



**HAL**  
open science

**Etude de la composition en métabolites primaires du phylloplan et des compartiments foliaires sources, l'apoplaste et le milieu intracellulaire. Importance de la barrière cuticulaire dans le passage des métabolites vers la surface foliaire**

Linda Stammitti

► **To cite this version:**

Linda Stammitti. Etude de la composition en métabolites primaires du phylloplan et des compartiments foliaires sources, l'apoplaste et le milieu intracellulaire. Importance de la barrière cuticulaire dans le passage des métabolites vers la surface foliaire. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1995. Français. NNT : 1995NAN10072 . tel-01748603

**HAL Id: tel-01748603**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748603>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

*Ecole doctorale : Biologie et Santé*  
*U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques*

**ÉTUDE DE LA COMPOSITION EN MÉTABOLITES PRIMAIRES DU PHYLLOPLAN  
ET DES COMPARTIMENTS FOLIAIRES SOURCES, L'APOPLASTE ET LE MILIEU  
INTRACELLULAIRE. IMPORTANCE DE LA BARRIÈRE CUTICULAIRE DANS LE  
PASSAGE DES MÉTABOLITES VERS LA SURFACE FOLIAIRE.**

présentée par **Linda STAMMITTI**

Spécialité : Biologie végétale



Soutenue publiquement le 30 mars 1995 devant la commission d'examen

Jury : Mme Mr. P. Dizengremel	<i>Université de Nancy I</i>	Président
C. Gauvrit	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>	Rapporteur
J. Luisetti	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>	Rapporteur
S. Derridj	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>	Examineur
J.P. Garrec	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>	Examineur

Université Henri Poincaré, Nancy I  
Faculté des Sciences  
Domaine Scientifique Victor Grignard  
BP 239  
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex

RÉGION LORRAINE

INRA  
Centre de Recherches Forestières de Nancy  
Unité Ecophysiologie Forestière  
Equipe Pollution Atmosphérique  
54280 Champenoux

## REMERCIEMENTS

*Je voudrais dans un premier temps exprimer mes remerciements aux membres du jury,*

*à Monsieur DIZENGREMEL qui me fait l'honneur de présider ce jury après avoir été mon professeur pendant plusieurs années à la Faculté de Nancy,*

*à Messieurs GAUVRIJ et LUISETTI pour avoir accepté avec enthousiasme d'examiner ce travail et d'en être rapporteurs,*

*à Madame DERRIDI, initiatrice de cette thèse, que je remercie tout particulièrement pour m'avoir accueillie dans son équipe et encadré, et qui a corrigé avec opiniâtreté ce mémoire,*

*à Monsieur GARREC, qui m'avait accueillie dans son laboratoire pour la réalisation d'un contrat concernant le dépérissement des arbres en bord de mer et qui m'a renouvelé sa confiance pour la réalisation de cette thèse.*

*Je remercie également la Région Lorraine, l'INRA, Mr François Le Tacon, Président du Centre INRA de Nancy, et Mr Pierre Ferron, précédent Chef de Département de la Zoologie, qui ont permis le financement de cette étude.*

*Je tiens également à exprimer ma très grande reconnaissance à Monsieur Fiala, Mme Ferron, Mr. Backalowicz, Nicole Hawlitzky, Yveline Querou, Tahar Taïbi, Benrui Wu, Andrée, Marie Christine, Françoise, Josée, Christine, Youssef, Kamel, Térésa, Leo, Yves Durand, Christine Durier, Lucien Kerhoas, Christian Malosse, Raymond Pailleux, Christine Foyer, pour leur accueil sympathique à mon arrivée à Versailles, ainsi que pour leurs conseils, mon initiation à de nouvelles techniques et surtout pour leur bonne humeur et leur amitié. Merci également à la Station de Phytopharmacie et au Laboratoire du Métabolisme pour l'utilisation de leur matériel.*

*Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes du Laboratoire d'Etude de la Pollution Atmosphérique : Béatrice, Bärbel, Catherine, Didier, Gilles, Laurence, Lu, Martin, Michèle, de Pathologie Forestière, Mr Pinon, Isabelle Genetet, Annie Meyer, Michel Morelet, Michel Perrochon, Arlette Schipfer, Gilberte Guinot, Mme Rozot, Mr Delatour, les Sols Forestiers, Mr Clément, Claude Brechet et Denise Olry, Dany Perrin, Mme Guillème. Merci encore à Jean Christophe Hervé (ENGREFF), François Lebourgeois et Didier Bert.*



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AGe	Acides gras estérifiés
AGl	Acides gras libres
AK	Alcanes
ANOVA	Analyse de la variance
AOH laires	Alcools primaires
BSTFA	Bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide
CC	Chaînes courtes
CCM	Chromatographie sur couche mince
CL	Chaînes longues
CM	Membrane cuticulaire
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DCM	Membrane cuticulaire décirée
DCM30	Membrane cuticulaire décirée par 30 s de trempage
DCM100	Membrane cuticulaire décirée par 100 s de trempage
d.e.	Diamètre extérieur
d.i.	Diamètre intérieur
DTT	Dithiothréitol
E0	Feuille de l'épi
E0+2	Deuxième feuille au dessus de la feuille de l'épi
E0-2	Deuxième feuille au dessous de la feuille de l'épi
EDTA	Acide tétraacétique éthylène diamine
FID	Détecteur à ionisation de flamme
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
IWF	Liquide de lavage du milieu intercellulaire
MES	Acide morpholinoéthane sulfonique
MF	Masse de matière fraîche
MS	Spectromètre de masse
NADP	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate
PCMBS	Acide paramercuribenzène sulfonique
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
rpm	Rotation par minute
SADH	Acide succinique dihydrazide
SAS	Statistical Analysis System
SCL	Lipides cuticulaires solubles
SCM	Membrane cuticulaire strippée
TLSE	Extrait soluble total de feuille
TMCS	Triméthylchlorosilane
TMS	Triméthylsilyl
Tre	Trempage

## **TABLE DES MATIÈRES**



*Étude de la composition en métabolites primaires du phylloplan et des compartiments foliaires sources, l'apoplaste et le milieu intracellulaire. Importance de la barrière cuticulaire dans le passage des métabolites vers la surface foliaire.*

Introduction générale .....	1
-----------------------------	---

Première Partie: Composition en métabolites primaires du phylloplan et des compartiments foliaires sources, l'apoplaste et le milieu intracellulaire chez le laurier cerise (*Prunus laurocerasus* L.) et le maïs (*Zea mays* L. var. Dea)

I-Introduction .....	4
II-Matériels et méthodes .....	5
1. Matériel végétal .....	5
1.1. Le maïs .....	5
1.2. Le laurier cerise ( <i>Prunus laurocerasus</i> L.) .....	5
2. Lessivage et analyse du phylloplan .....	5
3. Mesure de la surface foliaire .....	6
4. Extraction et analyse de l'apoplaste .....	6
4.1. Protocole .....	6
4.2. Précautions d'extraction de l'IWF .....	6
5. Extraction et analyse du milieu intracellulaire .....	8
6. Analyses des sucres solubles et des acides organiques par chromatographie en phase gazeuse .....	9
6.1. Préparation des échantillons .....	9
7. Analyses statistiques des résultats .....	9
III-Résultats .....	11
1. Composition biochimique en métabolites primaires des compartiments intracellulaire et intercellulaire et du phylloplan de la feuille de laurier cerise.....	11
1.1. Les sucres solubles.....	11
1.2. Les acides organiques .....	11
2. Composition biochimique en métabolites primaires des compartiments intracellulaire et intercellulaire et du phylloplan de la feuille de maïs .....	11
2.1. Les sucres solubles.....	12
2.2. Les acides organiques .....	12
3. Comparaison laurier/maïs .....	12
3.1. Les sucres solubles.....	12
3.2. Les acides organiques .....	13

4. Corrélation entre les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et le phylloplan de la feuille chez le laurier et le maïs .....	13
IV- Discussion .....	15

Deuxième Partie: Perméabilité des cuticules isolées de laurier cerise ( <i>Prunus laurocerasus</i> L.) aux sucres solubles: sélectivité de la cuticule et importance des cires cuticulaires
---

I-Introduction .....	20
II-Matériels et méthodes .....	22
1. Matériel végétal .....	22
2. Extraction des lipides cuticulaires solubles .....	22
2.1. Stripping des surfaces foliaires .....	22
2.2. Percolations de chloroforme .....	22
2.3. Trempage des feuilles entières .....	22
3. Isolement des membranes cuticulaires .....	22
4. Expériences de perméabilité sur les cuticules isolées .....	23
5. Calcul de la perméance .....	23
6. Analyses des sucres .....	24
7. Analyses statistiques .....	24
III-Résultats .....	26
1. Perméabilité au fructose, glucose, et saccharose des cuticules intactes .....	26
2. Perméabilité au fructose et au glucose des cuticules isolées témoins (CM), strippées (SCM) et décirées (DCM) .....	27
3. Perméabilité aux trois sucres des cuticules décirées par 30 s (DCM30) et 100 s de trempage (DCM100) .....	28
3.1. Sélectivité des membranes cuticulaires pour les sucres employés simultanément .....	28
3.2. Effet du temps de trempage sur le passage des sucres .....	29
IV-Discussion .....	30

Troisième partie: Influence de la composition chimique des cires cuticulaires de laurier cerise ( <i>Prunus laurocerasus</i> L.) dans le passage des sucres solubles
--

I-Introduction .....	34
II-Matériels et méthodes .....	36
1. Matériel végétal .....	36
2. Extraction des cires cuticulaires .....	36
2.1. Stripping des surfaces foliaires .....	36



2.2. Percolations de chloroforme .....	36
2.3. Trempage des feuilles entières selon une cinétique .....	36
3. Récupération des sucres solubles dans les cires cuticulaires de laurier cerise .....	37
4. Fractionnement des différentes classes chimiques des cires cuticulaires par chromatographie sur couche mince (CCM).....	37
5. Substances de référence et standards internes .....	37
6. Préparation des échantillons pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	38
6.1. Les alcanes .....	38
6.2. Méthylation des acides gras libres et des acides gras estérifiés .....	38
6.3. Triméthylsilylation des alcools primaires .....	38
7. Analyse des cires cuticulaires en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) .....	39
8. Identification de composés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse .....	39
9. Analyse des sucres par CPG-FID: .....	39
10. Mesures des surfaces foliaires .....	39
11. Analyses statistiques .....	39
III- Résultats .....	40
1. Cinétique d'extraction de 4 classes des cires de cuticules de laurier cerise par trempage .....	40
1.1. Les alcanes .....	41
1.2. Les alcools primaires.....	42
1.3. Les acides gras libres .....	42
1.4. Les acides gras estérifiés.....	43
2. Comparaison du trempage et de la percolation pour 210 s d'application du solvant .....	44
3. Influence de la composition chimique des cires dans le passage des sucres .....	45
3.1. Dans les expériences de perméabilité .....	45
3.2. Récupération des sucres solubles dans les cires cuticulaires .....	47
IV- Discussion .....	50
Conclusion générale et perspectives.....	53
Références bibliographiques .....	55
Annexes .....	63
Liste des figures.....	66
Liste des tableaux .....	71



## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



Le phylloplan<sup>1</sup> représente un écosystème à part entière. Il est le trait d'union entre la plante et son milieu biotique et abiotique, il est à la fois plante et milieu ambiant. Le phylloplan constitue la dernière étape au cours de laquelle l'insecte sélectionne son site de ponte ou de prise de nourriture. C'est également le lieu où vivent les micro-organismes épiphytes (bactéries, levures, champignons filamenteux). La colonisation va dépendre de l'environnement "feuille" (topographie, micro et macro climat, et biochimie), de la phylogénie de l'hôte, de la présence ou non d'autres organismes (Andrews, 1992), et de la coïncidence spatio-temporelle entre les organismes, la biologie de la plante et l'état des cuticules.

La topographie du phylloplan à l'échelle microscopique est faite de vallons, de dépressions, de collines et de pics que constituent les nervures, les stomates, les jonctions des cellules épidermiques, les hydathodes, les trichomes... La matière première de cette surface foliaire est formée par la cuticule, qui elle-même présente des topographies différentes selon la structure de ses cires épicuticulaires qui peuvent être amorphes ou cristallines, sous forme de rubans, tubes, tortillons... (Jeffree, 1986). La structure cristalline des cires épicuticulaires peut défavoriser la germination des spores de champignons et consécutivement la colonisation du phylloplan. Par exemple, Carver *et al.* (1990) ont montré que la face abaxiale des feuilles de *Lolium* spp. était moins contaminée par *Erysiphe graminis* (mildiou) que la face adaxiale, même quand elle était abondamment colonisée, en raison de la présence importante des cires sous forme de plaque. Les cires constituent une forme de résistance à ce champignon. De même pour certains insectes, la quantité et la structure des cires de surface affectent leur nutrition ou leur oviposition. C'est le cas par exemple des cires épicuticulaires en forme de bouquet du chou, qui empêchent les pontes de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Ypomeutidae) (Uematsu et Sakanoshita, 1989). La composition chimique des cires épicuticulaires agit aussi sur le comportement des insectes (Eigenbrode *et al.*, 1991).

La surface des feuilles est séparée de son environnement par une couche limite d'air de quelques millimètres d'épaisseur (phyllosphère<sup>2</sup>) (Burrage, 1976). Les températures de surface peuvent osciller de plusieurs degrés le long d'une feuille (Burrage, 1971). De même, les potentiels d'eau sont plus faibles sur les feuilles exposées à la périphérie d'un couvert végétal que sur les feuilles abritées à l'intérieur du couvert. Le vent, la pluie, la rosée et les radiations agissent également sur le climat de la surface foliaire.

La composition biochimique du phylloplan est importante dans le choix de la plante hôte par un insecte ou dans le développement des micro-organismes. Elle peut avoir une origine endogène (la plante) et exogène (miellats, poussières, pollens, microflore épiphyte). Les composés du phylloplan peuvent être stimulants pour les insectes ou les micro-organismes tels que: des sucres solubles, des acides aminés, des acides organiques, des éléments minéraux (Derridj *et al.*, 1989). D'autres composés présents à la surface de la feuille peuvent être allélochimiques telles que les phénols, les

<sup>1</sup> Phylloplan: définit ici comme la surface de la feuille immédiatement au dessus de la cuticule et en dessous de la couche limite d'air.

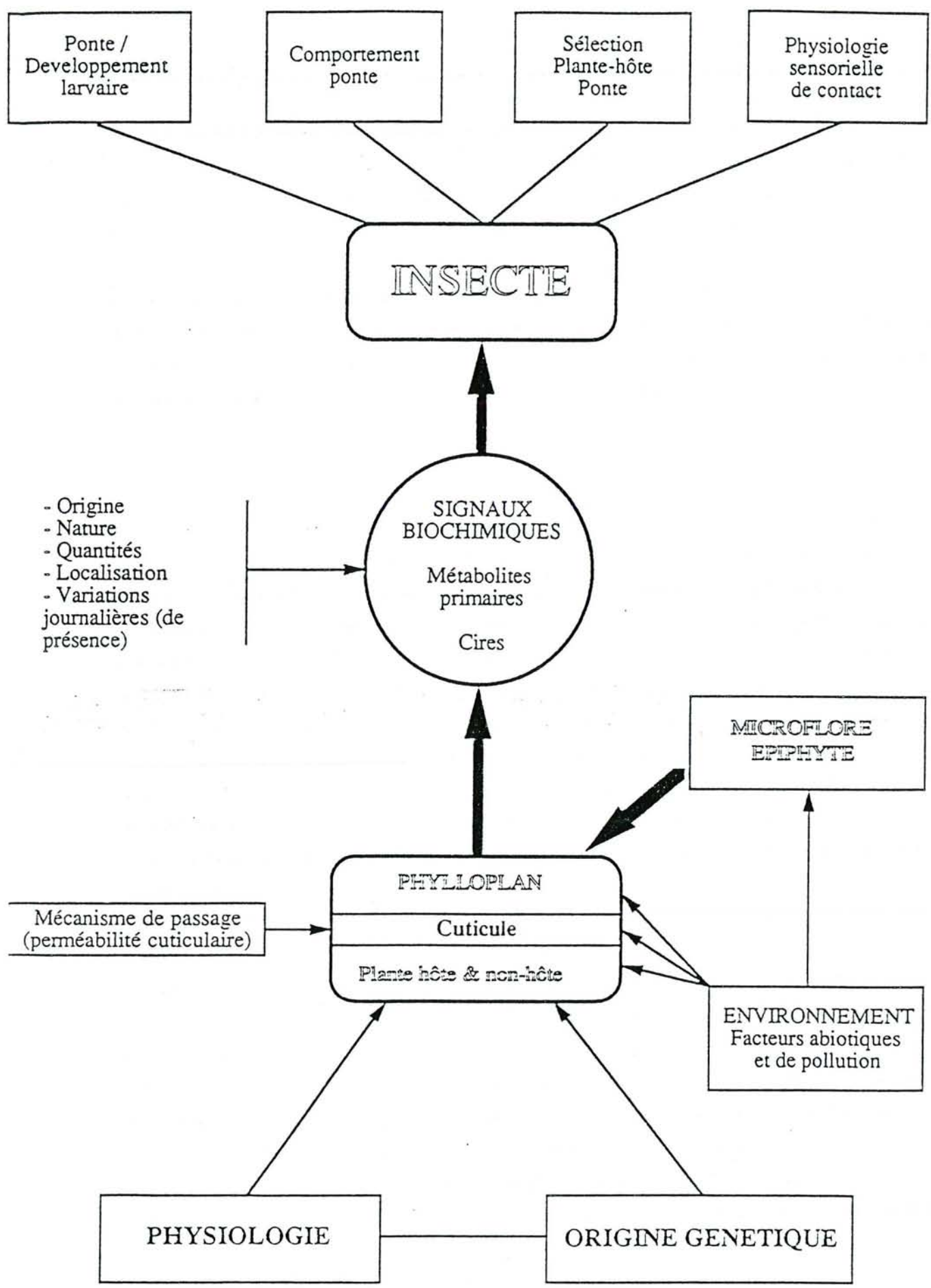
<sup>2</sup> Phyllosphère: elle comprend le phylloplan et la couche limite d'air.



triterpénoïdes, et certains composés des cires (Blakeman et Atkinson, 1981). De nombreux travaux ont montré que ces substances avaient un rôle dans la résistance des plantes aux insectes ravageurs par dissuasion. Par exemple, l'impact des cires sur la colonisation des surfaces foliaires peut se manifester à un niveau quantitatif et qualitatif. Ainsi, les Brassicacées ayant une cuticule très cireuse sont moins attaquées par l'altise (*Phyllotreta crucifera*) que les espèces à feuilles non cireuses (Bodnaryk, 1992). De même, le taux d'infestation de l'orge par le puceron (*Rhopalosiphum padi*) est en relation inverse avec les quantités de cires cuticulaires (Tsumuki *et al.*, 1989). La composition chimique des cires peut aussi être dissuasive pour le choix de la plante hôte dans le cas de la prise de nourriture de la larve de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, Lépidoptère, Noctuidae)(Yang *et al.*, 1993). Des composés autres que les cires ont également la propriété de repousser les insectes ravageurs. Ils peuvent provenir d'exsudats de trichomes glandulaires ; par exemple, les esters de glucose chez la tomate (*Lycopersicon pennellii*) induisent une résistance de cette espèce aux pucerons (*Macrosiphum euphorbiae*) (Goffreda *et al.*, 1989).

Les solutés provenant de la plante arrivent à la surface des feuilles en franchissant la barrière cuticulaire, soit par lessivage du à l'action de la pluie, du brouillard, de la rosée (Tukey, 1971), ou par une exsudation à travers les hydathodes (Frossard, 1981). Leur quantité, estimée après un lessivage partiel, à la surface des feuilles est de l'ordre de quelques  $\text{ng.cm}^{-2}$  (Derridj *et al.*, 1989 ; Fiala *et al.*, 1990). Les concentrations en exsudats varient quantitativement et qualitativement avec l'hôte, la position de la feuille, sa surface, la phénologie, la lumière, la température, la fertilité, le pH, la présence de blessures (Morris et Rouse, 1985, Fiala *et al.*, 1990). La composition en métabolites primaires de la surface dépend aussi d'un équilibre entre leur sortie de la feuille et leur entrée dans la feuille. Ce mouvement bidirectionnel s'effectue à travers la barrière cuticulaire s'il n'y a pas de blessures ni de piqûres de la feuille. La cuticule peut ainsi influencer sur la composition de surface de la feuille.

Ce sujet d'étude intervient dans le cadre de recherches concernant les relations plantes-insectes, et plus particulièrement dans le choix du site de ponte par la femelle de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis* Hbn., Lépidoptère, Pyralidae). Les travaux menés jusqu'à présent par les équipes de Versailles (Médiateurs Chimiques et Physiologie Végétale, Équipe de Mme Derridj), ont révélé que cet insecte généraliste distingue avec une très grande précision les lignées et les hybrides de maïs, la phénologie entre les espèces, et pour une même plante, elle distingue les différents niveaux et faces foliaires. Le site de ponte choisit par la pyrale correspond aux feuilles les plus riches en sucres (en fructose essentiellement et en saccharose). Le choix du site de ponte est aussi influencé par la présence d'acide malique (Peress, 1994). Or la femelle de la pyrale, comme beaucoup de lépidoptères, n'a pas accès à l'intérieur de la feuille, à aucun moment il n'y a contact avec les tissus foliaires. L'insecte ne peut donc tirer d'informations sur ces tissus que par la surface. Dans ces conditions, la composition biochimique de la surface doit être représentative de celle de l'intérieur de la feuille. Ainsi la plante



(d'après S.Derridj)

Figure 1: Facteurs abiotiques et biotiques impliqués dans la composition biochimique du phylloplan intervenant dans le choix de la plante hôte par un insecte.



choisie par la mère sera favorable aux descendants peu mobiles qui s'alimentent des feuilles et à l'intérieur des tiges.

Les facteurs intervenant dans la dernière étape (phylloplan) du choix de la plante hôte par un insecte sont résumés sur la figure 1.

Au cours de ce travail, nous nous proposons d'étudier la composition en métabolites primaires, les sucres solubles et les acides organiques à la surface de la feuille, et ce en considérant l'apport endogène de ces substances. La qualité de ces composés dans le phylloplan dépend principalement de leur source (métabolisme de la plante), et des différentes barrières successives qu'ils doivent franchir pour atteindre la surface, dont l'ultime est représentée par la cuticule. La détermination de l'information biochimique donnée par le phylloplan sur le contenu foliaire pourra donc être élucidée.

La première étape de cette étude a été la détermination de la composition en métabolites primaires du phylloplan et des compartiments foliaires sources, l'apoplaste et le milieu intracellulaire, chez le maïs (*Zea mays* L. var. Dea) et le laurier cerise (*Prunus laurocerasus* L.). L'apoplaste des feuilles est constitué par les espaces libres et les parois cellulaires. Les milieux intracellulaire et intercellulaire ont des fonctions différentes par rapport à ces métabolites. Le compartiment intracellulaire (à l'exception de l'épiderme) est leur site de synthèse et de mise en réserve, tandis que le compartiment intercellulaire intervient dans leur transport des tissus sources vers les tissus puits. De plus, l'apoplaste est en continuité directe avec la cuticule.

La deuxième étape de notre recherche a consisté en l'étude de la perméabilité de cuticules isolées aux sucres solubles, pour définir s'il y avait une sélectivité de leur passage, et si la quantité et la qualité des cires avaient un rôle dans la composition en métabolites primaires de la surface foliaire. L'étude de l'influence de la cuticule sur la qualité des métabolites du phylloplan requiert un végétal avec des feuilles hypo- ou hyper-stomatiques et dont la cuticule s'isole facilement. Ces conditions sont réunies par le laurier cerise (hypostomatique) et non par le maïs. Ces nécessités expliquent le choix du laurier cerise, quant au maïs, il a été choisi parce qu'il est l'hôte de la pyrale et qu'il est également étudié par l'équipe de Versailles.

Enfin, l'influence des cuticules dans le passage des sucres a été étudiée en relation avec la composition chimique de leurs cires. En effet, ces cires déterminent la résistance des cuticules végétales pour le transport de l'eau (Schönherr, 1982) et des composés organiques (Schönherr et Riederer, 1989). Par conséquent, la chimie des cires de laurier cerise a été étudiée en relation soit avec la perméabilité des cuticules, soit par la libération des sucres contenus dans la cuticule au cours de l'extraction des cires par le chloroforme.



## **PREMIÈRE PARTIE**

**COMPOSITION EN MÉTABOLITES PRIMAIRES DU PHYLLOPLAN ET  
DES COMPARTIMENTS FOLIAIRES SOURCES, L'APOPLASTE ET LE  
MILIEU INTRACELLULAIRE CHEZ LE LAURIER CERISE (*Prunus  
laurocerasus* L.) ET LE MAIS (*Zea mays* L. var. Dea)**



## I-Introduction

Le phylloplan contient des molécules très diverses telles que des sucres solubles, des acides aminés libres, des acides organiques et phénoliques, des terpènes et des alcaloïdes (Fokema, 1981 ; Merrall, 1981 ; Derridj *et al.*, 1989 ; Fiala *et al.*, 1993). Leur présence à la surface des feuilles est variable et leur quantité est généralement faible, de l'ordre de quelques  $\text{mg.m}^{-2}$  (Tukey Jr., 1971 ; Blakeman et Atkinson, 1981 ; Fokema, 1981 ; Jetty et Rao, 1987 ; Derridj *et al.*, 1989 ; Fiala *et al.*, 1993).

Des analyses précédentes de lessivats aqueux à la surface du maïs montrent la présence de glucose, fructose et saccharose à des concentrations très faibles de  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$   $\text{mol.m}^{-2}$  (Derridj *et al.*, 1987). Ces sucres ont pu être visualisés à la surface des feuilles de maïs, sous forme de précipité oses-argent par microscopie électronique à balayage (MEB) et microanalyse X (Fiala *et al.*, 1993). La distribution des sucres à la surface des feuilles est hétérogène. Ils sont surtout concentrés au niveau des parois anticlinales des cellules épidermiques, ce qui correspond au compartiment intercellulaire ou apoplastique. Ce compartiment est représenté par les espaces libres et les parois cellulaires.

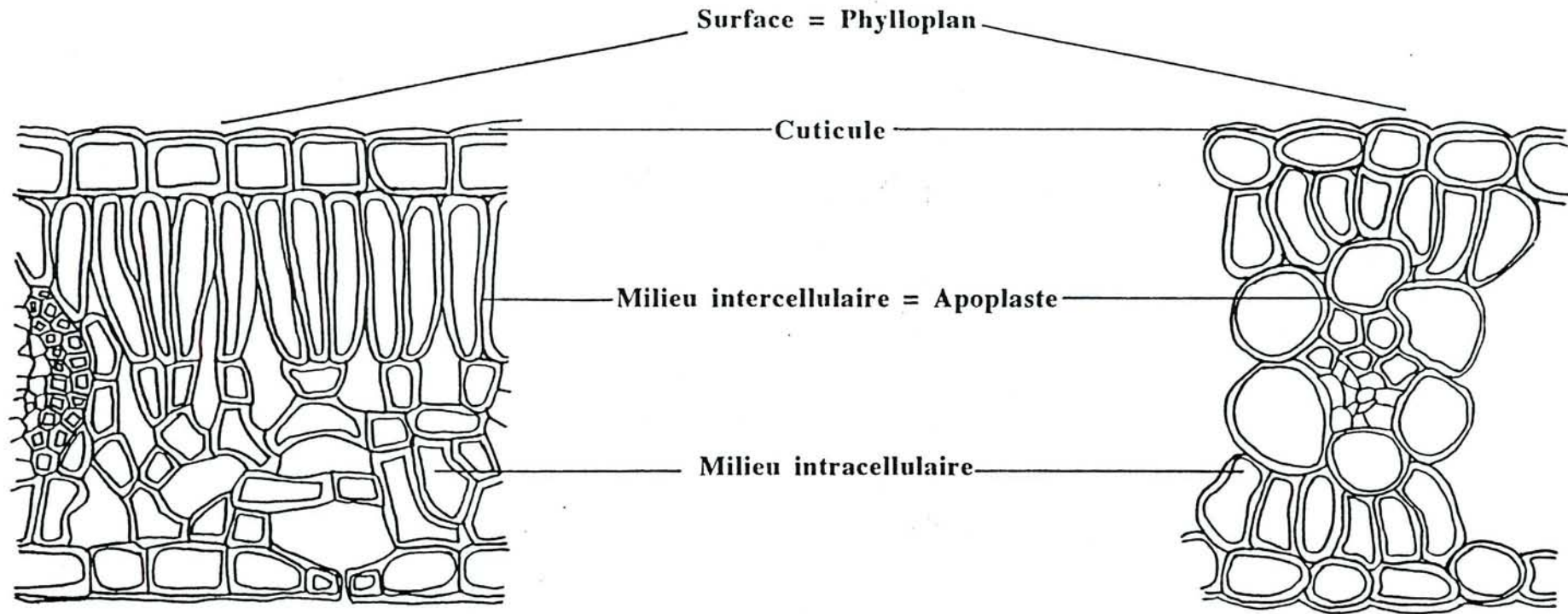
Chez les plantes supérieures, l'apoplaste occupe au maximum 5 % du volume tissulaire des organes aériens et des cortex racinaires (Grignon et Sentenac, 1991). Les feuilles d'orge, par exemple, ont un volume apoplastique de 1.2 à 1.7  $\mu\text{l.cm}^{-2}$  (Tetlow et Farrar, 1993). Le pH apoplastique a été estimé entre 5 et 6.5. Dans une feuille, le pH apoplastique est variable selon la fonction et l'activité physiologique au niveau d'un tissu ou au niveau cellulaire (stomates). En plus des sucres solubles, des acides organiques et aminés libres, le milieu apoplastique contient des protéines comme composés organiques (Pinedo *et al.*, 1993 ; Marentes *et al.*, 1993).

L'apoplaste est un milieu par lequel transitent les solutés produits par le mésophylle, pour alimenter les autres tissus foliaires hétérotrophes (Opaskornkul *et al.*, 1994), et charger les éléments conducteurs du phloème (Delrot, 1987).

Les substances hydrosolubles du phylloplan peuvent avoir également une origine exogène. Elles peuvent provenir du métabolisme des micro-organismes épiphytes, de miellats, de pollens, ou de poussières (Cooke et Rayner, 1984).

Au cours de ce chapitre, les informations données sur la plante par les métabolites primaires trouvés à la surface des feuilles sont étudiées. Ceci est réalisé en comparant la composition du phylloplan avec celle des compartiments intérieurs, le milieu intracellulaire, reflet de l'usine productrice des métabolites primaires, qui vont ensuite circuler pour partie dans la feuille et vers d'autres parties de la plante par le milieu intercellulaire ou apoplaste (figure 2). A cette fin la composition en sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) et en acides organiques (malate, trans-aconitate et succinate) des trois compartiments, ont été étudiés chez une plante de grande culture, le maïs (*Zea mays* var. Dea) et chez le laurier cerise (*Prunus laurocerasus*).

Figure 2: Présentation des différents niveaux de la feuille étudiés chez le laurier cerise et le maïs.



**Plantes type C3**  
(laurier cerise)

**Plantes types C4**  
(maïs)



## II-Matériels et méthodes

### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Le maïs

##### 1.1.1. Conditions de culture

Le maïs (*Zea mays* L.) de la variété Dea a été cultivé en chambre phytotronique. Les semis ont été effectués en godets contenant du terreau. Quand les plantules ont atteint le stade "deux feuilles", elles ont été transférées dans des pots de 20 litres. Le substrat était alors un mélange de terreau et de perlite (1/3-2/3). L'irrigation était réalisée par goutteurs avec une solution nutritive pour plantes neutrophiles.(Annexe)

Les conditions de températures étaient 24°C le jour, et 15°C la nuit, avec une photopériode jour/nuit de 16 h/8 h. Le taux de CO<sub>2</sub> était régulé à 350 ppm. Le taux d'oxygène était 32 %, et l'humidité 75 % environ.

##### 1.1.2. Prélèvement

Les feuilles de maïs ont été prélevées au stade "panicule sensible ou presque visible", et deux heures avant le coucher du soleil (fin de la période de photosynthèse). Les feuilles utilisées étaient celles de l'épi (E0) et de deux niveaux foliaires au dessus (E0+2) et en dessous (E0-2) et prélevées sur la même plante. Seule la partie médiane des feuilles a été employée d'une longueur de 25 cm à partir de 15 cm de la base. Pour les lessivats du phylloplan, les deux extrémités sectionnées ont été rapidement paraffinées pour éviter toutes fuites de métabolites par les coupures et donc une contamination due à l'intérieur de la feuille.

### 1.2. Laurier cerise (*Prunus laurocerasus* L.)

Les feuilles de laurier cerise ont été prélevées dans l'arboretum en forêt d'Amance (54) en été et à 13 h. Les feuilles ont été rincées très rapidement avec de l'eau distillée 5 heures avant leur prélèvement, afin de retirer le plus gros des poussières. Ces feuilles étaient âgées de 1 an et étaient situées en 2 et 3ème position à partir du bourgeon terminal et à 1 m 50 du sol.

Le lessivage des composés du phylloplan, et leur extraction de l'apoplaste et du milieu intracellulaire ont été réalisés successivement sur le même échantillon (figure 3).

### 2. Lessivage et analyse du phylloplan

Les feuilles ont été choisies indemnes de blessure pour éviter des fuites de métabolites. Les feuilles, ou les segments des feuilles paraffinées pour le maïs, ont été fixées avec une pince sur un plan incliné à 60°. De l'eau millipore a été pulvérisée à 20 cm de leur surface (25 ml par face), pendant 30 secondes, avec une pression de 15 bars (Fiala *et al.*, 1990). La taille des gouttes est alors de 0.1 à 0.3 mm. L'eau de lessivage a été récupérée dans une barquette en aluminium, puis filtrée à l'aide d'une seringue munie d'un filtre (0.45 µm de porosité) dans un ballon à évaporation préalablement stérilisé.

**Figure 3: Extraction des sucres solubles et acides organiques à trois niveaux de la feuille: la surface, le milieu intercellulaire et le milieu intracellulaire chez le laurier cerise et le maïs.**

Pulvérisation des surfaces foliaires avec de l'eau ultrapure



Récolte des lessivats de la **SURFACE FOLIAIRE**

Infiltration sous vide des feuilles par l'eau ou solutions tampons, suivie d'une centrifugation.



Récupération du liquide de lavage du **MILIEU INTERCELLULAIRE**

Extraction des feuilles lyophilisées à l'éthanol 80%



Récupération des sucres et acides organiques du **MILIEU INTRACELLULAIRE**



évaporations à sec, dérivatisations, et analyses par CPG-FID



Après évaporation à sec les sucres et acides organiques ont été dérivés pour leur analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID).

### 3. Mesure de la surface foliaire

Les résultats sont exprimés en masse de substance par unité de surface foliaire. Celle-ci a été mesurée avec un planimètre Li 3000 (Li-Cor, USA).

### 4. Extraction et analyse de l'apoplaste

#### 4.1. Protocole

La composition de l'apoplaste a été déterminée indirectement par l'analyse du liquide de lavage intercellulaire (IWF), technique utilisée par plusieurs auteurs (Madore et Webb, 1981 ; Pinedo *et al.*, 1993). Le liquide de lavage du milieu intercellulaire a été obtenu par l'infiltration d'eau ultra pure ou d'un tampon dans les feuilles coupées par l'alternance vide/pression ambiante. L'infiltration est jugée complète lors de l'obtention d'une couleur plus foncée de la feuille. La durée d'infiltration nécessaire est variable selon l'espèce végétale, mais aussi selon les feuilles. Après un rapide séchage sur du papier absorbant, les morceaux de feuilles ont été introduits dans des mini colonnes (utilisées en chromatographie) munies d'un verre fritté à leur extrémité, ainsi que d'un capuchon dans lequel a été récupéré l'IWF après une centrifugation à 2000 rpm pendant 20 min (centrifugeuse SIGMA 203).

Le liquide a été évaporé à sec, puis analysé par CPG-FID.

Au cours de l'extraction du liquide de lavage intercellulaire, deux précautions préalables ont été prises afin de doser au plus juste les métabolites primaires contenus dans ce compartiment. Dans un premier temps, l'absence de contamination du liquide de lavage par le cytosol a été vérifiée par le dosage de l'activité d'une enzyme de localisation cellulaire, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La deuxième précaution a été d'inhiber les invertases intercellulaires agents de la conversion du saccharose en glucose et fructose. Ces invertases peuvent être localisées dans les espaces libres et associées aux parois cellulaires.

