardo.

J'ai été très heureuse de pouvoir collaborer avec l'équipe du Laboratoire de Réseaux Electrique.

Je suis reconnaissante à Monsieur le Professeur Nikolay Korovkin et Monsieur le Professeur Reto Strasser de leur collaboration.

Mes remerciements vont également à Natalia Kroutchinina et Alexandre Kouznetsov qui ont rendu mon stage à l'UNIL possible.

INFLUENCE DES CHAMPS MAGNÉTIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA MOUSSE PHYSCOMITRELLA PATENS.....	1
INTRODUCTION.....	4
CHOIX D'UN VÉGÉTAL.....	5
PLANTES MODÈLES.....	6
CHAMP MAGNÉTIQUE.....	6
CHAMP ÉLECTROMAGNÉTIQUE À HAUTE FRÉQUENCE.....	8
<i>La cellule TEM (Transverse Electromagnetic).....</i>	8
TESTS STATISTIQUES.....	8
<i>Analyse des paramètres considérés.....</i>	8
<i>Les tests d'hypothèses.....</i>	9
<i>Pourquoi l'ANOVA (analysis of variance).....</i>	10
<i>Principes de l'ANOVA.....</i>	10
<i>Les suppositions de l'ANOVA.....</i>	10
<i>Un test de comparaison multiple qui suit l'ANOVA.....</i>	10
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	11
ÉTAT ACTUEL DES RECHERCHES.....	11
CYCLE DE DÉVELOPPEMENT DE <i>P. PATENS</i>	12
<i>Cycle de développement.....</i>	13
DÉVELOPPEMENT DE <i>P. PATENS</i> DANS LES CONDITIONS LABORATOIRE. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....	14
<i>Protocole 1 : Techniques générales de culture.....</i>	14
CONDITION DE CULTURE DE <i>P. PATENS</i>	15
APPAREILLAGE.....	16
<i>Dimensionnement de la bobine utilisée pour l'expérience.....</i>	16
<i>Formules utilisées pour le calcul des bobines.....</i>	17
<i>Champ magnétique continu.....</i>	19
<i>Champ magnétique alternatif.....</i>	19
<i>Champ électromagnétique à haute fréquence.....</i>	20
<i>Contrôle des caractéristiques de la lumière.....</i>	20
PRINCIPES ET SCHÉMAS. 1 ^{RE} MÉTHODE.....	21
PRINCIPES ET SCHÉMAS. 2 ^E MÉTHODE.....	22
<i>Géométrie fractale.....</i>	22
<i>La méthode de boîtes.....</i>	24
PRINCIPES ET SCHÉMAS. 3 ^E MÉTHODE.....	27
<i>La photosynthèse.....</i>	27
<i>Effet Kautsky.....</i>	29
<i>La procédure d'analyse de plante. Plant Efficiency Analyser (PEA).....</i>	29
RÉSULTATS.....	30
1 ^{RE} MÉTHODE.....	30
2 ^E MÉTHODE.....	32
3 ^E MÉTHODE.....	33
DISCUSSION.....	34
DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL.....	34
AMÉLIORATION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE MORPHOLOGIQUE.....	36
PERFECTIONNEMENT DE LA MÉTHODE D'ANALYSE DE LA CINÉTIQUE DE LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE.....	36
CONCLUSIONS.....	37
BIBLIOGRAPHIE.....	38

Introduction

De nos jours, le rayonnement non ionisant est omniprésent dans l'environnement. Le rayonnement non ionisant comprend toutes les formes de rayonnement qui- au contraire du rayonnement ionisant- n'ont pas assez d'énergie pour modifier les éléments constitutifs de la matière et des êtres vivants (atomes molécules). Font partie du rayonnement non ionisant les champs électriques et magnétiques, le rayonnement thermique, la lumière et le rayonnement ultraviolet.

Actuellement, les recherches ont tendance à se pencher davantage sur les effets du champ magnétique que sur ceux du champ électrique. En effet, il y a moins d'indices qui suggère que le champ électrique soit lié à des problèmes de santé. C'est pourquoi nous traitons surtout du champ magnétique.

Depuis une trentaine d'années, la consommation d'électricité n'a cessé de croître dans le monde industrialisé. Les réseaux de transport et distribution d'électricité se sont étendus. L'utilisation d'appareils électriques de toutes sortes a proliféré : radios, téléviseurs, ordinateurs personnels, fours à micro-ondes, téléphones portables, etc.

Les appareils et les installations électriques génèrent des champs électriques et magnétiques. Celui généré par les émetteurs et les téléphones portables est inévitable, car il constitue le moyen de transport utilisé pour le transfert des informations. Un émetteur doit émettre un rayonnement s'il doit fonctionner comme tel. La gamme de fréquence qu'on utilise est de 0 Hz à 300GHz. (Plante 1998)

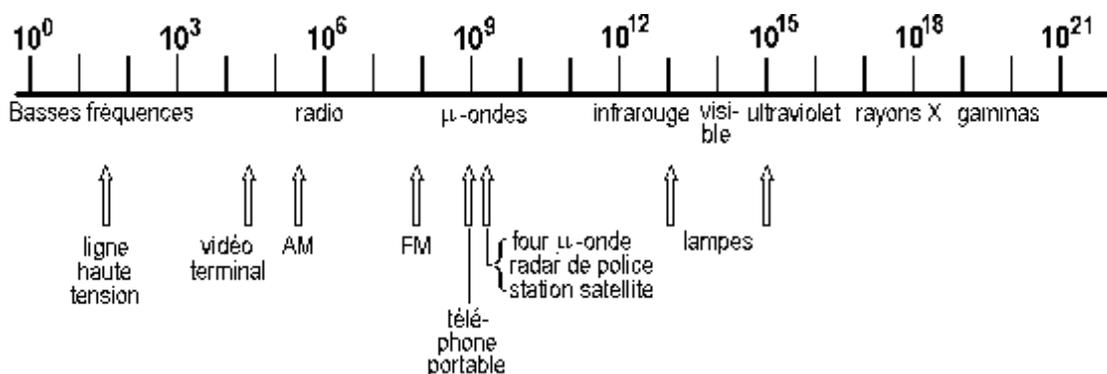


Fig.1 — Domaine de fréquences des champs électromagnétiques

Mais, lorsqu'il est émis par les appareils et les dispositifs électrotechniques, des chemins de fer jusqu'aux appareils électriques professionnels et domestiques, en passant par les lignes électriques de toute grandeur et les stations de transformation, le rayonnement est un produit secondaire non souhaitable. Ces champs constituent ce qu'on appelle globalement rayonnement électrique non ionisant. Dans le langage courant, on utilise le terme de « électrosmog ». Pour certains type d'installation, on connaît des mesures d'ordre technique ou des mesures de construction qui permettent de réduire les champs.

Les immissions peuvent avoir des intensités très différentes et des portées variables selon la source. En général, on admet que les immissions diminuent lorsqu'on s'éloigne de la source. Les champs générés par les lignes à haute tension, les chemins de fer et les émetteurs à forte puissance ont une portée relativement grande. Les lignes en câbles, les

stations de transformation et les émetteurs à faible puissance génèrent des champs à portée moyenne. Enfin, la portée des champs générés par les appareils électriques est faible. Depuis un certain nombre d'années, la société a commencé à s'interroger sur les effets potentiels liés à la présence du champ électromagnétique dans notre environnement. Des lois promulguées sur la protection de l'environnement (Ordonnance sur la protection contre le rayonnement non ionisant – ORNI) demande que le rayonnement soit limité de manière telle qu'il ne soit ni nuisible ni incommode pour l'homme et la nature.

Les deux premiers articles de la loi fédérale sur la protection de l'environnement stipulent :

« 1. La présente loi a pour but protéger les hommes, les animaux et les plantes, leurs biocénoses et leurs biotopes des atteintes nuisibles ou incommodes, et de la fertilité du sol.

2. Les atteintes qui pourraient devenir nuisibles ou incommodes seront réduites à titre préventif et assez tôt. »

Les lois de ce type préconisent en général des mesures prises à la source, de manière à limiter les émissions, que ce soit pour les pollutions atmosphériques, le bruit ou encore les rayonnements. Toutefois, pour les installations électriques nouvelles, l'ORNI fixe des distances minimales. Notons que cette ordonnance ne s'applique qu'aux installations fixes, soit les lignes haute tension, les antennes-relais de téléphonie mobile, les radars, etc. Les dispositifs mobiles, c'est-à-dire les appareils électroménagers, informatiques, etc. font l'objet de prescriptions de la part des organismes internationaux de normalisation (CEI, CISPR, ...). En particulier, les normes d'émissions applicables aux téléphones portables sont en préparation.

Au sens de la loi sur la protection de l'environnement, la prévention doit minimiser les risques qui ne sont pas encore définitivement établis. Dans l'ordonnance on indique que si de nouvelles connaissances plus approfondies apparaissent sur l'effet du rayonnement non ionisant faible, les valeurs limites d'immission devront être adaptées en conséquence. Comme les champs interagissent avec ce qui se trouve dans leur environnement immédiat, la communauté scientifique internationale poursuit depuis plus de vingt ans des recherches en vue de mieux connaître leurs effets possibles sur la santé humaine et la nature (selon ORNI-Suisse, 1999).

Le but de ce travail est d'étudier l'influence du champ électromagnétique sur la croissance d'une mousse, *Physcomitrella Patens*.

CHOIX D'UN VEGETAL

Le choix d'un végétal doit tenir compte des considérations suivantes :

- un nombre important de plantes, imposé par les tests statistiques, et des limitations raisonnables d'espace favorisent une plante de petite taille.
- une étude à différents stades de développement dans un laps de temps raisonnable serait possible surtout avec une plante présentant un cycle de vie relativement court.
- une morphologie de la plante doit être sensible aux influences externes.

Physcomitrella Patens a répondu à ces critères. D'autant plus que cette plante modèle est très bien étudiée.

PLANTES MODELES

Les plantes modèles sont des systèmes qui fournissent de précieuses informations, nécessaires à la compréhension de divers phénomènes biologiques. Il existe plusieurs modèles tels que le maïs, la tomate, le riz. Depuis quelques temps, les biologistes ont cherché une plante modèle satisfaisant à de nouvelles exigences expérimentale.

Physcomitrella patens s'est révélée être une plante modèle suffisamment représentative d'un ensemble de phénomènes biologiques et génétiques. Elle a un développement rapide et facile à caractériser, avec un temps de génération court. Pour des raisons d'économie de place et de matériel, on a choisi cette plante de petite taille dans le cadre de la présente étude.

L'idée que cette mousse peut être utilisée comme modèle en biologie végétale n'est pas nouvelle (Wang and Cove 1989; Cove, Kammerer et al. 1991 ; Cove and D. 1993 ; Schaefer 1993 ; Reski 1998 ; Reski, Reynolds et al. 1998)

Plusieurs de ses caractéristiques se sont avérées déterminantes à cet égard :

- la mousse est suffisamment représentative de plusieurs autres plantes par certains aspect de son développement (croissance tridimensionnelle apicale et intercalaire) ;
- un développement simple et un nombre réduit de types de cellules facilitent l'analyse de cette plante ;
- la possibilité de suivre la différenciation au niveau d'une seule cellule, ce qui facilite l'étude du développement.

La richesse de recherches précédentes et les connaissances approfondies du développement de *Physcomitrella patens* nous ont déterminés à l'utiliser pour cette expérience sous le champ électromagnétique.

CHAMP MAGNETIQUE

Le champ magnétique est généré par le courant électrique, c'est-à-dire par le mouvement des électrons.

La force totale (électrique et magnétique) subie par la charge q est donc de la forme :

$$\vec{F} = q[\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}]$$

- q - charge
- v - vitesse de la charge
- E - intensité du champ électrostatique
- B - induction magnétique

Le vecteur E est appelé champ électrique au point considéré. Quand les charges agissantes sont immobiles, il s'identifie au champ électrostatique.

Le vecteur B est appelé induction magnétique. Il n'existe que si les charges agissantes sont en mouvement (Gomonova 1991).

