

Matériels et méthodes

1. Le matériel végétal

1.1. Les caractères botaniques

1.1.1. Les racines

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

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

1.1.2. La tige

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

1.1.3. Les feuilles

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



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

1.1.4. Les fleurs

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

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



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

1.2. Les variétés

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

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

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

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

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

* Le type de Burley ou le tabac clair

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

Deux variétés ont été utilisées pour ce travail:

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

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

2. Les conditions de culture

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

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

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

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

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

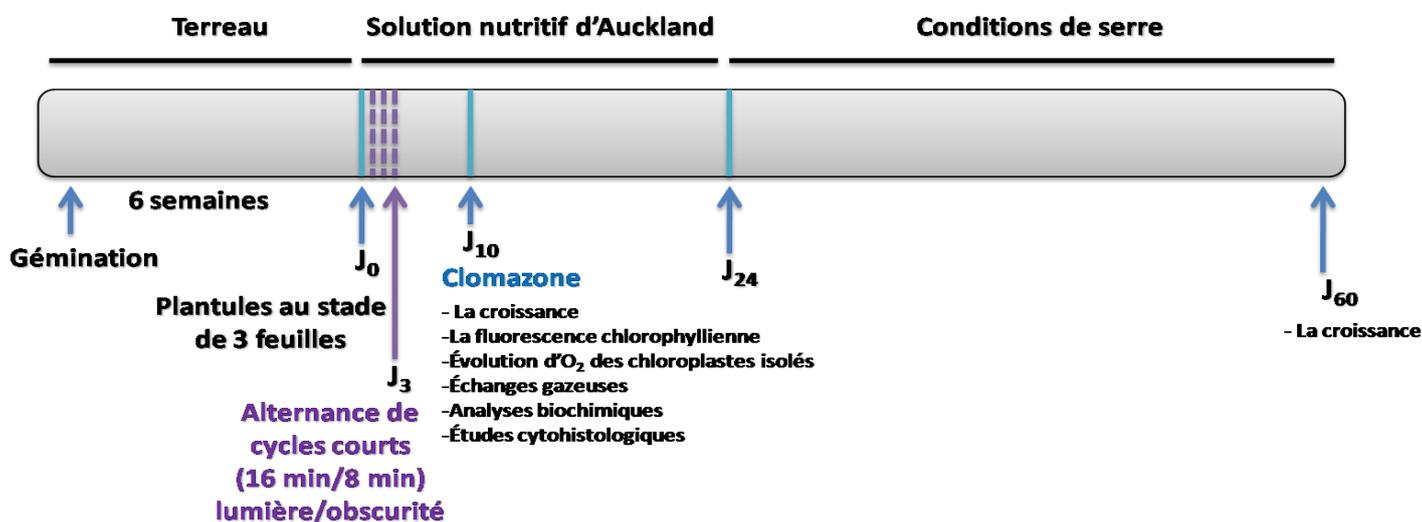


Figure 2. Représentation schématique du protocole expérimental, des traitements et des conditions de culture. J₀, J₃, J₁₀, J₂₄ et J₆₀ se réfèrent aux jours après le traitement par l'alternance.

3. Méthodes

3.1. Détermination de la croissance

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

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

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

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

3.3. Préparation des chloroplastes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5. Analyses biochimiques

3.5.1. Dosage des pigments photosynthétiques

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

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

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

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

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

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

3.5.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

L'extraction et le dosage de H_2O_2 ont été effectués selon la méthode décrite par [Murshed et al. \(2013\)](#) avec certaines modifications. Deux cent cinquante milligrammes de feuilles de tabac ont été broyées et homogénéisées dans 1 mL de 0,1 % d'acide trichloracétique (TCA). Le broyat a été centrifugé à $12,000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C. Les aliquotes de 100 μL de chaque tube ont été placées dans des microplaques à 96 puits, et avec 50 μL de 10 mM d'un tampon phosphate de potassium ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) (pH 7) et 100 μL de 1 M KI ont été ajoutés dans

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

Les solutions de dosage:

0,1 % TCA: 0,2 g TCA dans 200 mL H₂O

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

1 M KI: 4,15 g (KI) + 25 mL H₂O

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

3.5.3. Dosage de l'ascorbate

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

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

Les solutions de dosage:

6 % TCA: 12 g TCA dans 200 mL H₂O

10 % TCA: 20 g TCA dans 200 mL H₂O

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

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

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

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

: 100 µL 1 M AsA + 900 µL TCA 6 %

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

3.5.4. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

1. Extraction des enzymes

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

Les solutions d'extraction:

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

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

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

2. Dosage des protéines

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

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

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

Les solutions de dosage:

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

3. Détermination de l'activité des enzymes antioxydantes

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

- L'ascorbate peroxidase (APX)

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

Les solutions d'analyse:

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

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

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

- Déhydroascorbate reductase (DHAR)

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

Les solutions d'analyse:

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

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

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

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

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

5 µL (0,2 mM DHA) par puits

- *Monodéhydroascorbate reductase (MDHAR)*

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

Les solutions d'analyse:

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

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

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

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

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

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

- *Glutathione reductase (GR)*

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

Les solutions d'analyse:

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

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

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

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

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

- *Catalase (CAT)*

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

Les solutions d'analyse:

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

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

- *Superoxyde dismutase (SOD)*

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

Les solutions d'analyse:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Le dosage par HPLC

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

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

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

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

3.6. Analyses cytohistologiques

3.6.1 Prélèvements et fixation des échantillons

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

3.6.2 Inclusion et section

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

3.6.3 Colorations

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

3.6.4 Analyses microscopiques

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

4. Analyses statistiques

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

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