#### 4.2. Précautions d'extraction de l'IWF

##### 4.2.1. Contamination du milieu intercellulaire

Le dosage de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.49), utilisée ici comme enzyme marqueur du cytosol, a été effectué dans l'IWF et dans un extrait soluble total de feuille (TLSE, le contrôle). Pour ce cas précis, le milieu d'infiltration de l'IWF et d'extraction du TLSE était un tampon Tris-HCl pH 7.5, contenant du mercaptoéthanol 0.1 %, du KCl 0.1 M, du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 2 mM, du dithiothréitol (DTT) 1 mM et de l'acide tétraacétique d'éthylène diamine disodique (EDTA-Na<sub>2</sub>) 2 mM. L'extraction a été faite à 4°C.

Le DTT est un réducteur puissant, il maintient donc un milieu réducteur nécessaire à la conservation des groupements sulfhydryles (-SH) des protéines. Ces groupements interviennent dans la

conformation des protéines importante pour leur propriétés de catalyse (enzyme) ou de structure (cytosquelette). L'EDTA agit comme un chélateur des cations divalents, notamment le calcium dont dépend l'activité des protéases. Le PMSF est également un inhibiteur des protéases. Le mercaptoéthanol est utilisé pour inhiber les polyphénoloxydases qui sont abondantes dans les chloroplastes, il prévient les oxydations et le brunissement des tissus verts.

#### 4.2.1.1. Préparation de l'extrait soluble total de feuille (TLSE)

5 g de matière fraîche de feuille ont été broyés dans 20 ml de solution tampon, par application de 4 pulsations de 5 secondes avec 30 secondes d'intervalle en utilisant un broyeur Vir Tis S"23" à la vitesse 30. Le broyat a ensuite été filtré puis centrifugé pendant 20 minutes à 12000 g. Le surnageant résultant représente l'extrait soluble total de feuille.

#### 4.2.1.2. Dosage de l'activité de la G6PDH dans l'IWF et le TLSE

L'activité de la G6PDH a été mesurée à température ambiante selon la technique développée par Bergmeyer *et al.* (1974). La réaction a été déclenchée par l'addition de 20  $\mu$ l d'hexokinase (140 U.mg<sup>-1</sup> Boehringer Mannheim). L'absorbance a été mesurée à 340 nm avec un spectrophotomètre (Kontron UVIKON 930). Une unité d'activité a été définie comme la quantité d'enzyme qui produit un changement d'absorbance de 1. Les résultats ont été exprimés en unités par minute et par gramme de matière fraîche.

#### 4.2.1.3. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées pour la détermination de l'activité enzymatique selon la technique de coloration de Bradford (1976) modifiée par Bio-Rad, avec l'albumine de sérum bovin comme standard. La lecture de l'absorbance a été faite à 595 nm.

#### 4.2.1.4. Résultats de la contamination du liquide de lavage du milieu intercellulaire (IWF) par le cytosol

La quantité de protéines et l'activité de la glucose 6-phosphate déshydrogénase ont été mesurées à la fois dans le liquide de lavage du milieu intercellulaire et dans l'extrait foliaire total.

**Tableau 1: Dosage de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et des protéines dans le liquide de lavage du milieu intercellulaire (IWF) et l'extrait soluble total de feuille (TLSE) chez le laurier cerise et le maïs.(moyenne de 4 répétitions  $\pm$  écart type).**

		Protéines ( $\mu$ g.g <sup>-1</sup> MF)	G6PDH ( $10^{-3}$ U.min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> MF)
Maïs	IWF	10.14 $\pm$ 1.59	0.9 $\pm$ 0.21x10 <sup>-3</sup>
	TLSE	819.32 $\pm$ 296.16	304.6 $\pm$ 0.099
Laurier	IWF	36.48 $\pm$ 1.2	1.23 $\pm$ 0.46x10 <sup>-3</sup>
	TLSE	1492.3 $\pm$ 536.11	55.5 $\pm$ 0.012



Figure 4: Effet de l'inhibition de l'invertase de l'apoplaste de laurier cerise sur la quantité (a) et la proportion (b) des sucres solubles récoltés dans le milieu intercellulaire (IWF) (-I, sans inhibiteur; +I, avec inhibiteur). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types).

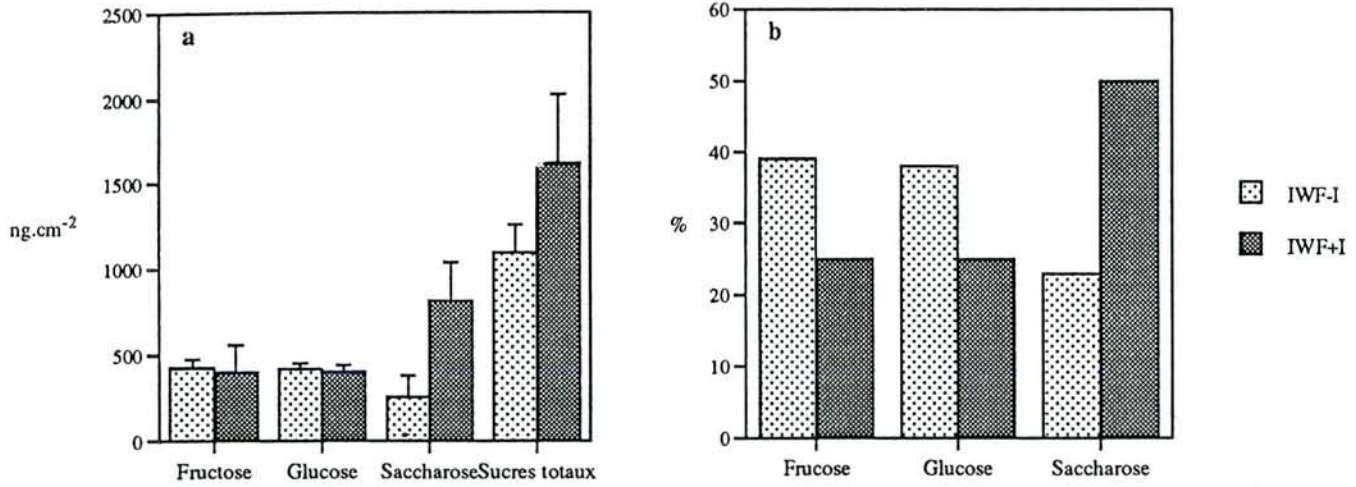
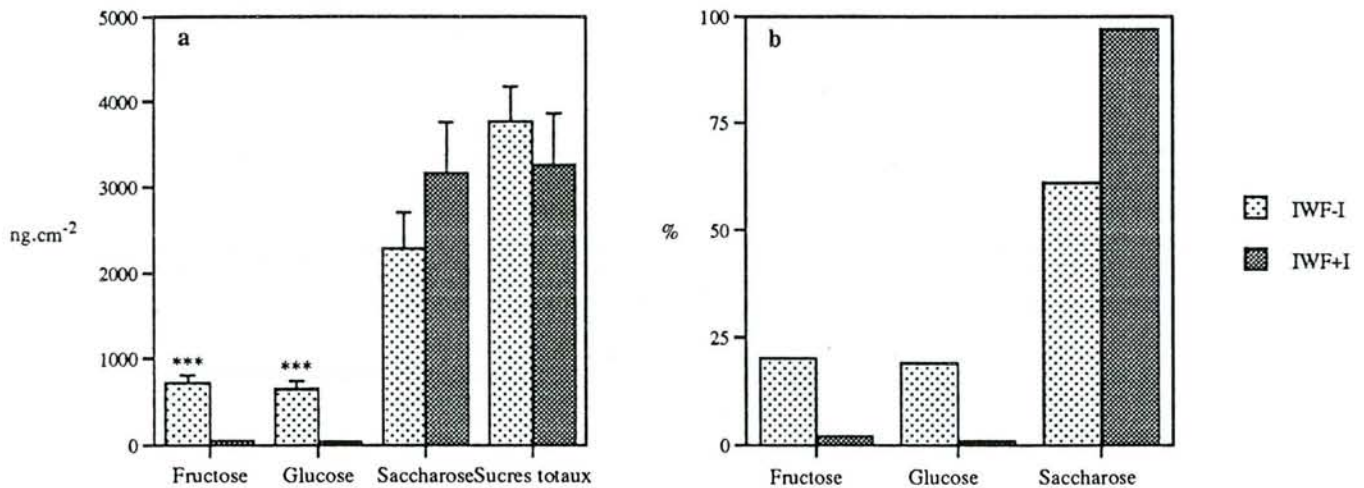


Figure 5: Effet de l'inhibition de l'invertase de l'apoplaste de maïs sur la quantité (a) et la proportion (b) des sucres solubles récoltés dans le milieu intercellulaire (IWF) (-I, sans inhibiteur; +I, avec inhibiteur), tous niveaux foliaires confondus. Effet très hautement significatif de l'inhibiteur  $\alpha = 0.001$ : \*\*\*. (moyenne de 12 répétitions, barres : écarts types).



Les protéines recueillies dans l'IWF représentent 2.5 et 1.2 % du TLSE de laurier et de maïs, respectivement (tableau 1). Le contenu en protéines de la feuille totale n'était pas significativement différent entre les deux plantes ( $t = 1.9$  ;  $p = 0.11$ ). En revanche le liquide de lavage intercellulaire du maïs était 3 fois moins riche en protéines que celui du laurier ( $t = 4.67$  ;  $p = 0.004$ ).

L'activité de la G6PDH de l'IWF représente 2 % et 0.3 % de celle du TLSE du laurier et du maïs respectivement. Pour chaque espèce cette différence est très hautement significative.

Le mode d'extraction de l'IWF utilisé ici se fait donc sans contamination intracellulaire.

#### 4.2.2. Effets de l'inhibition des invertases de l'apoplaste

Pour ce faire un tampon d'infiltration (MES-KOH 20 mM, pH 5.5) contenant un inhibiteur des invertases intercellulaires a été utilisé. Cet inhibiteur est l'acide para-chloromercuribenzène sulfonique (PCMBS) à la concentration de 1 mM (Delrot, communication personnelle). Cet inhibiteur se lie aux groupements SH des protéines, il bloque non seulement l'activité des invertases intercellulaires, mais aussi le transporteur du saccharose au niveau du plasmalemme (sens de transfert : extracellulaire vers intracellulaire). Le PCMBS ne traverse pas les membranes sur une période de quelques heures.

Les résultats de l'analyse des sucres solubles en présence ou non du PCMBS dans le milieu d'extraction de l'IWF des feuilles de laurier cerise et de maïs sont représentés figures 4 et 5 respectivement.

En présence de l'inhibiteur, le taux de saccharose triple chez le laurier ( $t = 2.17$  ;  $p = 0.07$ ). Bien qu'elle soit importante cette augmentation n'est pas significative en raison d'une trop grande variabilité. En revanche, parallèlement avec l'augmentation de saccharose, aucune diminution des hexoses n'a été observée, alors que celle-ci serait attendue. D'autres phénomènes seraient donc impliqués dans les taux de sucres trouvés. De plus, l'inhibition des invertases est importante dans le cas du laurier, car elle agit sur les proportions relatives des trois sucres entre eux, renversant le rapport hexoses/saccharose, utile pour la suite de la démarche de notre étude.

Dans le cas du maïs, on observe en revanche un doublement du saccharose (non significatif,  $t = 1.36$  ;  $p = 0.19$ ), accompagné d'une diminution du fructose et du glucose très significative ( $t = -7.64$  et  $t = -6.5$  respectivement ;  $p < 0.0001$ ).

L'inhibition des invertases acides se traduit par une augmentation du taux de saccharose et une baisse du taux des hexoses. Ce qui se traduit qualitativement par une quasi absence d'hexose chez le maïs, ainsi qu'une inversion du rapport hexoses/saccharose chez le laurier.

### 5. Extraction et analyse du milieu intracellulaire

Après extraction de l'IWF les feuilles ont été lyophilisées et broyées. Les sucres et les acides organiques ont été extraits à partir de 150 mg de poudre avec 10 ml d'éthanol à 80 % pendant 3 heures et en agitation à 4°C.

**Tableau 2: Conditions d'analyse chromatographiques des sucres solubles et des acides organiques.**

---

CPG-FID	
Appareil	Delsi Nermag DN 200
	Intégrateur ENICA 31
Colonne	SGE BPX5 25QC3
longueur	25 m
diamètre intérieur	0.32 mm
film	phénylsiloxane 5 %
épaisseur du film	0.5 $\mu\text{m}$
Injecteur	split/splitless 260°C
Température détecteur	300°C
Gaz vecteur	Hélium 0.8 bar
Alimentation de la flamme	Hydrogène/Air (0.8-1 bar)
Programme de température	110°C(30 s) - 160°C à 10°C.min <sup>-1</sup> 160°C (3 min) - 275°C (6 min) à 10°C.min <sup>-1</sup>

---



Les tubes ont été ensuite centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes pour sédimenter les débris. Plusieurs aliquotes ont été prélevés dans le surnageant pour être évaporés à sec. Les échantillons ont été conservés à -80°C.

## 6. Analyses des sucres solubles et des acides organiques par chromatographie en phase gazeuse

L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) nous permet de détecter des quantités très faibles de sucres (jusqu'à la picomole). Préalablement à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, il a été nécessaire de rendre volatils et donc chromatographiables les acides organiques et les sucres solubles. Cette transformation a été réalisée par une réaction de silylation qui rend également ces composés plus stables thermiquement. De plus, pour les sucres réducteurs, une première étape de préparation d'oximes de sucres a été nécessaire. En effet par ce moyen, les pics multiples dus aux formes tautomériques de ces sucres sont réduits. La transformation des sucres en dérivés oximes triméthylsilylés (TMS) a conduit à la formation de 2 isomères cis et trans.

### 6.1. Préparation des échantillons

#### 6.1.1. Oximation

Pour ce faire, 100 µl de pyridine (Pierce) et 5 µl de réactif STOX™ (Pierce) ont été ajoutés aux échantillons secs. Le mélange a été chauffé à 70°C pendant 30 minutes. Le STOX™ est une solution de pyridine contenant 25 mg.ml<sup>-1</sup> de chlorhydrate d'hydroxylamine et 6 mg.ml<sup>-1</sup> de phényl-β-D-glucopyranoside comme standard interne. L'hydroxylamine est un nucléophile comportant de l'azote, qui réagit avec les groupes carbonyles des sucres pour former des oximes de sucres.

#### 6.1.2. Silylation

La silylation a été réalisée sur les échantillons secs et à chaud (90°C pendant 30 minutes) par l'addition de 100 µl de bis (triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) avec 1 % de triméthylchlorosilane (TMCS) (Silyl 991, Macherey-Nagel). Après refroidissement complet, 1 µl de l'échantillon a été injecté pour l'analyse en CPG-FID dans les conditions présentées dans le tableau 2. Les résultats ont été exprimés en masse de composés par unité de surface foliaire.

## 7. Analyses statistiques des résultats

La comparaison des sucres et des acides organiques entre eux dans les différents compartiments a été faite par une analyse de la variance (ANOVA) factorielle.

Le contenu en métabolites primaires des plantes ont été comparés par le test t de Student.

La détermination des relations existantes entre le phylloplan et les milieux intercellulaire et intracellulaire a été réalisée par deux méthodes complémentaires. La première est le calcul du coefficient de corrélation, qui décrit l'évolution des différents milieux entre eux. La seconde est une

méthode particulière qui a été utilisée pour définir la proximité des trois niveaux de la feuille l'un par rapport à l'autre. Plus précisément il s'est agit dans notre cas, de déterminer auquel des deux compartiments, intracellulaire et intercellulaire, le phylloplan ressemblait le plus qualitativement. Cette méthode consiste au calcul de la distance euclidienne entre le phylloplan et les deux compartiments foliaires. Ainsi par exemple la distance entre le phylloplan et l'IWF est:

$$d = \sqrt{\sum_{k=1}^n \frac{(HS_{pk} - HS_{ik})^2}{\text{var}_{HS}}}$$

où HS représente le rapport hexoses/saccharose, p, le phylloplan, i l'IWF, var, la variance du rapport HS de l'ensemble phylloplan, milieux intercellulaire et intracellulaire et k la répétition. La distance euclidienne a la même unité que celle du rapport H/S.



Figure 6: Quantité (a) et proportion (b) des sucres solubles dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise. Différence entre les trois sucres significative: \* ( $\alpha = 0.05$ ) et très hautement significative: \*\*\* ( $\alpha = 0.001$ ). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types).

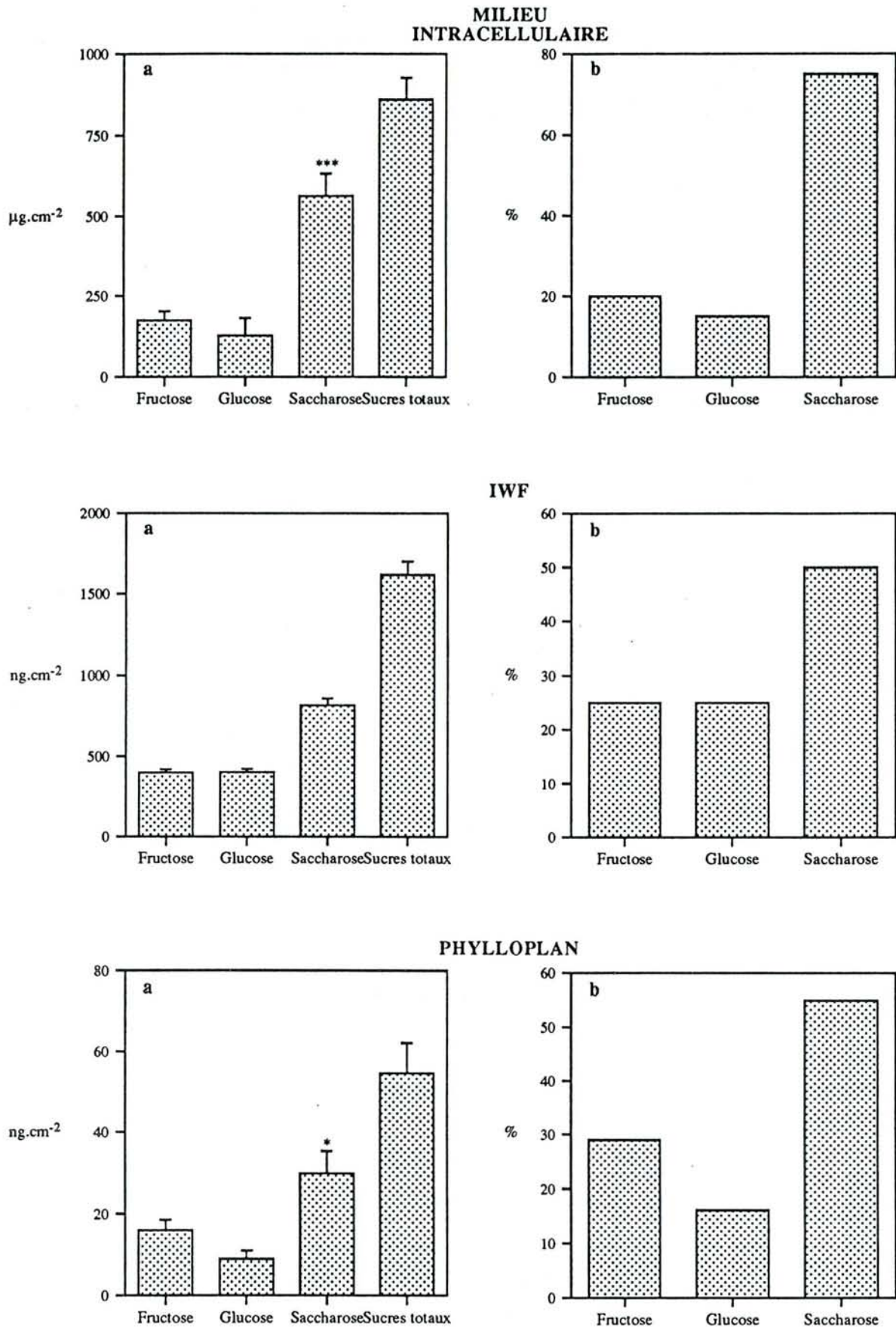
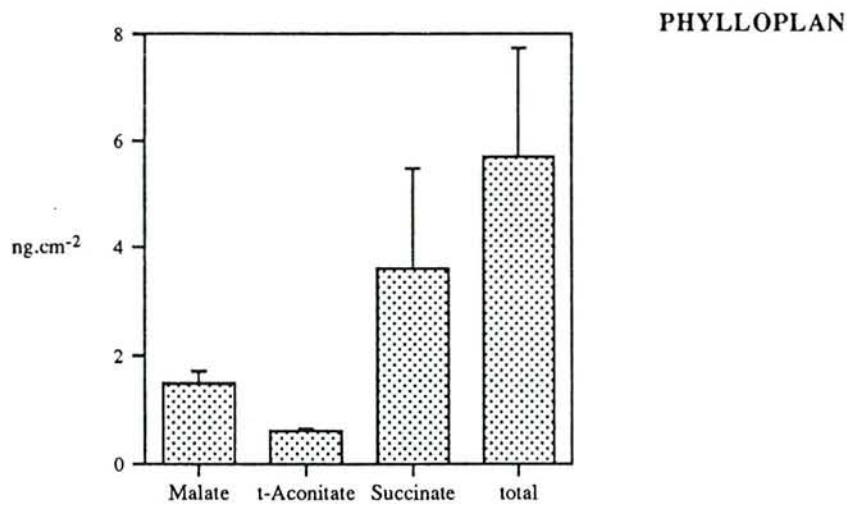
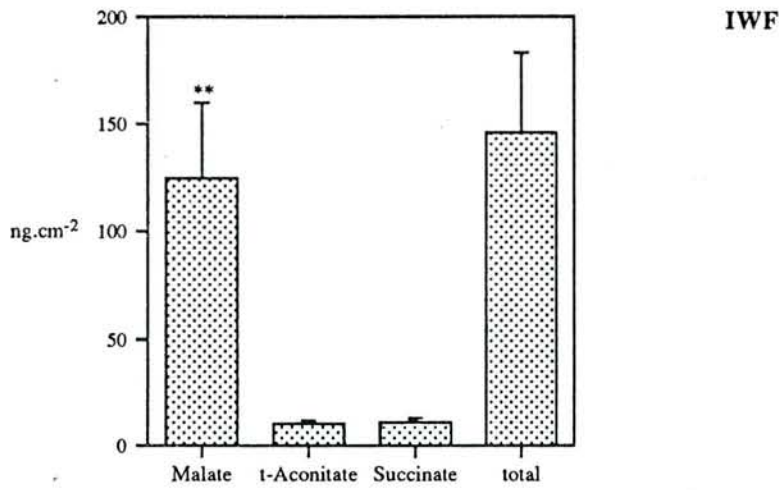
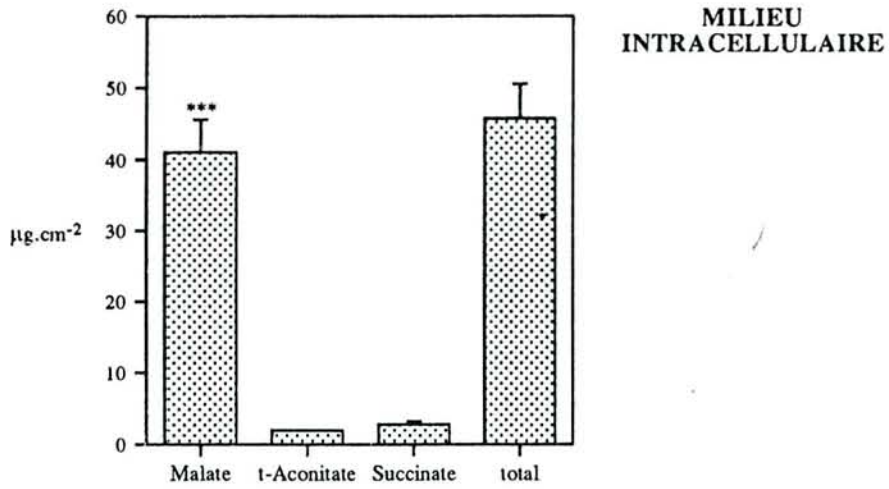


Figure 7: Quantité des acides organiques dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise. Différence entre les trois acides organiques hautement significative: \*\* ( $\alpha = 0.01$ ) et très hautement significative: \*\*\* ( $\alpha = 0.001$ ). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types).





### III-Résultats

#### 1. Composition biochimique en métabolites primaires des compartiments intracellulaire et intercellulaire et du phylloplan de la feuille de laurier cerise

Les résultats sont exprimés en masse par unité de surface foliaire. Chaque expérience a été répétée quatre fois.

La quantité de liquide de lavage recueillie était  $6.12 \pm 0.97 \mu\text{l.cm}^{-2}$ . L'infiltration a fait augmenter le poids des feuilles de  $45 \pm 2 \%$ .

##### 1.1. Les sucres solubles

Les résultats présentés figure 6 montrent que le milieu intracellulaire des feuilles de laurier cerise contient  $859.5 \pm 67.3 \mu\text{g.cm}^{-2}$  de sucres solubles totaux. Le saccharose représente 65 % des sucres solubles, il est 3 à 4 fois plus abondant ( $\alpha = 0.001$ ) que le fructose et le glucose respectivement, lesquels sont quantitativement équivalents.

La teneur en sucres solubles du compartiment intercellulaire constitue 0.2 % de celle du milieu intracellulaire. Le saccharose est en apparence le sucre le plus abondant, mais la différence n'est pas significative ( $F = 2.3$  ;  $p = 0.15$ ).

A la surface des feuilles de laurier cerise, la quantité totale des sucres est  $54.8 \pm 7.5 \text{ ng.cm}^{-2}$  avec le saccharose comme sucre majoritaire, (significatif ;  $\alpha = 0.05$ ). Il constitue 55 % des sucres solubles. Glucose et fructose sont également représentés.

##### 1.2. Les acides organiques

Le malate est le plus important des acides organiques dosés dans les milieux intracellulaire et intercellulaire où il y représente 90 % ( $\alpha = 0.001$ ) et 86 % ( $\alpha = 0.01$ ) respectivement des trois acides organiques dosés (figure 7).

Les acides organiques du milieu intercellulaire constituent 0.3 % de ceux du milieu intracellulaire.

Dans le phylloplan les acides organiques sont en quantités faibles, quelques  $\text{ng.cm}^{-2}$ . Il n'y a pas de prédominance de l'un d'eux ( $F = 2.02$  ;  $p = 0.19$ ).

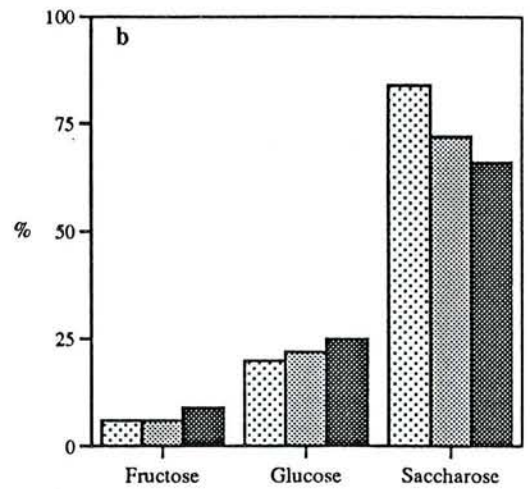
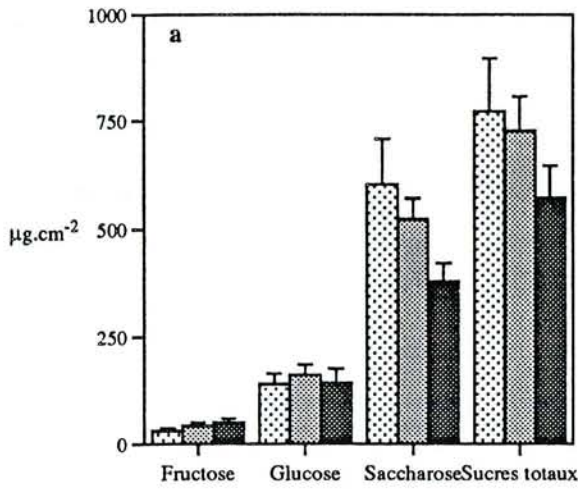
Le contenu en sucres solubles et en acides organiques du phylloplan représente 3 à 4 % de l'IWF et  $6.10^{-3}$  à  $12.10^{-3} \%$  (1/16000 à 1/8000) du compartiment intracellulaire.

#### 2. Composition biochimique en métabolites primaires des compartiments intracellulaire et intercellulaire et du phylloplan de la feuille de maïs

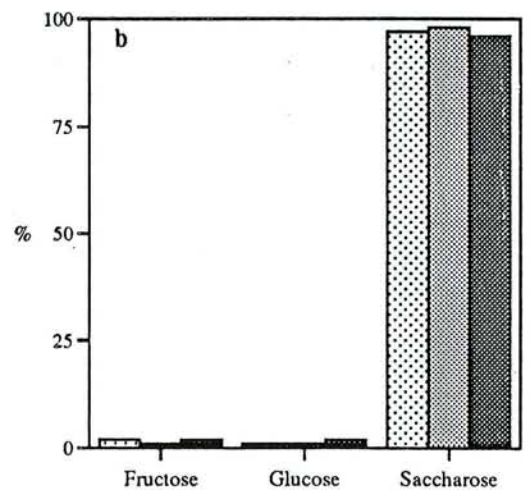
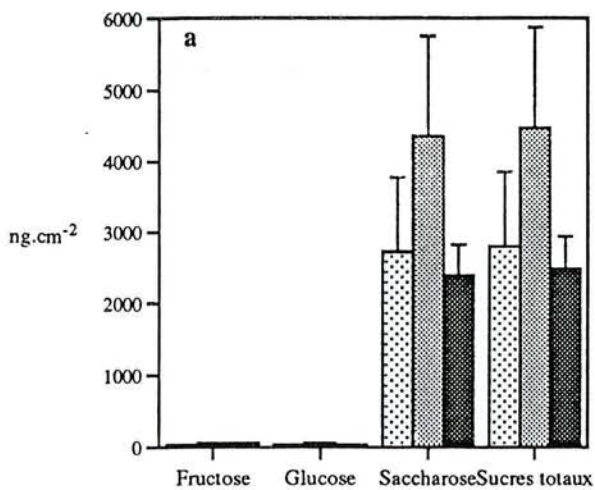
Les résultats sont exprimés en masse par unité de surface foliaire. Pour chaque niveau foliaire, l'expérience a été répétée quatre fois. Les acides organiques n'ont été dosés chez le maïs que pour un seul niveau foliaire (E0).

Figure 8: Quantité (a) et proportion (b) de sucres solubles dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de maïs avec distinction des niveaux foliaires (E0+2, E0 et E0-2). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types).

MILIEU INTRACELLULAIRE



IWF



PHYLLOPLAN

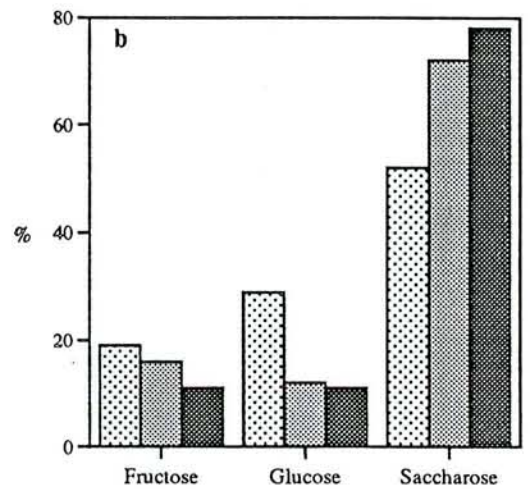
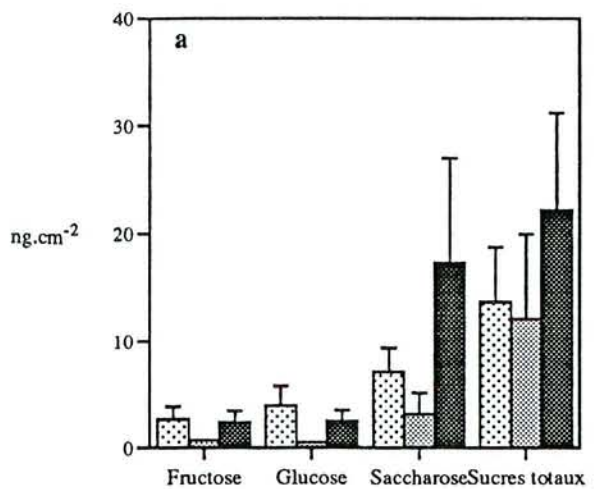
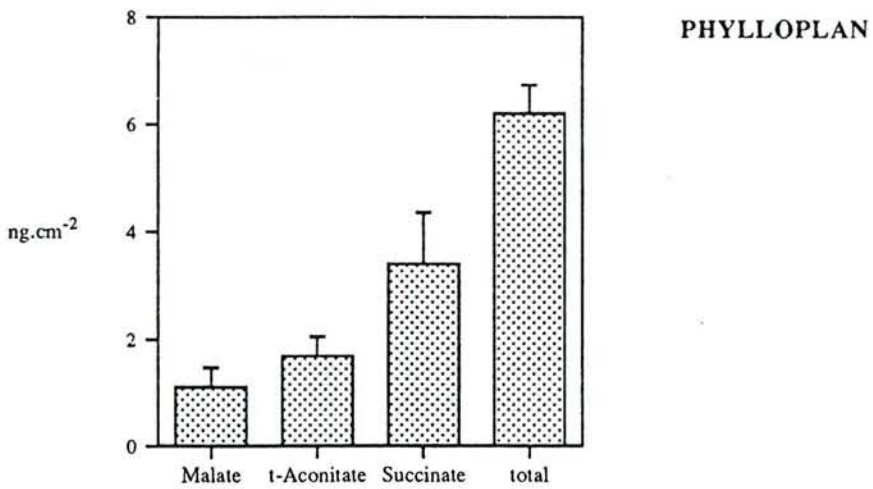
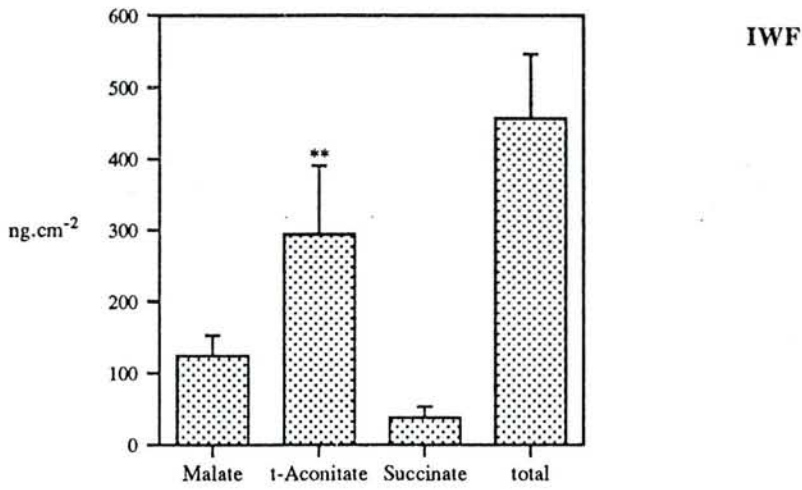
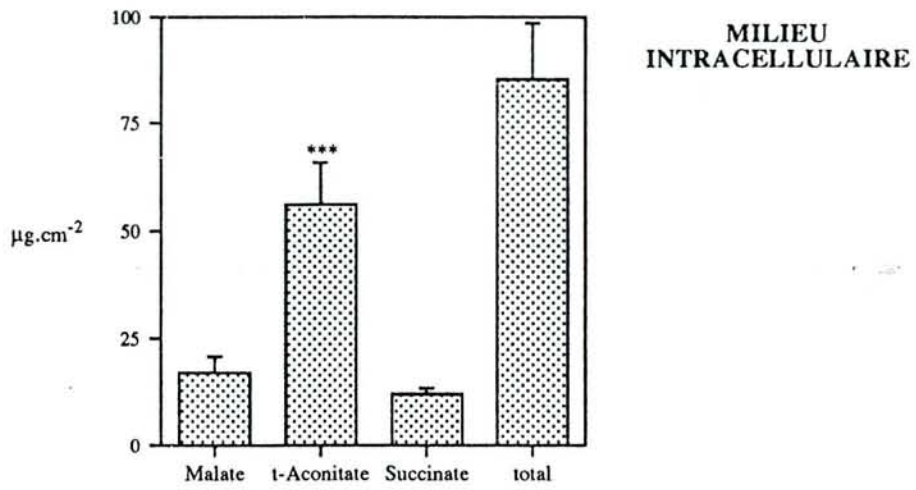




Figure 9: Quantité des acides organiques dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de maïs, niveau E0. Différence entre les trois acides organiques hautement significative: \*\* ( $\alpha = 0.05$ ) et très hautement significative: \*\*\* ( $\alpha = 0.01$ ). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types).