Examinons le cas des forces magnétiques appliquées à un élément de circuit filiforme :

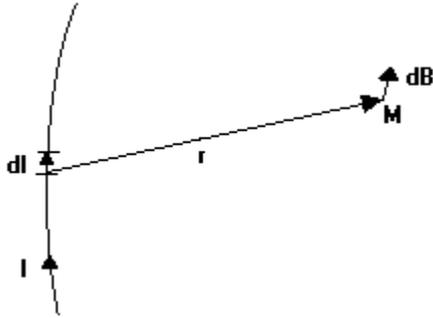


Fig.2 Élément du circuit de longueur dl

Chaque élément du circuit de longueur dl (fig.1), parcouru par un courant I crée, à son voisinage, un champ magnétique élémentaire dB donnée par la formule de Biot et Savart :

$$\overline{dB} = \frac{\mu_0}{4\pi} I \cdot d\vec{l} \wedge \frac{\vec{r}}{r^3}$$

μ_0 étant une nouvelle constante. Dans le système d'unités MKS, on définit l'intensité du courant en se donnant a priori la valeur numérique de cette constante ; on prend :

$$\mu_0 = 4\pi * 10^{-7}$$

Dans le vide l'induction magnétique B est liée au champ magnétique H par la relation : $B = \mu_0 H$. De plus l'induction magnétique dB est dirigée de manière que le trièdre (dl, r, dB) soit direct. (Brelot A., Hulin-Jung N. et al. 1994)

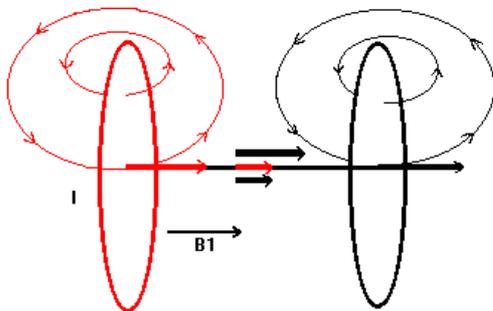


Fig. 3 – Induction à basse fréquence : distribution de l'induction magnétique produite par une bobine de Helmholtz

CHAMP ELECTROMAGNETIQUE A HAUTE FREQUENCE

La cellule TEM (*Transverse Electromagnetic*)

Les cellules TEM ont été développées pour obtenir un champ électromagnétique :

- uniforme dans la zone de travail, à l'intérieur de la cellule ;
- très rapidement décroissant à l'extérieur (Schönborn 2000).

TESTS STATISTIQUES

Analyse des paramètres considérés

La population, ayant généralement un effectif infini, subit un échantillonnage. Cela implique la sélection d'une partie d'une population, en l'occurrence d'un échantillon, l'étude de certaines caractéristiques de cet échantillon et le fait d'en tirer des inférences relatives à la population entière. Des méthodes statistiques permettent d'obtenir les informations désirées en utilisant les résultats d'un échantillon. Pour augmenter la précision de la définition des caractéristiques, l'extraction d'un échantillon doit être absolument aléatoire.

On réalise une étude statistique sur ce sous-ensemble d'une population. Pour assurer la fiabilité des résultats, les mesures sont généralement effectuées sur un nombre suffisant de plantes. Ensuite, l'étude porte sur les moyennes des paramètres mesurés dans le cadre de ce traitement (pour l'étude de l'influence du champ magnétique, on analyse un échantillon de plantes témoins et plusieurs échantillons de plantes exposées sous le champ ; paragraphe x). A l'aide de tests statistiques divers, on compare les moyennes obtenues et on en tire une conclusion sur l'effet du stress appliqué.

Il existe pourtant certaines raisons de supposer que la moyenne seule ne peut pas pleinement traduire l'état de la population : en particulier, la germination semble dépendre aussi de l'âge du stock de spores.

Moyenne. Mesure de tendance centrale qui permet de caractériser le centre de la distribution de fréquences d'une variable quantitative en donnant le même poids à toutes les observations (par opposition à la moyenne arithmétique pondérée). Elle est calculée par la somme des observations divisée par le nombre d'observations.

Médiane. Mesure de tendance centrale définie comme la valeur de la variable qui divise un ensemble d'observations rangées par ordre croissant ou décroissant en deux groupes d'effectifs égaux. Soit une variable aléatoire quantitative X . La médiane m est définie telle que la probabilité qu'une observation soit inférieure ou égale à la médiane soit inférieure ou égale à 0.5 : Nous trouvons donc 50% des observations de chaque côté de la médiane.

Variance. Mesure de dispersion d'une distribution correspondant au carré de l'écart type. Empiriquement la variance d'une variable quantitative X est définie comme la somme des carrés des écarts de chaque observation par rapport à la moyenne arithmétique, divisée par le nombre d'observations.

$$V(X) = \sigma^2$$

Coefficient de variation. Mesure de dispersion relative décrivant l'écart-type comme pourcentage de la moyenne arithmétique. Ce coefficient permet de comparer la dispersion de variables quantitatives qui ne sont pas exprimées dans la même unité (par exemple la germination des spores de stocks différents, avec différentes températures). $CV = (\sigma/\mu) \cdot 100$

Écart-type. Mesure de dispersion. Il correspond à la racine carrée positive de la variance.

En revanche, la structure de la population peut être caractérisée par le groupe des paramètres suivants :

- la moyenne*, la médiane* et le mode, qui situent l'ensemble de la population, représentant ainsi une mesure de la tendance centrale
- la variance*, l'écart type* et le coefficient de variation*, qui sont des mesures de la variabilité, ou de la dispersion

Comme déjà signalé, les tests statistiques imposent des conditions expérimentales comportant un échantillon soumis à un traitement et un échantillon témoin. Tous les tests statistiques vérifient l'hypothèse dite « nulle » qui postule qu'il n'existe aucune différence entre les populations dont les échantillons sont extraits (Zar 1984).

Les tests d'hypothèses

Les tests d'hypothèse sur une moyenne

Test bilatéral avec σ (pour la comparaison de deux populations)

l'hypothèse nulle : $H_0 : \mu =$ l'hypothèse nulle : valeur présumée

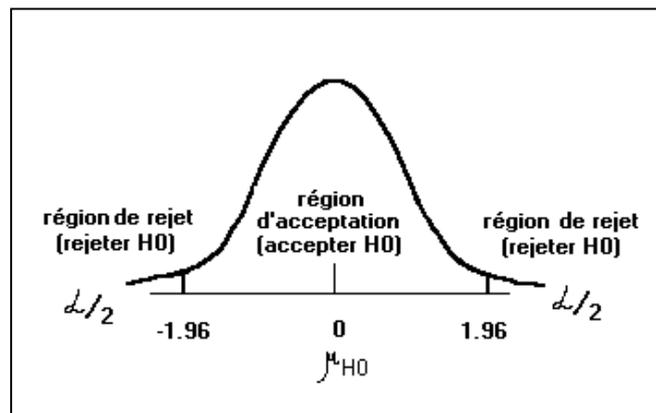
l'hypothèse alternative : $H_1 : \mu \neq$ valeur présumée

Si l'hypothèse nulle ne peut pas être acceptée, on doit conclure que la moyenne de la population n'est pas égale à la valeur.

Dans un test bilatéral, on a la situation montrée dans la figure ci-contre.

H_0 doit être rejetée lorsque μ_x est trop grande ou trop petite, le risque total d'erreur de rejet à H_0 est divisé en deux.

Si $\alpha = 0,05$, l'aire pour chacune des régions de rejet est égale à $\alpha/2$



La règle de décision

Accepter H_0 si la différence standardisée entre X et μ_{H_0} se situe dans la région d'acceptation ou

Rejeter H_0 si la différence standardisée entre X et μ_{H_0} se situe dans la région de rejet. (Calot 1978 ; Calot 1978)

Le rapport critique (RC)

La différence standardisée entre la statistique et la valeur présumée du paramètre

$$RC = \frac{X - \mu_{H_0}}{\sigma\pi}$$

Pour le traitement des résultats, on a utilisé le logiciel « STATISTICA »-le module « ANOVA/MANOVA » (*analysis of variance/ multivariate analysis of variance*).

* Voir encadré page précédente

Pourquoi l'ANOVA (analysis of variance)

Quand il y a plus de deux niveaux d'une variable indépendante à comparer, l'utilisation de tests t séparés pour comparer chaque paire de μ va donner des résultats difficiles à interpréter.

Une probabilité de 0.05 est nécessaire pour obtenir une seule valeur de t significative, mais quelle est la p d'obtenir un seul t significatif (parmi 6) par échantillonnage aléatoire? est-elle plus grande?

Plus il y a de t à comparer, plus la p que t soit significatif augmente (pas d'effet du traitement). ANOVA pour deux ou plus de groupes ANOVA, pour une variable indépendante

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$$H_0 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Principes de l'ANOVA

La variabilité totale dans un groupe de données est liée à la variabilité des individus dans chaque groupe et aussi à la variabilité entre groupes différents.

$t = X_1 - X_2 / S_{X_1 - X_2}$ = la variabilité entre groupes / la variabilité interne au groupe.

Les suppositions de l'ANOVA

Chacune des k populations d'où on extrait les groupes de l'étude suivent la loi normale.

Les variances des k populations sont égales.

Les sujets utilisés dans l'étude ont été choisis au hasard et sont cueillis indépendamment.

Un test de comparaison multiple qui suit l'ANOVA

Tukey *hsd* (honestly significant difference)

nous permet de comparer une paire de moyennes ou une paire de sous-ensembles de moyennes.

$$hsd = q_\alpha = \sqrt{\frac{MSig}{N_g}}$$

- on l'appelle la moyenne quadratique - mean square (MS) au lieu de la variance
- la valeur de q_α s'appelle la statistique du Studentized
- $df = df$ pour k , df pour $MSig$

df - degré de liberté

$df_{ig} = N_{tot} - k$

N_{tot} - nombre de données dans l'étude

k - le nombre de groupes (Assembler 1994)

Matériel et méthodes

ÉTAT ACTUEL DES RECHERCHES

Depuis peu de temps, quelques essais ont été réalisés dans le domaine de la croissance de *P. patens* sous le champ magnétique. Différentes études ont montré que le champ alternatif à 50 Hz de 1,2 mT diminue la croissance de la mousse.

Un diplôme présenté par Cristina Soleri (1997) établit qu'après l'exposition des spores de *P. patens* sous le champ magnétique, précisément égal à 1,2 mT AC, il y a plus des cellules mortes que pour les intensités inférieures (0,6 mT ; 0,9 mT ; 1,0 mT), ainsi que pour l'échantillon de contrôle sans champ.

Par la suite, on a observé que le nombre moyen de cellules par spore exposées durent 3 semaines sous le champ de 1,2 mT est réduit. (Soleri 1997)

Je montrerai toutefois par la suite que l'effet de certains paramètres, qu'il s'est avéré nécessaire de contrôler soigneusement pour assurer la reproductibilité des expériences, a été sous-estimé dans le cadre de ce travail de diplôme ; de ce fait, les différences obtenues d'une expérience à l'autre ont pu être attribuées à tort à l'influence du champ magnétique.

Dans le cadre du présent travail, j'ai cherché à utiliser une méthode expérimentale et un mode de traitement des résultats qui permettent d'aboutir à des conclusions significatives pour des champs d'intensités égales, mais à différentes fréquences comprises entre 0 Hz (courant continu) et 400 Hz. De fait, certaines des fréquences étudiées ont montré un effet constant sur la germination et la croissance des spores.

Pour d'autres fréquences en revanche, l'effet paraît fluctuer d'un essai à l'autre. Par ailleurs, on ne dispose pas pour l'instant d'explication concernant le mécanisme d'action des champs magnétiques à basse fréquence sur les systèmes biologiques. De même, des expériences au niveau moléculaire ont été réalisées.

Les agents mutagènes peuvent stimuler la recombinaison intrachromosomique. Ceci a été employé pour estimer l'ampleur de la catastrophe de Tchernobyl. Le tabac *Nicotiana tabacum* transgénique portant deux fragments incomplets et chevauchant (GU et US) du gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) a été utilisé. Aucun des deux fragments n'est fonctionnel, mais le produit d'un événement de recombinaison intrachromosomique (ICR) restitue le gène GUS fonctionnel. Sa présence peut être mise en évidence par l'activité enzymatique de son produit par coloration en bleu en présence d'un substrat spécifique (X-GAL). L'influence de champs électromagnétiques sur la ICR n'a jamais été vérifiée ; cette démarche en était donc la première tentative. Le nombre limité d'expériences et leur faible reproductibilité ne permettent malheureusement pas de tirer de conclusion de ce dernier travail

CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE *P. PATENS*

Toutes les mousses appartiennent à l'embranchement des Bryophytes (du gr. *bruon* =mousse). Les représentants du groupe sont souvent considérés comme de bons indicateurs des conditions microclimatiques et de la nature du sol.

Chez les Bryophytes la génération haploïde issue de la spore porte les organes reproducteurs sexués appelé : gamétophyte. La génération diploïde résulte de la fécondation et produit les spores par méiose qui vont conduire à la formation du sporophyte, appelé ici sporogone. Ce dernier se développe en parasite sur le gamétophyte et n'est jamais autonome.

L'appareil végétatif feuillé des mousses se base sur le protonéma (*protos* = primitif ; *nema* = filament). La plante feuillée comporte un axe et des feuilles simples ; elle est dépourvue de racines. Les gamètes se forment dans les gamétanges. Les gamétanges mâles sont appelés anthéridies et produisent des spermatozoïdes flagellés mobiles. Les gamétanges femelles sont des archégonies renfermant une unique oosphère. (G.Richter 1993).

Spore

La spore de mousse *Physcomitrella patens* est une méiospore résultant d'une méiose à partir d'une cellule mère diploïde. Elle est donc haploïde. C'est une cellule spécialisée entourée d'une vacuole et contenant les réserves d'amidon localisées dans des plastides et des lipides cytoplasmiques.

Donc la germination d'une spore dépend de la lumière. La spore gonfle par l'absorption d'eau. La paroi se déchire.

En premier, se forme le protonéma proprement dit, file de cellules chlorophylliennes à cloison perpendiculaires à l'axe. Ces tubes filamenteux comprennent deux types de cellules : cholonéma et caulonéma.

Cholonéma

Des rhizoïdes ou des cellules de chloronéma se différencient à la face inférieure.

Les cellules de chloronéma sont relativement courtes, elles contiennent une grande quantité de chloroplaste. L'élongation du cholonéma se fait principalement par la division apicale. Les parois entre les cellules sont perpendiculaires à l'axe de croissance.

Caulonéma

La transition de chloronéma en caulonéma est stimulée par les auxines* et a lieu environ 2-3 jours après la germination de la spore, ce qui correspond au stade de 4-5 cellules de chloronéma. Ces deux types de cellules se distinguent par leur forme, la cellule caulonienne étant plus allongée et moins épaisse. Une paroi est oblique par rapport à l'axe de croissance. La division des cellules de caulonéma est plus fréquente (toutes les huit heures, contre vingt quatre heures pour les cellules de chloronéma).

* auxine (auxanome = pousser) Désigne les hormones végétales qui provoquent essentiellement la croissance en longueur. [« Botanique générale »1998, Wilhelm Nutsch]

Rhizoïdes

Ce sont des cellules du caulonéma qui présentent un géotropisme positif. Les rhizoïdes, qui assurent la fixation de l'eau et des ions minéraux dans le sol, sont des filaments cellulaires ou même unicellulaires. Malgré une certaine analogie dans leur fonction, ils n'ont rien de commun avec la racine.

Bourgeon

Les bourgeons naissent à partir des cellules du protonéma. Celui-ci devient alors plus complexe et acquiert une organisation dans trois dimensions. A partir des bourgeons se développent des jeunes plantes feuillées, le gamétophore. Tout cet ensemble de protonéma de bourgeons et de pieds feuillés est haploïde.

Gamétophore

Il a une tige et des feuilles, mais différentes de celles que l'on trouve chez les plantes supérieures. Le gamétophore n'est pas vascularisé et les feuilles ne sont formées que d'une couche cellulaire.

Le gamétophore naît de la division régulière tridimensionnelle du bourgeon. La tige comporte le tissu hypoïde au centre, puis un tissu cortical et une couche de cellule épidermique. La feuille n'est formée que d'une seule couche de cellules.

Le protonéma et le gamétophore présentent un gravitropisme négatif.

Organes sexués

Les organes reproducteurs de la mousse se forment habituellement à l'extrémité de certains axes feuillés. On distingue deux types d'organe sexué qui porte gamétophore : les anthéridies et les archégones dans les quelles les gamètes males et femelles sont produits. Malgré l'habitat terrestre la fécondation reste aquatique. Le zygote donne la naissance au sporophyte.

Sporophyte

Le sporophyte, ou sporogone, qui se développe après la fécondation n'est jamais libre. Il demeure fixé sur le gamétophyte femelle. Il se constitue ainsi un pied ou suçoir. Il est relativement court chez *P.patens* (quelques millimètres), il porte une capsule contenant 5000 spores, le sporogonium.

Cycle de développement

Le cycle de développement de *P.patens* comporte ainsi deux phases successives :

- La phase gamétophytique, haploïde, correspondant aux tiges feuillées qui sont des organes sexuels : (*photos*= qui porte).
- La phase sporophythyque, diploïde, correspondant au sporogone. Il y a donc alternance de deux générations avec dominance de la phase haploïde.

Lorsque la fécondation a lieu, les spermatozoïdes pénètrent dans le col de l'archégone par chimiotropisme ; l'un d'eux fusionne avec l'oosphère pour donner le zygote. Celui-ci germe sans quitter l'archégone et se transforme en un sporophyte diploïde, le sporogone, qui reste attaché par son pied à la plante- mère. Le sporophyte reste un organisme dépendant.

Ce cycle dépend des saisons, des conditions climatiques, en particulier du rythme de température et d'éclairement.

DÉVELOPPEMENT DE P.PATENS DANS LES CONDITIONS LABORATOIRE. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.

Pour que la mousse *P.patens* se développe de manière nominale dans des conditions éloignées des conditions naturelles, elle a besoin de plusieurs éléments utilisés pour des processus métaboliques et constructifs. Dans les conditions de laboratoire, on ajoute ces éléments dans le milieu solidifié à base d'agar-agar.

Il existe un certain nombre de milieux différents que l'on utilise pour les expériences avec *P.patens*. Le plus simple d'entre eux est le milieu PP qui contient tous les macro-, micro-éléments et phosphates nécessaires au développement. Ils permettent de compléter le cycle de vie de la mousse en condition axénique. L'addition de glucose dans le milieu permet de mettre rapidement en évidence les éventuelles contaminations fongiques ou bactériennes, mais le glucose n'est pas utile au développement de la mousse. L'addition au milieu de NH_4 tartrate stimule la croissance des chloronéma. On utilise ce milieu pour produire du protonéma destiné à l'isolation de protoplastes, ainsi que pour produire de grandes quantités de matériel pour des analyses morphologiques et biochimiques.

Protocole 1 : Techniques générales de culture.

Milieu PP (Selon N.W.Ashton, N.H.Grimley&Cove Planta 144,427-435,1979)

Macro éléments

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.8 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.0125 g/l

Micro éléments

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.055 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.055 mg/l
H_3BO_3	0.614 mg/l
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.389 mg/l
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.055 mg/l
KI	0.028 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.025 mg/l

Tampon phosphate

Pour préparer cette solution il faut dissoudre 25g de KH_2PO_4 dans 50ml de H_2O . Parallèlement à la dissolution du sel, ajouter progressivement environ 40ml de KOH (concentration de la potasse 4M), tout en contrôlant le pH. Ajuster le pH à 7.0 et compléter à 100ml avec H_2O . Après l'autoclavage de la solution (1000x concentrée) ajouter 1ml par litre de milieu.

Ammonium Tartrate

Ajouter 500mg par litre de milieu avant l'autoclavage.

Glucose

Ajouter 5g par litre de milieu avant l'autoclavage.

Des éléments supplémentaires

Thiamine	500mg/l
Acide paraaminobenzoïque	250mg/l
Acide nicotinique	1g/l

Agar-agar

Ajouter 7g d'agar-agar (Merck 1614) par litre de milieu avant la stérilisation à l'autoclave. Pour des milieux liquides, le cycle d'autoclavage dure 90 minutes à 120°C.

CONDITION DE CULTURE DE *P. PATENS*

Les cultures de mousses sont réalisées à la surface d'un disque de cellophane (diamètre 8-6 cm) déposé dans la boîte de Petrie (diamètre 6-8cm) sur un milieu solidifié par l'agar-agar (concentration 0,7%). La température maintenue à 26-28°C. L'intensité lumineuse est :

Q.Ir	4,30- 7,40×10 μ mol m ⁻² ·s ⁻¹
PAR	4.97- 7,71×10 μ mol m ⁻² ·s ⁻¹
660/730	1,41- 1,86× μ mol m ⁻² ·s ⁻¹ (appareillage x)

La photopériode dont on a besoin est de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

L'expérience commence lorsqu'on verse environ 35ml (50°C) du milieu stérilisé dans la grande boîte de Petrie (20ml dans la petite). Inoculer 2ml (1ml) du stock par boîte. On peut également lancer des cultures à partir de n'importe quelle partie de la plante (protonéma, rhizoïdes, tiges, feuilles) en profitant du fait que toutes les parties de la plante sont capables de se différencier et de régénérer un protonéma.

Conservation du stock de P.patens

Collecter du protonéma de 6 à 8 jours obtenus sur le milieu NH₄ tartrate dans de l'eau distillée stérile (concentration de la mousse environ 5g par 100ml). Broyer ce matériel, à l'aide d'un broyeur de type Polytron, durant 30 secondes de façon à obtenir une suspension homogène ou les fragments de protonéma sont encore visibles. Garder le stock préparé à 4°C. On peut appliquer le même protocole pour les spores.

APPAREILLAGE

L'expérience doit se dérouler dans les conditions suivantes :

- l'intensité lumineuse définie par le protocole 1
- photopériode automatique- 16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité
- température bien précise 26-28°C et homogène dans tout la salle d'expérience
- humidité constante
- champ magnétique réglable

Les bobines de Helmholtz construites ont répondu à tous ces critères.

Dimensionnement de la bobine utilisée pour l'expérience

Données			Valeurs calculées		
N =	102		L =	162.78	m
r =	0.254	m	I_{max} =	8.25	A
D =	0.128	m	S =	1.23	mm ²
h =	4	W·m ⁻² ·K ⁻¹	B_o =	1.48	mT
δT =	60	K	R =	2.26	Ω
d =	1.25E-03	m	U =	18.60	V
ρ =	1.70E-08	Ωm			

- N - nombre totale de spires pour les deux côtés
 r - rayon moyen des enroulements [m]
 D - distance moyenne entre un enroulement et le centre de la bobine [m]
 (demi-distance entre les enroulements)
 h - facteur de transfert de puissance (refroidissement) [W·m⁻²·K⁻¹]
 δT - échauffement maximal admis [K]
 d - diamètre du fil [m]
 ρ - résistivité du fil (cuivre) [Ωm]
 L - longueur du fil [m]
 I_{max} - courant maximal [A]
 S - section du fil [m²]
 B_o - induction totale [mT]
 B₁ - induction due aux spires d'un seul côté [mT]
 R - résistance [Ω]
 U - tension [V]