Le volume de l'IWF extrait est  $2.07 \pm 0.6 \mu\text{l.cm}^{-2}$ , et après l'infiltration, le poids des feuilles augmente de  $21 \pm 3 \%$  (niveaux foliaires confondus).

### 2.1. Les sucres solubles

Les résultats obtenus pour les trois niveaux foliaires sont représentés figure 8. Tous niveaux foliaires confondus, les sucres solubles représentent  $690 \mu\text{g.cm}^{-2}$  en moyenne dans le milieu intracellulaire. Le saccharose est majoritaire ( $\alpha = 0.001$ ), quel que soit le niveau foliaire considéré. Les teneurs en glucose sont plus importantes que celles en fructose (significatif ( $\alpha = 0.05$ ) pour la feuille de l'épi).

La teneur en sucres de l'IWF représente  $0.5 \%$  du milieu intracellulaire. Le saccharose est toujours le sucre le plus abondant ( $\alpha = 0.001$ ) aux trois niveaux foliaires, où il représente plus de  $95 \%$  des sucres totaux. L'apoplaste de la feuille de l'épi paraît plus riche en sucre solubles que les deux autres niveaux foliaires, mais cette différence n'est pas significative ( $F = 1.037$  ;  $p = 0.39$ ). Le glucose et le fructose sont également représentés ( $F = 1.2$  ;  $p = 0.34$ ).

Chez le maïs, la teneur en sucres solubles du phylloplan varie de  $12.1 \pm 7.9$  pour la feuille de l'épi à  $22.2 \pm 9 \text{ ng.cm}^{-2}$  pour la feuille la plus âgée E0-2. Malgré cette apparente supériorité de la feuille la plus âgée, les trois niveaux foliaires ne sont pas différents ( $F = 0.52$  ;  $p = 0.61$ ). La prédominance du saccharose n'est plus vérifiée (échantillon trop petit et variabilité trop grande).

### 2.2. Les acides organiques

La composition en acides organiques des milieux intracellulaire et intercellulaire et du phylloplan de la feuille de l'épi est représentée figure 9.

Les deux compartiments foliaires sont caractérisés par une abondance en trans-aconitate, significative ( $\alpha = 0.05$ ) et hautement significative respectivement ( $\alpha = 0.01$ ).

Le contenu en acides organiques du milieu intercellulaire représente  $0.5 \%$  de celui du milieu intracellulaire.

Le taux d'acides organiques dosé dans le phylloplan est  $7 \text{ ng.cm}^{-2}$ . Les trois acides sont également représentés ( $F = 3.6$  ;  $p = 0.07$ ).

Les métabolites primaires du phylloplan représentent  $0.5$  à  $1.4 \%$  de ceux de l'IWF, contre  $2.10^{-3}$  à  $7.10^{-3} \%$  ( $1/50000$  à  $1/14000$ ) de ceux du compartiment intracellulaire.

## 3. Comparaison laurier/maïs

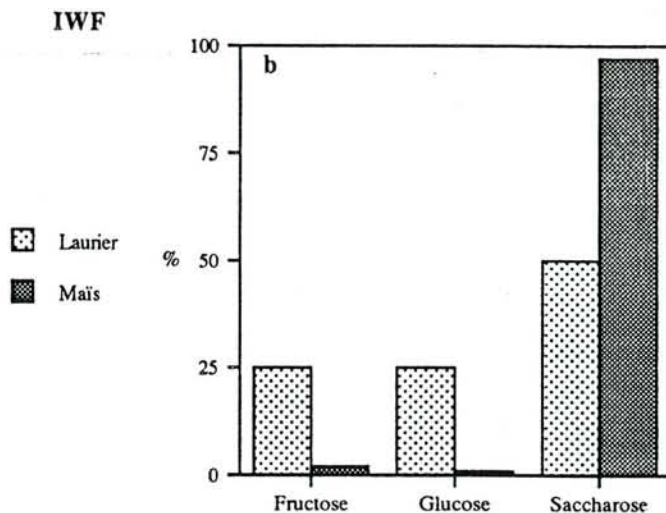
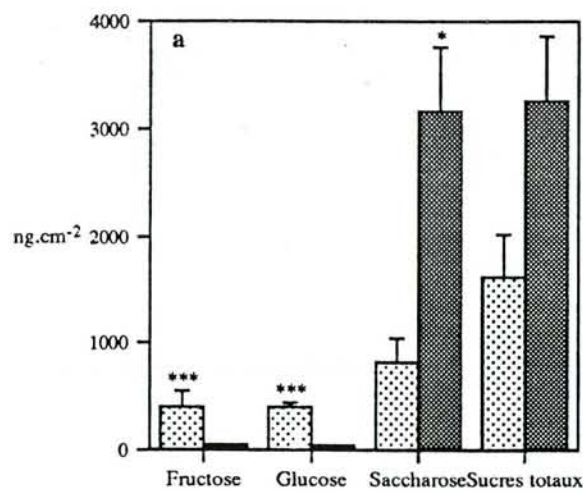
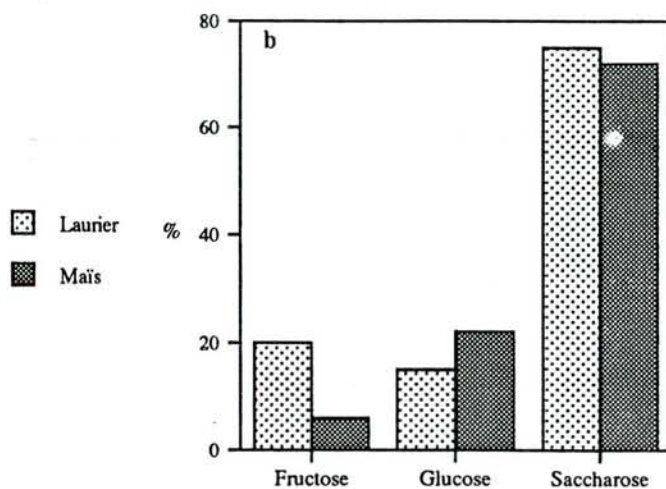
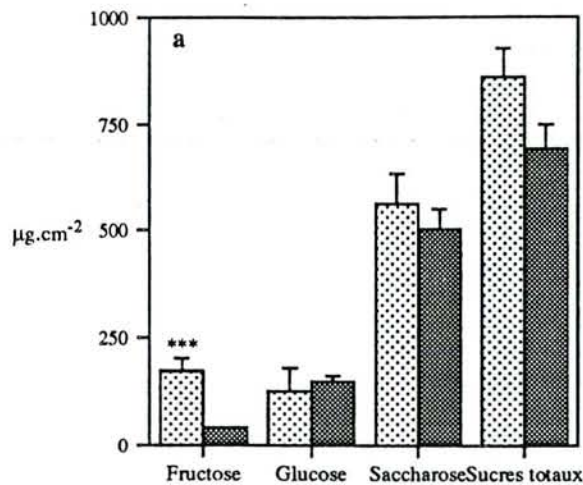
### 3.1. Les sucres solubles

La comparaison des deux plantes (figure 10) révèle une richesse équivalente en sucres totaux ( $t = -1.6$  ;  $p = 0.13$ ), mais leur proportion est différente. Le compartiment intracellulaire du laurier se différencie par 4 fois plus de fructose ( $t = -7.51$  ;  $p < 0.0001$ ).



Figure 10: Quantité (a) et proportion (b) de sucres solubles dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF), et dans le phylloplan de feuilles de laurier cerise et de maïs (tous niveaux foliaires confondus). Différence significative entre le laurier et le maïs  $\alpha = 0.05$  : \*, hautement significative  $\alpha = 0.01$  : \*\*, très hautement significative  $\alpha = 0.001$  : \*\*\*. (moyenne de 4 répétitions pour le laurier, 12 pour le maïs, barres : écarts types).

### MILIEU INTRACELLULAIRE



### PHYLLOPLAN

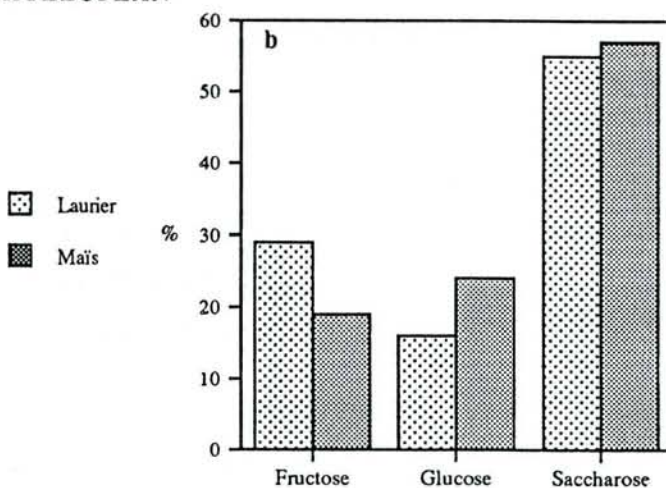
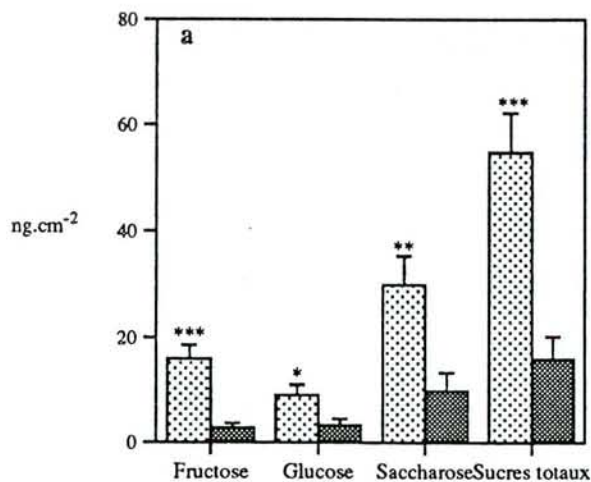
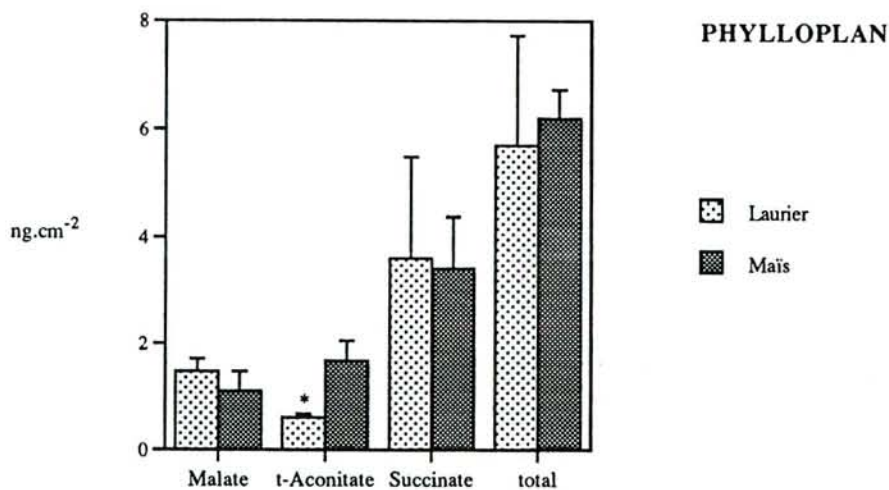
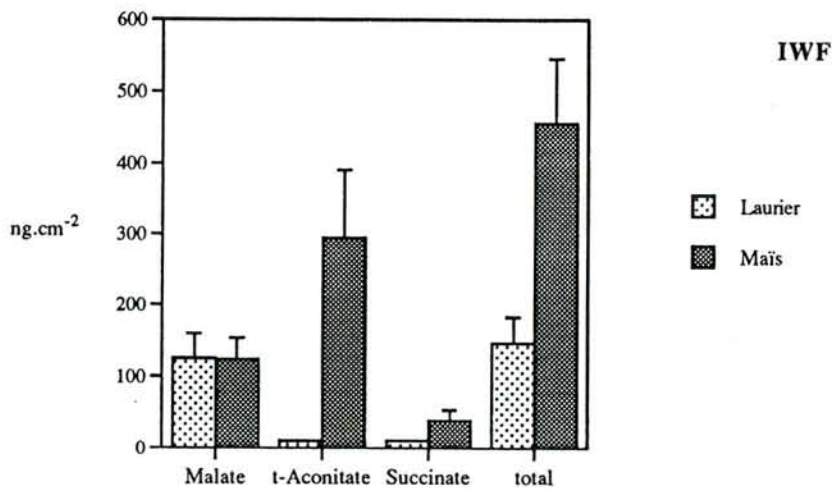
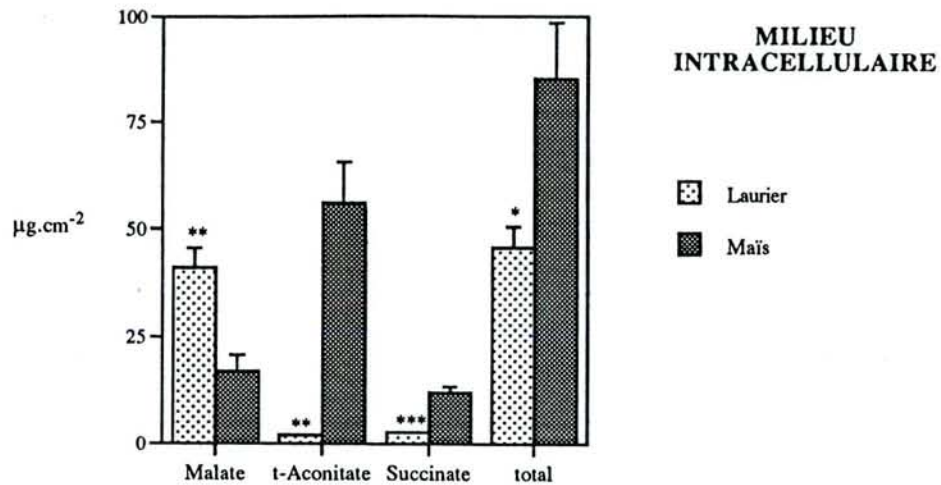


Figure 11: Quantité d'acides organiques dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF), et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise et de maïs (niveau E0). Différence significative entre le laurier et le maïs  $\alpha = 0.05$  : \*, hautement significative  $\alpha = 0.01$  : \*\*, très hautement significative  $\alpha = 0.001$  : \*\*\*. (moyenne de 4 répétitions pour le laurier, 4 pour le maïs, barres : écarts types).





Le saccharose est prépondérant dans l'IWF du maïs (4 fois plus,  $t = 2.19$  ;  $p = 0.04$ ), tandis que le glucose et le fructose sont 8 à 9 fois plus importants chez le laurier ( $t = -14.56$  ;  $p < 0.0001$ , et  $t = -4.15$  ;  $p = 0.001$ , respectivement).

La surface du laurier cerise est 3 fois plus riche en sucres que celle du maïs, tous niveaux foliaires confondus, ( $t = -4.64$  ;  $p < 0.0001$ ). Les trois sucres sont plus abondants chez le laurier cerise.

### 3.2. Les acides organiques

Les résultats présentés sur la figure 11 montrent que le maïs contient 2 fois plus d'acides organiques que le laurier ( $t = 2.97$  ;  $p = 0.03$ ). Le compartiment intracellulaire du maïs se distingue de celui du laurier par une très grande abondance en trans-aconitate (28 fois plus,  $t = 5.57$  ;  $p = 0.001$ ) et à un degré moindre en succinate (4 fois plus,  $t = 6.05$  ;  $p < 0.0001$ ) ; en revanche, il est deux fois moins riche en malate ( $t = -4.06$  ;  $p = 0.007$ ).

L'IWF de maïs diffère de celui du laurier par une plus grande richesse en acides organiques ( $t = 3.21$  ;  $p = 0.02$ ) et surtout en trans-aconitate (30 fois plus ;  $t = 2.96$  ;  $p = 0.025$ ).

La quantité d'acides organiques à la surface des feuilles n'est pas différente entre les deux espèces ( $t = 0.24$  ;  $p = 0.82$ ).

Les deux espèces végétales ne montrent pas de différence fondamentale en surface. En revanche, elles se distinguent à l'intérieur de la feuille, que ce soit au niveau du compartiment intercellulaire ou intracellulaire. Le maïs est plus riche en acides organiques, essentiellement en trans-aconitate, et en saccharose (IWF). Le laurier est beaucoup plus riche en malate et en hexoses.

### 4. Corrélation entre les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et le phylloplan de la feuille chez le laurier et le maïs

Le but de l'analyse des métabolites primaires dans deux compartiments de la feuille et le phylloplan est de déterminer ce que représente la composition du phylloplan par rapport à celle de l'intérieur de la feuille et d'une certaine manière d'avoir une indication sur le type d'information à la disposition de l'insecte ou des micro-organismes colonisateurs.

Pour approcher cette relation, deux sortes de mesures ont été réalisées : celle du calcul de la distance euclidienne, et le calcul des coefficients de corrélation des couples milieu intracellulaire-IWF IWF-phyloplan et milieu intracellulaire-phyloplan. Pour ces calculs, le rapport hexoses/saccharose a été utilisé car il diminue les écarts importants de concentration des trois sucres entre les trois niveaux de la feuille étudiés. De plus, la considération des trois sucres simultanément permet de mieux tenir compte de la qualité inhérente à chaque milieu étudié.

La distance euclidienne indique une composition en sucres solubles du milieu intercellulaire (IWF) plus proche de celle du milieu intracellulaire que du phylloplan. De même le phylloplan est plus proche du milieu intracellulaire que de l'IWF, quels que soient le végétal et le niveau foliaire dans le cas du maïs. Le phylloplan apporterait une information qualitative proche de celle du milieu de

biosynthèse de la feuille en ce qui concerne les sucres solubles, et pour ces conditions particulières d'expérimentation (conditions de culture, stade de développement, date de prélèvement).

Les résultats du calcul du coefficient de corrélation pour le rapport hexoses/saccharose du phylloplan et des milieux intracellulaire et intercellulaire chez le laurier cerise et le maïs révèlent une corrélation positive entre le phylloplan et le milieu intracellulaire. Cette tendance est significative ( $\alpha = 0.05$ ) pour la feuille la plus âgée E0-2 ( $r = 0.95$ ), pour la feuille de l'épi  $r = 0.94$  ( $\alpha = 0.10$ ) et pour le laurier ( $r = 0.82$ , non significatif). Seule la feuille la plus jeune du maïs (E0+2) ne confirme pas cette tendance. Entre le phylloplan et le milieu intercellulaire la corrélation est négative (sauf chez le laurier et le niveau E0-2 du maïs), mais à aucun moment significative. Cette corrélation négative entre le phylloplan et l'IWF laisserait entrevoir un rôle non négligeable de la cuticule, qui diminuerait avec l'âge de la feuille (corrélation positive pour E0-2,  $r = 0.93$ ,  $\alpha = 0.10$ ).



#### IV-Discussion

Plusieurs méthodes d'extraction du liquide apoplastique ont déjà été utilisées, comme l'abrasion des surfaces foliaires (Geiger *et al.*, 1974), l'analyse du milieu de lavage de petits morceaux de feuilles (Kursanov et Brovchenko, 1970), ou encore l'incubation de fragments foliaires sans épiderme inférieur (Delrot *et al.*, 1983). Les deux premières techniques sont aléatoires en ce qui concerne la contamination par le cytoplasme des cellules cassées. Avec la technique employée par Delrot *et al.*, la difficulté majeure est d'avoir un matériel végétal dont l'épiderme se retire facilement, ce qui n'est pas le cas du laurier cerise, et du maïs. La technique d'infiltration suivie d'une centrifugation est facile à mettre en oeuvre. De plus, d'autres auteurs (Madore et Webb, 1981 ; Tetlow et Farrar, 1993 ; Pinedo *et al.*, 1993) ont montré que cette technique évite en grande partie la contamination cytoplasmique. Cette démonstration a été réalisée dans la plupart des cas par des mesures d'activités d'enzymes de localisation cellulaire, comme la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ou encore la malate déshydrogénase (Aked et Hall, 1993a ; Tetlow et Farrar, 1993).

L'inhibition des invertases intercellulaires était une autre précaution importante que nous avons prise pour analyser le contenu du liquide apoplastique avec le moins de biais possible. L'acide para-chloromercuribenzène sulfonique (PCMBS) ajouté au milieu d'infiltration a bloqué les groupements sulfhydryles des protéines.

Chez le laurier cerise, l'addition du PCMBS a eu pour conséquence d'augmenter le taux de saccharose sans modifier le contenu en hexoses. L'augmentation du taux de saccharose pourrait s'expliquer à la fois par l'inhibition des invertases et aussi par le blocage de son absorption par les cellules. Ce type de blocage a été démontré également dans les feuilles de la fève (*Vicia faba*, M'Batchi et Delrot, 1984) et de la betterave à sucre (*Beta vulgaris*, Giaquinta, 1979). En revanche, dans le cas des hexoses, l'inhibition des invertases ne conduit pas à une diminution des taux de fructose et de glucose, ce qui laisse supposer l'existence d'un autre phénomène compensatoire, tel que le blocage de leur absorption par le PCMBS. Le PCMBS n'aurait pas une sélectivité exclusive pour le transporteur de saccharose. En effet, Aked et Hall (1993b), ont montré chez le pois (*Pisum sativum* L. cv Argenteum) que le PCMBS inhibait à la fois l'absorption du glucose, du fructose et du saccharose. Le PCMBS se lierait aux groupements SH des transporteurs membranaires sensibles à ce type de produit.

En revanche chez le maïs, l'action du PCMBS serait un blocage des invertases qui s'exprime à la fois par la diminution du taux des hexoses, et l'augmentation du contenu en saccharose, laquelle pourrait également être imputable au blocage de l'absorption du saccharose. Malheureusement, nous n'avons pas les moyens de déterminer la part relative de chaque phénomène (ce n'était pas non plus le but de cette étude).

L'action des invertases intercellulaires est également difficile à déterminer. Elle agirait en hydrolysant le saccharose en glucose et fructose avant la charge du phloème (Foyer, 1987). En fait, le contenu en sucre de l'espace libre résulte d'un équilibre entre deux processus différents : leur efflux

du mésophylle, et leur retrait dû au processus d'exportation hors de la feuille. Ainsi, en bloquant les invertases et l'absorption des sucres, une approche plus "réelle" du contenu apoplastique est obtenue, mais sans bloquer l'efflux du mésophylle.

A notre connaissance, aucun travail ne fait état à ce jour des relations entre les deux compartiments: apoplaste et milieu intracellulaire, et le phylloplan. Les études quantifiant les métabolites primaires, en particulier les sucres solubles retrouvés à la surface des feuilles ont été réalisées dans le cadre des relations plantes insectes (Derridj *et al.*, 1989; Peress, 1994). Ces derniers auteurs ont recueilli les sucres solubles : glucose, fructose et saccharose à la surface de différentes variétés de maïs et de tournesol dans une gamme allant de 40 à 200 ng.cm<sup>-2</sup>. Il s'agissait dans ces cas précis, de récupérer ce que l'insecte pouvait détecter et non pas de procéder à un lessivage drastique de la surface foliaire. Cette large gamme de quantité est due aux différentes espèces, et dans une même espèce, à la variété et au stade de développement. Par exemple, la surface des feuilles de la variété de maïs LG11 est moins riche en sucres que celle de la variété Dea, pour les mêmes conditions de culture et le même stade phénologique (Fiala *et al.*, 1990). Ces études relient également le contenu du phylloplan et celui des feuilles totales du maïs. Ainsi, les sucres solubles totaux du phylloplan représentent 0.09 % de ceux des tissus intérieurs (maïs var. Dea), alors que nous avons trouvé un pourcentage de 0.007 % entre ces deux compartiments. Cette différence est principalement due à une plus grande richesse en sucres solubles des surfaces foliaires, en relation peut être avec les conditions de culture (serre/ phytotron).

En effet, les composés recueillis en surface peuvent avoir une origine endogène (la feuille), et exogène, par les micro-organismes et autres miellats et pollens (Cooke et Rayner, 1984). Les expérimentations que nous avons faites sur le maïs étaient réalisées en chambre phytotronique. Les apports de substances exogènes sont beaucoup plus limitées que dans les conditions de serre ou à l'extérieur, en particulier pour ce qui est des miellats d'insectes et les micro-organismes, qui sont très peu favorisés par les conditions assez sèches de ce milieu. En effet, il peut exister un métabolisme des sucres solubles par les micro-organismes épiphytes qui seraient présents quand l'humidité au niveau du phylloplan excède 95 % (Cooke et Rayner, 1984). De plus les quantités en sucres solubles du phylloplan varient au cours de la journée avec l'assimilation du carbone et la translocation des métabolites. Il est donc difficile de comparer des substances recueillies sur des plantes cultivées dans des conditions différentes, comme il était artificiel de comparer le maïs et le laurier, dans notre étude.

Fiala *et al.* (1993) ont également montré que sur une même plante et sur trois niveaux foliaires, la surface des feuilles les plus âgées était plus riche, alors qu'il n'y avait pas de différence dans le contenu en sucres des feuilles jeunes et âgées. De plus, sur une feuille de maïs la face adaxiale est parfois plus riche que la face abaxiale et il existe un gradient longitudinal de la distribution des sucres. La surface de la partie basale est plus riche que celle de la partie médiane ou apicale. Ce gradient a été démontré à la surface des feuilles et dans les feuilles, pour les sucres totaux.



Tableau 3: Sucres solubles contenus dans l'apoplaste et le milieu Intracellulaire de différentes espèces, en référence à la littérature.

Espèces	Glucose			Fructose			Saccharose			
	Apoplaste $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$	Milieu Cellulaire $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$	% Apo/Intra	Apoplaste $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$	Milieu Cellulaire $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$	% Apo/Intra	Apoplaste $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$	Milieu Cellulaire $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$	% Apo/Intra	
<i>Zea mays</i> var. Dea	2.35	7.9	0.03	2.8	2.2	0.1	168.6	267.8	0.6	
<i>Prunus laurocerasus</i>	16.5	5.15	0.3	16.4	7.1	0.2	33.5	23	0.2	Références
<i>Hordeum distichum</i>	16.1	1	1.6	14.9	0.9	1.7	37.1	7.6	0.5	Tetlow et Farrar, 1993
<i>Vicia faba</i>	0.7	0.003	22.6	0.09	0.003	2.6	2.7	0.05	5.7	Delrot et al. 1983
<i>Cucurbita pepo</i>	6.1	0.8	0.8	0.9	0.1	0.8	7.9	1.4	0.6	Madore et Webb 1981

En revanche, les proportions entre les trois sucres sont indépendantes des variétés et des phénologies. Quel que soit le végétal, le saccharose est toujours majoritaire dans les tissus, comme à la surface des feuilles.

En ce qui concerne les acides organiques, nous ne disposons à ce jour d'aucun travail sur leur représentation dans les trois compartiments étudiés ici. Les seules données sont leur quantification à la surface du phylloplan. Fiala *et al.* (1993) ont montré que la quantité d'acides organiques variait entre 10 (malate et trans-aconitate) et 100 ng.cm<sup>-2</sup> (citrate et oxalate). Par ailleurs Peress (1994) a trouvé des taux de malate très variables de 1 à 1000 ng.cm<sup>-2</sup> chez différents hybrides de tabac. Ces concentrations sont en moyenne plus élevées chez le tabac que chez le laurier et le maïs.

L'origine endogène des métabolites primaires est assez vraisemblable, mais comment expliquer leur passage de l'intérieur vers l'extérieur de la feuille ? Avant d'envisager l'étape cuticulaire (car il n'est pas possible de l'envisager par les stomates), primordiale pour ce transfert, il faut déjà que les métabolites s'affranchissent du compartiment cellulaire.

Il est connu que le transport à longue distance du saccharose, se fait par une étape apoplastique (Delrot *et al.*, 1983) et il y a un transfert intensif entre le mésophylle et l'épiderme (Dittrich et Raschke, 1977). Pour cette raison, les sucres solubles du phylloplan seraient vraisemblablement originaires de l'apoplaste.

Les travaux concernant le contenu en métabolites de l'apoplaste ont été réalisés dans le cadre des études de la charge du phloème (Madore et Webb, 1981), ou des feuilles infectées par des organismes pathogènes (Tetlow et Farrar, 1993).

Il est très difficile de comparer les résultats présentés dans le tableau 3, des compartiments apoplastiques obtenus par les différents auteurs, car les végétaux ont été cultivés dans des conditions différentes ; l'heure de prélèvement des échantillons ainsi que le mode d'extraction des métabolites sont sources de variation (Delrot *et al.*, 1983). De plus, bien souvent les unités choisies pour exprimer les résultats sont hétérogènes (en mole ou masse par unité de surface ou de masse de matière fraîche). C'est pourquoi, une comparaison qualitative des sucres entre eux dans un même compartiment a été retenue dans les études prenant en compte l'apoplaste et le milieu cellulaire (ce qui est d'ailleurs plus intéressant). Ainsi le contenu en sucres totaux de l'apoplaste représente généralement moins de 1% du contenu intracellulaire, entre 0.2 % chez le laurier à 0.9 % chez l'orge (*Hordeum distichum* L. ; Tetlow et Farrar, 1993). Cependant Delrot *et al.* (1983) ont trouvé un rapport plus élevé chez *Vicia faba* (7 à 8 %), qui peut être dû à la méthode d'extraction du compartiment intercellulaire. Les feuilles de fèves, dont l'épiderme est enlevé, sont mises en incubation sur un milieu maintenant des conditions isoosmotiques pour le parenchyme. Une telle technique conduirait à une surestimation de la part relative des sucres de l'apoplaste par rapport au milieu intracellulaire. Cette constatation est retrouvée surtout pour le glucose apoplastique qui représente chez la fève entre 20 et 40 % du glucose intracellulaire, selon l'heure de prélèvement, alors qu'il ne compte qu'entre 0.03 % (maïs) et 1.6 % (orge).



En général, le saccharose est le sucre le plus représenté quel que soit le compartiment, à l'exception de *Cucurbita pepo* (Madore et Webb, 1981), chez lequel le glucose est le plus important à la fois dans l'apoplaste et le milieu intracellulaire. Chez cette espèce le saccharose n'est pas le sucre de transport par excellence, il s'agit du stachyose, qui dans cette expérience n'était guère plus important.

Les méthodes que nous avons utilisées pour quantifier les métabolites primaires dans les trois compartiments sont globales. Elles ne prennent pas en compte les gradients de concentration qui peuvent exister entre les différentes régions tissulaires de la feuille, et qui se repercuteraient alors d'un compartiment à l'autre. Les métabolites primaires de l'apoplaste proviennent en majorité du milieu intracellulaire et ceux du phylloplan de l'apoplaste qui est en contact le plus direct avec la surface des feuilles par les parois des cellules de l'assise épidermique. La répartition des sucres solubles, dans quels compartiments que ce soient, n'est pas forcément équivalente entre les différentes régions de la feuille. En effet, Fricke *et al.* (1994) ont montré que les sucres solubles étaient inégalement répartis chez l'orge entre l'épiderme (dans la limite de détection 2 mM), le mésophylle (78 mM) et les cellules de la gaine (intermédiaires). Les différents types cellulaires se distinguent non seulement par la quantité des sucres solubles qu'elles contiennent mais aussi par leur qualité. L'épiderme est quasiment dépourvu de saccharose, alors qu'il accumule le fructose et le glucose (Dietz *et al.*, 1994). Les espaces adjacents aux cellules de la gaine où la charge et la décharge du phloème existent, seraient d'un point de vue nutritionnel assez différents des autres régions de la feuille (Tetlow et Farrar, 1993). Les espaces libres seraient plus concentrés en sucres dans la région mésophyllienne, lieu de synthèse des métabolites, que du côté de l'épiderme. Opaskornkul *et al.* (1994) renforcent le concept d'un mécanisme d'export du saccharose des cellules mésophylliennes dans l'apoplaste. Aked et Hall (1993b) ont montré que l'absorption dans l'épiderme des sucres passait également par une étape apoplastique par l'intermédiaire de transporteurs membranaires sensibles au PCMBMS.

Toutes ces données, sont réunies pour mettre en évidence que l'étude que nous avons menée pour définir quelles informations le phylloplan apportait aux insectes ou aux micro-organismes, est très globale. Elle ne prend pas en compte les différences de quantité voire de qualité, qui existent à l'intérieur même des compartiments que nous avons étudiés. Cette analyse pour le moins globale pourrait expliquer en partie pourquoi le phylloplan ressemble plus au compartiment cellulaire qu'à l'apoplaste. En effet, d'un point de vue anatomique la cuticule est directement en contact avec l'apoplaste (parois cellulaires des cellules épidermiques), il serait donc légitime de s'attendre à une composition de l'apoplaste et du phylloplan similaire. Les autres hypothèses pouvant expliquer cette observation seraient soit un rôle effectif de la cuticule dans le passage des métabolites ou des apports exogènes qui n'ont pas été abordés dans cette étude ou une influence de facteurs environnementaux, ou leur combinaison.

Dans nos conditions d'analyses, la composition qualitative des sucres solubles présente à la surface de la feuille de laurier cerise ou de maïs, ressemble plutôt au compartiment de synthèse de la feuille.

Par ailleurs, la composition du phylloplan en métabolites primaires va dépendre non seulement de la qualité de leur source mais également de la cuticule, qui n'est pas une barrière complètement imperméable (Price, 1982). D'autant que son rôle ne doit pas être négligé, car nous avons obtenu une corrélation négative du rapport hexoses/saccharose entre l'apoplaste et le phylloplan.



## **DEUXIÈME PARTIE**

**PERMÉABILITÉ DES CUTICULES ISOLÉES DE LE LAURIER CERISE  
(*Prunus laurocerasus* L.) AUX SUCRES SOLUBLES:  
SÉLECTIVITÉ DE LA CUTICULE ET  
IMPORTANCE DES CIRES CUTICULAIRES**



## I-Introduction

La nature de l'information que l'insecte ou les micro-organismes obtiennent à la surface de la feuille dépend de la qualité de la source, ici le milieu intracellulaire et des modalités de son transfert à travers la cuticule.

La cuticule est la première barrière entre toutes les parties aériennes des végétaux supérieurs et l'atmosphère. C'est un revêtement lipidique protecteur qui prévient la perte d'eau par transpiration (la transpiration cuticulaire représente en général 5 % de la transpiration foliaire totale). Elle limite également la perte des électrolytes et des solutés organiques par lessivage, et protège la plante des agressions externes telles que les polluants, les insectes et les pathogènes.

Les cuticules ont une structure en couches (figure 12) avec des propriétés physiques et chimiques non uniformes. La composition chimique peut être représentée par deux groupes de composés de nature lipidique caractérisés selon leur solubilité dans les solvants organiques: les cires, appelées aussi lipides solubles cuticulaires (SCL) et la matrice de cutine, qui est un polymère lipidique insoluble. Les SCL constituent la principale résistance de la cuticule au transfert de l'eau (Schönherr, 1982) et des substances organiques non électrolytes (Schönherr et Riederer, 1989). Dans les SCL, on distingue encore les cires épicuticulaires et les cires intracuticulaires de part leur voie de biosynthèse et leur localisation dans la cuticule différentes. Les cires épicuticulaires constituent la partie la plus extérieure des cuticules. Elle consiste en un film amorphe duquel émergent des structures cristallines. Les cires intracuticulaires sont imbriquées dans la matrice de cutine.