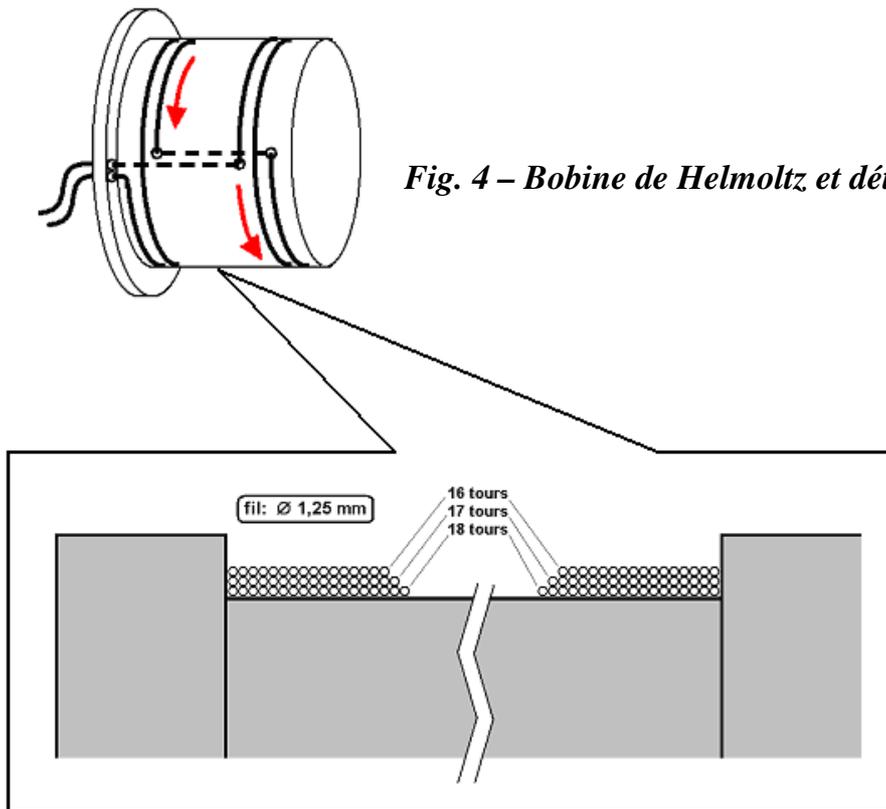


Fig. 4 – Bobine de Helmholtz et détail des enroulements

Formules utilisées pour le calcul des bobines

1. Calcul de courant parcouru des circuits d'une bobine :

$$I = \frac{N}{2} \cdot I_0$$

2. La longueur du fil utile pour une bobine :

$$L = 2\pi r N$$

3. Calcul de courant en tenant des caractéristiques du fil:

$$I_0 = \frac{\pi}{2} \sqrt{\frac{h\delta T}{\rho}} d^3$$

4. Soit un fil cylindrique, la surface de la section est définie par :

$$S = \pi \frac{d^2}{4}$$

5. D'après la loi de Biot et Savart, on peut écrire :

$$B_1 = \mu_0 I \frac{4\sqrt{5}}{25} \frac{1}{r}$$

6. Le champ magnétique dans le solénoïde est presque homogène et égal :

$$\mathbf{B}_0 = 2\mathbf{B}_1 = \mu_0 I \frac{8\sqrt{5}}{25} \frac{1}{r}$$

7. La résistance dépend des paramètres du fil :

$$R = \rho \frac{L}{S} = 8\rho \frac{Nr}{d^2}$$

8. On obtient, pour le nombre de spires de la bobine, l'équation suivante :

$$N = \frac{Rd}{8\rho} \frac{1}{r^2}$$

Ces bobines ont équipées des ventilateurs, des thermomètre mercuriels, des lampes spéciales avec les longueurs d'ondes indispensables pour le développement de la mousse. Les dimensions de la zone de travail sont : 150 × 150 × 100 mm.



Fig. 5 – Photo du dispositif expérimental pour les essais à basse fréquence

L'idée de ce travail est de mettre en évidence l'effet du champ magnétique ayant des caractéristiques semblables à celles que l'on rencontre dans notre vie quotidienne.

- DC (courant de traction des transports urbains ou de montagne)
 - 16Hz (chemin de fer)
 - 50Hz (réseaux électriques, appareils électroménagers)
 - 400Hz (alimentations de réseaux d'énergie locaux)
- } (AC)

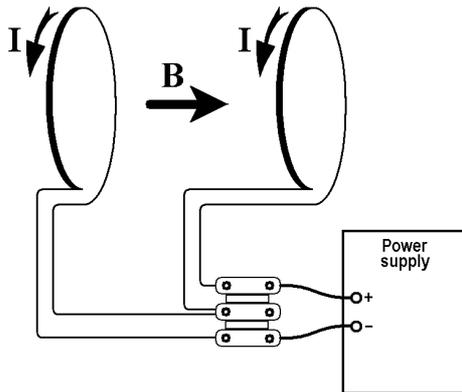


Fig. 6 – Connexion de la bobine de Helmholtz

Champ magnétique continu.

Les flux magnétiques nécessaires pour l'expérience sont générés par la source de courant stabilisée, pouvant fournir des intensités de champ magnétique allant jusqu'à environ 1,5 mT.

Champ magnétique alternatif.

L'installation utilisée pour cet essai comprend l'autotransformateur réglable :

Domaine de fréquence : 50 Hz
 Tension : 220 V
 Courant maximal : 10 A

Pour les fréquences de 16 Hz et 400 Hz, on a utilisé de sources de tension à fréquence variable :

Domaine de fréquence : 10÷1500 Hz
 Tension : 150 V
 Courant maximal : 10 A

Champ électromagnétique à haute fréquence

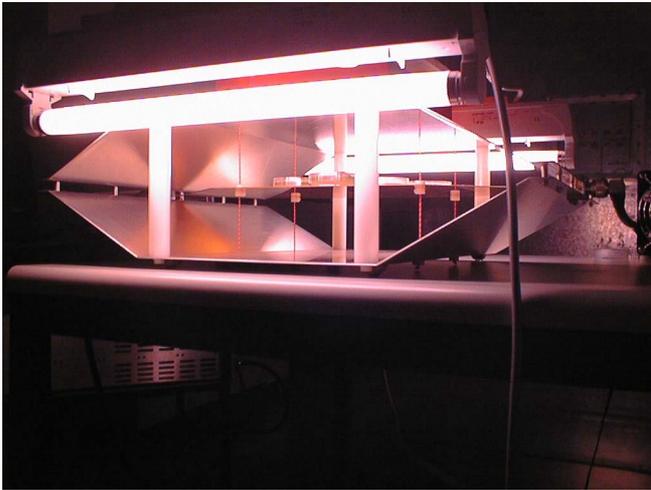


Fig. 5 – Photo du dispositif expérimental pour les essais à haute fréquence

Les cellules TEM (*Transverse Electromagneti*) sont constituées de deux plaques métalliques inférieure et supérieure reliées à la terre et d'une plaque intermédiaire placée au potentiel. Leur forme est calculée pour que l'ensemble présente une impédance caractéristique de 50Ω , ce qui permet de les alimenter au moyen d'un amplificateur haute fréquence.

La cellule utilisée a les caractéristiques suivantes :

Domaine de fréquence	: 0 à 1 GHz
Puissance maximale	: 1000 W
Champ pour 1 V à l'entrée	: 13.6 V/m
Champ maximal	: 3 kV/m
Impédance d'onde	: 377Ω
Zone de travail	: 250 x 250 x 74 mm

Contrôle des caractéristiques de la lumière

Suivant le protocole 1, la mousse *Physcomitrella patens* a besoin de conditions lumineuses spécifiques. Il existe plusieurs capteurs de quanta qui permettent de mesurer les longueurs d'onde et les rapports entre elles. Les essais présentés dans ce travail seront réalisés à l'aide de trois capteurs :

- SKP 215 PAR (Photosynthetically Active Radiation) mesure de quanta à l'intérieure de la bande de fréquences indépendamment de la longueur d'onde.
- SKR 210 Q.Ir (Quanta Intensity radiation) mesure des quanta émis en relation avec la courbe photosynthétique à double pic. Selon McCree 1976 et Sheehy 1983.
- SKR 110 660/730nm mesure le rapport d'intensité de rayonnement entre rouge et infrarouge.

PRINCIPES ET SCHEMAS. 1^{RE} METHODE

Toutes les installations utilisées sont disposées dans un cage de Faraday. Six bobines de Helmholtz placées de la sorte que le champ magnétique d'une bobine soit négligeable au niveaux des autres bobines. L'expérience comprend six condition différents :

1. une bobine – 6A (DC)
2. une bobine – 6A (16Hz, 1.07mT)
3. une bobine – 6A (50Hz, 1.07mT)
4. une bobine – 6A (50Hz, 1.20mT)
5. une bobine – 6A (400Hz, 1.07mT)
6. une bobine – 0A (contrôle)

L'éclairage dans la bobine se fait par 2 lampes ayant le spectre suivant :

Q.Ir	1,40- 1,82×10 μ mol m ⁻² .s ⁻¹
PAR	1.32- 1,72×10 μ mol m ⁻² .s ⁻¹
660/730	2,52- 3,17× μ mol m ⁻² .s ⁻¹

Ces valeurs représentent des conditions sous-optimales par rapport au protocole 1. On peut supposer que lorsque la plante est ainsi affaiblie par des conditions lumineuses de ce type, elle devient plus sensible au stress du champ magnétique. La photopériode est fixée à 16 heures de jour et 8 heures de nuit. On effectue le contrôle de la température globale et celui de chaque bobine séparément.

La première méthode d'expérience est fondée sur l'observation de la vitesse de germination des spores de *P. patens*.

Protocole 2 : Préparation de la culture des spores.

D'abord on prépare le milieu PP. Une fois autoclavé et chauffé (50°C), on le coule dans des petites boîtes de Petrie (\varnothing 6cm). Environ 35 μ l du stock de spores mélangé avec 1ml d'agar-agar (0,7%) sont versés sur la surface de disque de cellophane (\varnothing 6cm), préalablement déposé sur un milieu solidifié par l'agar-agar. Le brassage favorise la distribution homogène des spores. Le nombre de spores par boîte doit être assez pour que l'analyse statistique porte sur un effectif d'environ 120 à 220.

Les boîtes ainsi préparés sont exposées sous le champ magnétique (une boîte par bobine). Après six jours d'exposition, on observe le nombre de cellules autour de chaque spore avec un grossissement de 40 et 100 fois.

De la même façon on prépare des boîtes pour l'expérience sous le champ électromagnétique à haute fréquence. L'expérience comprend que deux conditions:

1. une cellules TEM- 900MHz
2. une cellule contrôle

Les conditions de l'intensité lumineuse, de l'humidité et de la température sont égales à ceux des expériences aux basses fréquences. (M.Burkhardt, Pocovic et al. 1996, M.Penafiel, 1997 #57)

Les résultats obtenus sont traités à l'aide du logiciel « STATISTICA »-le module « ANOVA/MANOVA » (analysis of variance/ multivariante analysis of variance)- le Tukey- test.

PRINCIPES ET SCHEMAS. 2^E METHODE.

Il existe une méthode descriptive des objets arborescents tel que L-System. Les L-systems permettent de décrire la topologie d'une plante de manière courte et récursive.

Une plante est essentiellement une tige principale, tentant de pousser verticalement vers le haut, et de laquelle partent quelques tiges plus petites. Ces tiges reprennent le modèle de la plante.

Voici les termes qui servent de base à notre langage L-system :

F : segment vers l'avant

X : dessine une branche

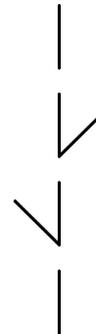
- : tourne dans le sens négatif

+ : tourne dans le sens positif

[: sauvegarde la position en cours

] : restaure la précédente

(pas de limite du nombre de sauvegardes)



Ce dessin de plante s'écrirait ainsi : F[-X]F[+X]FF

En appliquant le L-SYSTEM, on obtient un dessin de ce style. Mais l'utilisation de cette méthode s'avère limitée par la complexité rapidement croissante des équations, lorsque la structure devient plus hiérarchisée. (J. E. Hopcroft and Ullman 1979, Prusinkiewicz, 1990 #59)

Géométrie fractale.

Des objets naturels très divers, dont beaucoup sont fort familiers, tels la Terre, le Ciel et l'Océan. Bien que leur étude appartienne à des sciences différentes, entre autres la géomorphologie, l'astronomie et la théorie de la turbulence, mais ils restent toujours des objets de formes extrêmement irrégulières ou interrompues. Pour les étudier on a mis au point et largement utilisé une nouvelle géométrie de la nature.

La fin des années 70 a vu se développer la notion de géométrie fractale dans de nombreux domaines de la physique. Le concept de géométrie fractale, introduit B.B. Mandelbrot, fournit une base solide pour l'analyse des phénomènes naturels dans divers secteurs des sciences.

Le terme « fractal » a été introduit par B.B. Mandelbrot (*fractal*, c'est-à-dire a été fractionné à l'infini, du latin « *fractus* » dérivé du verbe « frangere », briser). Définition du terme fractal par B.B. Mandelbrot « Un ensemble qui présente des irrégularités à toutes les échelles ». Autrement dit c'est un objet géométrique tel que les mêmes propriétés apparaissent à différentes échelles. Il est caractérisé par une structure hiérarchisée obéissant à une loi qui sera explicitée ultérieurement.

La géométrie fractale est le complément qui manquait à la géométrie euclidienne : comme l'a fait remarquer Mandelbrot, les nuages ne sont pas les sphères, les montagnes des cônes, ni les îles des cercles et leur description nécessite une géométrisation adaptée.

On trouve également des géométries fractales dans les trajectoires de particules, dans les linges de flux hydrodynamique, les ondes, les paysages, îles et rivières, dans les plantes...

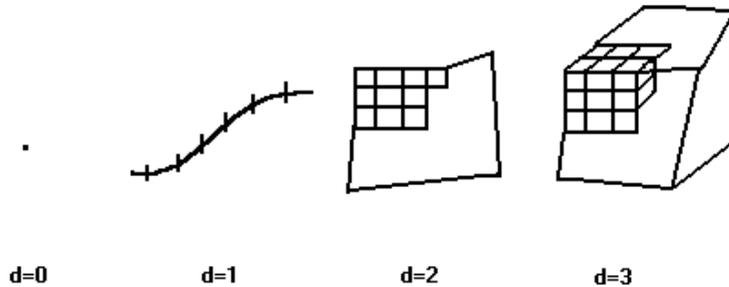


Fig. 7 – Exemples d'objets de différentes dimensions fractales

Pour mesurer une longueur, une surface ou un volume, une méthode usuelle consiste à recouvrir ces ensemble de pavés dont la longueur, la surface ou le volume sont pris comme unité de mesure. C'est précisément ce que l'on fait lorsqu'on calcule ces grandeurs au moyen d'intégrales multiples.

Si ε est le côté (étalon de longueur) d'un pavé, la mesure obtenue est,

$$M = N \cdot \varepsilon^d = N \cdot \mu$$

ou μ est l'unité de mesure (longueur, surface ou volume dans le cas présent). Cantor, Carathéodory, Peano, ... ont montré qu'il existait des objets pour lesquels cette méthode était mise en défaut. C'est se que va détailler maintenant.

La longueur de la côte de Bretagne

Supposons en effet que l'on veuille appliquer la méthode précédente à la mesure de la longueur, entre deux points fixés, d'une côte très découpée comme la côte de Bretagne. On constate rapidement que l'on est confronté à une difficulté : la longueur mesurée L dépend de l'unité de mesure choisie ε , et croît indéfiniment quand ε décroît.



Fig. 8 – Mesure de la longueur d'une côte

Pour un étalon de mesure ε_1 , on trouve une longueur $N_1 \varepsilon_1$ mais un étalon de mesure plus petit ε_2 donne une nouvelle valeur plus grande,

$$L(\varepsilon_1) = N_1 \cdot \varepsilon_1 \quad L(\varepsilon_2) = N_2 \cdot \varepsilon_2 \neq L(\varepsilon_1)$$

et ceci sur une échelle allant de plusieurs dizaines de kilomètres à quelques mètres. L.F. Richardson a constaté que la longueur variait pratiquement suivant une loi :

$$L(\varepsilon) = N(\varepsilon) \varepsilon \propto \varepsilon^{-\rho}$$

La figure 8 montre le comportement de la longueur de la côte et de l'unité de mesure. On voit que pour une courbe « normale » comme le cercle, la longueur devient constante ($\rho=0$) quand l'unité de mesure devient assez petite par rapport au rayon de courbure. La dimension du cercle est bien sûr $D=1$ (et correspond à $\rho=0$)

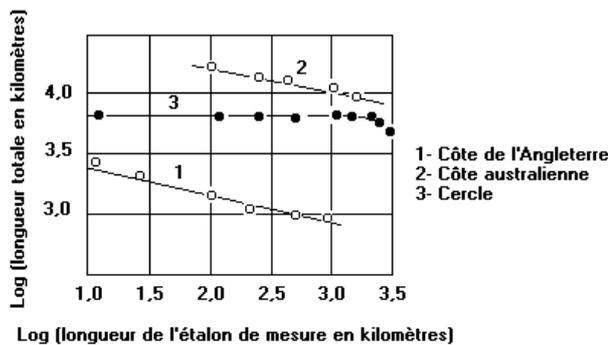


Fig. 9 – Mesures des longueurs de diverses côtes effectuées par Richardson (1961)

L'exposant $(1+\rho)$ de $1/N(\varepsilon)$ est une « dimension fractale ». Cette détermination de la mesure fractale basée sur le recouvrement de la côte par des disques de rayon ε est précisément celle utilisée par Pontrjagin et Schirelman, 1932 (Tricot 1993) pour définir la *dimension de recouvrement*.

La méthode de boîtes

C'est une méthode souvent utilisée pour de nombreuses structures fractales. Soit $N(\varepsilon)$ le nombre de pavés de côté ε recouvrant E :

$$(E) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left(\frac{\log N(\varepsilon)}{-\log \varepsilon} \right)$$

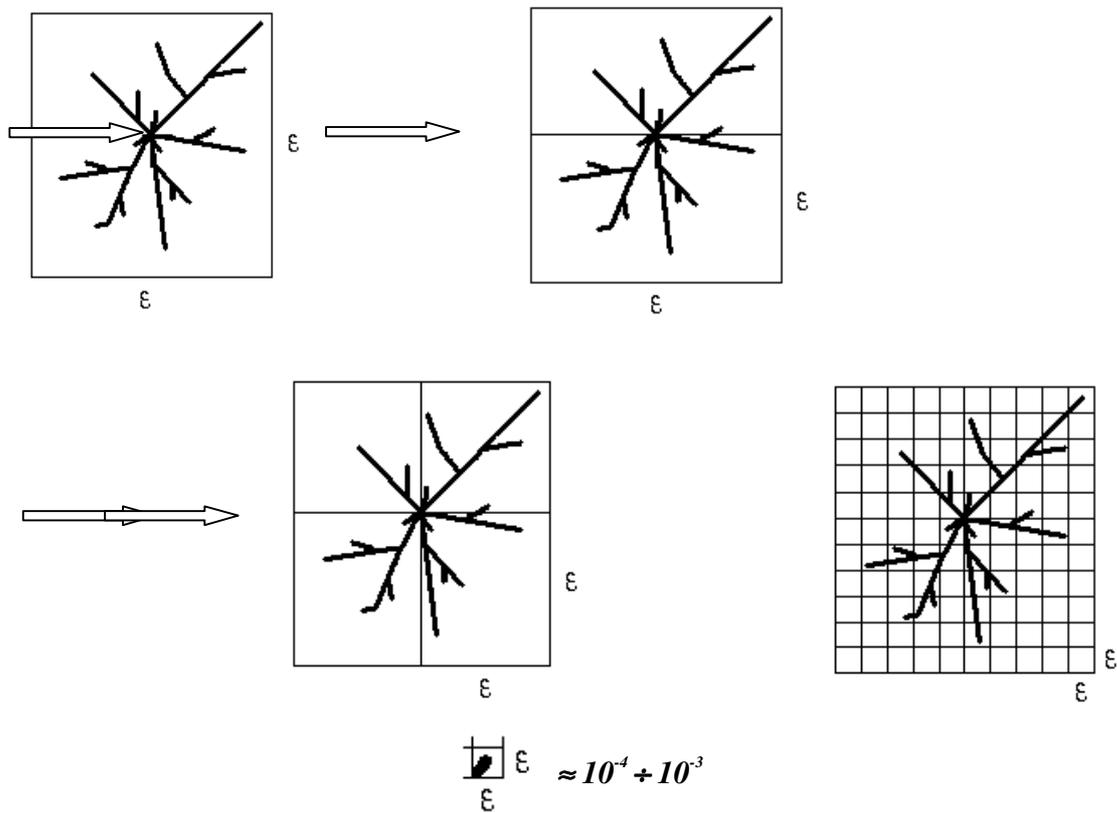


Fig.10 – Mesure de la dimension d’un objet arborescent par la méthode des boîtes

Les dimensions fractales peuvent être mesurer par la méthode des boîtes. Le nombre de boîtes (N) et la leur taille (ε) sont liées d’une formule suivante :

$$N \propto \epsilon^{-D}$$

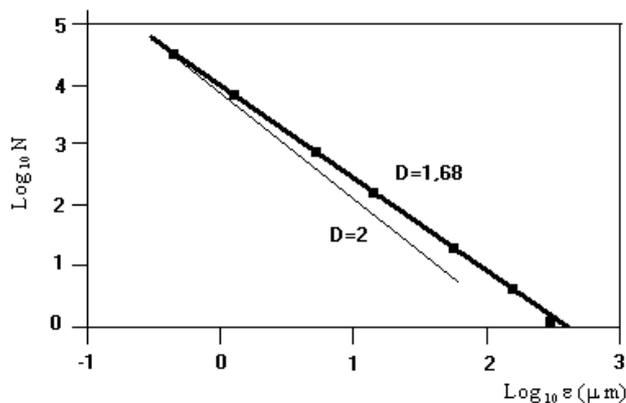


Fig. 11 – Détermination de la dimension fractale D de la structure arborescente

D - est la pente de la tangente à une courbe déterminée. Par contre ayant cette caractéristique d’un objet fractal, on peut toujours reproduire une image initiale.

Le développement de la mousse est suivi à partir d'une spore, et la méthode fractale est appliquée à l'analyse morphologique de *P.patens*.

Après 12 jours d'exposition sous le champ magnétique, on prend une série de photos. L'appareillage employé :

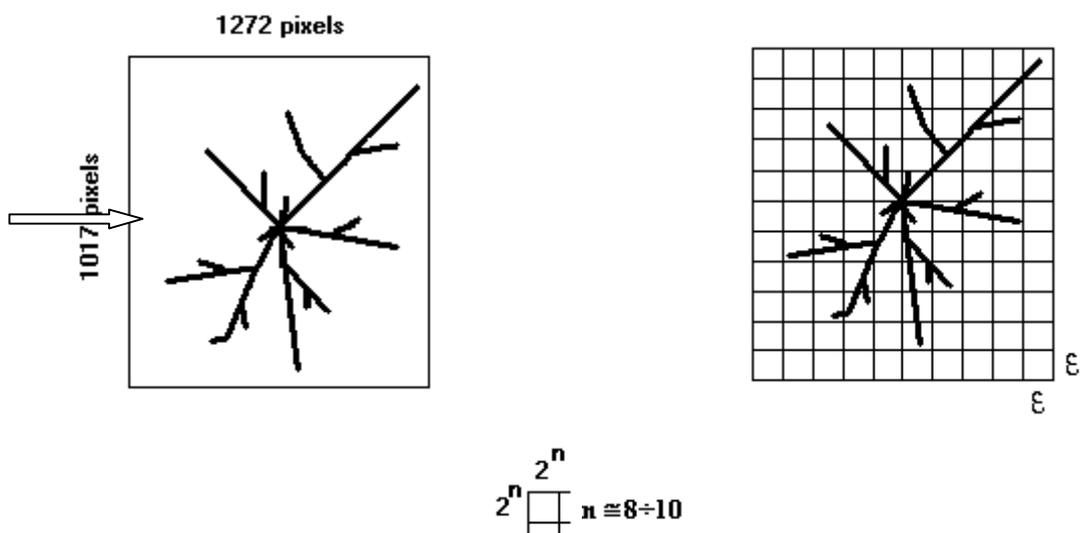
- camera numérique « Leica DC 200 »
- microscope « Diavert », Leitz

Tandis qu'une spore de la mousse est tridimensionnelle, on prend des photos de différents plans en tournant la molette de mise au point du microscope. (photo) Après avoir transféré des images sur le Macintosh on utilise le logiciel « Image SXM » de Steve Barrett version modifié du logiciel NIT Image de Wayne Pasband (national institutes of Health, USA). En gardant les parties plus nettes de chaque photo ce logiciel produit une image Composite. Ainsi cela permet d'augmenter artificiellement la profondeur de champ.