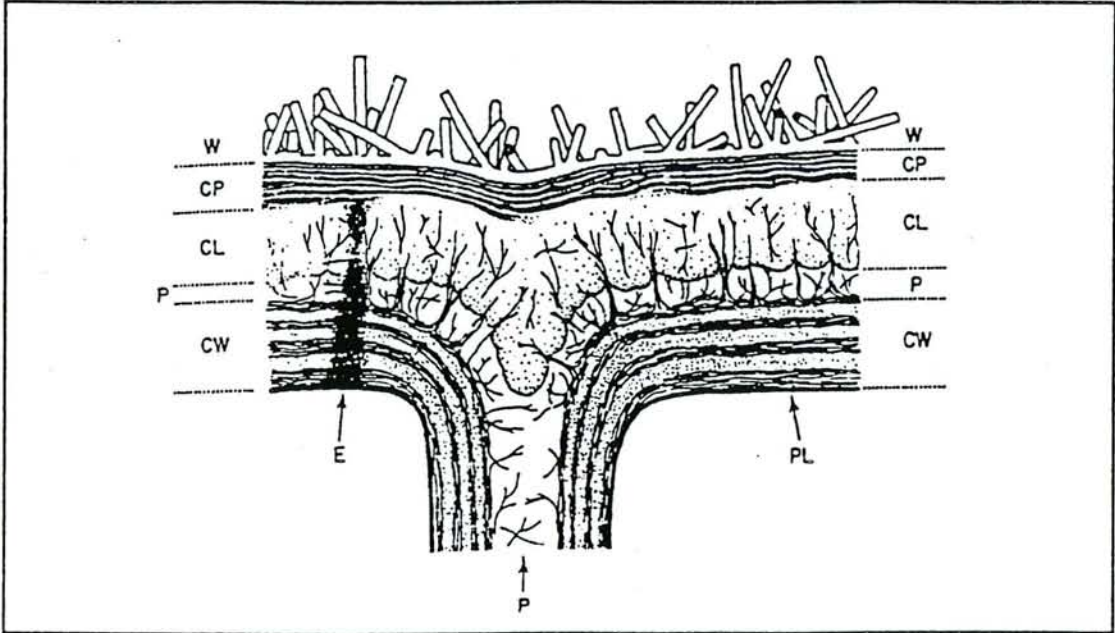
La cuticule n'est pas une barrière complètement imperméable (Price, 1982). La perméabilité cuticulaire à l'eau (Schönherr, 1976 a), aux gaz (Lendzian, 1982) aux produits phytosanitaires (Price, 1982; Chamel *et al.*, 1991) et aux ions (Ferrandon et Chamel, 1989) a été abondamment étudiée. En revanche, peu de travaux ont été menés pour étudier le transport des métabolites à travers la cuticule. Seules des observations de leur lessivage induit par les pluies, les pluies acides ou la rosée ont été faites (Tukey, 1970; Adams et Hutchinson, 1987; Alenäs et Skärsby, 1988; Mitterhuber *et al.*, 1989; Mengel *et al.*, 1990). Les composés trouvés dans les lessivats des végétaux sont des sucres, des substances pectiques, des acides aminés, des substances phénoliques, des gibberellines et des vitamines (Tukey, 1970).

Dans ce chapitre, la perméabilité des cuticules de laurier cerise (*Prunus laurocerasus* L.) aux sucres solubles glucose, fructose et saccharose est abordée. La cuticule isolée est un excellent moyen d'étudier la diffusion des molécules en évitant la variabilité de la source et de la surface.

L'influence de la qualité de la membrane cuticulaire sur le passage des sucres solubles est approchée en modifiant le contenu en lipides solubles de la cuticule. Aussi, pour tenter d'établir ce lien, deux types d'extraction ont été réalisés:

- l'extraction des cires épicuticulaires par le stripping, (arrachage)

Figure 12: Structure de la cuticule des plantes (d'après Jeffree, 1986). W: cires épicuticulaires, CP: cuticule primaire, CL: cuticule secondaire, P: pectine et lamelle moyenne, CW: paroi cellulaire, PL: plasmalemme.

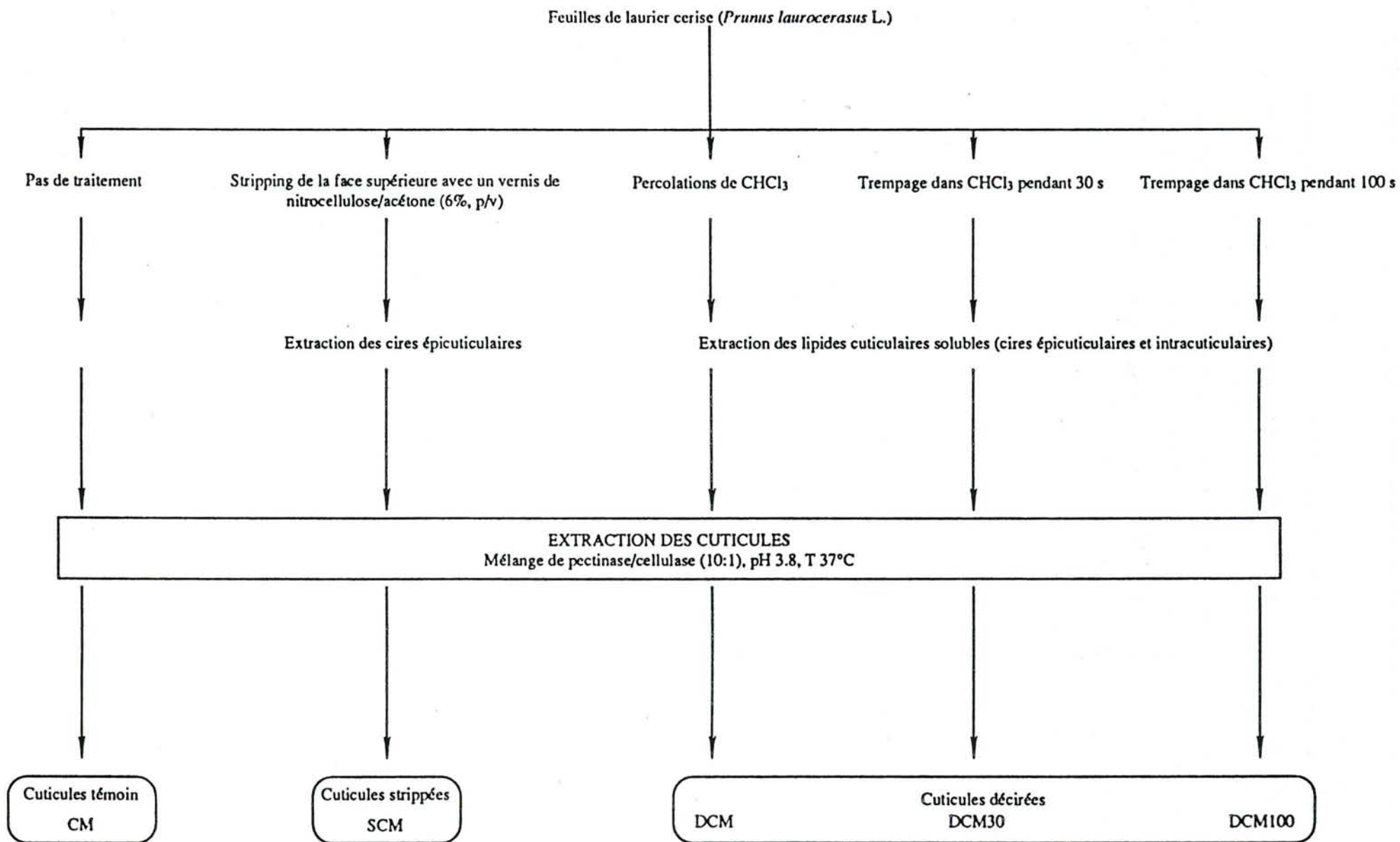


- l'extraction des SCL (épicuticulaires et intracuticulaires) par percolation de chloroforme ou par trempage des feuilles dans le chloroforme pendant des durées définies, permettra de préciser le rôle des SCL dans leur globalité, et par différence avec la perméabilité des cuticules dont les cires épicuticulaires ont été retirées, le rôle des cires intracuticulaires pourra être déduit.

La technique de percolation a été utilisée car elle permettait dans d'autres études de comparer la composition des cires sur les 2 faces foliaires séparément et elle peut être facilement mise en oeuvre pour des études *in situ*. Cependant un a priori sur son efficacité d'extraction des SCL nous a enjoint à utiliser également la technique du trempage.



Figure 13: Protocole d'extraction des cires cuticulaires pour les expérimentations de perméabilité.



## II-Matériels et méthodes

### 1. Matériel végétal

Des feuilles complètement développées de laurier cerise (*Prunus laurocerasus* L.) ont été utilisées pour les expériences sur cuticules isolées. Les feuilles proviennent d'arbres cultivés en conditions naturelles (arboretum en forêt d'Amance, Meurthe et Moselle (54)). Ces feuilles sont hypostomatiques et leurs cuticules sont faciles à extraire. Toutes les feuilles ont été prélevées au même rang, deuxième et troisième à partir du bourgeon terminal de la branche et situées à 1.5 m du sol. Elles avaient toutes la même orientation.

Les extractions des cires cuticulaires par les solvants ont été effectuées sur feuille avant l'isolement des cuticules (figure 13).

### 2. Extraction des lipides cuticulaires solubles

#### 2.1. Stripping des surfaces foliaires

Le stripping consiste en l'application d'un vernis (6 % p/v de nitrocellulose/acétone) à la surface de la feuille. Quand le vernis est sec, il forme un film qui imprègne les cires épicuticulaires. Après isolement, les membranes cuticulaires obtenues, ont été appelées SCM, membranes cuticulaires strippées.

#### 2.2. Percolations de chloroforme

Les lipides cuticulaires solubles ont été extraits de la surface foliaire adaxiale par percolation (4x5 ml ; température ambiante) de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$  ; Normapur, Prolabo). Après extraction, les membranes cuticulaires résultant de ce traitement ont été appelées membranes cuticulaires décirées, DCM.

#### 2.3. Trempage des feuilles entières

Les feuilles indemnes de blessures ont été immergées dans 100 ml de chloroforme, pendant 30 et 100 s et en agitation.

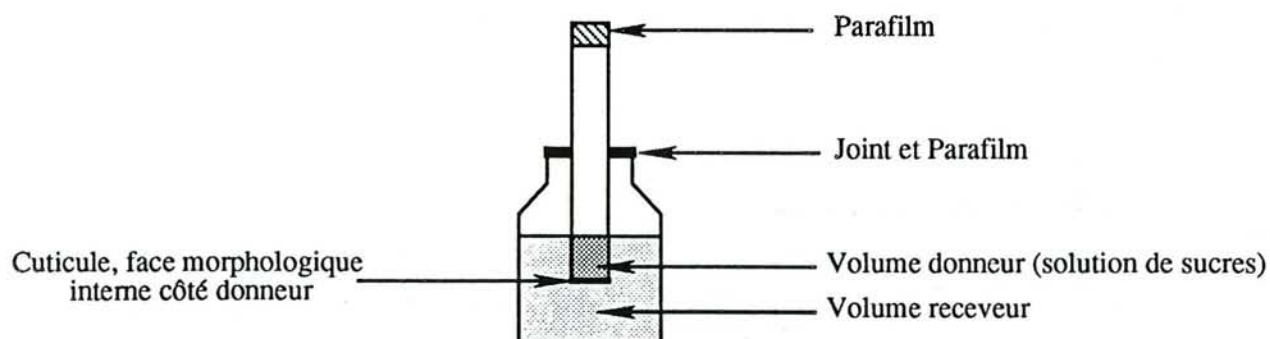
Les cuticules isolées à partir de ces feuilles, ont été appelées DCM30 et DCM100.

### 3. Isolement des membranes cuticulaires

L'extraction de la cuticule a été conduite en utilisant une méthode enzymatique (Orgell, 1955). Des feuilles complètement développées intactes ou dont les cires ont été extraites (par stripping, par percolation, ou par trempage) ont été coupées en morceaux. Elles ont été désinfectées avec  $\text{NaClO}$  2 % et rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée. Les morceaux de feuilles ont été ensuite incubés à 37°C dans un tampon d'acide acétique/acétate de sodium 0.2 M contenant de la pectinase de levure 4 % (p/v) (0.005 U.mg<sup>-1</sup>; Fluka), et de la cellulase d'*Aspergillus niger* 0.4 % (p/v) (0.67 U.mg<sup>-1</sup>, Fluka). Après une semaine, les cuticules ont été séparées, les débris cellulaires adhérents ont été



Figure 14: Dispositif expérimental de perméabilité cuticulaire.



retirés avec un pinceau. Seules les cuticules intactes de la face supérieure des feuilles ont été conservées (face sans stomate). Les cuticules ont été séchées à l'air sur une plaque de Téflon. Les cuticules n'ayant pas subi de modification de leur contenu en cires ont été appelées CM.

#### 4. Expériences de perméabilité sur les cuticules isolées

Elles ont été réalisées avec un système composé de deux compartiments aqueux séparés par la cuticule : le donneur, contenant les sucres, et le receveur (figure 14). Le compartiment receveur consistait en un flacon contenant 8 ml d'une solution tampon composée d'acide succinique dihydrazide (SADH) 2 mM à pH 5 avec de l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) 1 mM pour éviter une prolifération microbienne ( $\text{NaN}_3$  est un inhibiteur des ATPases mitochondriales). Dans ces flacons le compartiment donneur a été suspendu : il s'agit d'un tube à paroi épaisse (12 mm d.e., 7.5 mm d.i., 100 mm L) avec la cuticule collée à une extrémité avec une colle epoxy (Epoxy, Framet, France). La face morphologique interne de la cuticule a été dirigée vers l'intérieur du donneur contenant 0.8 ml de sucre dans une solution tamponnée, afin de simuler la diffusion des sucres de l'intérieur vers la surface extérieure de la cuticule. Toute cette expérience a été réalisée en conditions stériles.

Les cinétiques de passage des sucres ont été étudiées pour les membranes CM, DCM et SCM avec les sucres pris séparément. Elles ont été suivies en changeant le receveur à différents temps: 0.5, 1, 3, 6, et 24 h. En revanche, pour les membranes DCM30, DCM100, et les membranes témoins CM, la perméabilité des membranes a été étudiée par la quantité de sucres qui les traverse après 24 h. Pour cette dernière expérience, les sucres ont été utilisés simultanément.

Le système a été agité à 100 rpm (Agitateur Rota-Test 74401, Bioblock Scientific).

L'intégrité des cuticules et de l'assemblage du dispositif a été contrôlée avant et après les expériences de perméabilité. La vérification a été faite en remplissant le donneur avec 1 ml d'eau distillée et en contrôlant son niveau après 24 h.

#### 5. Calcul de la perméance

La perméabilité des cuticules isolées aux sucres solubles peut être exprimée par la perméance. La perméance est l'équivalent d'une conductance. Elle caractérise la conductance d'une membrane d'épaisseur non définie à une molécule donnée et elle a la dimension d'une vitesse ( $\text{m.s}^{-1}$ ). Ce paramètre nous a permis de décrire la perméabilité d'une cuticule donnée pour une molécule donnée. (Kerler et Schönherr, 1988):

$$P = \frac{CV}{tS\Delta C}$$

C ( $\mu\text{g.m}^{-3}$ ): concentrations des sucres qui ont traversé la cuticule, et qui ont été mesurées dans le receveur.

$V$  ( $m^3$ ): volume receveur ( $8.10^{-6} m^{-3}$ ).

$t$  (s): durée de l'expérience.

$S$  ( $m^2$ ): surface cuticulaire exposée aux sucres ( $45.36 \times 10^{-6} m^{-2}$ ).

$\partial C$  ( $\mu g.m^{-3}$ ): force motrice, i.e. la différence de concentration en sucre entre les compartiments receveur et donneur.

## 6. Analyses des sucres

Les échantillons de sucres ont été évaporés à sec soit par un évaporateur rotatif sous vide (Jouan, RC10.10), soit lyophilisés. Les sucres ayant traversé les cuticules partiellement décirées par des percolations de chloroforme ou par le stripping ont été dosés par colorimétrie. Cette méthode utilise l'acide sulfurique et la cystéine (Dische, 1962) pour quantifier le glucose et le fructose, tandis que le saccharose a été déterminé par la méthode décrite par Bergmeyer *et al.* (1974). La sensibilité des deux méthodes colorimétriques utilisées étaient  $2 \mu g.ml^{-1}$ .

L'absorbance du glucose et du fructose a été mesurée à 405 nm, et celle du saccharose à 390 nm (spectrophotomètre Jobin Yvon Hitachi 100 60).

Le dosage des sucres recueillis après leur passage à travers des cuticules partiellement décirées par le trempage des feuilles dans le chloroforme a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) dans les conditions expérimentales décrites dans la première partie (page 9).

## 7. Analyses statistiques

L'exploitation de la perméabilité des sucres a été faite avec deux méthodes d'analyses statistiques utilisant SAS® (Statistical Analysis System; SAS Institute Inc., 1989). Une analyse de la variance (ANOVA) en mesure répétée a été utilisée car la même membrane a été testée à des temps différents. Le facteur répétition à l'intérieur des traitements (sucre, type de cuticule) a été inclus dans le modèle pour absorber les corrélations entre les erreurs expérimentales.

Le modèle comprenait aussi les effets sucres, la répétition dans le traitement (erreur 1), le temps, l'interaction sucre\*temps et l'interaction temps\*répétition dans le traitement (erreur 2). L'effet du facteur traitement a été testé contre l'erreur 1 et ces effets incluant le temps ont été testés contre l'erreur 2. Ainsi, comme l'interaction sucre\*temps est significative, les valeurs des moyennes ajustées ont été comparées pour les temps: 0.5, 1, 3, 6, et 24 h par le test t de Student.

D'autre part, les droites qui approchent le mieux les courbes décrivant la perméabilité des différents sucres et des membranes ont été calculées par la méthode des moindres carrés (régression linéaire). Les pentes moyennes de ces droites ont été comparées par une ANOVA.

Le même modèle a été utilisé pour les expériences de percolation et de stripping, avec le type de membrane cuticulaire ajouté comme facteur.



Dans le cas des traitements des cuticules par trempage, la sélectivité des membranes pour les sucres a été réalisée avec une analyse de la variance factorielle, lorsque celle-ci était significative une comparaison des moyennes par le test t de Student a été effectuée. Une analyse statistique similaire a été utilisée pour déterminer l'influence des trois types de membrane sur le passage des sucres.

Figure 15: Cinétique de passage du fructose ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), glucose ( $4 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) et saccharose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) à travers les cuticules isolées.  $Q_t$  la quantité de sucre qui traverse le cuticule et mesurée dans le receveur au temps  $t$ .  $Q_0$ , la quantité de sucre dans le donneur à  $t = 0$ . Les expériences de perméabilité ont été conduites avec 5 à 7 cuticules. Barres: écarts types.

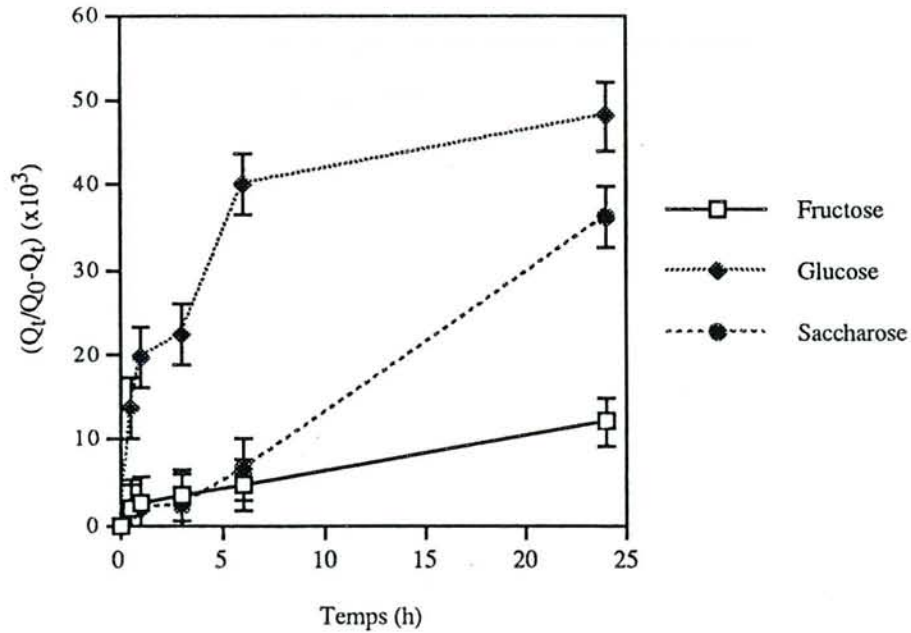


Tableau 4: Perméance des cuticules isolées (CM, témoin) de la feuille de laurier cerise au fructose ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), au glucose ( $4 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) et au saccharose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) dans la solution du donneur.

Sucres	Perméance $\text{m.s}^{-1}$
Fructose	$2.34 \times 10^{-9}$
Glucose	$21.7 \times 10^{-9}$
Saccharose	$4.13 \times 10^{-9}$

### III-Résultats

#### 1. Perméabilité des cuticules intactes au fructose, glucose, et saccharose:

Les courbes de perméabilité pour les trois sucres à travers les cuticules isolées de laurier cerise (CM) sont représentées figure 15. Elles sont exprimées par la quantité de sucre dans le receveur ( $Q_t$ ) rapportée à celle du donneur, en fonction du temps, et  $Q_t \ll Q_0$ .

La concentration de chaque sucre dans le donneur a été délibérément choisie différente ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg.ml}^{-1}$  et  $15 \text{ mg.ml}^{-1}$  pour le fructose, le glucose et le saccharose, respectivement), afin de simuler leur proportion dans les tissus foliaires. Les sucres n'ont pas été détectés avant 0.5 h.

Deux types d'analyses statistiques, décrites dans la section matériels et méthodes, ont été utilisées pour exploiter les résultats, afin de prendre en compte la variabilité souvent trouvée dans la perméabilité cuticulaire, comme on peut le voir avec les grands écarts types.

Dans un premier temps, les moyennes ajustées de la quantité de chaque sucre qui traversent la cuticule à différent temps ont été comparées. Cette comparaison était possible uniquement parce que l'ANOVA montrait une interaction sucre\*temps significative ( $F = 5.28$ ,  $P < 0.0001$ ). De 0.5 à 6 h, la diffusion du glucose à travers les cuticules était plus élevée que celle du fructose et du saccharose, dont les quantités dans le receveur n'étaient pas significativement différentes pour ces temps. De 6 à 24 h, une forte augmentation du rapport  $Q_t/Q_0 - Q_t$  du saccharose est observée. Néanmoins, la perméabilité des cuticules isolées des feuilles de laurier cerise était toujours plus importante pour le glucose que pour le fructose et le saccharose. La quantité de fructose reste faible. Le passage du glucose à travers CM était plus rapide de 0.5 à 6 h, et ralentissait de 6 à 24 h. D'un autre côté, le saccharose traverse lentement CM jusqu'à 24 h. De même le fructose diffuse lentement au travers de CM tout au long de la cinétique.

La perméabilité des cuticules isolées aux trois sucres est significativement différente (ANOVA,  $F = 4.79$ ,  $P = 0.0026$ ). La perméabilité de chaque membrane (répétition), est donnée par la pente des droites qui approchent le mieux les courbes décrivant la perméabilité calculée par la méthode des moindres carrés. Les pentes moyennes de ces droites ont été comparées par une ANOVA. La perméabilité au glucose est plus importante que celle au fructose ( $P = 0.011$ ) ou au saccharose ( $P = 0.028$ ) et la diffusion du fructose et du saccharose était similaire ( $P = 0.790$ ). Le calcul de leur perméance (tableau 4) montre que le glucose traverse CM 9 fois plus vite que le fructose et 5 fois plus que le saccharose. Ainsi la perméabilité de CM au glucose est plus importante que celle au fructose au saccharose.

Consécutivement à cette première expérience nous avons essayé de déterminer si le passage des sucres sur cuticules isolées caractérisé ci-dessus pouvait être relié aux résultats obtenus sur les feuilles de laurier cerise en première partie du mémoire.

Pour comparer ces deux résultats, la quantité des sucres (rapportée à la surface de la cuticule traversée) après 24 h de perméabilité dans chaque compartiment a été prise en compte. Ces chiffres ont permis de déterminer la proportion des sucres du compartiment donneur qui a traversé les



Figure 17: Cinétique de passage du fructose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans le donneur) à travers les cuticules isolées témoins (CM), strippées (SCM) et décirées (DCM).  $Q_t$  la quantité de sucre qui traverse le cuticule et mesurée dans le receveur au temps  $t$ .  $Q_0$ , la quantité de sucre dans le donneur à  $t = 0$ . Les expériences de perméabilité ont été conduites avec 6 à 8 cuticules. Barres: écarts types.

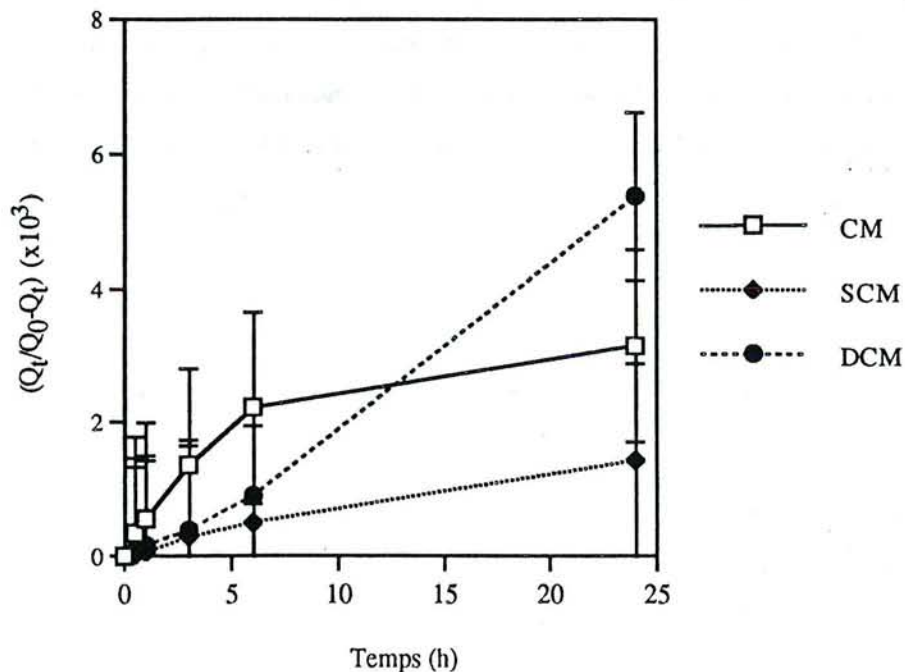
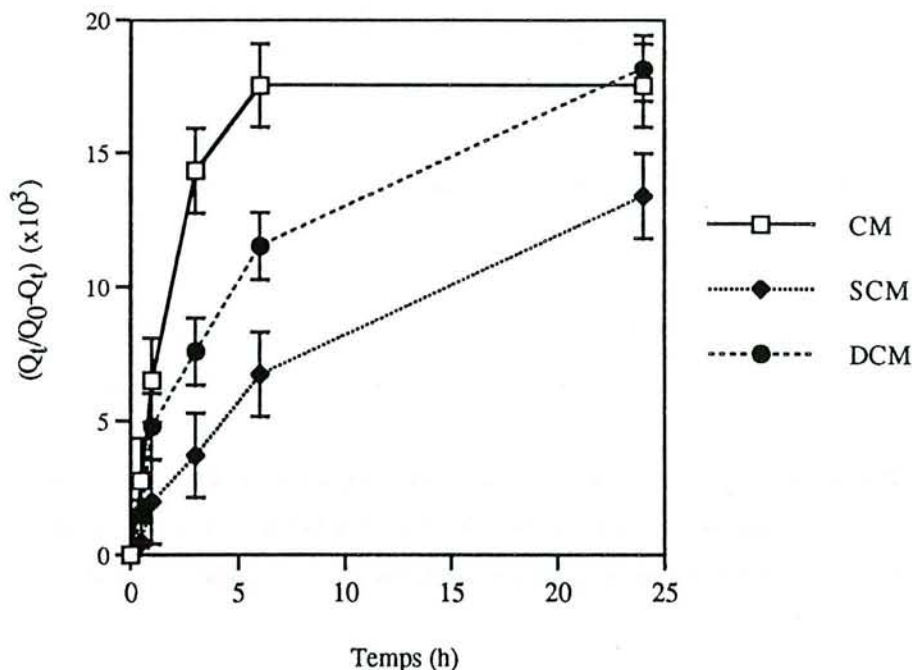
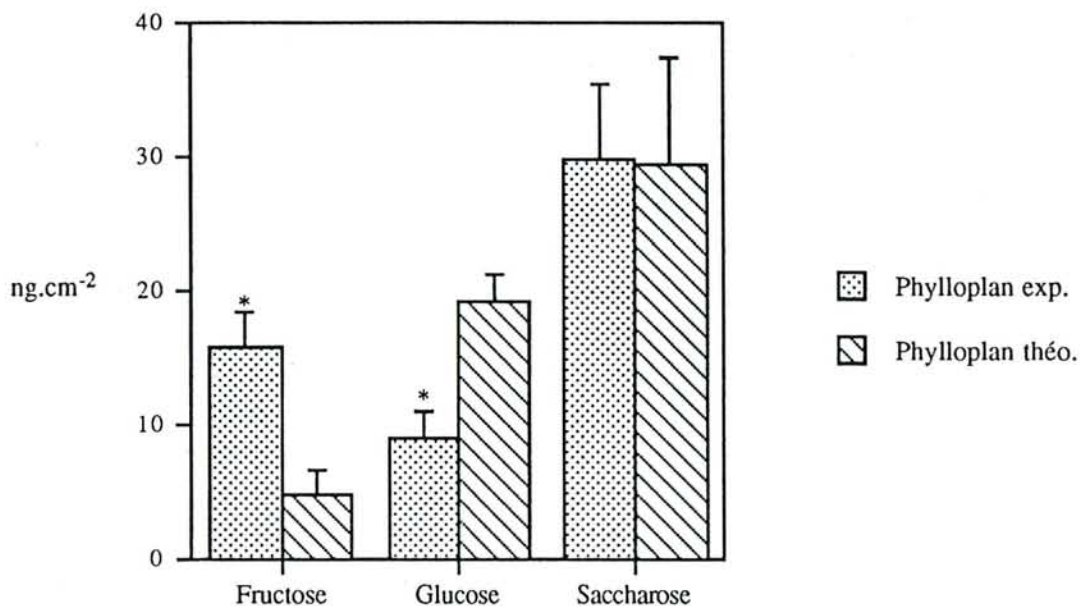


Figure 18: Cinétique de passage du glucose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans le donneur) à travers les cuticules isolées témoins (CM), strippées (SCM) et décirées (DCM).  $Q_t$  la quantité de sucre qui traverse le cuticule et mesurée dans le receveur au temps  $t$ .  $Q_0$ , la quantité de sucre dans le donneur à  $t = 0$ . Les expériences de perméabilité ont été conduites avec 5 à 8 cuticules. Barres: écarts types.



cuticules. Ce taux est de 1.2 %, 4.8 % et 3.6 % pour le fructose, le glucose et le saccharose respectivement. A partir de ces valeurs et des quantités moyennes de chaque sucre dosées dans le milieu intercellulaire des feuilles de laurier cerise une composition du phylloplan telle qu'elle serait si la cuticule était le seul facteur influant sur sa composition a été déterminée (figure 16). La composition théorique du phylloplan se différencie de la composition expérimentale par une inversion des quantités et de fructose et de glucose, et la différence entre la composition expérimentale et théorique est significativement différente pour les deux hexoses. La cuticule n'est donc pas le seul facteur intervenant dans la composition du phylloplan observée dans le premier chapitre.

**Figure 16:** Comparaison de la composition en sucres solubles du phylloplan de laurier cerise déterminée expérimentalement (exp.) et théoriquement (théo.) à partir des expériences de perméabilité des cuticules isolées. Différence significative, \* ( $\alpha = 0.05$ ) entre les deux déterminations. (moyenne de 4 répétitions, barres: écarts types).



## 2. Perméabilité des cuticules isolées témoins (CM), strippées (SCM) et décirées (DCM) au fructose et au glucose

Dans ce second type d'expérience, les courbes de perméabilité au fructose et au glucose à travers CM, SCM et DCM sont montrées figures 17 et 18 respectivement. Comme dans cette expérience, le type de cuticule était étudié, la même concentration en sucres a été utilisée (15 mg.ml<sup>-1</sup>).

En dépit des différences de perméabilité des trois types de cuticules au glucose visibles sur la figure 18 pour 3 et 6 h, l'ANOVA n'a pas révélé une interaction sucre\*membrane\*temps significative ( $F = 0.75$ ,  $P = 0.65$ ). Pour cette raison, la comparaison des moyennes ajustées de la quantité de

glucose ou de fructose qui ont traversé les différents types de cuticules ne peut pas être faite. Ainsi, comparées à la perméabilité de CM, ni les cuticules strippées, ni les cuticules ayant subi une percolation de chloroforme n'ont montré un changement de leur perméabilité à chaque sucre. La réduction partielle du contenu en lipides solubles cuticulaires par stripping ou par percolation de chloroforme n'affecterait pas la perméabilité cuticulaire au glucose et au fructose.

Quand les cinétiques de passage du glucose et du fructose à travers SCM et DCM sont comparées (par les pentes moyennes des courbes calculées par la méthode des moindres carrés), une perméabilité plus importante au glucose est de nouveau retrouvée, quel que soit le type cuticulaire (ANOVA pour l'effet sucre:  $F = 22.96$  ;  $P < 0.0001$ ). Pour les membranes cuticulaires témoins (CM), la probabilité d'avoir la même pente pour le glucose et le fructose est  $P = 0.028$ , pour les membranes strippées et les membranes décirées, la probabilité est de  $P = 0.005$  et  $P = 0.004$  respectivement.

La perméance de CM, SCM et DCM pour les deux sucres est donnée dans le tableau 5.

**Tableau 5: Perméance des membranes cuticulaires témoins (CM), strippées (SCM) et décirées (DCM) au glucose et au fructose à  $15 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans la solution du donneur.**

Sucres	Perméance $\text{m.s}^{-1}$		
	CM	SCM	DCM
Fructose	$5.24 \times 10^{-10}$	$2.84 \times 10^{-10}$	$11.2 \times 10^{-10}$
Glucose	$21.9 \times 10^{-10}$	$24.7 \times 10^{-10}$	$29.7 \times 10^{-10}$

L'augmentation de la perméabilité au glucose par rapport à celle au fructose varie de 3 à 9 selon le type de membrane. Ainsi il apparaît ici qu'une réduction partielle du contenu en cires solubles cuticulaires n'affecte pas le passage d'un même sucre, et que la sélectivité de la cuticule aux sucres solubles est maintenue.

### 3. Perméabilité des cuticules décirées par 30 s (DCM30) et 100 s de trempage (DCM100) aux trois sucres

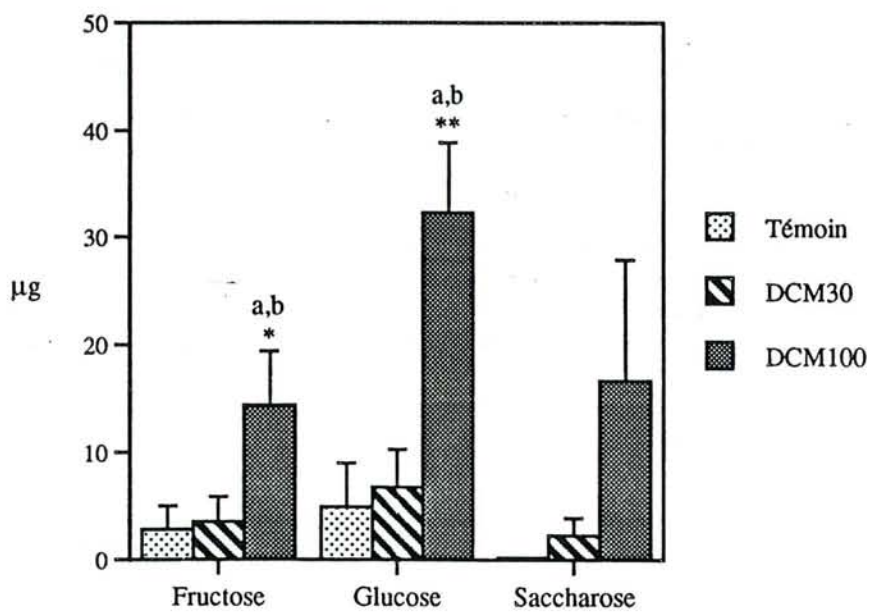
#### 3.1. Sélectivité des membranes cuticulaires pour les sucres simultanément

La perméabilité a été évaluée dans cette expérience par la quantité de sucre retrouvée dans le receveur après 24 h d'expérimentation (figure 19). Cinq répétitions par type membranaire ont été effectuées. La concentration de chacun des trois sucres du compartiment donneur était  $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (ordre de grandeur plus proche de celui dosé dans le milieu intercellulaire).