Pour traiter des photos de spores obtenues comme objets fractals, on les transmet en noir et blanc sous forme de dessin au trait, on efface tous les bruits de fond et on saisit l'image ainsi obtenue dans le logiciel graphique élaboré dans un système MATLAB version 5,3. L'idée de ce logiciel est de mettre en évidence la longueur du contact d'une spore avec le milieu. On a proposé que la surface du contact d'une spore avec le milieu est proportionnelle à l'absorption des micro- et macro éléments nécessaires pour la plante. Autrement dit, si une spore est bien développée, elle a une grande surface de contact .

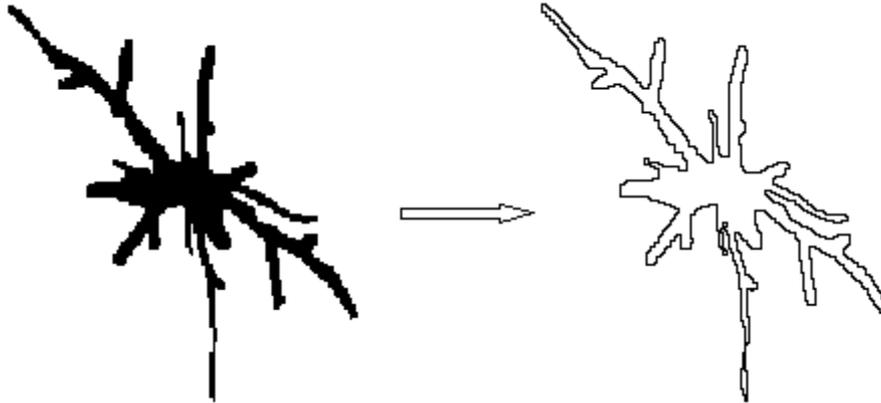
La dimension des fichiers de départ est 35 Ko. Les pas d'exécution du logiciel sont:

1. saisie de l'image composite comme fichier monochromatique, avec l'extension BMP



2. déformation de l'image de manière à obtenir un carré tel que le nombre de pixels sur chaque côté soit une puissance de 2.

3. transformation de l'objet complet en objet filiforme



4. conservation de l'objet pour l'analyse visuelle.
Calcul de la taille de boîte contenant le plus petit élément de structure fractale ;
la dimension minimale de la boîte est 2^p , $p \cong 1+2$
5. élaboration de la courbe logarithmique, détermination de la dimension fractale

PRINCIPES ET SCHEMAS. 3^E METHODE

La photosynthèse

La photosynthèse est le processus utilisé par les végétaux et les procaryotes photoautotrophes pour transformer de l'énergie lumineuse en liaisons chimiques stables. Les molécules qui constituent la clé de voûte de toutes les transformations bioénergétiques de la photosynthèse sont les chlorophylles et les systèmes ADP/ATP et NADP⁺/NADPH. Les chlorophylles sont les pigments photorécepteurs qui captent l'énergie électromagnétique du soleil, tandis que les biomolécules ATP et NADPH stockent l'énergie solaire sous forme chimique. Cette énergie est le point de départ de la synthèse des matériaux cellulaires et de toute la biomasse végétale de la terre.

La photosynthèse est un ensemble de processus très complexes qui se produit dans un intervalle de temps qui s'étend sur 19 ordres de grandeurs (10^{-15} à 10^4 secondes). La photosynthèse couvre les domaines suivants : la physique des radiations (10^{-15} à 10^{-9} secondes), la photochimie (de 10^{-8} à 10^{-4} secondes), la biochimie (10^{-4} à 10^1 secondes), la physiologie (10^{-3} à 10^5 secondes) ainsi que la botanique et l'écologie (au-delà de 10^3 à 10^4 secondes).

La photosynthèse comprend deux séries de réactions – les réactions lumineuses et les réactions obscures – qui toutes deux sont séparables dans le temps et dans l'espace. Aux réactions lumineuses, qui se déroulent dans la membrane des thylakoïdes, sont associés le dégagement d'O₂, la formation d'un réducteur physiologique (NADPH) ou artificiel (sels ferreux, divers colorants, etc.) et la biosynthèse de l'ATP. Aux réactions obscures, qui s'effectuent dans le stroma, sont associées la fixation de CO₂ et la biosynthèse des sucres, graisses et protéines.

- la première étape de la photosynthèse correspond à l'absorption de quanta de lumière par des molécules réceptrices (pigments) et au transfert de leur énergie vers le centre réactionnel photochimique. L'énergie de la lumière sera finalement transformée en ATP et en NADPH+H⁺. Ces réactions photochimiques sont étroitement liées à la réduction du CO₂ dans le stroma des chloroplastes, processus purement biochimique dépend de ATP et NADPH + H⁺.
- la fixation du CO₂ atmosphérique en glucide conduit à la formation des produits terminaux de la photosynthèse qui renferment l'énergie chimique stable déjà mentionnée.

Le bilan de la photolyse de l'eau est : 1/2O₂, deux protons H⁺ et deux électrons. Au niveau de chloroplaste dans les thylakoïde La chaîne photosynthétique participe au transport des ces électrons. Un de ce passage réalise deux molécules de plastoquinone Q_A et Q_B (Q de *quencher*, à cause de la capacité d'atténuer la fluorescence de la chlorophylle) (U.Lüttge, M.Kluge et al. 1992).

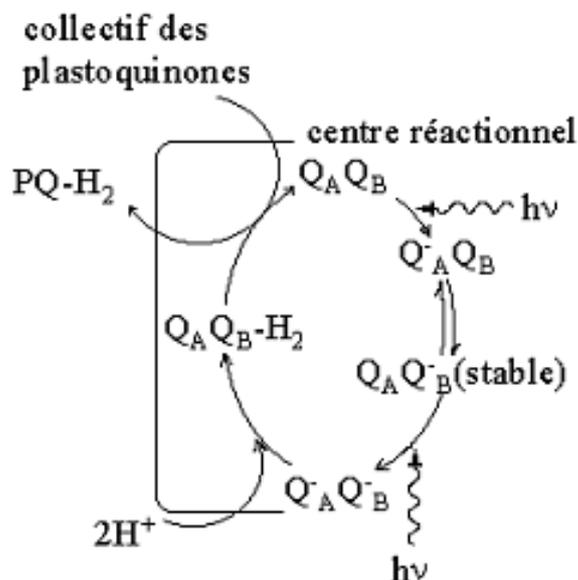


Fig. 12 – Passage des électrons au niveau du centre réactionnel

L'absorption d'un quantum de lumière (ou photon) par un pigment, la chlorophylle, par exemple, entraîne une augmentation de son énergie correspondant à l'énergie du quantum de lumière. La molécule pigmentaire passe ainsi d'un *état fondamental* à un *état excité*. Cette stimulation correspond en fait au passage d'un électron π sur une orbite ayant un niveau énergétique plus élevé grâce à l'énergie lumineuse absorbée. Cet électron est alors dans un état plus énergétique (c'est-à-dire plus réactif).

Les états excités sont instables. Les électrons ont donc tendance à retourner à l'état le moins énergétique (soit l'état fondamental). La durée de l'état excité est d'autant plus courte que l'état énergétique est plus élevé. Les quanta de lumière pouvant être absorbés et exciter une molécule de pigment, sont ceux dont l'énergie permet d'atteindre l'un des états excités possible.

Par ailleurs, l'énergie libérée par le retour à l'état fondamental peut être réémise sous forme de lumière. Ce processus est appelé *fluorescence*. Les photons de la lumière fluorescente émise par la chlorophylle sont rouges étant donné à l'énergie d'excitation du 1^{er} état singulet.

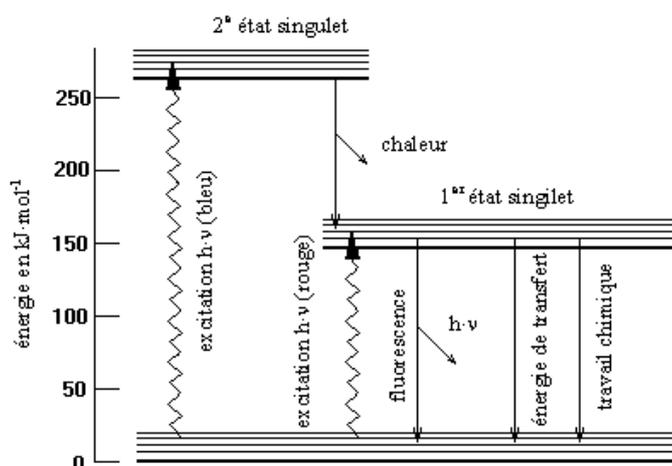


Fig.13 Schéma simplifié des états excités d'une molécule de chlorophylle.

La fluorescence de la chlorophylle représente une énergie d'excitation non utilisée, donc perdue. Elle est en fait très limitée, bien que mesurable, dans les cellules vivantes. Elle est d'autant plus faible que l'énergie d'excitation du 1^{er} état singulet est plus efficacement utilisée sous forme de travail photochimique. La mesure de la fluorescence chlorophyllienne dans des conditions données peut nous informer sur l'efficacité de la réaction claire de la photosynthèse.

(U.Lüttge, M.Kluge et al. 1992)

Effet Kautsky

Lorsque des cellules sont brusquement éclairées après une période d'obscurité, la fluorescence qui apparaît monte d'abord rapidement jusqu'à une valeur maximale et diminue soudain. L'intensité de la fluorescence présente 1 à 2 oscillations identiques avant de se stabiliser à une valeur constante (effet Kautsky). On observe le même phénomène au moment où la lumière qui enclenche la photosynthèse est allumée : le dégagement d'oxygène et l'absorption de gaz carbonique montrent des oscillations caractéristiques, qui correspondent à celles de la fluorescence. Un fort éclair lumineux, lancé au milieu d'une période obscure, entraîne immédiatement une faible émission de fluorescence rouge, qu'il est possible de mesurer à l'aide d'une cellule photoélectrique sensible. (U.Lüttge, M.Kluge et al. 1992)

La procédure d'analyse de plante. Plant Efficiency Analyser (PEA)

L'appareil mesure le signal émis par les plantes vertes. Le résultat représente la cinétique de fluorescence de la chlorophylle. Plusieurs caractéristiques de cette courbe témoignent de l'état du système photosynthétique.

Cette appareil portable « Firmware » version P02.002 comprend le capteur photosensible branché au boîtier de contrôle et le bloc d'alimentation. Le capteur consiste en une diode émettant des rayons de 580÷700 nm, une photodiode qui capte la réémission de fluorescence et filtre la transmission du signal. Le boîtier de contrôle comporte un microprocesseur avec tableau de contrôle et un affichage numérique.

La force de l'éclairage, la durée de l'impulse lumineuse, le temps d'enregistrement des données sont des paramètres variables. Comme résultat on obtient une courbe comportant des pics correspondant à l'état du photosystème.

Résultats

1^{RE} METHODE

L'application de la 1^{re} méthode dans les expériences a montré que les plantes réagissent au champ magnétique d'une façon mesurable. Suivant cette méthode, 11 expériences ont été effectuées. Pour le traitement des résultats de chaque essai, on a employé le test statistique d'ANOVA/MANOVA.

L'écart absolu (en anglais : *standard error*) s'applique à l'incertitude qui apparaît autour d'un indice global, comme la moyenne par exemple ; il peut par conséquent donner une idée de la précision calculée sur un sous-ensemble de mesures. Si les \bar{x}_i sont les moyennes calculées sur des ensembles de données et si μ est la moyenne des moyennes effectuées sur l'ensemble des ensembles (relatifs à la même expérience), alors l'écart absolu est la moyenne des écarts $|\bar{x}_i - \mu|$. L'incertitude est en général liée aux erreurs de mesures.

L'écart-type (σ) (en anglais : *standard deviation*) est une caractéristique de dispersion, indiquée sur le graphique par des barres d'incertitude sur les données, correspondent à $\pm \sigma$.

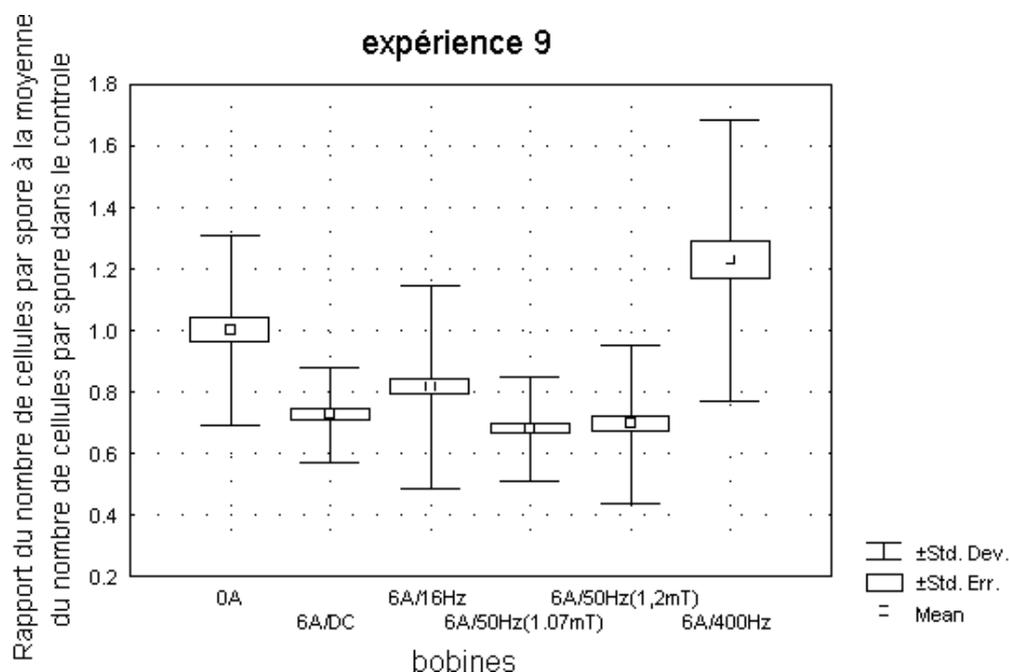


Fig. 14 – Comparaison des résultats de six conditions différentes d'une expérience à basses fréquences

De même, pour le traitement des résultats on a calculé la moyenne du nombre de cellules par spore, puis apprécié ensuite en pourcentage du nombre moyen de cellules du contrôle.

Exp./co ndit.	contrôle	6A/DC	6A/16H z	6A/50H z-1.07	6A/50H z-1.2	6A/400 Hz
1	100%	82%	87%	93%	-	107%
2	100%	77%	91%	82%	-	99%
3	100%	98%	78%	138%	-	167%
4	100%	84%	75%	114%	-	131%
5	100%	44%	56%	58%	-	108%
6	100%	74%	74%	97%	-	119%
7	100%	80%	66%	112%	-	141%
8	100%	99%	65%	75%	77%	119%
9	100%	72%	81%	68%	69%	122%
10	100%	106%	75%	74%	75%	116%
11	100%	120%	81%	89%	80%	132%



aucune
influence



croissance
retardée



croissance
accélérée

Comparaison du nombre moyen de cellules par spore

Plusieurs expériences sous le champ à haute fréquence (900MHz) ont été effectuées. Ci-dessous quelques résultats de ces expériences:

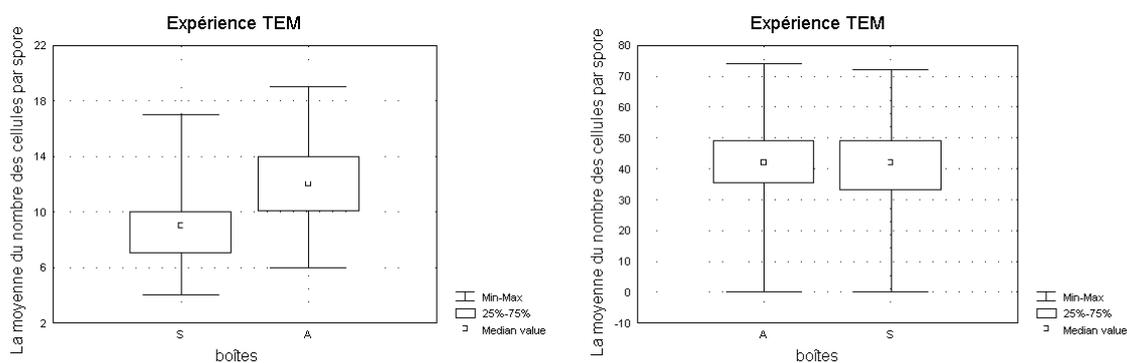


Fig. 15 – Comparaison des résultats de six conditions différentes d'une expérience à hautes fréquences

2^E METHODE

La méthode de fractale a été appliquée pour interpréter des photos de spores. On a pris comme base la proposition que la longueur de la surface de contact d'une spore avec le milieu nutritif peut montrer l'état d'une spore. Si une spore est bien développée elle a une structure complexe et une longueur du contact assez grande, le processus d'absorption des macro- et micro-éléments se passe à plein bord à par ça la vitesse du développement est haute. Par contre si la taille d'une plante est relativement petite une spore ne reçoit pas assez de la nourriture pour le développement rapide.

Des résultats de deux expériences indépendantes, faites chacune avec deux spores, ont été saisis dans le logiciel graphique. Les pentes des droites déterminées à différents stades de développement ont été reportées dans le graphique suivants :

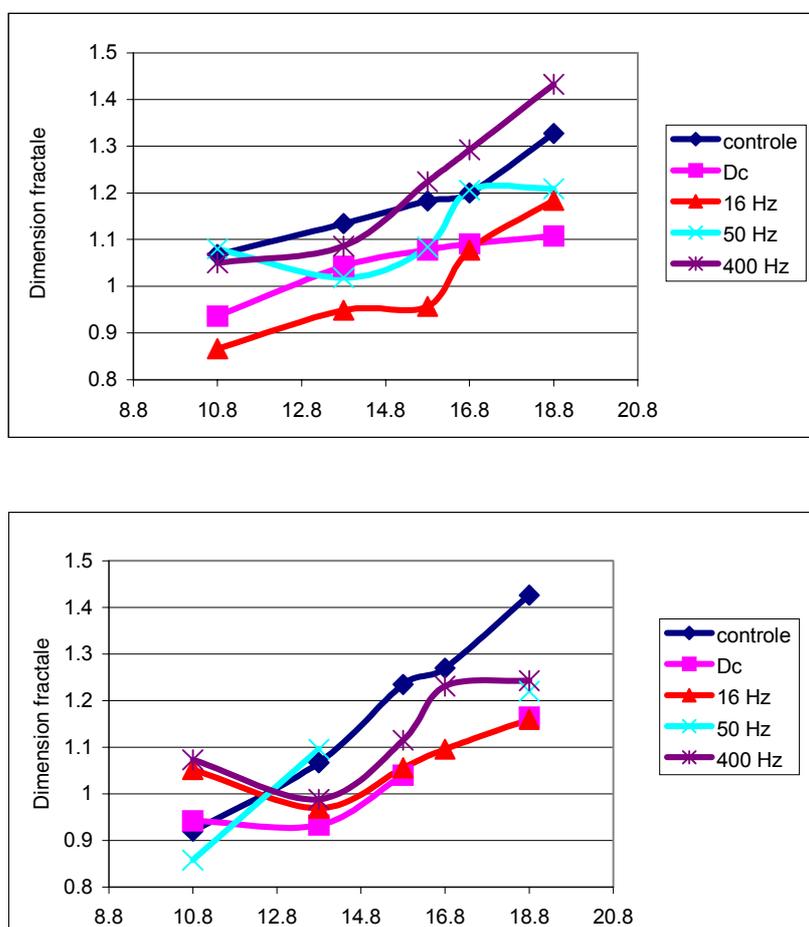


Fig. 16 – Comparaison des dimensions fractales de différentes spores (1^{re} expérience)

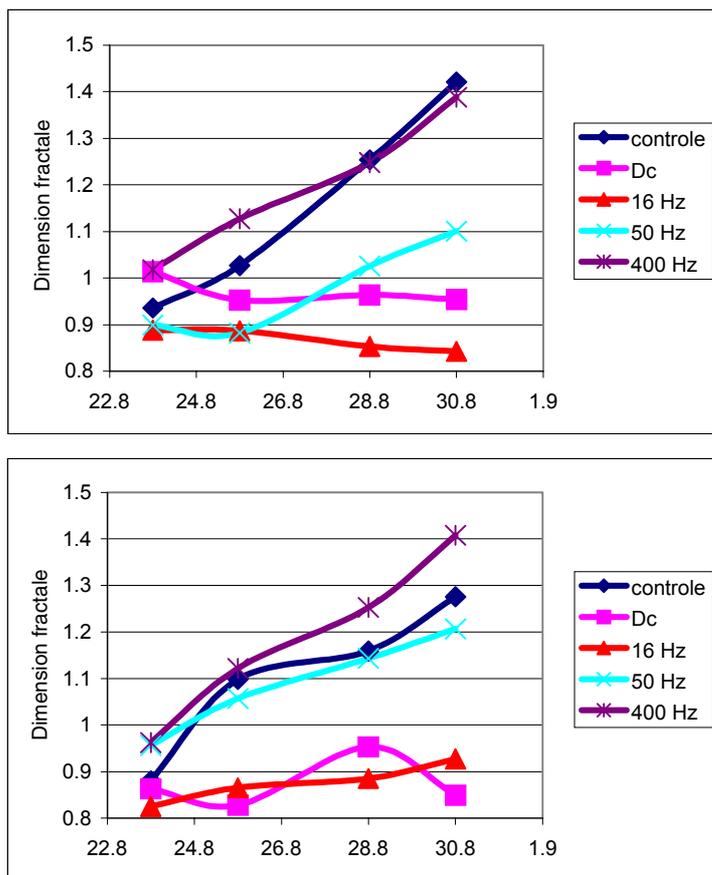


Fig. 17 – Comparaison des dimensions fractales de différentes spores (2^e expérience)

3^E METHODE

La méthode d'analyse de la cinétique fluorescente a été mise en pratique. Cette méthode a donné la possibilité de connaître plusieurs paramètres du photosystème en relation avec son état physiologique, l'efficacité de l'absorption des quanta de la lumière, l'efficacité du transport des électrons au niveau du centre réactionnel etc. Les résultats préliminaires ont été obtenus grâce à cette méthode.

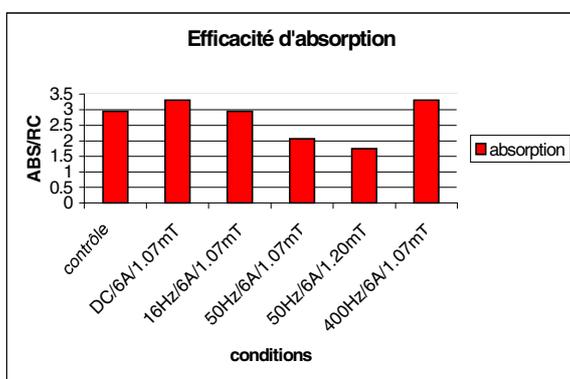


Fig. 18 – Absorption des quanta de la lumière par le centre réactionnel

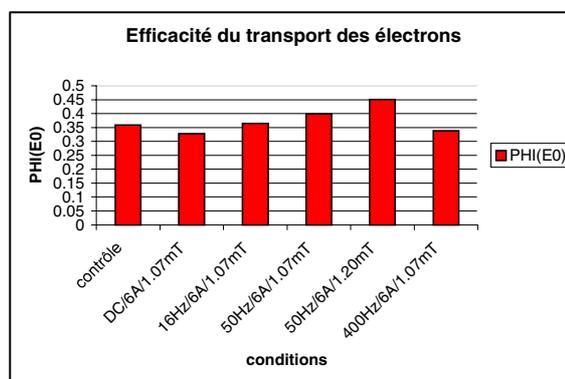


Fig. 19 – Potentiel du transport des électrons

Discussion

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Le déroulement des expériences, ainsi que les mesures supplémentaires, a démontré que le dispositif est bien approprié à l'étude de l'action du champ magnétique sur un végétal. Néanmoins, nous avons rencontré quelques problèmes techniques qui se sont manifestés au cours de nos expériences.

La technique de contrôle de température s'est révélée mal adaptée dans les bobines. Le courant électrique, induisant le champ magnétique, produit une certaine quantité de chaleur qui, à son tour, réchauffe des bobines. Pour cela la ventilation commune a été optimisée. Dans la bobine témoin, dans laquelle il n'y a pas de courant, une source de chaleur supplémentaire a été ajoutée. Cela a permis d'obtenir des conditions quasi identiques dans les différentes bobines.