Si une tendance s'affiche pour une sélectivité des membranes cuticulaires quelles qu'elles soient, en faveur du glucose, celle-ci n'est pas significative (ANOVA du témoin:  $F = 0.77$ ,  $P = 0.48$ ; DCM30:  $F = 0.81$ ,  $P = 0.47$ ; DCM100:  $F = 1.47$ ,  $P = 0.27$ ). A titre indicatif, cette tendance observée deviendrait significative si l'effectif était quadruplé pour chaque type de membranes, réduisant ainsi, la variabilité très importante de la perméabilité cuticulaire.



Figure 19: Quantité de sucres solubles qui traverse les cuticules après 24 h d'expérimentation. DCM30, DCM 100,30 et cent secondes de trempage dans le chloroforme. a: différence de passage entre DCM100 et le témoin, b: entre DCM30 et DCM100, \*\*: hautement significative ( $\alpha = 0.01$ ) et \*: significative ( $\alpha = 0.05$ ). (moyenne de 5 membranes, barres: écarts types).



Que les sucres soient utilisés séparément ou ensemble, le passage du glucose est toujours plus important que celui du fructose et du saccharose, et cette sélectivité est conservée quelle que soit la durée de trempage des feuilles dans le chloroforme.

### 3.2. Effet du temps de trempage sur le passage des sucres

La réduction en lipides solubles des cuticules n'a pas le même effet selon le sucre (figure 19). Ainsi, le passage du saccharose n'est pas différent quelle que soit la membrane qu'il traverse ( $F = 1.85$ ,  $P = 0.2$ ). En revanche la perméabilité des membranes au fructose et au glucose est différente selon le temps de trempage.

Par rapport au témoin, 30 s de décirage ne suffisent pas à modifier la perméabilité cuticulaire au fructose ou au glucose. En revanche pour 100 s de décirage, la quantité de fructose et de glucose retrouvée dans le receveur est 5 et 6.5 fois plus élevée respectivement, que celle obtenue après passage à travers les cuticules intactes (hautement significatif pour le glucose ( $t = -3.52$ ,  $p = 0.008$ ) et presque significatif pour le fructose ( $t = -2.11$ ,  $p = 0.06$ )).

Le temps de décirage est également important, puisque pour 100 s de trempage le passage du fructose et du glucose est amélioré d'un facteur 4 par rapport à 30 s de trempage. Ce résultat est hautement significatif pour le glucose ( $\alpha = 0.001$ ) et significatif pour le fructose ( $\alpha = 0.005$ ).

Le décirage partiel des cuticules par trempage a permis d'entrevoir le rôle prépondérant des cires intracuticulaires en tant que barrières, alors que les cires épicuticulaires ne semblent pas affecter le passage des sucres.

#### IV-Discussion

Très peu de travaux font état du passage des sucres à travers la cuticule.

La plupart de ce qui a été fait concerne la perte des sucres par la plante dans les phénomènes de lessivage causés par les brouillards ou les pluies acides (Tukey, 1970 ; Mitterhuber *et al.*, 1989 ; Mengel *et al.*, 1990) mais pas particulièrement au niveau de la cuticule. La compréhension de la perméabilité des cuticules isolées dépend à la fois des propriétés physiques et chimiques des composés diffusant et des caractéristiques (composition chimique et organisation structurale) des membranes cuticulaires.

Puisque la cuticule de laurier ne contient pas de transporteur de solutés et qu'elle est 1000 fois plus épaisse que le plasmalemme, un transport actif peut être exclu. Le passage des molécules organiques concerne des phénomènes de diffusion (Price, 1982). Les cinétiques de diffusion à travers la cuticule ont été déterminées dans un système à "concentrations infinies" (où concentration dans le compartiment receveur  $\ll$  concentration dans le compartiment donneur). Habituellement dans un tel système quand la quantité de solutés qui traverse la membrane est tracée en fonction du temps, après un temps de retard, le flux devient indépendant du temps, i.e. l'état d'équilibre a été atteint. Cependant les cinétiques de diffusion obtenues dans notre étude, ne reproduisent pas exactement ces courbes. Dans la plupart des cas la pénétration augmente et atteint un plateau. Cela suggère que le gradient de concentration n'est pas maintenu (la force motrice n'est pas constante), puisque la quantité d'un soluté qui diffuse à travers une membrane d'une surface donnée pendant un certain temps est mesurée comme une fonction de l'amplitude de cette force motrice (Schönherr et Riederer, 1989). Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. (1) La réduction de la force motrice pourrait être due à un équilibre des concentrations entre les solutions du compartiment donneur et du compartiment receveur. Cependant la quantité de sucre dans le receveur a toujours été négligeable par rapport à celle du donneur et le système était bien agité afin d'éviter la formation de gradient dans la solution du receveur adjacente à la surface de la membrane. (2) Le passage des sucres à travers la cuticule peut être décrite dans un premier temps par la fixation du soluté par la membrane suivie par sa libération dans la solution du compartiment receveur. Ainsi une autre hypothèse serait une augmentation des solutés fixés dans la membrane avec aucune augmentation correspondante dans le receveur. Ce phénomène pourrait être expliqué soit par une interaction entre les molécules de solutés et des composés de la membrane cuticulaire (cutine ou cires) ou par une altération de la membrane cuticulaire pendant les expériences de cinétique de diffusion des sucres. A notre avis l'hypothèse d'une interaction entre les sucres et les composés cuticulaires est la plus vraisemblable, puisque différents auteurs ont trouvé des sucres dans les cires (Goffreda *et al.*, 1990; Ohya *et al.*, 1994). Présentement, nous avons aucun moyen de démontrer ces suppositions et d'autres analyses devraient être réalisées. Par exemple, la détermination de la quantité de solutés à la fois dans la solution du donneur, dans la membrane cuticulaire et dans la solution du receveur serait intéressante.



Les expériences de perméabilité sur cuticules intactes mises en relation avec les quantités de sucres solubles dosés dans l'apoplaste et le phylloplan du laurier cerise ont mis en évidence que la cuticule n'intervient pas seule dans la composition de surface des sucres solubles. D'autres facteurs abiotiques (climat, pollution) et biotiques (microflore épiphyte) interviendraient de même que les phénomènes de réabsorption des métabolites (Schreiber et Schönherr, 1993) qui ne sont pas présents dans les expériences sur cuticules isolées.

Les exemples de perméabilité cités dans la suite de la discussion concernent le passage de molécules de la face morphologique externe de la cuticule vers la face morphologique interne de la cuticule.

La gamme de perméance allant de  $4 \times 10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$  (*Ficus elastica*, 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique)) à  $8.6 \times 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$  (*Citrus aurantium*, hexachlorobenzène) a été rapportée par Schönherr et Riederer (1989). Dans la plupart des cas, la diffusion des molécules organiques serait inversement liée à leur solubilité à l'eau, comme Davis *et al.* (1979) l'ont montré. Ces derniers auteurs ont trouvé une plus grande perméabilité des cuticules de feuilles de *Citrus mitis* au 2,6 dichloro-4-nitroaniline (insoluble dans l'eau) ( $10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$ ) qu'à l'acide trichloroacétique (solubilité dans l'eau :  $1200 \text{ g.l}^{-1}$ ) ( $2.2 \times 10^{-9} \text{ m.s}^{-1}$ ). Ce fait est supporté par la nature essentiellement lipidique de la cuticule, ayant ainsi très peu de propriétés hydrophiles (Becker *et al.*, 1986). Ceci expliquerait en partie pourquoi la perméabilité des cuticules des feuilles de *P. laurocerasus* était plus élevée au glucose qu'au fructose, car la solubilité dans l'eau (à la température ambiante) est de  $820 \text{ g.l}^{-1}$  et  $3750 \text{ g.l}^{-1}$  pour le glucose et le fructose respectivement. La perméabilité des cuticules isolées au même composé était différente entre les espèces: il y avait un rapport de 270 entre la plus petite perméance :  $10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$  (*F. elastica*) et la plus élevée  $2.72 \times 10^{-8} \text{ m.s}^{-1}$  (fruit de *Capsicum annuum*) pour le 2,4-D (Riederer et Schönherr, 1985). Les quelques travaux mentionnant la diffusion des sucres à travers les cuticules isolées ont également montré cette différence entre les espèces végétales. Par exemple, la gamme des perméances des cuticules isolées au glucose varie de  $10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$  (feuille de *Euonymus japonicus* ; Kannan, 1969) jusqu'à  $2.10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$  (fruit de *Malus sylvestris* ; Goodman et Addy, 1963).

Les sucres sont des composés polaires non électrolytes et les membranes cuticulaires se comportent comme un échangeur de cations ( $\text{pH}_i \approx 3$  ; Schönherr et Huber, 1977). La limitation de leur passage à travers la cuticule pourrait être liée à leur masse moléculaire. Ainsi, la diffusion du glucose (MM = 180) est plus élevée que celle du saccharose (MM = 342) comme il est vérifié ici pour le laurier cerise. En revanche, la même perméabilité au glucose et au saccharose a été trouvée pour les feuilles de *Euonymus japonicus* ( $10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$ ) et les fruits de *Lycopersicon esculentum* ( $3.10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$ ) (Kannan, 1969). Un autre exemple a révélé que la masse moléculaire seule, n'explique pas le transport des molécules organiques non-électrolytes à travers la cuticule ; la cuticule de pomme avait la même perméabilité à l'urée (MM = 60) et au glucose ( $2.10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$ ; Goodman et Addy, 1963). Aucune relation entre la masse moléculaire et la perméabilité a été également trouvée pour les composés lipophiles. La perméance des cuticules isolées de *C. annuum* était différente pour le 2-nitrophénol



( $P = 970.10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$ ) et le 4-nitrophénol ( $P = 185.10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$ ), ayant la même masse moléculaire (MM = 139.11) (Shafer et Schönherr, 1985).

Cependant, lorsque Schönherr (1976 b) a démontré l'existence de pores dans les cuticules de feuilles de *C. aurantium* sans SCL, il a trouvé qu'elles étaient imperméables au raffinose (MM = 594.52) et au saccharose, mais perméables au glucose et encore au plus à l'urée.

Ces pores polaires cuticulaires seraient des formations dynamiques existant seulement quand la cuticule est hydratée. Les pores résulteraient de la constitution de dipôles entre l'eau et les fonction carboxyles, hydroxyles et les liaisons esters des molécules constituant la cuticule. Ces pores formeraient la voie de passage aqueuse des composés hydrophiles. La taille de ces pores a été estimée à partir du passage des molécules de rayon moléculaire connu et la taille maximum a été déterminée à 0.47 nm. Cette taille expliquerait pourquoi le passage du saccharose n'est pas observé dans les cuticules des feuilles de *C. aurantium*, car son rayon moléculaire est de 0.55 nm contre 0.44 nm pour le glucose.

Les autres critères impliqués dans la diffusion des composés sont les caractéristiques des membranes cuticulaires. Elles concernent leur ultrastructure et leur composition chimique. Par exemple, Gouret *et al.* (1993) a souligné que chez un groupe de plante ayant la même structure fine, telle qu'une cuticule complètement réticulée (cas du laurier cerise), la perméabilité à l'herbicide diuron diminuait avec l'augmentation de leur contenu en cire. Ces résultats sont en accord avec les nôtres montrant que la perméabilité aux sucres solubles augmentait avec la quantité de cire extraites par le trempage de 100 s. Les cires limitent la diffusion des composés organiques à travers la cuticule.

La contribution des cires épi- et intracuticulaires dans le transport des sucres solubles a été étudié dans ce mémoire. L'élimination des cires épicuticulaires par le stripping n'a aucun effet sur la perméabilité cuticulaire des sucres solubles. Haas et Rentschler (1984) ont introduit la méthode de stripping, mais il n'y a aucune preuve d'une parfaite élimination sélective et quantitative des cires épicuticulaires. On peut seulement estimer que la majorité des cires épicuticulaires ont été enlevées. Le retrait des SCL peut conduire à une augmentation de la perméance à l'eau et aux solutés jusqu'à 3 ordres de grandeur et même plus (Schönherr, 1982 ; Riederer et Schönherr, 1985). Schönherr et Riederer (1989) ont suggéré que l'augmentation de la perméabilité pourrait être plus importante pour les composés hydrophiles que les lipophiles lorsque les SCL sont retirés. La gamme de cette augmentation est également variable selon les espèces et les composés qui diffusent. Par exemple, lorsque les cuticules de feuilles de *C. aurantium* étaient décirées, la perméabilité au 4-nitrophénol augmentait d'un facteur 1330 contre 9 pour le DEHP (acide 1,2-benzènedicarboxylique bis(2-éthylhexyl) ester) plus lipophile (Kerler et Schönherr, 1988). La perméabilité au phénol augmentait d'un facteur 6 pour *L. esculantum* jusqu'à 1035 pour *F. elastica*, quand les SCL étaient enlevées (Shafer et Schönherr, 1985). Un autre exemple est la perméabilité au 2,4-D, qui augmente d'un facteur de 29 jusqu'à 9192 pour ces mêmes espèces respectivement (Riederer, et Schönherr, 1985). Norris (1974) a essayé en vain de démontrer une corrélation entre la quantité de cires retirée et la gamme de

l'augmentation de la perméabilité au 2.4-D des cuticules isolées à partir de plusieurs espèces végétales. Ces faits argumentent fortement en faveur de l'importance de la qualité des cires et/ou de leur arrangement dans la matrice de cutine.

Ces auteurs ont obtenus ces résultats à partir de cuticules qui ont été décirées une fois isolées, alors que dans nos expériences les cires ont été extraites à partir de feuilles entières et les cuticules étaient ensuite isolées. Dans ce cas, on pourrait imaginer que le solvant agissant sur les deux faces de la cuticule, améliore l'extraction des cires et par conséquent, augmente la perméabilité. Riederer et Schneider (1989) ont comparé la composition des cires extraites à partir des cuticules isolées et à partir de la feuille entière de *C. aurantium*. L'extraction par immersion des feuilles entières dans le chloroforme à 30°C pendant 30 min a montré qu'elle n'était pas aussi complète que l'immersion des cuticules isolées, et qu'il y avait une discrimination des homologues<sup>1</sup> à nombre de carbone élevé des classes des constituants aliphatiques. L'extraction des cires à partir des feuilles sous-estime les chaînes longues par rapport aux chaînes courtes. De plus Gouret *et al.* (1993) ont montré que les cuticules de *P. laurocerasus* contenaient 107  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de cires solubles, l'un des contenus les plus élevés qu'ils ont donné avec celui du *F. elastica* (119  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). A la fois le matériel d'où sont extraites les cires, les feuilles, et la quantité importante des cires de laurier cerise montrent que seul un décirage partiel a été obtenu, et expliqueraient donc une augmentation de la perméabilité aux sucres peu spectaculaire, comparée à celles de la littérature. Lorsque les cires solubles cuticulaires ont été retirées par percolations de chloroforme dans nos expériences, aucune modification de la perméabilité aux sucres solubles n'était significative, alors que la réduction des SCL pour 100 s de trempage induisait une augmentation de perméabilité pour le glucose et le fructose significative. Il apparaît ainsi que la percolation est moins efficace que le trempage pour extraire les cires cuticulaires. C'est pourquoi, dans le chapitre suivant, l'analyse des cires extraites selon les différentes méthodes employées au cours des expériences de perméabilité seront effectuées afin d'essayer de définir un lien entre la quantité et la qualité des lipides solubles cuticulaires et le passage des sucres à travers ces cuticules modifiées.

---

<sup>1</sup>Les homologues sont des chaînes carbonées constitutives d'une même famille chimique de cires. On parle d'homologues pairs ou impairs, à chaînes courtes ou longues. Ils ne se distinguent que par leur nombre d'atomes de carbone.



## **TROISIÈME PARTIE**

**INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES CIRES  
CUTICULAIRES DE LAURIER CERISE (*Prunus laurocerasus* L.)  
DANS LE PASSAGE DES SUCRES SOLUBLES.**



## I-Introduction

Les cuticules sont de fines couches continues de matériel essentiellement lipidique déposées à la surface la plus externe des parois des cellules épidermiques. Les cuticules sont généralement caractérisées par deux classes spécifiques de substances lipidiques: les lipides solubles et les polyesters insolubles de cutine.

Au niveau de l'organisation de la cuticule, ces deux composés principaux se répartissent comme suit: de la surface externe vers l'intérieur de la feuille par (voir figure 12 page 21):

- les cires épicuticulaires, qui forment un film amorphe d'où émergent des structures cristallines. Celles-ci sont de différentes formes, les plus fréquentes sont des tubes, des plaques ou lamelles, des rubans, filaments, bâtonnets, granules, dendrites (Jeffree, 1986). La quantité des cires épicuticulaires peut varier de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  jusqu'à  $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  chez les espèces xérophytes (Holloway, 1994). La composition des cires épicuticulaires est spécifique des espèces végétales, et elle peut changer au cours du développement de la plante. Les composés les plus caractéristiques identifiés des cires sont aliphatiques avec des chaînes longues à nombre pair ou impair d'atomes de carbone, et cycliques chez certaines espèces. Les constituants les plus fréquents (figure 20) sont des alcools primaires (C26, C28, C30), des alcools secondaires (C29), des alcanes (C29, C31), des  $\beta$ -dicétones (C31, C33), des triterpènes et des acides gras.(Tulloch, 1976 ; Baker, 1982)

- la cuticule proprement dite ou cuticule primaire, constituée de cutine et de cires. La cutine est un biopolyester composé d'hydroxyacides et d'époxyhydroxyacides en C16 et C18 ; elle forme une matrice (Kolattukudy, 1984). Les cires intracuticulaires, imbriquées dans la cutine, ont généralement une composition différente de celle des cires de surface, et elles sont constituées principalement d'acides gras.

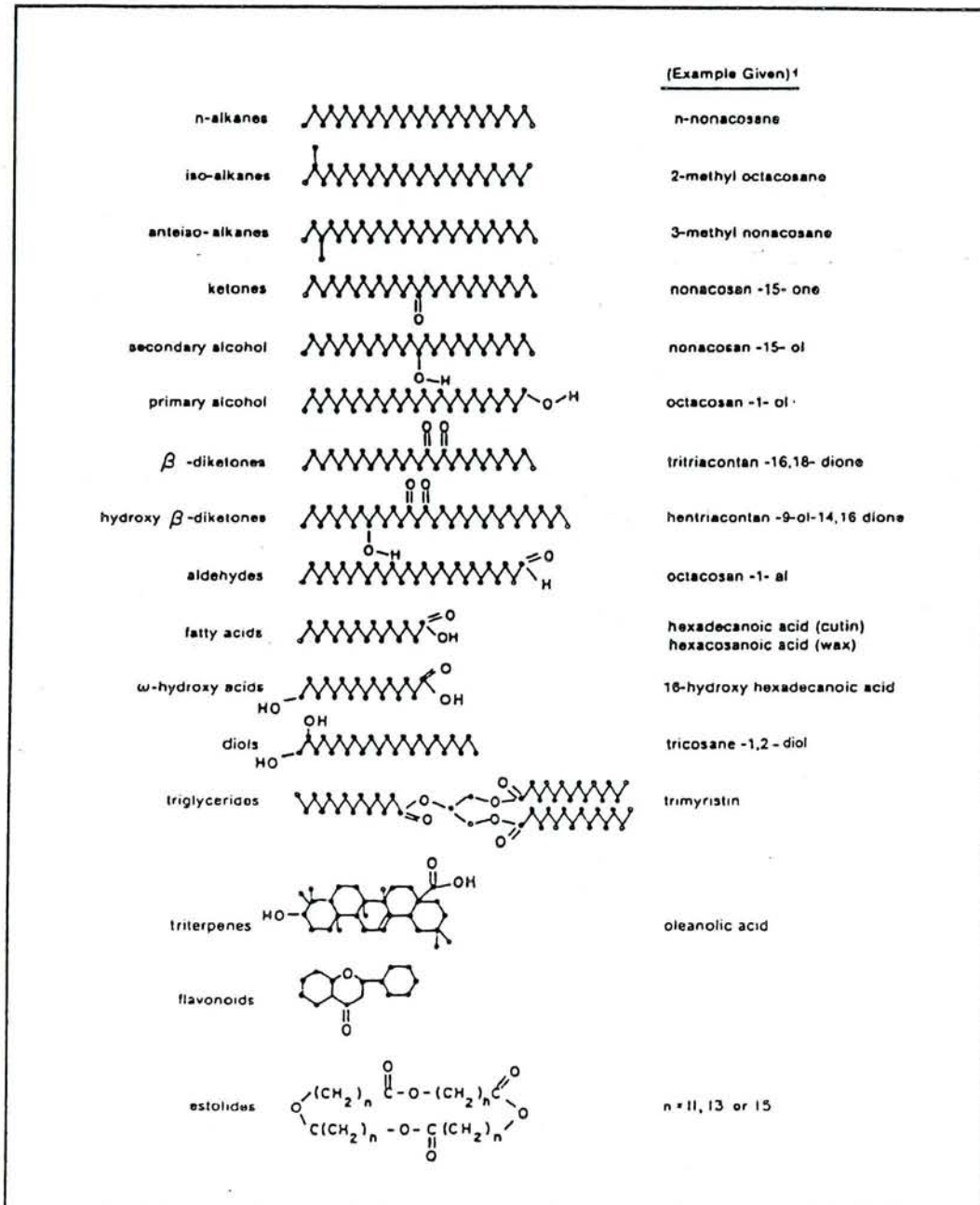
- les couches cuticulaires ou cuticule secondaire, contenant en plus de la cutine et des cires, de la cellulose. C'est une région réticulée, formant souvent la plus grande épaisseur de la cuticule.

- la lamelle de pectine ou lamelle subcuticulaire qui est équivalente à la lamelle moyenne avec laquelle elle est continue.

Dans le chapitre précédent, l'étude de la perméabilité de la membrane cuticulaire aux sucres solubles avait révélé qu'il y avait une sélectivité dans leur passage. De plus, lorsque le contenu en lipides solubles cuticulaires était réduit, la perméabilité était plus ou moins modifiée en fonction de la méthode d'extraction des cires employée.

Aussi, la qualité des cires extraites selon les différentes techniques utilisées pour les expérimentations de perméabilité sont étudiées dans ce chapitre. Cette étude a été limitée à quatre classes chimiques constituant les cires : les alcanes, les alcools primaires, les acides gras libres et les acides gras estérifiés. Ces classes ont été choisies, car elles sont les plus fréquentes dans les deux types

Figure 20: Les classes principales de substances chimiques constituant les cires cuticulaires des plantes (modifié d'après Juniper et Jeffree, 1983).





de cires (épicuticulaires et intracuticulaires). Ensuite, nous verrons s'il existe un lien entre la composition chimique des cires extraites et le passage des sucres.

## **II-Matériels et méthodes**

### **1. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé dans ce chapitre est identique à celui décrit dans le chapitre précédent page 22.

### **2. Extraction des cires cuticulaires**

Les cires ont été extraites à partir de feuilles complètement développées et indemnes de blessures, avec le chloroforme comme solvant organique. Le chloroforme a été démontré comme le plus efficace pour l'extraction des cires (Riederer et Schneider, 1989).

Plusieurs méthodes d'extraction des cires ont été utilisées, les unes correspondant à celles employées au cours des expériences de perméabilité (voir page 22 de la deuxième partie), les autres ont concerné une étude de la cinétique d'extraction des cires par trempage et la comparaison des techniques d'extraction par trempage et par percolation.

#### **2.1. Stripping des surfaces foliaires**

Les cires retirées par le film d'acétate de nitrocellulose ont été récupérées par le trempage du film dans 20 ml de chloroforme pendant 5 min et en agitation.

#### **2.2. Percolations de chloroforme**

Pour la comparaison de la technique de percolation à celle du trempage, le temps d'application du solvant a été le paramètre contrôlé (210 s).

#### **2.3. Trempage des feuilles entières selon une cinétique**

Les feuilles ont été trempées successivement dans 12 barquettes en aluminium contenant 100 ml de chloroforme et en agitation. Chaque barquette correspondant à une durée de trempage de la cinétique qui se répartit comme suit: 2 s, 3 s, 5 s, 10 s, 10 s, 10 s 10 s, 50 s, 50 s, 10 s, 20 s, 30 s, soit une durée totale de 210 s.

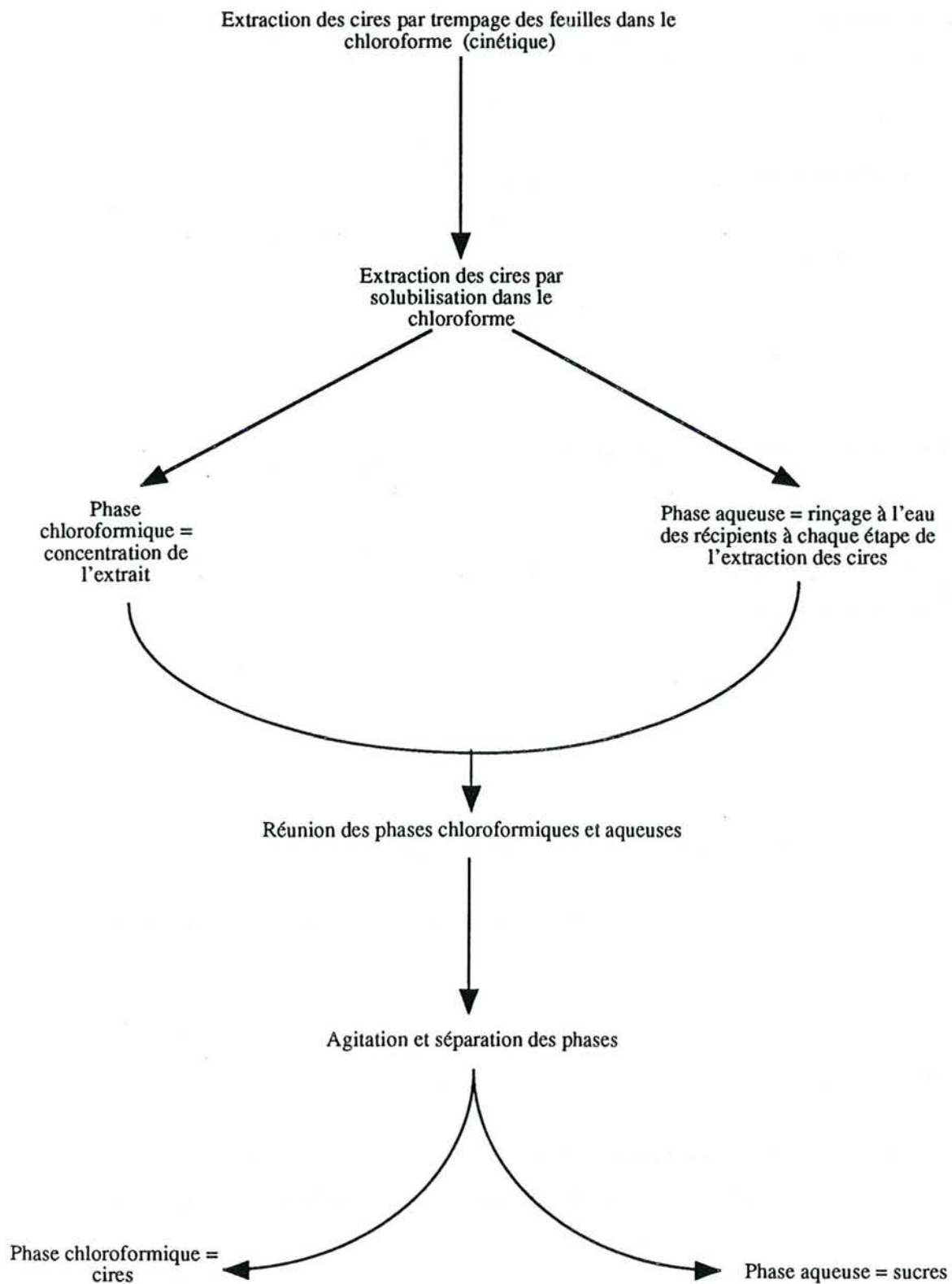
Cette expérience a compté 3 répétitions de 2 feuilles.

La gamme des durées de trempage graduellement plus longues a été définie pour déterminer le degré d'accessibilité des différents composés au solvant.

Les extraits bruts résultant de ces différentes techniques d'extraction ont été évaporés à sec, dans un premier temps avec un évaporateur rotatif sous vide pour les grands volumes et ensuite sous courant d'azote.



Figure 21: Protocole de récupération des sucres dans les cires cuticulaires de laurier cerise.



### 3. Récupération des sucres solubles dans les cires cuticulaires de laurier cerise

Les sucres solubles ont été récupérés lors de l'étude de la cinétique d'extraction des cires par le trempage des feuilles dans le chloroforme décrite ci-dessus.

A chaque temps de l'extraction des cires, les récipients ont été rincés à l'eau, qui a été rajoutée à la phase chloroformique du même temps. Après agitation du mélange, deux phases ont été obtenues, la phase chloroformique contenant les cires et la phase aqueuse contenant les substances hydrosolubles dont les sucres.(figure 21)

Les différentes classes chimiques des cires ont ensuite été séparées par chromatographie sur couche mince. Ainsi une analyse plus fine de chacune des classes peut être obtenue en utilisant une colonne adaptée. La sensibilité de l'analyse des composés mineurs est aussi améliorée.

### 4. Fractionnement des différentes classes chimiques des cires cuticulaires par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits bruts secs ont été repris avec 100 à 200 µl de chloroforme. Un aliquote a été déposé sur une plaque de verre recouverte de gel de silice (Kieselgel F254, 20 x 20 cm, 0.25 mm, Merck) activée à 100°C pendant une heure. Le volume déposé dépendait de la concentration de l'extrait brut.

Les plaques ont été éluées deux fois dans le même sens et à deux hauteurs différentes avec deux solvants de polarité croissante (chromatographie à palier multiple). L'utilisation de plusieurs solvants a permis d'obtenir une meilleure séparation des différentes classes chimiques constituant les cires. L'hexane, employé en premier, a servi à la migration des composés peu ou pas polaires comme les alcanes. Après séchage de la plaque, l'élution par le chloroforme a entraîné les composés plus polaires comme les alcools ou les acides gras.

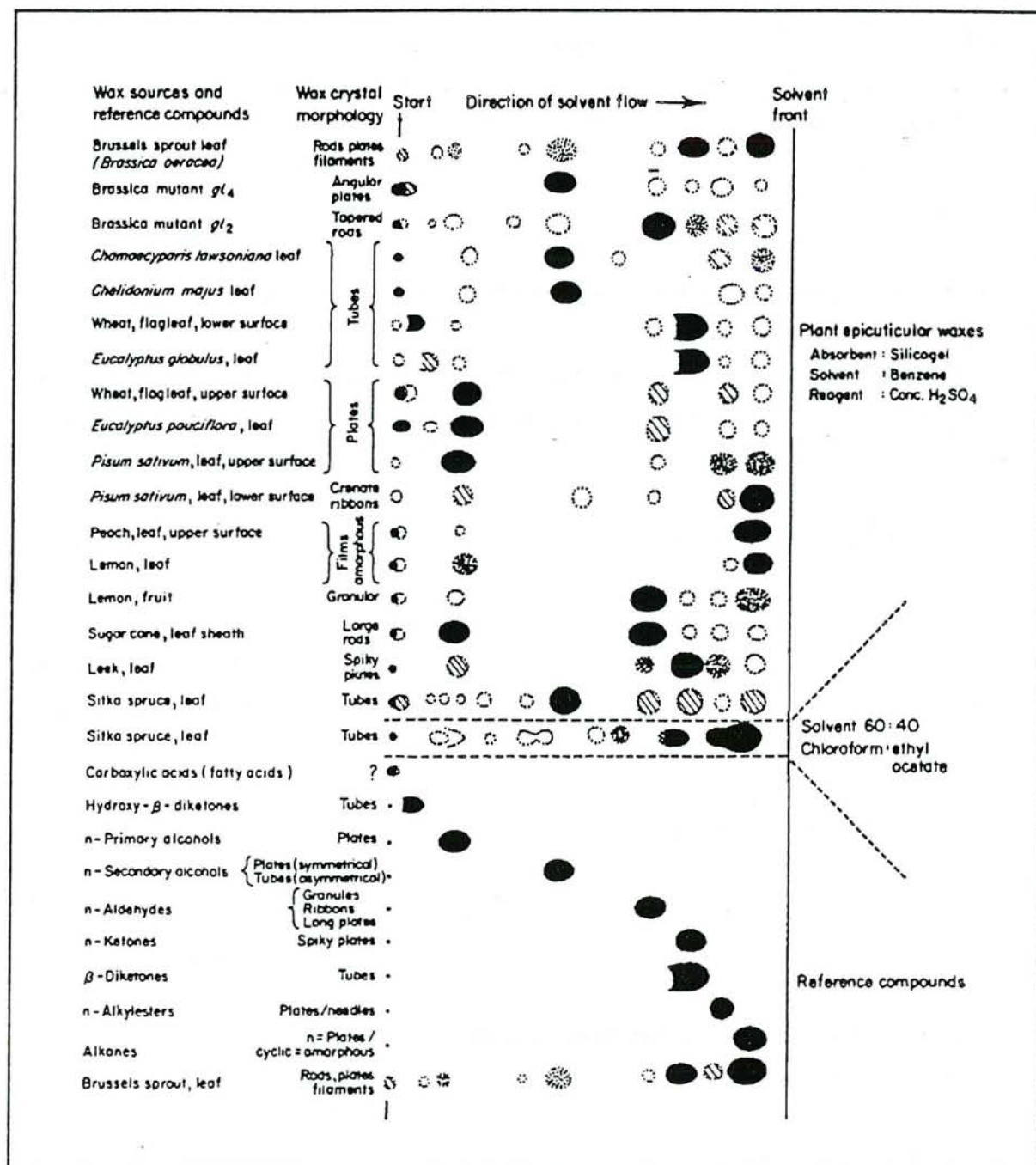
La révélation a été faite à la vapeur d'iode. Un exemple de migration en CCM des différentes classes chimiques des cires est donné figure 22.

Après leur séparation sur couche mince, les spots contenant les composés intéressants, ont été grattés de la plaque. Les composés comportant des fonctions carboxyles et hydroxyles ont été méthylés ou triméthyl-silylés, pour pouvoir être analysés en chromatographies en phase gazeuse.

### 5. Substances de référence et standards internes

Les substances des références ont été utilisées pour identifier soit les classes chimiques par chromatographie sur couche mince, soit les composés eux mêmes par chromatographie en phase gazeuse. L'identification des composés en CPG, se fait par la comparaison des temps de rétention des composés de l'échantillon et ceux des substances témoins (standards externes). Pour les alcanes, les homologues de C17 à C34, pour les alcools primaires : C21, C24, C26, C28 et C30, pour les acides gras : C16:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C22:0 et C24:0 ont été utilisés.

Figure 22: Résultat d'une séparation des cires cuticulaires par chromatographie sur couche mince (gel de silice G, solvant benzène, sauf spécification) ; les constituants des cires sont comparés à des standards connus, leur morphologie cristalline est indiquée (d'après Jeffree, 1986).





Les standards internes (ajoutés dans l'échantillon) ont permis une quantification des composés en tenant compte des pertes éventuelles qui ont pu survenir au cours de leur préparation. C'est pourquoi, aux extraits bruts (avant leur dépôt donc) un mélange de 20 µg de chaque composé représentant trois des classes chimiques étudiées a été ajouté. Ces standards internes ont été choisis car ils ne sont pas présents ou alors à l'état de trace dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Il s'agit pour les alcanes de l'heptadecane, de l'acide heptadecanoïque pour les acides gras libres et du heneicosanol pour les alcools primaires. Dans le cas des acides gras estérifiés, le standard interne (l'acide heptadecanoïque) a été ajouté à l'échantillon après qu'il ait été gratté de la plaque à raison de 5 µg par échantillon.

Les substances de référence comme les standards internes provenaient de source commerciale (Sigma).

La nature des classes fractionnées à partir de l'extrait brut est indiquée par la comparaison de leur migration avec celle des témoins déposés sur la même plaque. Ces témoins utilisés sont des alcanes, alcools primaires, et acides gras. Les acides gras estérifiés ne migrent pas, ils restent au lieu de dépôt de l'extrait brut. Ces témoins correspondent au choix des classes que nous avons étudiées plus particulièrement.

## **6. Préparation des échantillons pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

### **6.1. Les alcanes**

Les alcanes ont été directement analysés par CPG. Pour ce faire, ils ont été extraits de la silice par un mélange hexane/eau (10:1, v/v). La phase supérieure (hexane) a été récupérée, évaporée à sec sous courant d'azote et reprise dans un volume d'hexane 100 µl. Le volume d'injection était 10 µl.