Pour vérifier l'absence de différence entre les bobines, on a employé la première méthode de comptage sans aucun champ magnétique dans les différentes bobines et on a comparé le nombre moyen de cellules par spore.

bobine de contrôle	bobine prévue pour...			
	...DC	...16Hz	...50Hz	...400Hz
100%	97%	95%	91%	93%

Contrôle de la variabilité entre les bobines

La variation de la température durant les expériences est de 2 à 2,5°C. Parallèlement on a réalisé une expérience indépendante, sans champ magnétique, dans les mêmes conditions lumineuses que celles qui prévalent dans les bobines, mais en imposant une différence de température de 3°C. Le dénombrement des cellules issues d'une spore a montré que cette différence n'exerce aucune influence sur la moyenne du nombre des cellules par spore.

température	24°C	27°C
moyenne	19.67	19.55
différence	1%	

Comparaison de la moyenne du nombre de cellules par spore

Une des améliorations possibles du dispositif serait de contrôler la température durant tout une expérience.

Afin de s'assurer de l'absence d'un effet autre que le champ magnétique, les différentes fréquences ont été appliquées successivement dans différentes bobines. Aucune influence n'a été constatée sur les résultats.

L'amélioration de la méthode d'analyse du dénombrement des cellules issues d'une spore. La méthode de dénombrement des cellules déjà a été utilisée précédemment. Le compte a été effectué dans les 21 jours suivant le début de l'expérience. Il est montré que la tendance de développement est la même après 5 jours qu'après 13 jours. De ce fait, nous pouvons analyser des plantes qui contiennent un petit nombre des cellules par spore (à 5 jours de développement) et il n'est pas nécessaire d'attendre un développement plus important de la plante qui nécessiterait des comptages fastidieux. Cela permet également d'analyser un nombre des spores suffisant pour que les test statistiques soient significatifs (120-220 échantillons par condition).

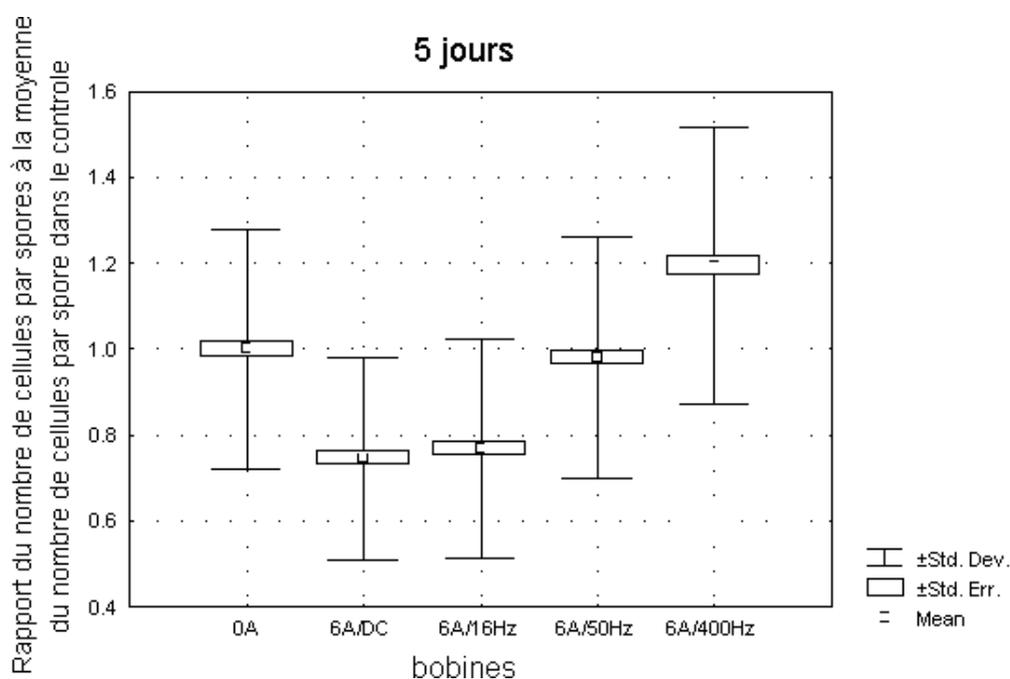


Fig. 20 – Comparaison des résultats des six conditions différentes au cours d'une expérience

L'étude porte sur les moyennes des paramètres mesurés dans le cadre de ce traitement.

Une analyse de l'influence du stock de spores utilisés sur le développement des cellules a montré que :

- le nombre de cellules par spore en présence d'un champ magnétique, rapporté au nombre de cellules par spore du contrôle, varie d'un stock à l'autre ;
- en revanche, la tendance à un retard ou à une stimulation de la croissance reste généralement la même quel que soit le stock.

Contrairement aux résultats obtenus dans d'autres études, on a trouvé que le taux de mortalité des spores ne dépend pas du champ magnétique. Les résultats de plusieurs expériences se sont révélés variables à l'intérieur d'un même stock, et plus encore d'un stock à l'autre, de sorte que ce paramètre ne semble pas pouvoir servir pour l'analyse de l'influence du champ magnétique.

exp./condit.	contrôle	6A/DC	6A/16Hz	6A/50Hz	6A/400Hz
1	11.50%	8.00%	5.90%	6.50%	4.50%
2	11.80%	16.20%	10.30%	9.50%	6.50%
5	13.50%	13.50%	12.60%	12.90%	8.60%
4	0.90%	0.90%	2.30%	0.90%	0.80%
3	1.20%	2.60%	4.10%	3.90%	3.80%



même stock des spores

Mortalité (en pourcentage de spores mortes par rapport au nombre des plantes totales)

AMELIORATION DE LA METHODE D'ANALYSE MORPHOLOGIQUE

Pour pouvoir traiter précisément une photo de spore comme objet fractal, il est tout d'abord nécessaire d'avoir une image nette. Telle était la première raison d'utiliser le logiciel « Image SHM ». Mais parfois, quand les cellules issues d'une spore sont trop nombreuses, il devient impossible de voir la microstructure au centre d'une spore. La tache obtenue rapproche artificiellement la dimension fractale d'une spore de celle d'un cercle et altère les résultats. Pour cette raison, on a optimisé le logiciel utilisé pour évaluer la dimension fractale de façon à transformer l'objet complet en objet filiforme. Cette opération a augmenté la précision de la méthode.

PERFECTIONNEMENT DE LA METHODE D'ANALYSE DE LA CINETIQUE DE LA FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE

Dans un premier temps, l'appareil servant à mesurer le signal émis par les plantes au niveau de feuilles, a été utilisé pour le protonéma de la mousse. Normalement, le contact direct ne peut être employé que pour les feuilles ; dans notre cas, le capteur causait des dégâts visibles au protonéma. Par la suite, le perfectionnement de la méthode a permis la mesure à travers la boîte de Petri et le milieu gélifié. Par ailleurs, l'optimisation des conditions de la mesure a donné le cycle suivant :

- 1 μ s de lumière
- 10 μ s d'adaptation à l'obscurité
- 1 μ s de lumière...

Les résultats de ce cycle se sont avérés suffisamment reproductibles.

Conclusions

Nous avons élaboré un dispositif afin d'étudier l'action du champ magnétique sur le développement de la mousse *P.patens*. Il a été mis en évidence la réaction de la plante à des champs magnétiques de différentes fréquences. Le tableau X présente la comparaison du nombre moyen de cellules par spore. Au niveau d'une plante on peut remarquer que

- DC et 16 Hz ralentissent la division d'une spore
- 400 Hz accélère la division d'une spore

Le tableau X montre qu'au niveau d'une population homogène la même tendance s'affirme que celle observée pour une spore

- DC et 16 Hz diminuent la vitesse de la croissance des plantes
- 400 Hz au contraire stimule le développement des spores

Par contre à une fréquence 50 Hz aucune différence significative n'a pas été observée. Les résultats varient d'une expérience à l'autre. Mais dans 6 expériences sur 11 on a observé un retard de croissance.

L'analyse morphologique de la mousse *P. patens* confirme les résultats de la méthode de dénombrement des cellules issues d'une spore.

- après 6 jours d'exposition sous les champs à 16 Hz et DC, la structure d'une plante, ayant une relativement faible longueur du contact avec le milieu, est définitivement moins complexe que celle constatée sur l'échantillon témoin.
- l'analyse d'images des spores après l'exposition à 50 Hz montre que la structure des plantes est moins développée que celle du contrôle.
- les spores exposées à 400 Hz présentent une plus grande longueur de contact avec le milieu que les spores de l'échantillon de contrôle.

Cette méthode mathématique confirme l'effet biologique produit sur le développement de la mousse sous le champ magnétique à différentes fréquences, tel qu'il a déjà été mis en évidence par les autres méthodes.

L'essai à haute fréquence semble indiquer que deux effets se superposent au niveau de la plante : l'action directe du champ magnétique sur le système biologique d'une part, et l'effet thermique causé par du flux magnétique à 900 Hz d'autre part. En effet, les conditions expérimentales utilisées se sont révélées inaptes à séparer les deux effets en question de sorte que c'est toute la méthodologie expérimentale qui devrait être réexaminée en vue des études ultérieures.

Après amélioration de la méthode de traitement de la cinétique de la fluorescence chlorophyllienne, celle-ci s'est révélée tout à fait fiable. Les résultats préliminaires obtenus se sont avérés clairement reproductibles. Malheureusement, le temps à disposition dans le cadre de ce travail n'a pas permis de procéder aux multiples répétitions de l'expérience qui seules auraient pu mettre en évidence le fonctionnement du photosystème exposé au champ magnétique.

Par ce travail nous avons pu montrer l'effet, au niveau biologique, des champs magnétiques de différentes fréquences sur le développement de la mousse *P. patens*. En revanche, le mécanisme d'action du champ magnétique aux niveaux génétique et physiologique reste inconnu et offre un vaste champ de recherches à approfondir au moyen de méthodes expérimentales de nature différente.

Bibliographie

- Assembler, M. (1994). General conventions and statistics 1, Statistica for Windows.
- Brelot A., Hulin-Jung N., et al. (1994). Électricité Magnétisme.
- Calot, G. (1978). Cours de calcul des probabilités.
- Calot, G. (1978). Cours de statistique descriptive.
- Cove, D. J. and K. C. D. (1993). "The moss *Physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction." The Plant Cell **5**: 1483-1488.
- Cove, D. J., W. Kammerer, et al. (1991). Developmental genetic studies of the moss *Physcomitrella patens*. Molecular biology of plant development. G. I. Jenkins and W. Schuch. Cambridge, UK, Company of biologists: 31 - 43.
- G.Richter (1993). Métabolisme des végétaux.
- Gomonova (1991). Physique.
- J. E. Hopcroft and J. D. Ullman (1979). Introduction to Automata Theory, Languages, and Computation.
- M.Burkhardt, K. Pocovic, et al. (1996). "Numerical and Experimental Dosimetry Of Petri Dish Exposure Setups." Bioelectromagnetics **17**: 483-493.
- Plante, M. (1998). Les champs électriques et magnétiques et la santé. Québec: 28.
- Reski, R. (1998). "DEVELOPMENT, GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY OF MOSSES [Review]." Botanica Acta **111**(1): 1-15.
- Reski, R., S. Reynolds, et al. (1998). "Moss (*Physcomitrella Patens*) Expressed Sequence Tags Include Several Sequences Which Are Novel For Plants." Botanica Acta **111**(2): 143-149.
- Schaefer, D. G. (1993). *Physcomitrella patens*, a model system for the genetic dissection of plant developmental processes, University of Lausanne, Switzerland.
- Schönborn, F. J. (2000). Risk assessment to EMF exposure by mobile phones: optimization of rf exposure setups: 65.
- Soleri, C. (1997). Inquinamento elettromagnetico a 50 Hz. Stato dell'arte e prime indagini sperimentali. Torino, Politecnico di Torino: 190.
- Tricot, C. (1993). Courbes et dimension fractale.
- U.Lüttge, M.Kluge, et al. (1992). Botanique.
- Wang, T. L. and D. J. Cove (1989). "Mosses - lower plants with high potential." Plants today **2**: 44-50.
- Zar, J. H. (1984). Biostatistical analysis.