### **6.2. Méthylation des acides gras libres et des acides gras estérifiés**

La méthylation a été effectuée à chaud sur des échantillons secs (70°C pendant 20 min) en présence de 1 ml du réactif de méthylation: BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (14 %; p/v; Merck).

Après refroidissement les esters méthyliques d'acides gras obtenus ont été extraits avec un mélange hexane/eau (10/1, v/v). Deux phases ont été distinguées après agitation et centrifugation de 5 minutes à 4000 rpm (centrifugeuse Sigma). La phase supérieure (hexane) a été récupérée et évaporée à sec sous courant d'azote.

### **6.3. Triméthylsilylation des alcools primaires**

Les dérivés TMS (triméthylsilyl) des alcools ont été obtenus à partir de la silice grattée en présence de 200 µl de pyridine et 70 µl de BSTFA-TMCS (1 %; v/v; Silyl 991, Macherey-Nagel) et à chaud (90°C pendant 30 min). Les alcools TMS ont été récupérés après addition d'un mélange hexane/eau (10:1, v/v) dans la phase supérieure. Cette phase a été évaporée à sec sous courant d'azote.

**Tableau 6: Conditions d'analyse chromatographiques des alcanes et des alcools primaires.**

	CPG-FID
Appareil	Delsi Nermag DN 200 Intégrateur ENICA 31
Colonne Alcanes et Alcools Primaires	SGE BP1 12QC3
longueur	12 m
diamètre intérieur	0.33 mm
film	diméthyle siloxane
épaisseur du film	0.25 $\mu\text{m}$
Injecteur	de Ros 250°C
Température détecteur	310°C
Gaz vecteur	Hélium 0.3 bar (Alcanes) 0.4 bar (Alcools)
Alimentation de la flamme	Air/Hydrogène (1-0.8 bar)
Programme de température Alcanes et Alcools Primaires	200°C(1 min) - 300°C à 9°C.min <sup>-1</sup> 300°C (9 min)

**Tableau 7: Conditions d'analyse chromatographiques des acides gras.**

	CPG-FID
Appareil	Delsi Nermag DN 200
	Intégrateur ENICA 31
Colonne Acides gras	SUPELCO
longueur	30 m
diamètre intérieur	0.53 mm
film	supelcowax 10
épaisseur du film	1 $\mu\text{m}$
Injecteur	de Ros 250°C
Température détecteur	310°C
Gaz vecteur	Hélium 5 bar
Alimentation de la flamme	Air/Hydrogène (1-0.8 bar)
Programme de température	200°C - 235°C à 2.5°C.min <sup>-1</sup>
	235°C - 270°C à 15°C.min <sup>-1</sup>
	270°C (40 min)



**Tableau 8: Conditions d'analyse chromatographiques en CPG-SM**

---

	CPG-SM
Appareil:	Hewlett Packard 5890 (CPG) Hewlett Packard 5971 A (SM)
Colonne:	CP-Sil 5CB (Chrompack) longueur: 25 m diamètre intérieur: 0.25 mm film: polydiméthylsiloxane épaisseur du film: 0.25 $\mu\text{m}$
Injecteur:	split/splitless 200°C
Interface:	280°C
Faisceau d'électrons:	70 eV
Scan:	50-550 a.m.u
Gaz vecteur:	Hélium 1 ml.min <sup>-1</sup>
Programme de température:	50°C (1 min)-280°C (30°C.min <sup>-1</sup> ) pendant 30 min

---

### **7. Analyse des cires cuticulaires en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID)**

Les échantillons secs ont été repris dans un volume d'hexane 100 µl et une quantité variable d'échantillon allant de 5 à 10 µl a été injectée dans les conditions chromatographiques des tableaux 6 et 7.

Dans certains cas les substances de référence dont nous disposions n'ont pas permis l'identification de pics pourtant importants. Un recours à la CPG couplée à un spectromètre de masse a donc été nécessaire pour effectuer ces identifications et quelques vérifications. Elles concernent en particulier les alcools primaires et les acides gras estérifiés.

### **8. Identification de composés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse**

Certains échantillons d'alcools primaires et d'acides gras estérifiés préalablement analysés par CPG-FID ont été repris pour être identifiés par CPG-SM, dans les conditions chromatographiques décrites dans le tableau 8.

### **9. Analyse des sucres par CPG-FID:**

Les échantillons secs ont été dérivés et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) dans les conditions expérimentales décrites dans la première partie (page 9). De plus, leur identité a été vérifiée en CPG-SM.

### **10. Mesures des surfaces foliaires**

Afin d'évaluer les quantités de substances par unité de surface, celles-ci ont été mesurées avec un planimètre Li 3000 (Li-Cor, USA).

### **11. Analyses statistiques**

La comparaison des techniques de décirage utilisées pour les expériences de perméabilité a été réalisée par une analyse de la variance factorielle. Quand celle-ci était significative, les différentes techniques ont été comparées entre elles par le test t de Student.

La percolation et le trempage pour 210 s d'application du solvant, ont été comparés avec le test t de Student.

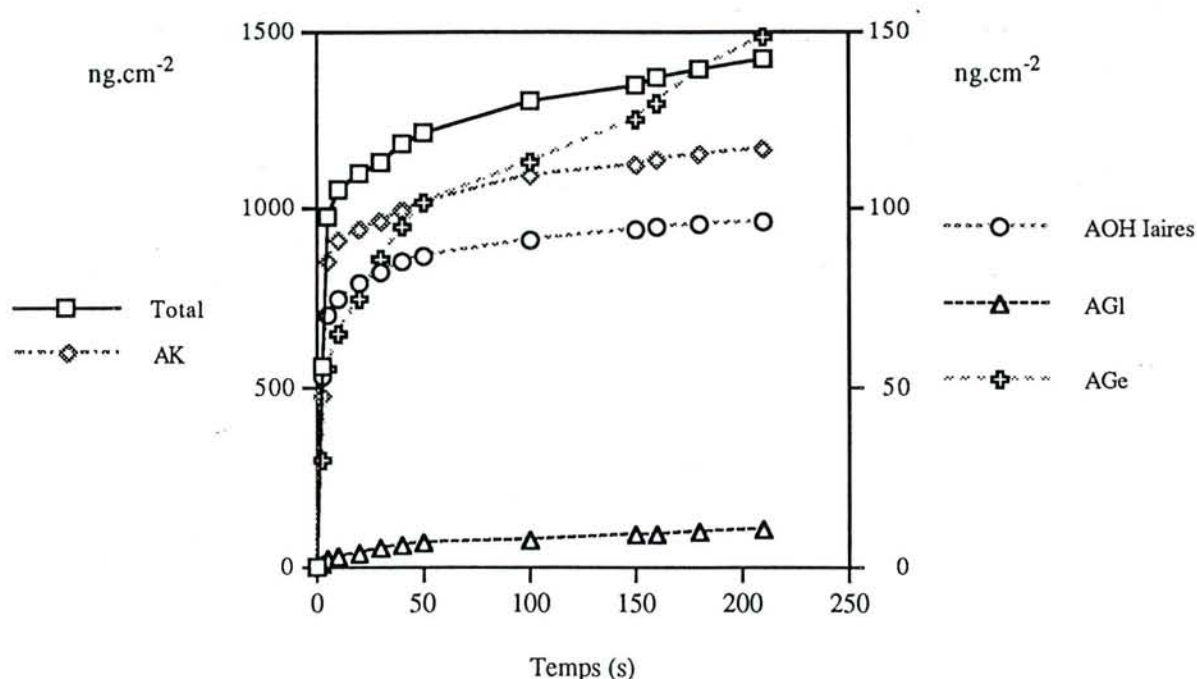
D'autre part, les droites qui approchent le mieux les courbes décrivant la cinétique d'extraction des différents constituants des cires ainsi que celle des sucres dans les cires ont été calculées par la méthode des moindres carrés (linéarisation). Les pentes moyennes de ces droites ont été comparées par une ANOVA.

### III- Résultats

#### 1. Cinétique d'extraction de 4 classes des cires de cuticules de laurier cerise par trempage

La figure 23 représente la cinétique d'extraction des quatre classes chimiques en temps cumulés et leur somme, chaque point correspond à la moyenne des 3 répétitions. Ainsi, sur les 210 s de la cinétique, plus de la moitié de la somme des 4 classes a été extraite en 5 s de trempage, et 80 % en 30 s.

**Figure 23:** Cinétique d'extraction des lipides solubles cuticulaires de laurier cerise, avec représentation des quatre classes: alcools primaires (AOH laires), alcanes (AK), acides gras libres (AGl), acides gras estérifiés (AGe), et leur somme (Total).



Quelle que soit la durée de trempage, les alcanes sont majoritaires. A 210 s, ils représentent 82 % des quatre classes (tableau 9) et les acides gras libres seulement 0.8 %.

**Tableau 9:** Proportions relatives des 4 classes extraites à 210 s de trempage dans le chloroforme.

Classe chimique	Représentation par rapport à leur totalité (%)
Alcanes	82
Alcools primaires	6.8
Acides gras libres	0.7
Acides gras estérifiés	10.5



**Tableau 10: Pourcentage des homologues constituant 4 classes chimiques des lipides solubles cuticulaires extraits à 210 s de trempage dans le chloroforme.**

Nombre de carbone	Classes chimiques			
	Alcanes	Alcools Iaires	Acides gras libres	Acides gras estérifiés
16	-	-	35.5	21.6
17	-	-	-	-
18	1	-	42.9	18.9
19	1.9	-	-	-
20	1.1	-	5.2	1.2
21	1.4	-	-	0.8
22	2.2	4.6	5.3	3.2
23	1.3	1.4	-	2.1
24	0.7	16.8	7	8.8
25	1.3	2.1	-	2.5
26	0.8	15.8	2.1	6.6
27	8.7	3	-	2.4
28	4	23.8	1.4	10.6
29	50.8	7.2	-	4.3
30	3	17.5	0.6	13.9
31	20.2	1.1	-	0.4
32	0.6	6	-	2.9
33	0.8	0.2	-	-
34	0.1	0.6	-	-
35	< 0.1	-	-	-

Au vu, de ces résultats, la part relative importante des alcanes tend à masquer l'évolution de l'extraction des autres composés plus faiblement représentés, c'est pourquoi, la cinétique d'extraction de chacune des quatre classes a été signalée séparément avec distinction des chaînes courtes et longues. La limite entre les chaînes courtes et les chaînes longues a été définie arbitrairement à 25 atomes de carbone.

### 1.1. Les alcanes

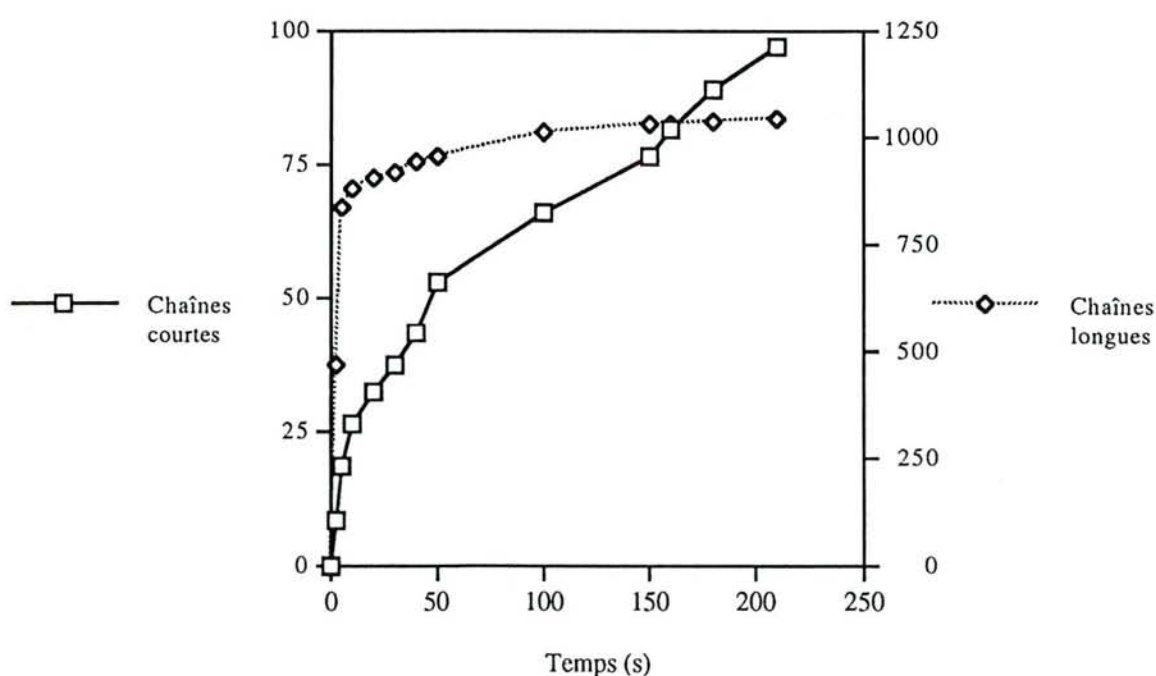
Les longueurs de chaînes des alcanes extraits en 210 s varient de 18 à 35 atomes de carbone, avec des chaînes paires et impaires (tableau 10). Les alcanes sont représentés essentiellement par des chaînes longues (de C26 à C35), soit 89 % des alcanes totaux à 210 s.

Le nonacosane (C29) représente 50 % des alcanes extraits à 210 s.

Les alcanes sont rapidement extraits, puisqu'en moins de 5 s, plus de la moitié a été extraite et 90 % en moins de 50 s par rapport au temps final de la cinétique (figure 23).

Lorsque la taille des homologues est distinguée, la cinétique d'extraction n'est pas homogène. Ainsi, les chaînes longues sont extraites plus tôt que les chaînes courtes. La moitié des chaînes longues est obtenue en moins de 5 s, alors qu'il faut plus de 40 s pour obtenir ce même résultat pour les chaînes courtes (figure 24).

Figure 24: Cinétique d'extraction des alcanes avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes, de C18 à C25 et chaînes longues de C26 à C35.



La distinction des longueurs de chaînes, du fait de leur inégale représentation, permet de mettre en évidence des disparités d'extraction dans une même classe chimique.

Figure 25: Cinétique d'extraction des alcools primaires avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes de C22 à C25, chaînes longues de C26 à C34.

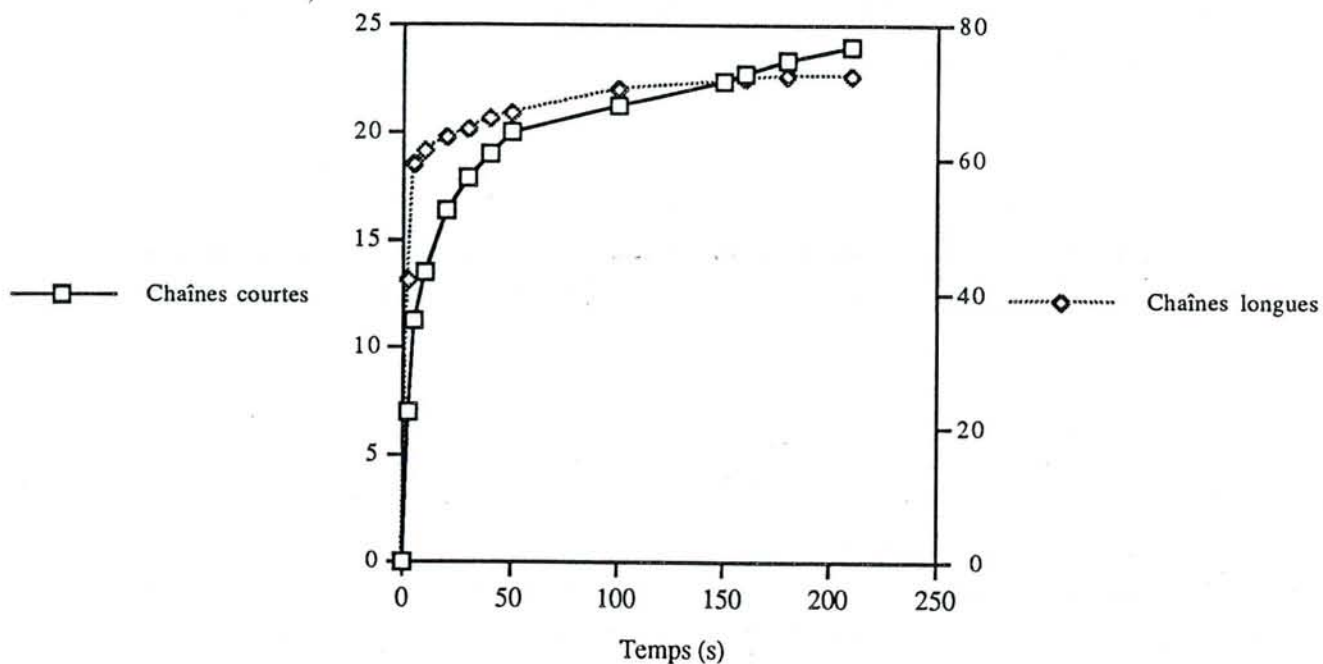
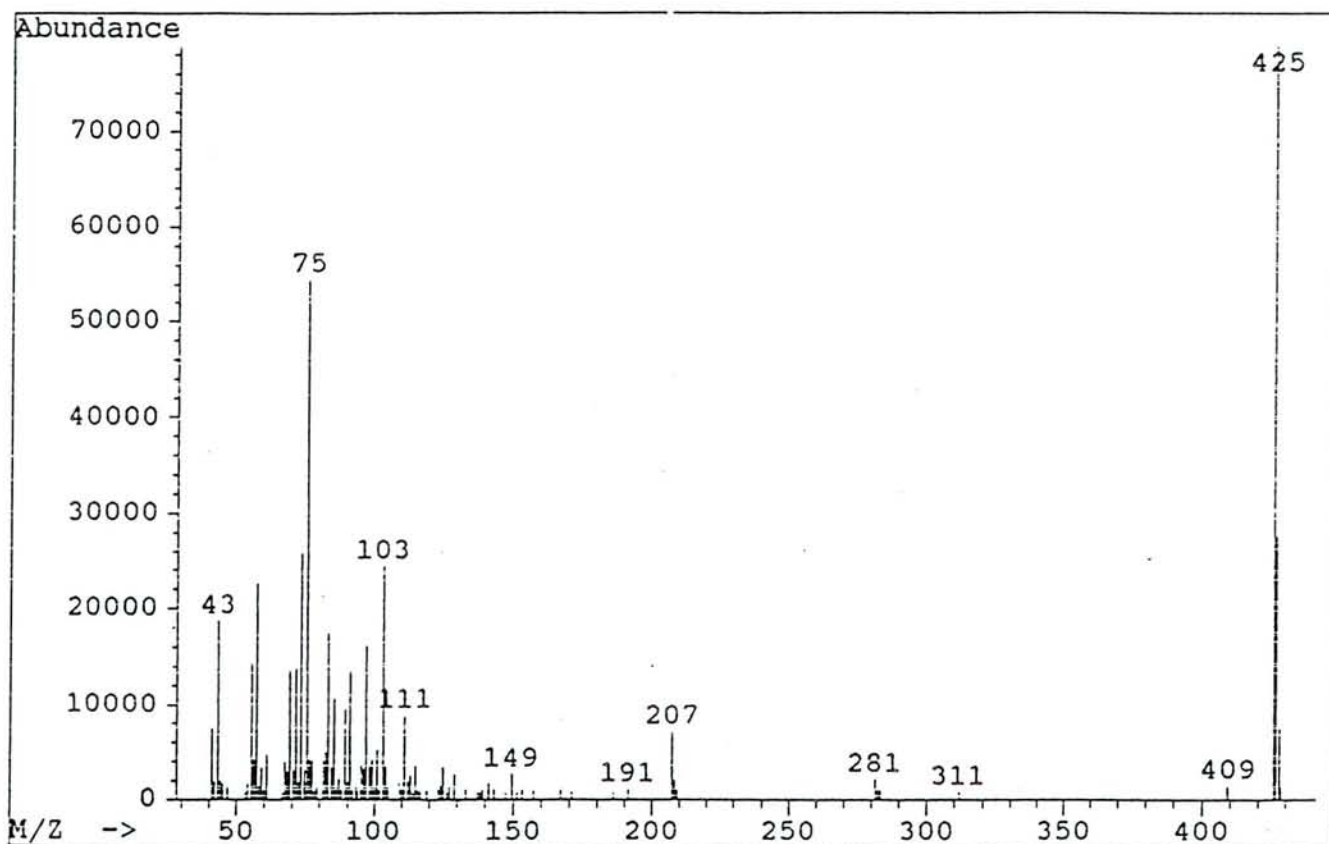


Figure 26: Spectre de masse du triméthylsilyléther du pentacosanol.





### 1.2. Les alcools primaires

Les alcools primaires de laurier cerise sont constitués par des homologues de longueurs de chaînes de 22 à 34 atomes de carbone à nombre pair et impair. Le plus abondant est l'octacosanol (C28).(tableau 10)

La présence des chaînes impaires a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les spectres de masse des triméthylsilyléthers des alcools primaires sont caractérisés par le fragment  $[M-15]^+$  correspondant à la perte d'un radical méthyle et le pic m/e 75 (diméthylsilanol) qui est typique de cette classe de substance.(exemple du C25 figure 26)

En 2 s, plus de la moitié des alcools primaires a été extraite, et 90 % en 50 s (figure 25). Comme pour les alcanes, les chaînes longues sont obtenues plus tôt que les courtes. En 2 s de trempage, plus de la moitié des chaînes longues a été extraite, et 90 % en 40 s, contre 100 à 150 s de trempage pour les chaînes courtes.

### 1.3. Les acides gras libres

Ils sont représentés par des chaînes à nombre pair de carbone allant de 16 à 30 atomes de carbone (tableau 10). L'homologue à 18 atomes de carbone intégré dans le tableau, représente la somme du C18:0 (acide stéarique) et de deux insaturés C18:1 (acide oléique), et C18:2(acide linoléique). Le C18:1 et le C18:2 constituent 24 et 15 % respectivement du C18. Le C18:3, marqueur d'une contamination par des lipides des membranes des plastes, n'a pas été détecté dans les différentes fractions. Le C16:0 est le plus important des acides gras libres .

Contrairement aux alcools primaires et aux alcanes, les acides gras libres sont représentés dans leur majorité (96 %) par des chaînes courtes. La moitié des acides gras libres a été extraite entre 30 et 40 s, et 90 % en plus de 160 s.(figure 27)

Figure 27: Cinétique d'extraction des acides gras libres avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes de C16 à C24 et chaînes longues de C26 à C30.

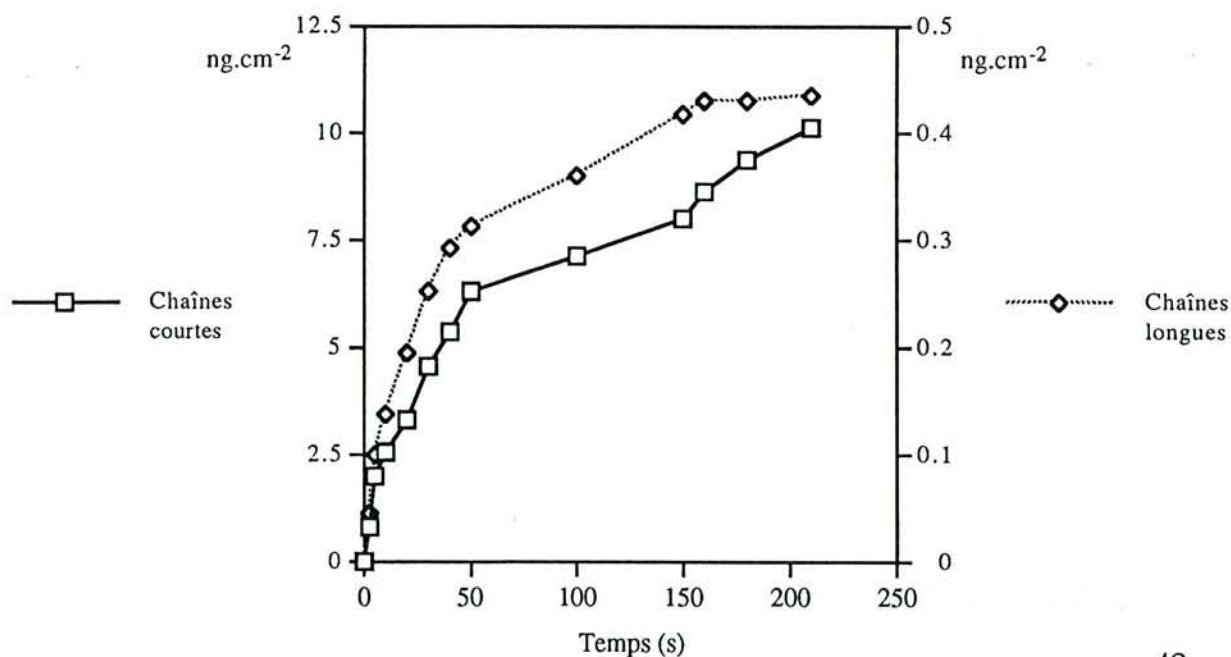


Figure 28: Cinétique d'extraction des acides gras estérifiés avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes de C16 à C25 et chaînes longues de C26 à C32.

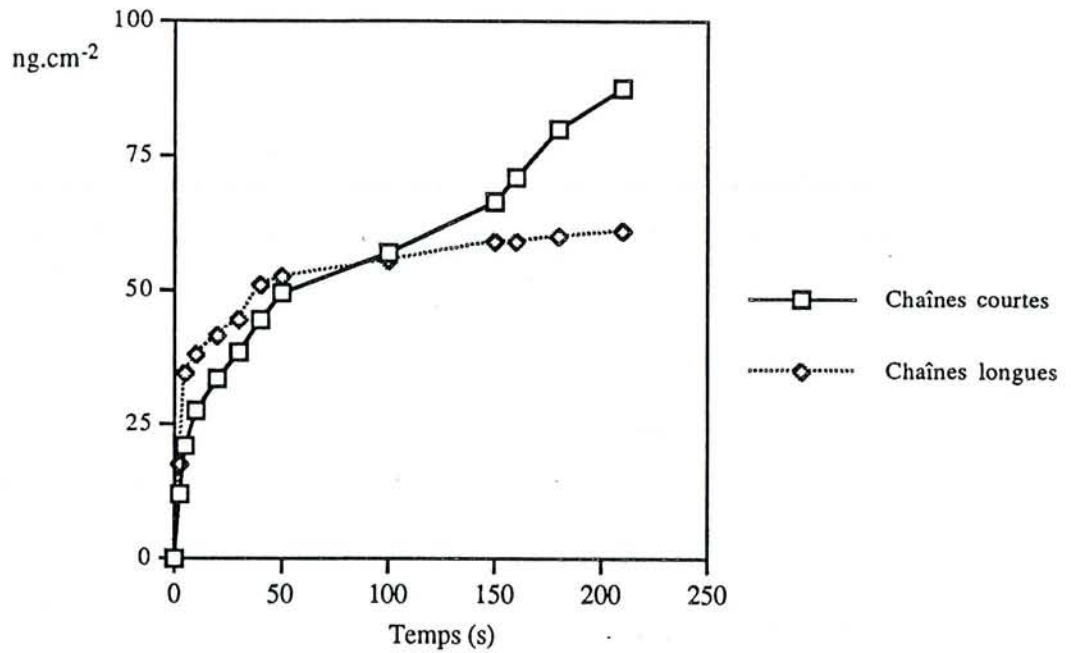
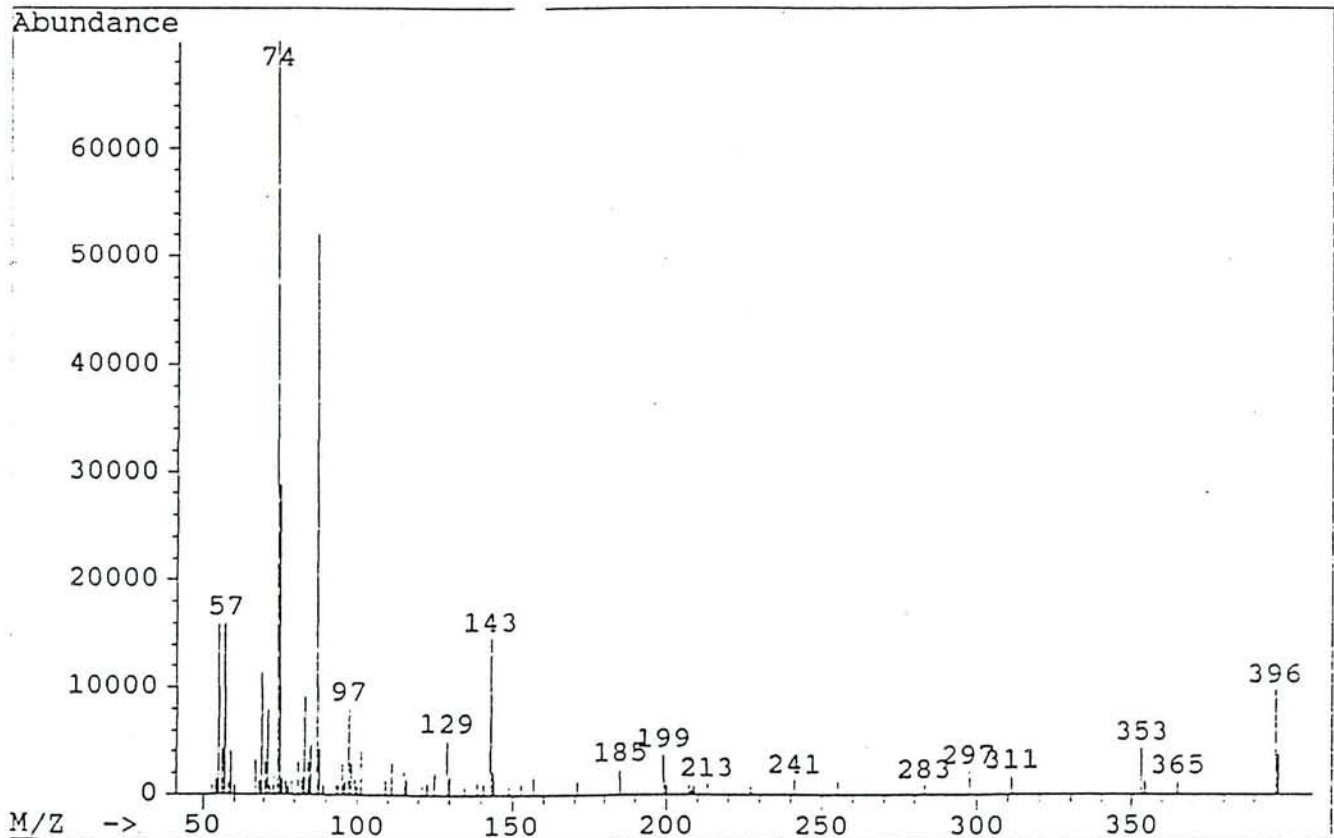


Figure 29: Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide pentacosanoïque.



Ces résultats obtenus pour l'ensemble des acides gras libres sont également représentatifs des chaînes courtes. En revanche les chaînes longues sont obtenues un peu plus tôt ; 50 % entre 20 et 30 s et 90 en moins de 150 s.

Les acides gras libres sont extraits bien plus tard que les alcools primaires et les alcanes.

#### 1.4. Les acides gras estérifiés

Les acides gras estérifiés sont obtenus par méthanolyse. Les composés libérant ces acides gras n'ont pas été identifiés, ni les autres résidus de l'hydrolyse. Les renseignements que nous possédons indiquent que les composés d'origine sont très polaires, ils ne migrent pas en chromatographie sur couche mince, ils restent au point de dépôt des extraits bruts.

Ces acides gras estérifiés ont des longueurs de chaînes de C16 à C32 avec des nombre pairs et impairs de carbone. Les chaînes impaires ont été identifiées par CPG-SM. Les spectres de masse des esters méthyliques des acides gras saturés sont caractérisés par les fragments  $m/e$  74, 87,  $[M-47]^+$  et le pic de l'ion moléculaire  $[M]^+$  (exemple du C25:0 ; figure 29). Elles représentent 12.5 % des acides gras estérifiés obtenus après 210 s de trempage.

De même que les acides gras libres, les acides gras estérifiés (AGe) comportent des chaînes insaturées à 18 atomes de carbone (C18:1 et C18:2). Le C16:0 est le plus important des AGe (tableau 10). Les AGe ont été extraits pour moitié en 20 s et 80 % entre 100 et 150 s. (figure 28)

Comme pour les autres classes, les chaînes longues sont extraites plus tôt que les courtes. Il faut moins de 5 s pour extraire la moitié des longues contre 40 s pour obtenir les courtes.

Les principaux résultats de la cinétique révèlent que les alcanes et les alcools primaires sont extraits plus tôt que les acides gras libres et estérifiés. De plus quelle que soit la classe étudiée, les chaînes courtes sont extraites plus tard.

Cette cinétique a permis de démontrer que la durée d'application du solvant agissait sur la quantité de cires extraites et sur leur qualité, tant dans les proportions relatives entre les 4 classes qu'à l'intérieur même de ces classes, où il y a une sélectivité de l'extraction. Aussi, les deux techniques, la percolation et le trempage, ont été comparées pour un même temps d'application du solvant: 210 s.



Figure 30: Comparaison de l'extraction des SCL, par percolation de chloroforme et par trempage dans le chloroforme pour un même temps d'application du solvant (210 s) et pour quatre classes chimiques constituant les SCL et leur total (AK: alcanes, AOH laires: alcools primaires, AGe: acides gras estérifiés, AGI: acides gras libres). Différence entre la percolation et le trempage significative \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significative \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significative \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (Moyenne de 4 répétitions pour la percolation et 3 pour le trempage ; barres = écarts types).

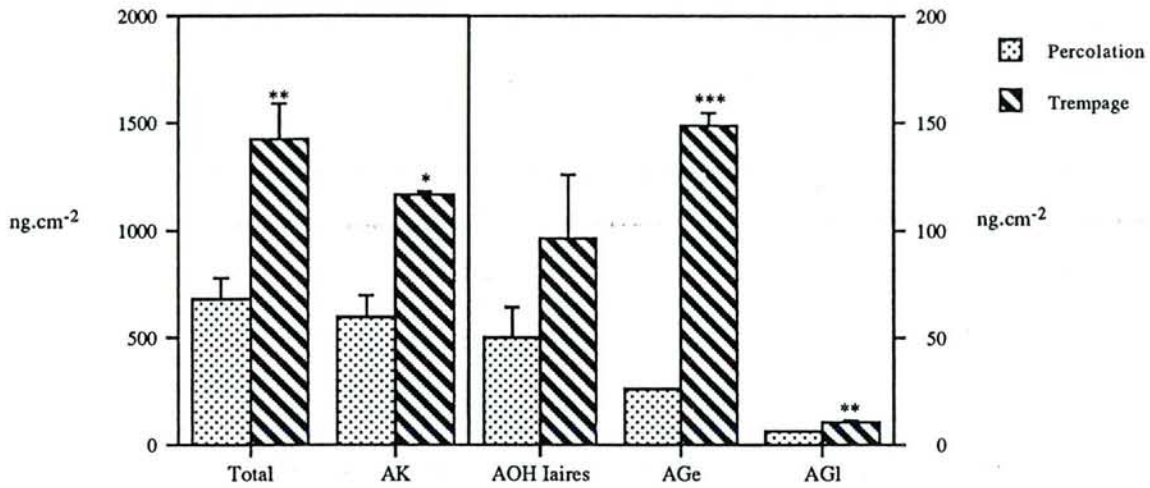
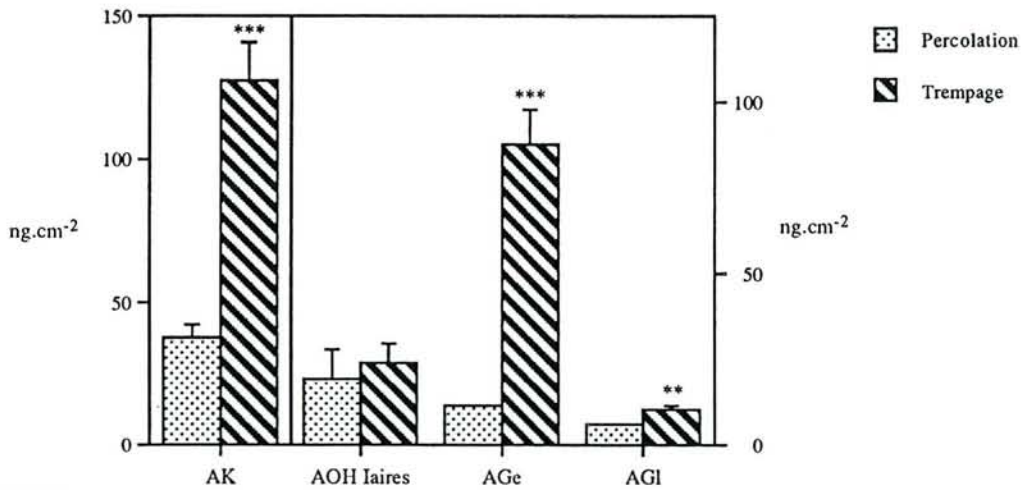
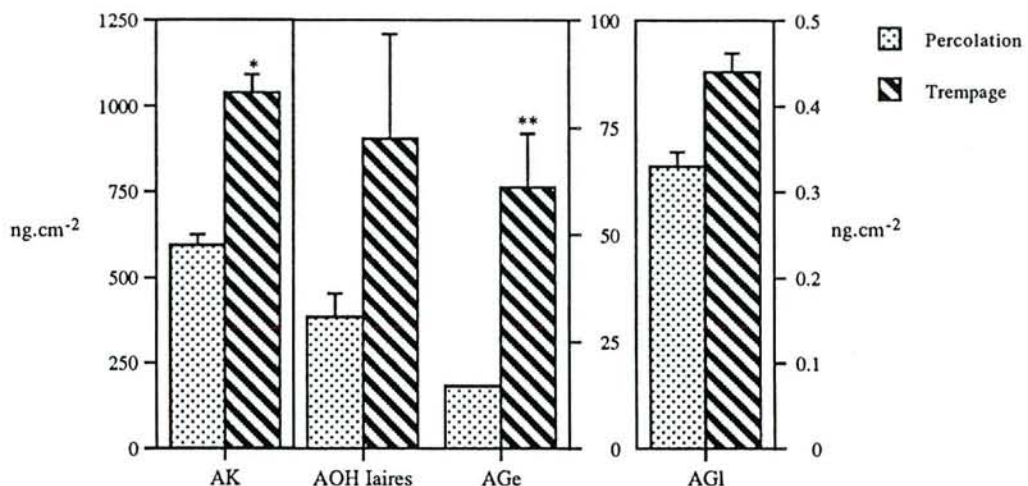


Figure 31: Comparaison de l'extraction des chaînes courtes et des chaînes longues des SCL, par percolation de chloroforme et par trempage dans le chloroforme pour un même temps d'application du solvant (210 s) et pour quatre classes chimiques constituant les SCL (AK: alcanes, AOH laires: alcools primaires, AGe: acides gras estérifiés, AGI: acides gras libres). Différence entre la percolation et le trempage significative \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significative \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significative \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (Moyenne de 4 répétitions pour la percolation et 3 pour le trempage ; barres = écarts types).

CHAINES COURTES



CHAINES LONGUES



## 2. Comparaison du trempage et de la percolation pour 210 s d'application du solvant

La figure 30 montre qu'à temps égal d'application du solvant, le trempage extrait davantage les 4 classes des cires (Total, hautement significatif:  $\alpha = 0.01$ ). Cette différence d'extraction se retrouve pour les alcanes (significatif,  $\alpha = 0.05$ ), les acides gras libres (hautement significatif,  $\alpha = 0.01$ ) et les acides gras estérifiés (très hautement significatif,  $\alpha = 0.001$ ), mais pas pour les alcools primaires.

Qualitativement, les deux méthodes se distinguent par une part plus importante des acides gras estérifiés obtenus par trempage (tableau 11).

**Tableau 11: Pourcentages relatifs de quatre classes de lipides solubles cuticulaires extraites des cuticules de laurier cerise par percolation et trempage pendant 210 s d'application du chloroforme.**

	Percolation	Trempage
Alcanes	88	82
Alcools primaires	7.4	6.8
Acides gras libres	0.8	0.7
Acides gras estérifiés	3.8	10.5

Les longueurs de chaînes obtenues par percolation et par trempage ont été comparées pour les 4 classes (figures 31).

Pour les alcanes, le trempage extrait à la fois plus de courtes chaînes (jusqu'à 25 atomes de carbone) et de longues chaînes ( $\alpha = 0.001$  et  $\alpha = 0.05$  respectivement).

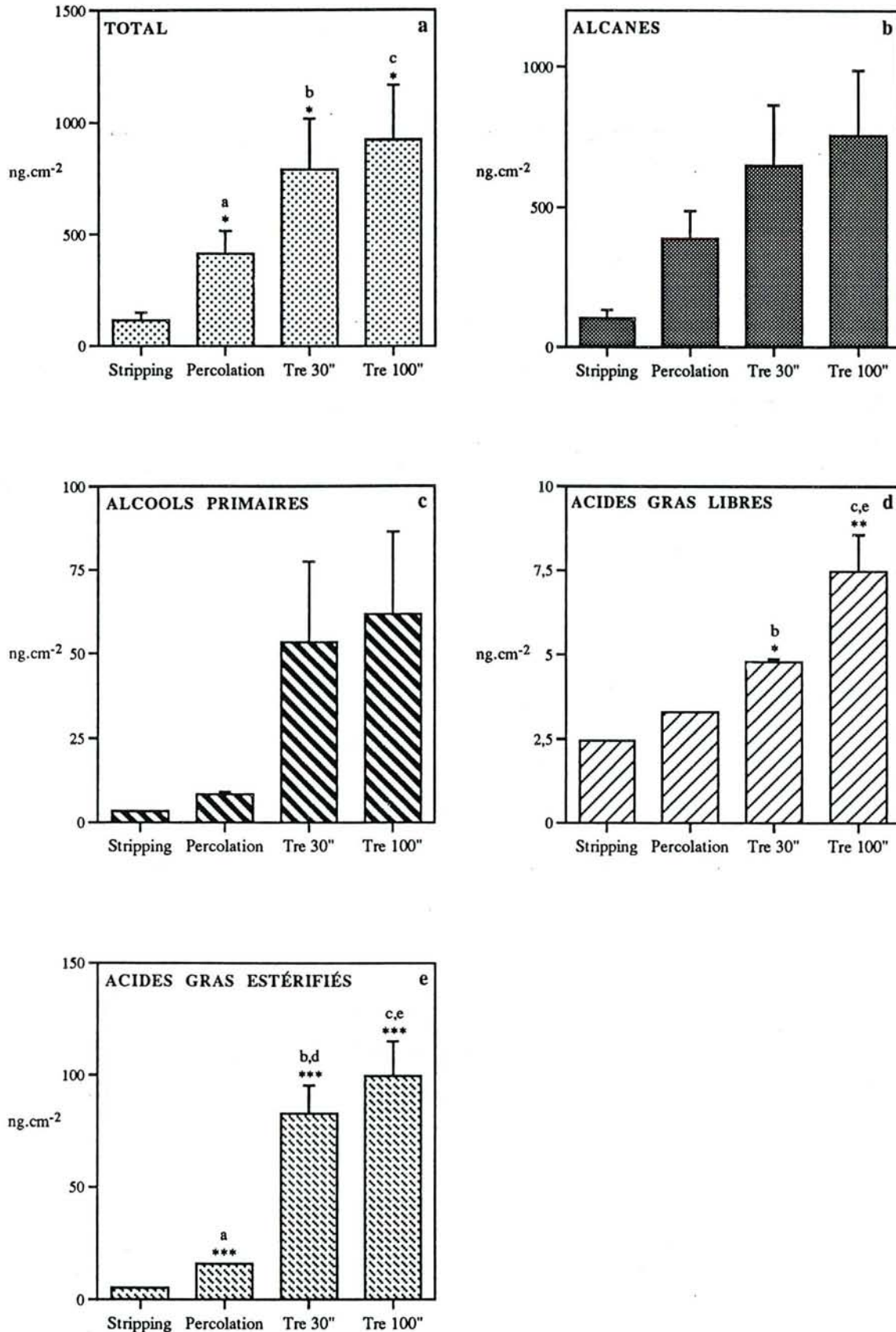
Le trempage permet d'obtenir 7.7 et 4 fois plus de chaînes courtes et longues respectivement que la percolation. En revanche les alcools primaires ne sont pas plus extraits par l'une ou l'autre des deux techniques et quelle que soit la longueur de chaîne, malgré une tendance à une meilleure extraction des chaînes longues par trempage visible sur la figure 31.

Enfin, en ce qui concerne les acides gras libres, les chaînes courtes sont mieux extraites par trempage que par percolation, alors que les deux méthodes ne modifient pas l'extraction des chaînes longues.

Ainsi, pour un même temps d'application du chloroforme, le trempage est plus efficace pour extraire les cires, quantitativement et qualitativement. Cependant, il ne semble pas influencer sur l'extraction des alcools primaires.



Figure 32: Quantification de quatre classes de cires extraites par trois méthodes: le stripping, la percolation de chloroforme et le trempage dans le chloroforme pendant 30 et 100 s. a: différence d'extraction entre le stripping et la percolation, b: entre 30 s de trempage et le stripping, c: entre 100 s de trempage et le stripping, d: entre 30 s de trempage et la percolation, e: entre 100 s de trempage et la percolation. Les différences sont significatives \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significatives \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significatives \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (moyenne de 5 répétitions pour les trempages, et 4 pour la percolation et le stripping, barres: écarts types).





### 3. Influence de la composition chimique des cires dans le passage des sucres

#### 3.1. Dans les expériences de perméabilité

Dans cette partie, la comparaison des cires extraites par le stripping avec celles obtenues par le trempage ou la percolation est artificielle. En effet, cela revient à comparer les cires épicuticulaires avec les lipides solubles cuticulaires incluant à la fois les cires épi- et intracuticulaires. Par conséquent, les comparaisons ultérieures sont seulement destinées à déterminer l'influence des qualités chimiques des cires extraites sur la perméabilité indépendamment de leur position structurale. Par ailleurs, connaissant la composition des 4 classes chimiques (alcanes, alcools primaires, acides gras libres et estérifiés) des cires épicuticulaires, nous pourrions approcher par déduction des SCL extraits par percolation et par trempage, la composition des cires intracuticulaires.

La figure 32a montre que les cires épicuticulaires extraites par le stripping représentent 22 %, 12 % et 10 % des SCL extraits respectivement par la percolation, les trempages à 30 s et 100 s (sur la base des quatre classes, significatif,  $\alpha = 0.05$ ). En revanche, entre la percolation et les trempage à 2 temps il n'y a pas de différence d'extraction pour la totalité des 4 classes étudiées.

Qualitativement, les alcanes sont majoritaires, et les acides gras libres minoritaires, quelle que soit la méthode utilisée. (tableau 12)

**Tableau 12: Pourcentages relatifs de quatre classes de lipides solubles extraits des cuticules de laurier cerise par différentes méthodes.**

	Stripping	Percolation	Trempage 30 s	Trempage 100 s
Alcanes	90.4	93.4	82.1	82
Alcools primaires	2	3	6.8	6.7
Acides gras libres	2.1	0.8	0.6	0.5
Acides gras estérifiés	4.5	3.8	10.5	10.8

#### 3.1.1. Les alcanes

Les alcanes extraits par le stripping ne diffèrent pas qualitativement de ceux obtenus par la percolation et le trempage, dont ils constituent 27 % et 15 % respectivement (figure 32b). Ils ont des longueurs de chaînes allant de 18 à 34 atomes de carbone, avec le nonacosane comme homologue majoritaire (tableau 13). Les alcanes à chaînes longues sont plus abondants que ceux à chaînes courtes ( $\alpha = 0.05$  pour le stripping et les deux temps du trempage et  $\alpha = 0.01$  pour la percolation). En revanche, le trempage, quelle qu'en soit la durée, paraît plus efficace que la percolation, car les résultats de l'ANOVA ne sont pas significatifs (problème d'effectif). De même, en distinguant les longueurs de chaînes, il n'y a pas de différence d'extraction entre les méthodes employées (figures 33a et 34a).

Les alcanes ne paraissent donc pas impliqués dans les différences de perméabilité.



Figure 33: Quantification des chaînes courtes des quatre classes de cires extraites par trois méthodes: le stripping, la percolation de chloroforme et le trempage dans le chloroforme pendant 30 et 100 s. a: différence d'extraction entre le stripping et la percolation, b: entre 30 s de trempage et le stripping, c: entre 100 s de trempage et le stripping, d: entre 30 s de trempage et la percolation, e: entre 100 s de trempage et la percolation. Les différences sont significatives, \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significatives \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significatives \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (moyenne de 5 répétitions pour les trempages et 4 pour la percolation et le stripping, barres: écarts types).

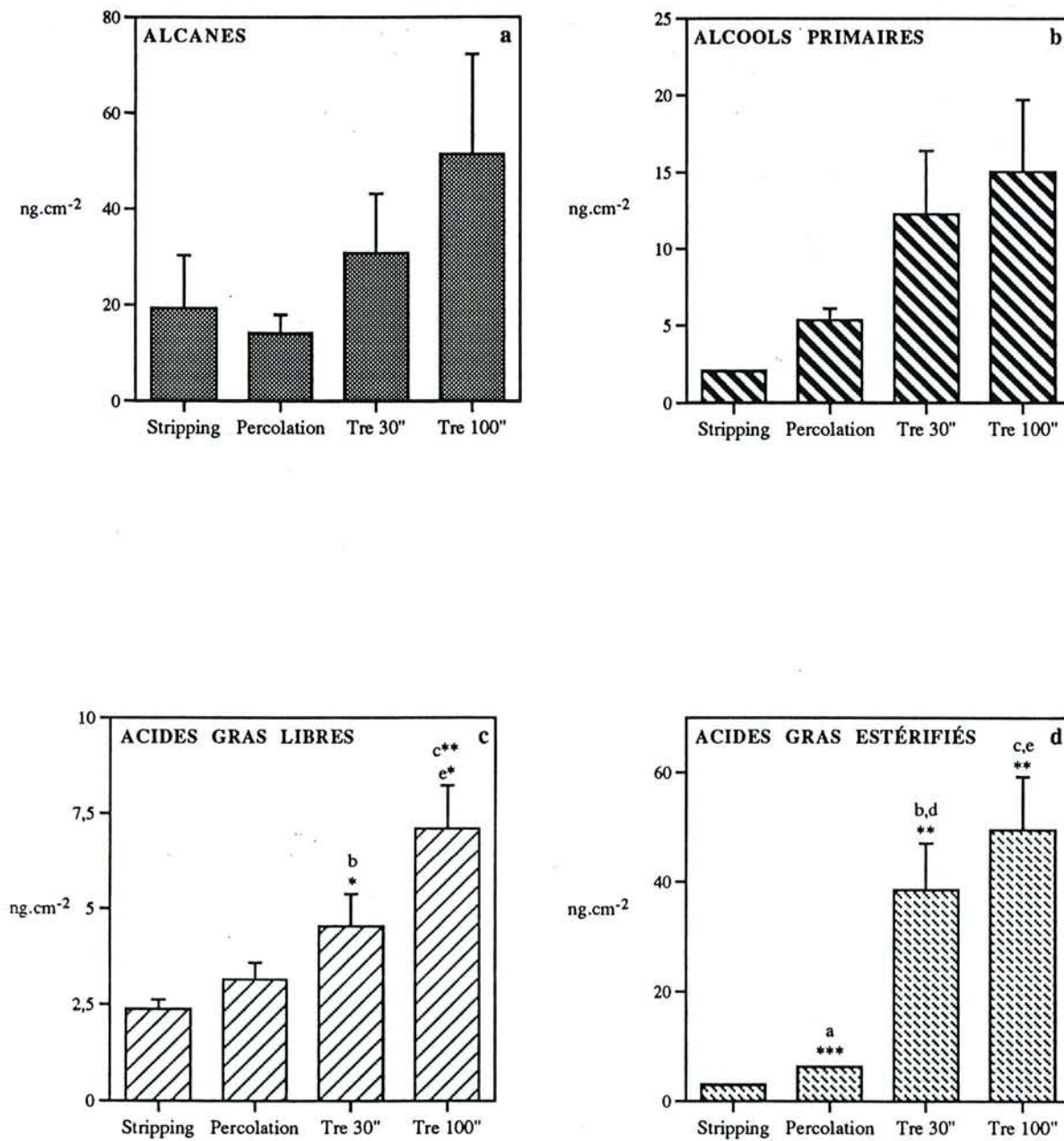
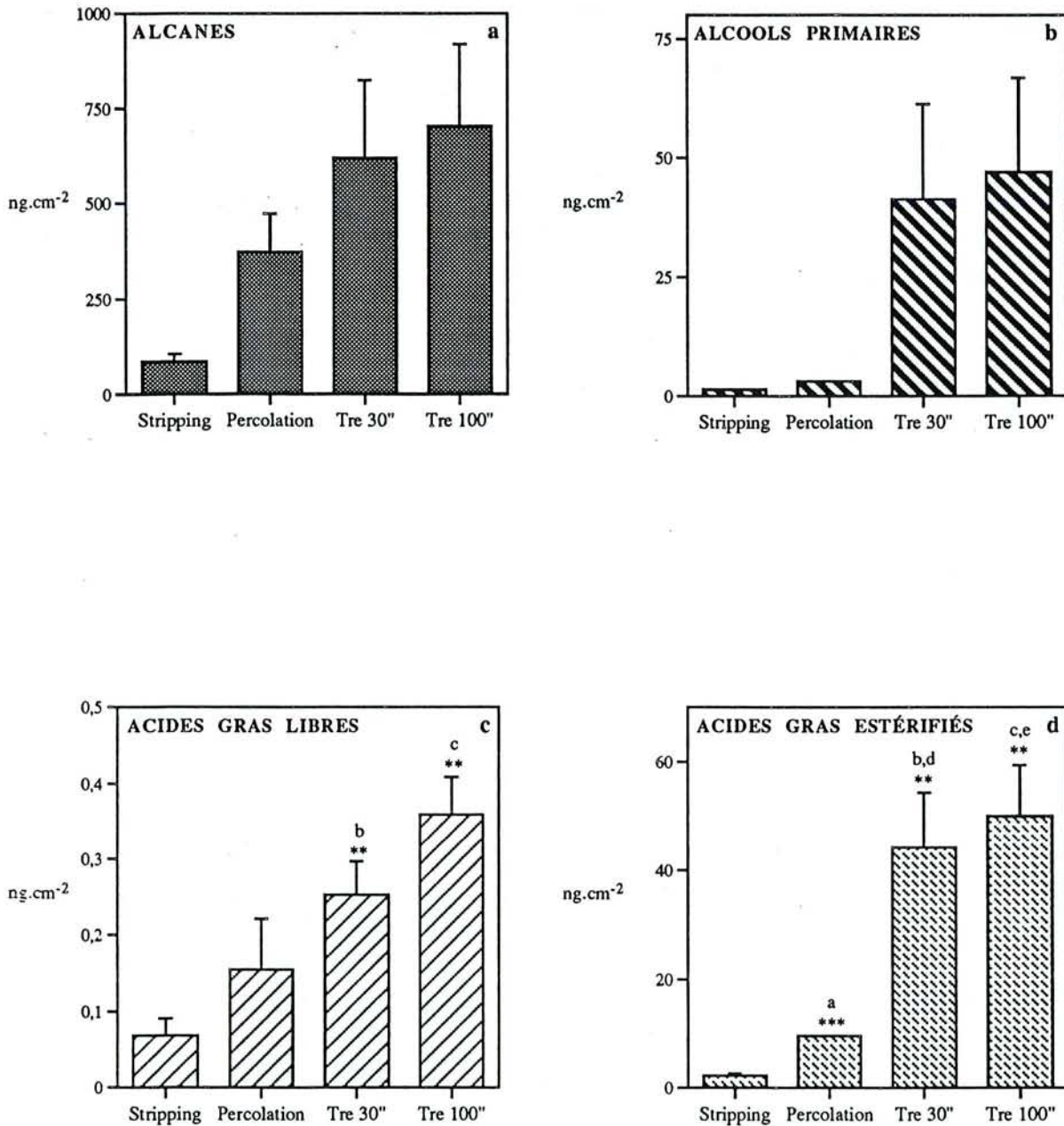




Figure 34: Quantification des chaînes longues des quatre classes de cires extraites par trois méthodes: le stripping, la percolation de chloroforme et le trempage dans le chloroforme pendant 30 et 100 s. a: différence d'extraction entre le stripping et la percolation, b: entre 30 s de trempage et le stripping, c: entre 100 s de trempage et le stripping, d: entre 30 s de trempage et la percolation, e: entre 100 s de trempage et la percolation. Les différences sont hautement significatives \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significatives \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (moyenne de 5 répétitions pour les trempages et 4 pour la percolation et le stripping, barres: écarts types).



### 3.1.2. Les alcools primaires

Les résultats visibles sur les figures 32c, 33b et 34b montrent que le trempage retire 16 à 18 fois (30 et 100 s respectivement) plus d'alcools primaires que la percolation, et quelles que soient les longueurs de chaînes. Les chaînes longues sont 15 fois plus extraites par trempage que par percolation, mais il faut noter par ailleurs que les alcools primaires obtenus par la percolation sont constitués par des chaînes courtes à 63 % (significatif,  $\alpha = 0.05$ ) contre 24 % dans le cas des trempages. La dominance des chaînes courtes est obtenue également dans le cas des cires épicuticulaires (significatif,  $\alpha = 0.05$ ), mais à l'intérieur de cette catégorie les homologues sont représentés différemment (tableau 13).

Cependant, ces résultats visibles sur les figures 33b et 34b ne sont pas statistiquement démontrés, en raison d'une grande variabilité dans l'extraction des alcools et d'un nombre de répétitions trop faible pour des analyses aussi exigeantes que l'ANOVA.

La similitude d'extraction des alcools primaires entre le stripping et la percolation laisserait entrevoir une efficacité de cette dernière (pour les conditions d'applications particulières à notre étude) limitée aux cires épicuticulaires, mais avec plus de "profondeur" que le stripping en raison des quantités extraites plus importantes.

### 3.1.3. Les acides gras libres

Les acides gras libres sont davantage extraits par trempage que par les autres techniques (ANOVA,  $F = 11.77$ ,  $p = 0.001$ ) (figure 32d). Les deux temps de trempage ne modifient pas de façon significative leur extraction. En revanche au temps 100 s, le trempage est plus efficace que la percolation (hautement significatif,  $\alpha = 0.01$ ), de même lorsque les chaînes courtes sont considérées (figures 33c et 34c). Mise à part leur quantité plus faible dans les cires épicuticulaires, leur qualité n'est pas très différente des SCL dans leur ensemble. Les chaînes courtes sont plus abondantes que les chaînes longues (hautement significatif pour la percolation et très hautement significatif pour le stripping).

### 3.1.4. Les acides gras estérifiés

On retrouve également pour cette classe une différence d'extraction entre les 4 techniques. (ANOVA,  $F = 24.71$ ,  $p < 0.001$ ). En plus, cette fois les deux temps de trempage sont plus efficaces sur la quantité extraite d'AGE que la percolation (figure 32e) et quelle que soit la longueur des chaînes (figures 33d et 34d). Les cires épicuticulaires contiennent très peu d'acides gras estérifiés, mais avec des proportions chaînes courtes/chaînes longues équivalentes aux autres extractions.

Le stripping permet d'identifier les composés des cires épicuticulaires, constituées essentiellement par des alcanes. Ce qui explique leur forme plutôt amorphe. Par déduction des cires épicuticulaires des SCL extraits par trempage, on pourrait envisager la composition des cires intracuticulaires qui se distingueraient par une plus grande richesse des quatre classes chimiques, et



des acides gras estérifiés en particulier, et d'un point de vue qualitatif par des alcools primaires à chaînes longues.

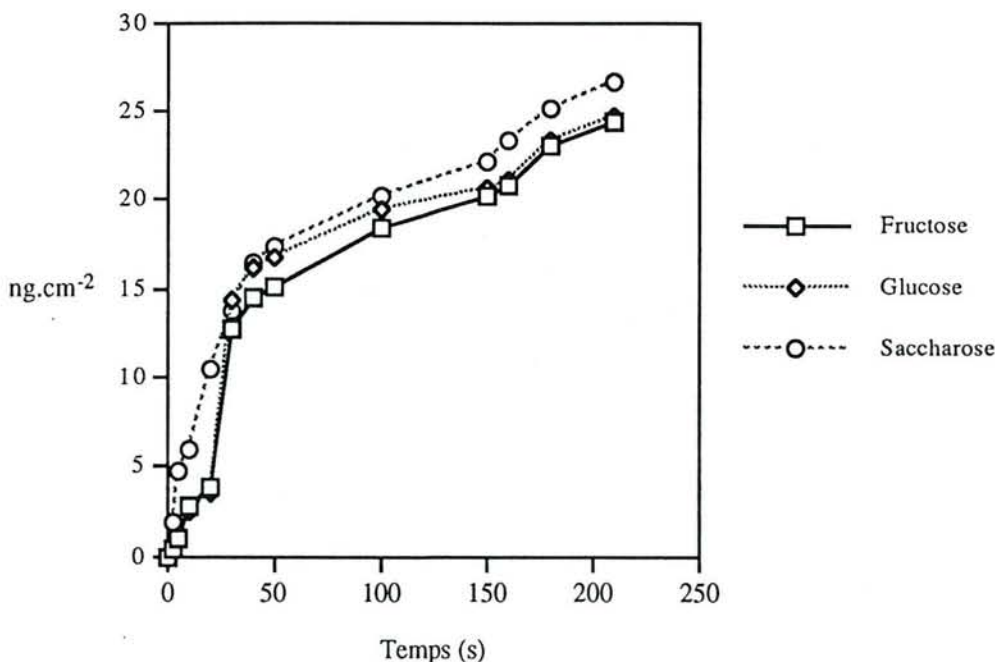
Dans le chapitre précédent, le traitement qui offrait une tendance nette à l'augmentation du passage des sucres était le trempage dans le chloroforme pendant 100 s. Ce qui distingue le trempage à 100 s de la percolation dans les expériences de perméabilité est une extraction plus importante des 4 classes (Totalité), en particulier des acides gras libres et estérifiés. Pour les acides gras libres ce sont surtout les chaînes courtes qui sont concernées, alors que les chaînes longues et courtes le sont pour les acides gras estérifiés.

En revanche, la comparaison entre la composition des lipides solubles extraits à 30 s et ceux à 100 s, n'a révélé aucune différence significative qui pourrait expliquer pourquoi la perméabilité des cuticules décirées par 100 s de trempage dans le chloroforme était plus importante que celle des cuticules décirées par 30 s de trempage (deuxième partie). Seule une légère augmentation de la quantité des différentes classes extraites est observée.

### 3.2. Récupération des sucres solubles dans les cires cuticulaires

La récupération des sucres solubles dans les cires de laurier cerise a été réalisée selon une cinétique représentée figure 35, les courbes correspondent à la moyenne de trois répétitions.

Figure 35: Cinétique de libération des sucres solubles dans les cires cuticulaires de laurier cerise.



Au cours du temps, le glucose, le fructose et le saccharose sont libérés de façon similaire en fonction du temps ( $F = 0.01$ ,  $p = 0.99$ ). En effet, la moitié des sucres récupérés après 210 s dans les



Figure 36: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des alcanes avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes, de C18 à C25 et chaînes longues de C26 à C35.

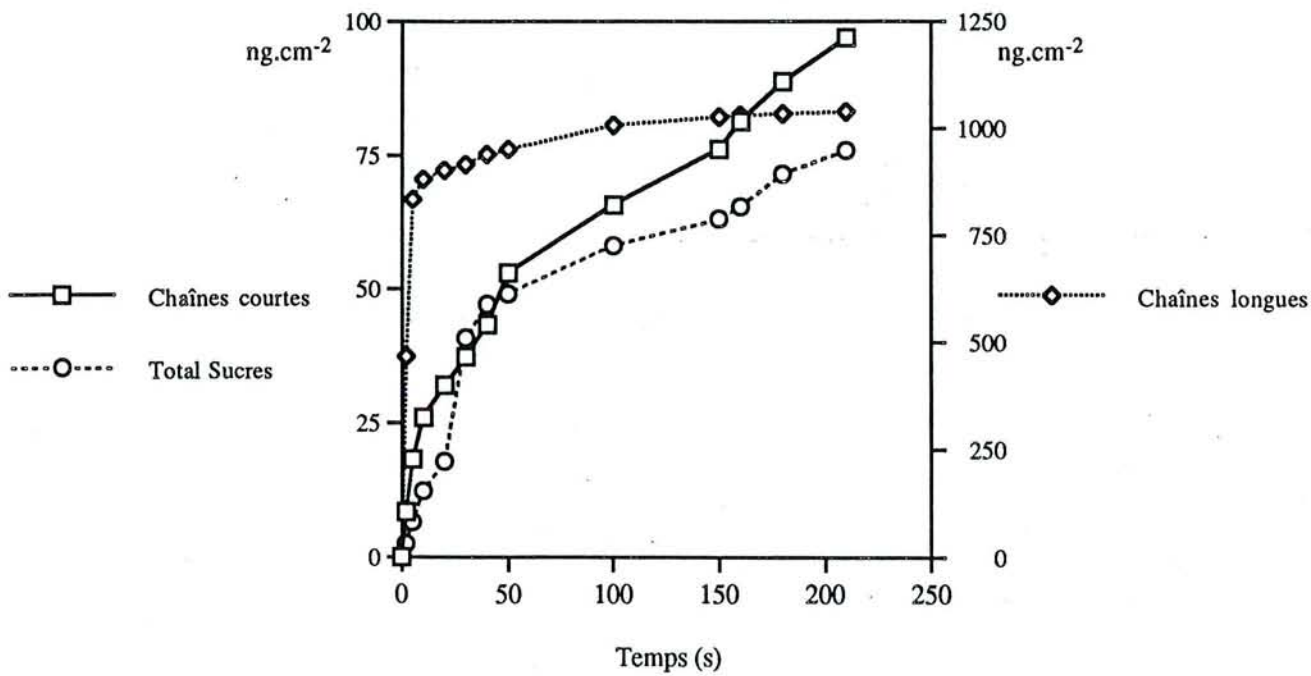
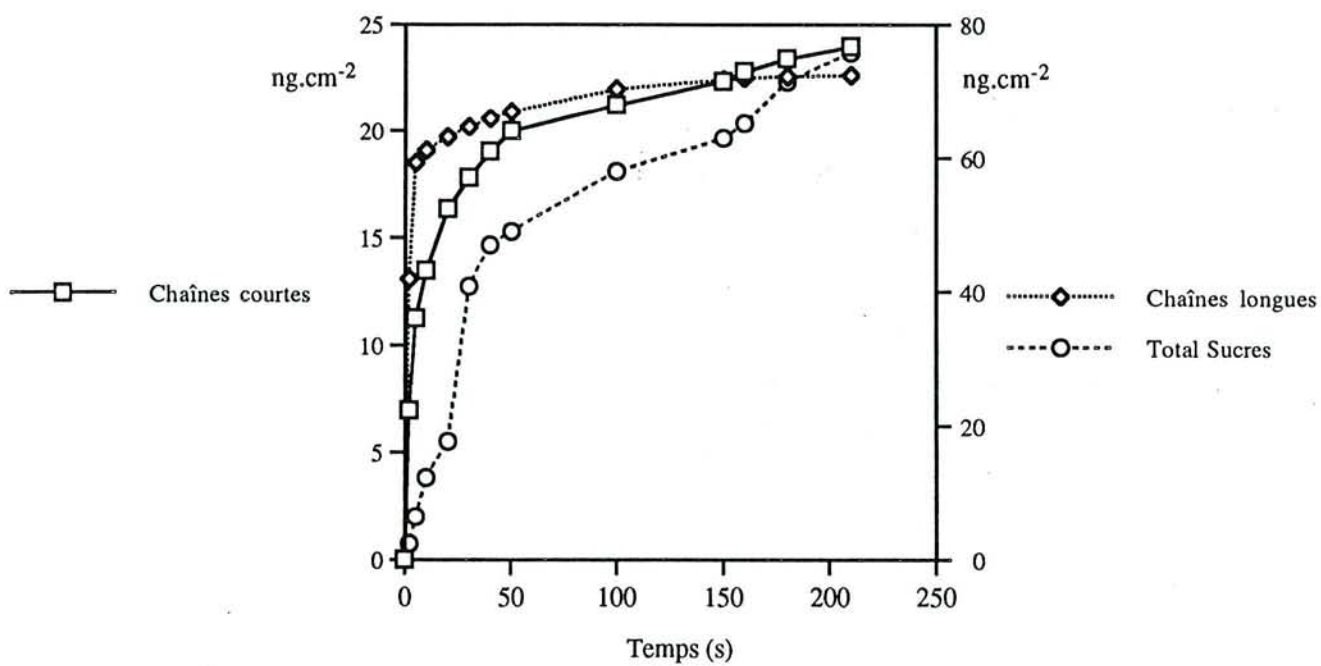


Figure 37: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des alcools primaires avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes de C22 à C25, chaînes longues de C26 à C34.



cires est obtenue entre 20 et 30 s, et 90 % en plus de 160 s. En revanche, il n'y a pas de corrélation entre la cinétique de libération des hexoses et celle du saccharose ( $r = 0.49$  et  $0.44$  pour le fructose et le glucose respectivement), alors qu'entre le fructose et le glucose cette corrélation est de  $0.987$ .

La récupération des sucres dans les cires a été comparée avec celle des 4 classes chimiques et avec distinction dans chaque cas des longueurs de chaînes par les pentes moyennes (régression linéaire). Au vu du résultat significatif de l'ANOVA ( $F = 28.78$ ,  $p < 0.0001$ ), il ressort que l'extraction des sucres dans les cires ne suit pas celle des alcanes (très hautement significatif,  $\alpha = 0.001$ ) et quelle que soit la longueur des chaînes (figures 36 à 39). En revanche, la cinétique de libération des sucres et celle des 3 autres classes sont semblables.

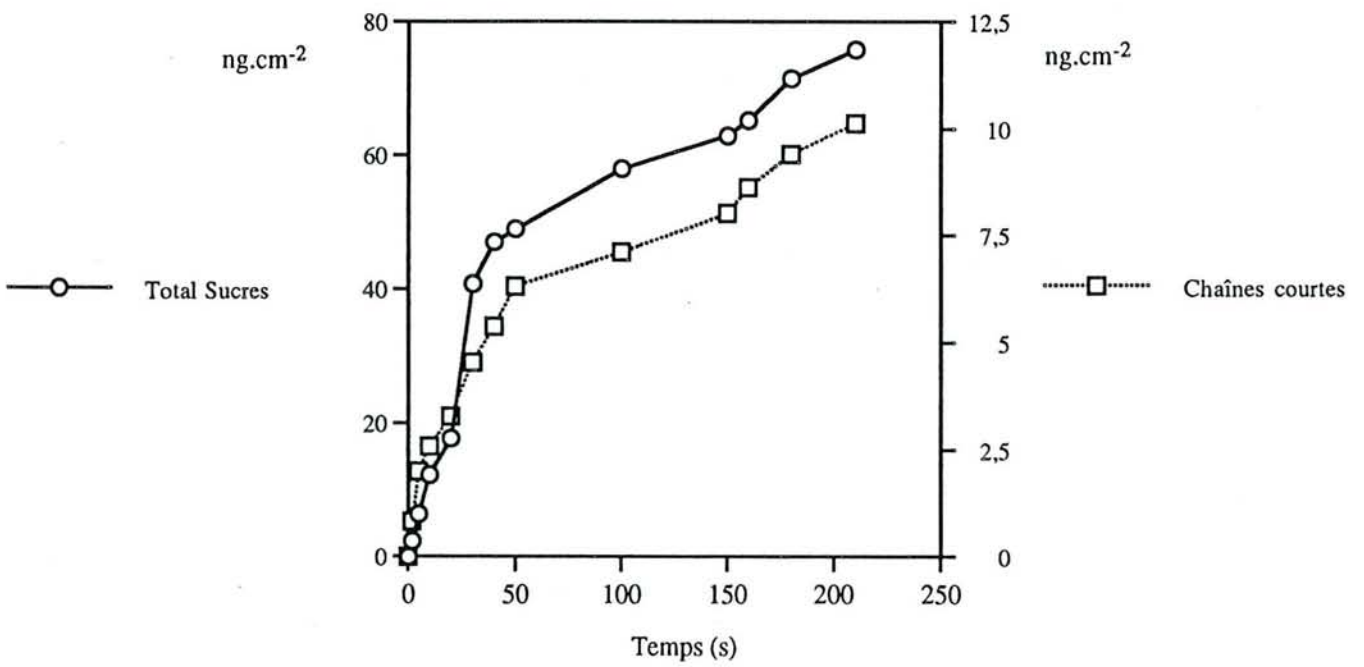
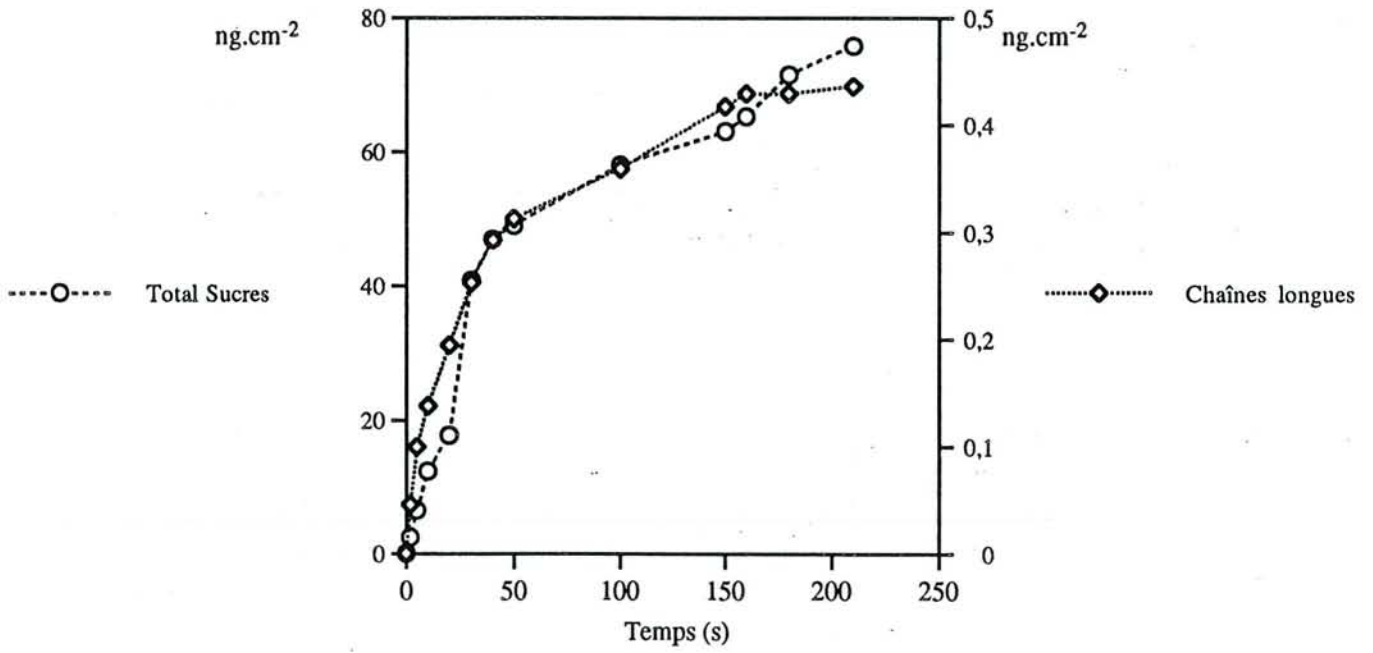
Afin de déterminer à quelle classe des cires la libération des sucres était corrélée, les coefficients de corrélation ont été calculés sur toute la cinétique. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Coefficient de corrélation calculés sur toute la cinétique d'extraction des sucres et des cires avec distinction des longueurs de chaînes pour les cires (CC: chaînes courtes, CL: chaînes longues).

		Fructose	Glucose	Saccharose	Sucres totaux
Alcanes	CC	0.71	0.61	0.78	0.80
	CL	0.10	0.13	0.74	0.36
	Totaux	0.19	0.21	0.81	0.45
Alcools primaires	CC	0.58	0.47	0.40	0.55
	CL	0.35	0.27	-0.16	0.19
	Totaux	0.39	0.30	-0.05	0.25
Acides gras libres	CC	0.72	0.63	0.78	0.81
	CL	0.89	0.92	0.53	0.90
	Totaux	0.77	0.68	0.77	0.84
Acides gras estérifiés	CC	0.78	0.69	0.81	0.81
	CL	0.27	0.26	0.53	0.53
	Totaux	0.67	0.61	0.83	0.83

La liaison avec les longueurs de chaînes y est également représentée. Aucun des coefficients de corrélation calculés n'est significatif, mais ils peuvent servir pour dégager des tendances d'évolution entre les sucre et les 4 classes chimiques des cires étudiées. Il se détache de ces résultats une liaison entre la cinétique de récupération des sucres totaux et celles des acides gras estérifiés (totaux et chaînes courtes) et des acides gras libres (totaux et chaînes longues). Ces résultats sont également visibles sur les figures 38 et 39.

Figure 38: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des acides gras libres avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires de laurier cerise. Chaînes courtes de C16 à C24 et chaînes longues de C26 à C30.





Pour les hexoses, la meilleure corrélation est obtenue avec les acides gras libres à chaînes longues. Par contre, la cinétique de libération du saccharose est plutôt liée à celles des acides gras estérifiés (totaux et chaînes courtes) et aussi des alcanes.

Les composés des cires impliqués dans le passage des sucres ne sont pas aisés à déterminer, seul un faisceau de présomption se tisse vers les composés les plus polaires qui ont été analysés: les acides gras libres et les acides gras estérifiés.

**Figure 39:** Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux des acides gras estérifiés avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes de C16 à C25 et chaînes longues de C26 à C32.

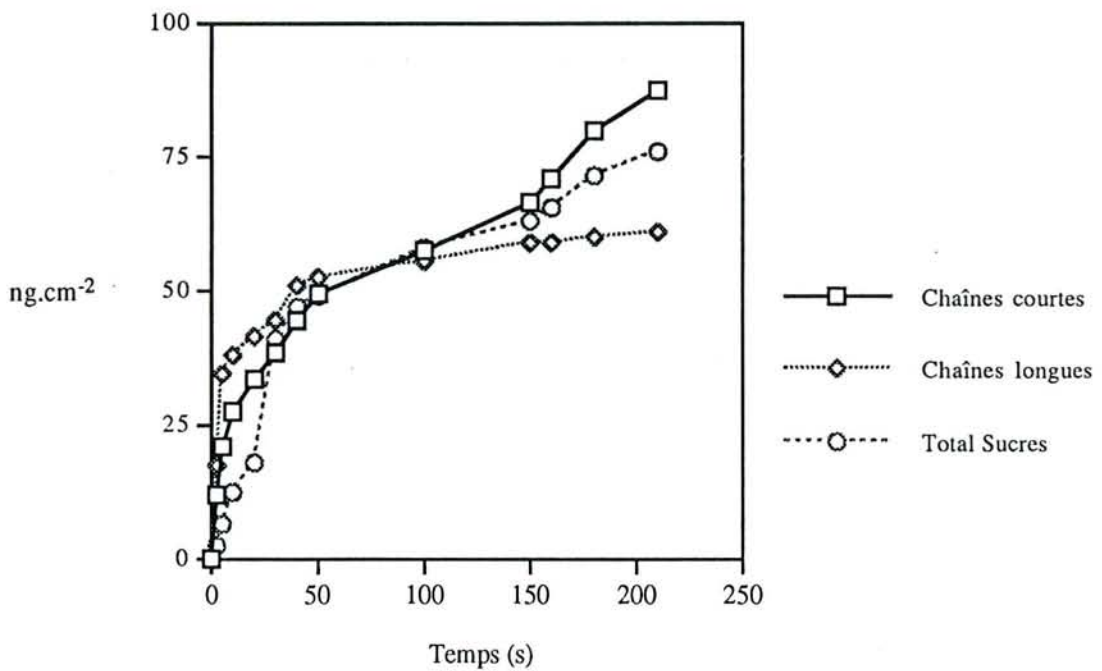
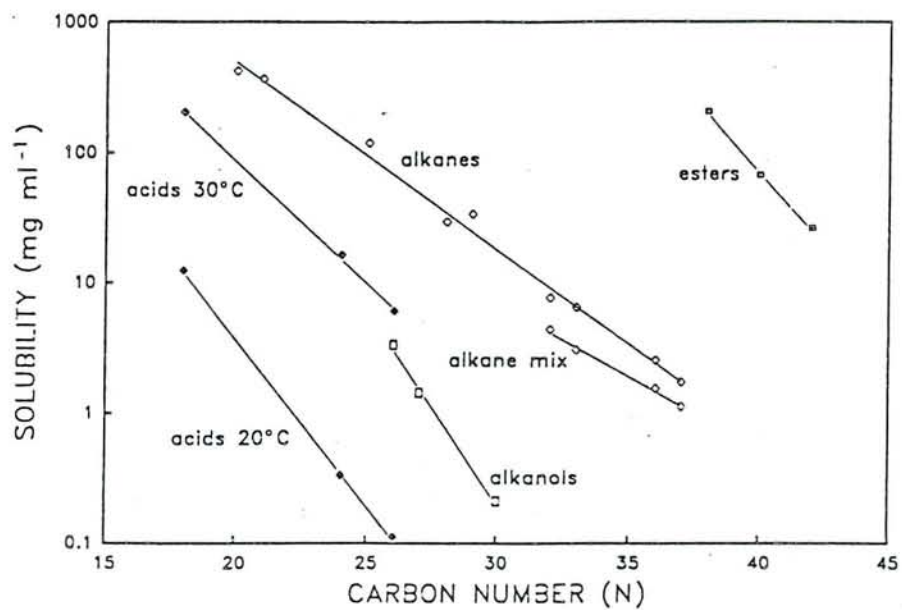


Figure 40: Solubilité de différentes classes chimiques à 20°C dans le chloroforme (d'après Riederer et Schneider, 1989).



#### IV- Discussion

L'influence de la qualité des cuticules de laurier dans le passage des sucres a été abordée par l'analyse des lipides cuticulaires solubles, car ces derniers déterminent la résistance de la cuticule au transport de l'eau (Schönherr, 1982) et des composés non électrolytes (Schönherr et Riederer, 1989). Chez le laurier cerise, la composante SCL représente  $16.7 \pm 2.2$  % (p/p) de la cuticule (Gouret *et al.*, 1993).

L'étude de la qualité des cires cuticulaires sur le passage des sucres à travers la cuticule a été réalisée par l'analyse de 4 classes constituant les cires de laurier cerise : les alcanes, les alcools primaires, les acides gras libres et les acides estérifiés. Ces composés ont été choisis car ils sont représentatifs d'un type de cires, les cires épicuticulaires (alcanes et alcools, essentiellement), et les cires intracuticulaires (acides gras) (Baker, 1982), et car ils offrent une large gamme de polarité. Outre ces quatre classes, les cires de laurier cerise contiennent également des cétones.

La part relativement importante des alcanes chez le laurier cerise (80 % des 4 classes) n'est pas inhabituelle dans le règne végétal, par exemple, les cires de *Solandra grandiflora* en contiennent 92 % (Tulloch, 1976). Les cires végétales sont souvent constituées par une classe prédominante de composés, comme par exemple les alcools primaires dans les feuilles de *Pisum sativum* (face abaxiale), ou encore les cétones chez *Allium* sp. (Holloway, 1994). La gamme des longueurs de chaînes décrite dans chacune des classes que nous avons étudiées, est tout à fait commune (Baker, 1982).

Les résultats de l'extraction des cires en fonction de la durée de trempage des feuilles dans le chloroforme, a montré que les alcanes et les alcools primaires étaient extraits avant les acides gras libres ou estérifiés. Une partie de la différence d'extraction de ces composés dans le chloroforme peut trouver une explication par une différence de solubilité des 4 classes dans le solvant. Riederer et Schneider (1989) ont déterminé la solubilité dans le chloroforme de chacune de ces classes et pour des longueurs de chaînes différentes au moyen de substances commerciales (figure 40). Ainsi pour un même nombre d'atome de carbone, les alcanes sont plus solubles dans le chloroforme que les alcools primaires eux mêmes plus solubles que les acides gras. En revanche, sur ce graphique, quelle que soit la classe de composé, les chaînes courtes ont une solubilité plus élevée dans le chloroforme que les chaînes longues. Or l'extraction des cires en fonction du temps montrent que les chaînes longues sont retirées plus tôt des cuticules que les courtes. Ce fait serait une indication en faveur d'une localisation plus superficielle ou une accessibilité meilleure des chaînes longues. Outre la solubilité de ces substances dans le chloroforme, le coefficient de diffusion des composés dans la matrice de cutine peut également intervenir. Il est fonction du volume molaire de la molécule qui diffuse ; les composés à longues chaînes diffusent moins vite dans la matrice de cutine que les chaînes courtes (Riederer et Schneider, 1989). Ces résultats confortent d'autant plus l'hypothèse d'une meilleure accessibilité des chaînes longues et leur localisation vers les couches les plus extérieures de la cuticule.



Tableau 15: Différentes méthodes d'extraction des cires cuticulaires (d'après Riederer et Schneider, 1989). ns: non spécifié.

Solvent	Temp.	Time	Species	Material	Method	Reference
CHCl <sub>3</sub>	ns	3×3-10 s	all species	leaves fruits	immersion	Holloway (1984)
	ns	2×ns	<i>Berberis aquifolium</i>	leaves	rinsing	Berg (1985)
	cold	ns	<i>Brassica napus</i>	leaves	rinsing	Holloway et al. (1977)
	ambient	4×10 s	<i>Brassica napus</i>	leaves	immersion	Whitecross and Armstrong (1972)
	ns	3×ns	<i>Calotropis gigantea</i>	leaves	immersion	Lakshminarayana et al. (1988)
	ns	30 s	<i>Chenopodium album</i>	leaves	rinsing	Taylor et al. (1981)
	boiling	ns	<i>Citrus aurantium</i>	isolated cuticles	soxhlet	Haas and Schönherr (1979)
	ns	6 min	<i>Citrus halimii</i>	leaves	immersion	Gülz et al. (1987)
	ambient	30 s	<i>Citrus spp.</i>	leaves fruits	immersion	Baker et al. (1975)
	ns	3 min	<i>Citrus spp.</i>	leaves	immersion	Nordby et al. (1979)
	ns	ns	<i>Halimium halimifolium</i>	leaves	immersion	Gülz et al. (1982)
	ns	ns	<i>Hordeum vulgare</i>	leaves	immersion	Mikkelsen (1984)
	ns	ns	leaves	leaves	immersion	Svenningsson (1988)
	ambient	15 s	<i>Isocoma spp.</i>	leaves	immersion	Mayeux and Jordan (1987)
	ns	2×20 s	<i>Larix leptolepis</i>	needles	immersion	Niemann and Baas (1978)
	ns	30 s	<i>Malus pumilum</i>	fruits	immersion	Silva Fernandes et al. (1964)
	55-58°C	50 s	<i>Musa spp.</i>	leaves	immersion	Freeman and Turner (1985)
	ns	10 s	<i>Picea abies</i>	needles	immersion	Schuck (1976)
	ns	10 s	<i>Pinus sylvestris</i>	needles	immersion	Schütt and Schuck (1973)
	ambient	2-3 min	<i>Rhododendron fortunei</i>	leaves	immersion	Salasoo (1983a)
ns	ns	<i>Rubus fruticosus</i>	leaves	rinsing	Haas and Rentschler (1984)	
ns	45-60 s	<i>Sorghum bicolor</i>	leaves	immersion	Avato et al. (1984)	
ns	20 s	<i>Zea mays</i>	leaves	immersion	Barta and Kömives (1984)	
ns	45-60 s	<i>Zea mays</i>	leaves	immersion	Bianchi et al. (1982)	
ns	2 s	<i>Zea mays</i>	leaves	immersion	Blaker and Greyson (1988)	
CHCl <sub>3</sub> , MeOH	boiling	2 h per solvent	<i>Citrus spp.</i>	isolated cuticles	extraction	Baker and Procopiou (1975)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (2:1)	ns	ns	<i>Avena sativa</i>	ground leaves	extraction	Svenningsson and Liljenberg (1986)
CHCl <sub>3</sub> , MeOH	hot	ns	<i>Spinacia oleracea</i>	isolated cuticles	extraction	Holloway (1974)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH (2:1)	ns	ns	<i>Trifolium repens</i>	whole plants	immersion	Body (1974)
CHCl <sub>3</sub> /Et <sub>2</sub> O (1:1)	ns	ns	<i>spp.</i>	leaves	rinsing	Hunt and Baker (1982)
Benzene	boiling	ns	<i>Ficus lacor</i>	dry material	extraction	Behari et al. (1982)
Et <sub>2</sub> O n-hexane	ns	3×5-10 s	all species	leaves fruits	immersion	Holloway (1984)
	ns	ns	<i>Abies balsamea</i>	needles	immersion	Tulloch (1987)
	ambient	45 s	<i>Juniperus scopulorum</i>	twigs	immersion	Tulloch and Bergerter (1981)
light petroleum	ns	ns	<i>Picea glauca</i>	needles	immersion	Tulloch (1987)
	ns	ns	<i>Abies balsamea</i>	dried needles	extraction	Beri and Lemon (1970)
	ambient	1-5 min	<i>Epicardiaceae</i>	twigs	immersion	Salasoo (1983b)
	ambient	15-120 s	<i>Ericaceae</i>	twigs	immersion	Salasoo (1981)
	ns	2×1 h	<i>Ericaceae</i>	twigs	immersion	Salasoo (1987)
	ns	2 days	<i>Empetraceae</i>	ground material	extraction	Seigler et al. (1974)
	ns	ns	<i>Larrea divaricata</i>	dried needles	extraction	Beri and Lemon (1970)
	ns	ns	<i>Picea mariana</i>	needles	immersion	Salasoo (1983c)
ns	ns	<i>spp.</i>	leaves	immersion	Shelvey and Koziol (1986)	
ns	ns	ns	<i>Lolium perenne</i>	leaves	ns	

La quantité et la qualité des cires extraites dépendent non seulement de la durée d'application du solvant (défini par la cinétique), mais aussi de sa technique d'application (défini par le trempage et la percolation pour 210 s de contact avec le solvant). Le trempage extrait 2 fois plus de cire que la percolation, et qualitativement, il favorise celle des acides gras libres et estérifiés. De plus, le matériel à partir duquel sont extraits les SCL influe également sur leur qualité et leur quantité. Riederer et Schneider (1989) ont montré que l'extraction des cires à partir des feuilles et des cuticules isolées n'était pas équivalente. Les homologues à nombre élevé d'atomes de carbone des composés aliphatiques et la fraction des esters d'acyles étaient discriminés quand les lipides solubles cuticulaires sont extraits à partir des feuilles entières de *Citrus aurantium* par rapport à ceux extraits à partir des cuticules isolées.

Les multiples techniques employées pour extraire les SCL (tableau 15) permettent donc difficilement de comparer les perméabilités des cuticules dont le contenu en SCL a été ainsi réduit.

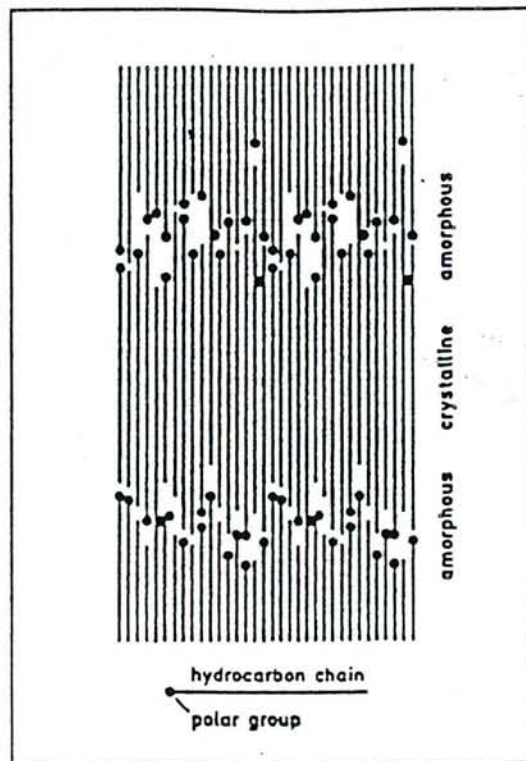
Les cires épicuticulaires extraites par le stripping contiennent les 4 classes étudiées. La participation importante des alcanes explique l'absence de forme cristalline particulière des cires épicuticulaires de laurier. Jeffree (1986) a défini une corrélation entre la composition de ces cires et leur forme. Le retrait des cires épicuticulaires ne modifie pas le passage des sucres à travers les cuticules. Les SCL extraits par stripping représentent 21 % de la somme des 4 classes extraites par 2 s de trempage. Au delà de cette durée, une extraction majoritaire des cires intracuticulaires pourrait être envisagée. Dans la littérature, l'extraction des cires épicuticulaires a été réalisée par des trempages dans les solvants pendant des durées courtes : de 2 s (Blaker et Greyson, 1988) jusqu'à 6 min (Gülz *et al.*, 1987), une atteinte des cires intracuticulaires dans ces conditions n'est pas à rejeter.

Le rôle des cires épicuticulaires dans le passage des sucres à travers la cuticule est donc négligeable. La comparaison des caractéristiques des cires extraites par stripping avec celles obtenues par les autres techniques (trempage et percolation) laissent supposer avant tout une influence de la quantité des cires. En effet, la réduction du contenu en SCL des cuticules a pour effet d'augmenter la perméabilité des cuticules aux solutés (Schönherr et Riederer, 1989).

Les seules pistes permettant d'établir un lien entre la perméabilité et la composition chimique des cires sont obtenues par la comparaison des SCL extraits par la percolation et par 100 s de trempage, car les perméabilités aux sucres diffèrent le plus pour ces deux méthodes. Quantitativement le trempage extrait davantage les 4 classes. Qualitativement, il favorise une extraction plus importante des acides gras libres et estérifiés. Dans le cas du trempage, le solvant aurait accès à des zones de la cuticule plus profondes que celles que peut atteindre la percolation et qui contiendraient plus d'acides gras libres, composés plus caractéristiques des cires intracuticulaires. Une autre explication serait une solubilisation plus facile des composés dans le chloroforme par le trempage que par la percolation. Par ailleurs, l'analyse des sucres dans les cires extraites en fonction du temps laisse supposer une intervention des acides gras libres dans le passage des sucres. Cependant ces substances ne seraient pas impliquées dans la sélectivité des cuticules aux sucres observée dans les expériences de perméabilité, puisque celle-ci n'était pas modifiée quand les cuticules étaient décirées. Les analyses des



Figure 41: Modèle d'alignement moléculaire des cires intracuticulaires (dimensions non réelles) ; les chaînes aliphatiques s'ordonnent perpendiculairement par rapport à la surface foliaire. Les points en bout de chaîne correspondent aux groupes fonctionnels des molécules (d'après Riederer et Schneider, 1990).





SCL réalisées dans notre étude ont concerné des SCL extraits sur un ensemble de feuilles avant l'isolement de leurs cuticules. L'analyse réalisée sur ces SCL ne correspond donc pas aux membranes cuticulaires qui ont été utilisées pour la perméabilité, mais sur la population dont elles sont issues. Ces conditions expliquent peut être les difficultés de mise en évidence de corrélation entre la composition chimique et la quantité des cires extraites et le passage des sucres.

Peu de travaux à notre connaissance, établissent un lien entre la chimie des cires et la perméabilité comme nous l'avons traité. Riederer et Schneider (1990) n'ont trouvé aucune corrélation entre la perméance à l'eau et la composition des SCL déterminée pour une même population de cuticules, ni même pour les cuticules prises individuellement. Ces auteurs suggèrent que la chimie des composés du point de vue de leurs groupes fonctionnels ne suffisent pas pour expliquer le rôle de barrière limitante des cires. En fait ce rôle serait réalisé non pas par les substitutions polaires, mais par la chaîne carbonée des composés aliphatiques. Pour être efficace la barrière doit être imperméable. Ceci est réalisé par la capacité des molécules à former des cristaux, elle-même dépendant de la présence des chaînes aliphatiques de carbone. Ces auteurs ont proposé une représentation de la structure moléculaire des SCL (figure 41). Les régions cristallines seraient formées par les chaînes aliphatiques de carbone et elles sont orientées perpendiculairement au plan de la cuticule. La zone cristalline est inaccessible et donc imperméable aux solutés et à l'eau. Les zones cristallines sont séparées par des zones amorphes, représentées par les groupements terminaux des chaînes qui peuvent être des fonctions polaires (hydroxyles, carboxyles) ou non (méthyle). Le transport des solutés ou de l'eau ne serait possible que dans cette zone amorphe. La barrière limitant les phénomènes de diffusion dans la cuticule serait formée par l'organisation en plusieurs couches de cette structure moléculaire des SCL, dont les propriétés générales sont modulées par les différentes classes chimiques constituant les cires. La structure des cires intracuticulaires en cristaux a été récemment déterminée par des analyses des cires par diffraction aux rayons X (Reynhardt et Riederer, 1994).

L'organisation des SCL dans la matrice de cutine semble tout aussi importante que la composition des cires dans le passage des solutés. Il serait donc intéressant de voir dans quelles mesures les extractions des cires par les solvants organiques altèrent cette organisation par des observations en lumière polarisée.

**CONCLUSION GÉNÉRALE  
ET  
PERSPECTIVES**



Les recherches entreprises au cours de cette étude avaient pour but de définir dans un premier temps ce que la composition biochimique du phylloplan représentait par rapport aux compartiments foliaires sources, l'apoplaste et le milieu intracellulaire, et ensuite de quelles manières la cuticule intervenait dans cette composition. Ces principales études sont résumées figure 42.

Ces études ont été menées en considérant uniquement les apports endogènes des métabolites primaires.

Les principaux résultats ont révélé que:

1 • la composition en sucres solubles du phylloplan était proche de celle du milieu intracellulaire et quelle que soit la plante (laurier cerise ou maïs).

2 • la perméabilité des cuticules isolées et "intactes" de laurier cerise était sélective aux sucres solubles. Le passage du glucose était favorisé envers celui du fructose et du saccharose.

• la perméabilité aux sucres des cuticules était améliorée d'un facteur 5 à 6 lorsque le contenu en cires était réduit ou modifié.

• les cires épicuticulaires n'influaient pas sur le passage des sucres contrairement aux cires intracuticulaires, principales barrières à leur passage.

3 • les composés les plus polaires des cires (acides gras libres et estérifiés) seraient impliqués dans le passage des sucres.

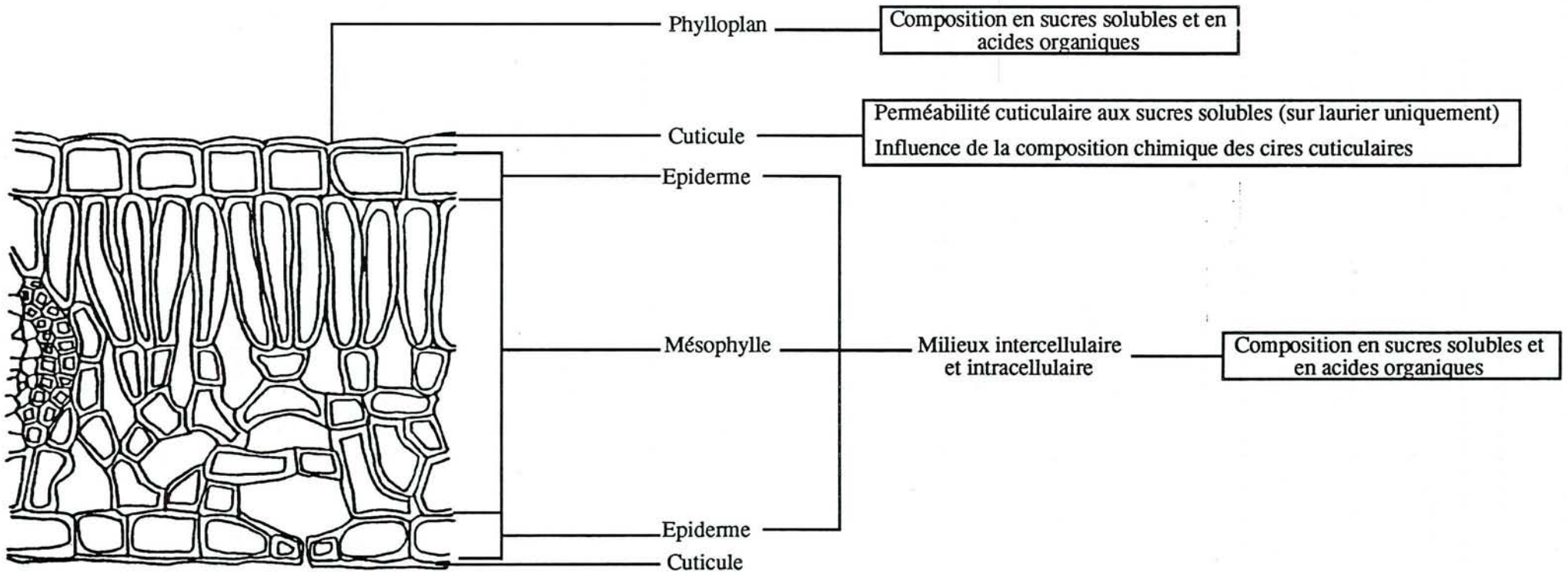
Le premier résultat est en accord avec les observations réalisées par Derridj *et al.* (1986) sur le choix du site de ponte d'*Ostrinia nubilalis* pour les feuilles dont le contenu en sucres était le plus riche. L'insecte ou les micro-organismes auraient donc une information sur l'état physiologique de la plante. La composition du phylloplan est influencée à la fois par celle des compartiments foliaires sources et par la cuticule. Cependant la barrière cuticulaire n'explique pas à elle seule la composition en sucres solubles de la surface. Ce fait a été évoqué par la comparaison de la composition en sucres solubles du phylloplan déterminée *in situ* avec celle obtenue à partir des expériences de perméabilité sur cuticules isolées de laurier cerise. L'influence de l'environnement abiotique et biotique (microflore épiphyte) sur cette composition n'est pas négligeable (Cooke et Rayner, 1984).

Les perspectives de recherches qu'ouvrent ce travail sont:

• d'affiner les méthodes permettant la mise en évidence des relations existant entre le phylloplan et l'intérieur de la feuille. Il serait approprié de les étudier en distinguant par exemple l'épiderme du mésophylle, l'épiderme étant le plus directement relié à la cuticule. De plus, l'épiderme ne photosynthétise pas, il doit donc importer ces métabolites des cellules mésophylliennes par la voie apoplasmique. De même, la façon dont le milieu intercellulaire a été analysé dans notre étude prend en compte tous les tissus de la feuille. Une différence de concentration en métabolites des différentes zones tissulaires de la feuille est tout à fait envisageable (Dietz *et al.*, 1994 ; Fricke *et al.*, 1994). La relation entre la composition de l'apoplaste de l'assise épidermique pourrait être étudiée en adaptant le



Figure 42: Etudes réalisées aux différents niveaux de la feuille de laurier cerise.



matériel végétal dont l'épiderme se retire facilement, comme par exemple la fève (*Vicia faba*) ou le pois (*Pisum sativum* cv Argenteum) en utilisant les techniques déjà développées par Delrot (1983). On peut également envisager de travailler sur des protoplastes issus de chaque type de tissus (Opaskornkul *et al.*, 1994 ; Dietz *et al.*, 1994).

- pour l'étude de l'influence de la qualité des cires cuticulaires sur le passage des sucres, l'extraction des cires pourrait être améliorée, soit par un trempage encore plus long des feuilles, soit par une extraction des cires après isolement des cuticules. Ce dernier point se justifie par les expériences de Riederer et de Schneider (1989), qui mettaient en évidence une meilleure extraction des cires à partir des cuticules isolées qu'à partir des feuilles. La technique d'extraction des cires à partir des cuticules isolées de laurier cerise a été réalisée, mais les cuticules étaient trop fragilisées pour l'étude ultérieure de la perméabilité. La technique d'extraction à partir de ce matériel pourrait donc être améliorée. L'influence des composés chimiques constituant les cires pourrait être approfondie en utilisant des temps d'application du solvant (chloroforme) différents afin de privilégier l'extraction de certains d'entre eux. Les expériences réalisées au cours de notre étude ont montré que les composés les plus polaires étaient extraits bien plus tard.

- de procéder à une étude de la liaison entre le phylloplan et les milieux intercellulaire et intracellulaire, selon une cinétique journalière en conditions contrôlées (phytotron). Sachant que les taux de sucres dans les tissus foliaires varient au cours de la journée, il serait intéressant de savoir si ce phénomène se répercute au niveau du phylloplan.

- de rechercher d'autres éléments qui pourraient expliquer le passage des sucres à travers la cuticule, en particulier l'organisation des régions cristallines de cires imbriquées dans la matrice de cutine, par des observations en lumière polarisée.

Dans le cadre des relations de la plante avec son environnement biotique, nos résultats pourraient servir:

- à l'étude des interactions de la plante avec les insectes d'une part, et d'autre part avec les micro-organismes épiphytes.

- à la prévision des risques potentiels d'infestations et de contaminations d'une espèce végétale ou d'une culture.

- à l'évaluation des dysfonctionnements dans le système "plante-perméabilité cuticulaire-phyloplan-organismes colonisateurs" et à ses différents niveaux lors de perturbations dues à l'environnement (stress hydrique, pollution atmosphérique, traitements pesticides...)

Ces études devraient permettre de comprendre les mécanismes de passage des métabolites qui constituent des signaux biochimiques pour l'insecte et une source trophique pour les micro-organismes.



**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Adams C.M. and Hutchinson T.C., 1987.- Comparative abilities of leaf surfaces to neutralize acidic rain drops. II. The influence of leaf wettability, leaf age and rain duration on the changes of droplets pH and chemistry on leaf surfaces. *New Phytol.*, 106, 435-456.
- Aked J. and Hall J.L., 1993 a.- Effect of powdery mildew infection on concentrations of apoplastic sugars in pea leaves. *New Phytol.*, 123, 277-282.
- Aked J. and Hall J.L., 1993 b.- The uptake of glucose, fructose and sucrose into the lower epidermis of leaf discs of pea (*Pisum sativum* L. cv. *Argenteum*). *New Phytol.*, 123, 271-276.
- Alenäs I. and Skärsby L., 1988.- Throughfall of plant nutrients in relation to crown thinning in a swedish coniferous forest. *Water Air Soil Pollut.*, 38, 223-237.
- Andrews J.H., 1992.- Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 603-635.
- Baker E.A., 1982.- Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In "The Plant Cuticle", Cutler D.F., Alvin K.L. and Price C.E., ed., Academic Press, London, 139-165.
- Becker M., Kerstiens G. and Schönherr J., 1986.- Water permeability of plant cuticles. Permeance, diffusion and partition coefficients. *Trees*, 1, 54-60.
- Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F. and Stork H., 1974.- D-Glucose Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase. In "Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H.U., ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1241-1246.
- Blakeman J.P. and Atkinson P., 1981.- Antimicrobial substances associated with the aerial surfaces of plants. In "Microbial Ecology of the Phylloplane", Blakeman P.J., ed., Academic Press, London, 245-263.
- Blaker T.W. and Greyson F.I., 1988.- Developmental variation of leaf surface wax of maize, *Zea mays*. *Can. J. Bot.*, 66, 839-846.
- Bodnaryk R.P., 1992.- Leaf epicuticular wax, an antixenotic factor in Brassicaceae that affects the rate and pattern of feeding of flea beetles, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze). *Can. J. Plant Sci.*, 72, 1295-1303.

Bradford M.M., 1976.- A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

Burrage S.W., 1976.- Aerial microclimate around plant surfaces. In "Microbiology of Aerial Plant Surfaces", Dickinson C.H. and Preece T.F., ed., London, Academic, 173-184.

Burrage S.W., 1971.- The micro-climate at the leaf surface. In "Ecology of Leaf Surface Micro-Organisms", Preece T.F. and Dickinson, C.H., ed., London, Academic, 91-101.

Carver T.L.W., Thomas B.J., Ingerson-Morris S.M. and Roderick H.W., 1990.- The role of the abaxial leaf surface waxes of *Lolium spp.* in resistance to *Erysiphe graminis*. *Plant Pathol.*, 39, 573-583.

Chamel A., Gaillardon P. and Gauvrit C., 1991.- La pénération foliaire des herbicides. In "Les herbicides", INRA ed., 7-49.

Cooke R.C. and Rayner A.D.M., 1984.- Ecology of Saprophytic Fungi. Longman, London, New York, 415p.

Davis D.G., Mullins J.S., Stolzenberg G.E. and Booth G.D., 1979.- Permeation of organic molecules of widely differing solubilities and of water through isolated cuticles of orange leaves. *Pestic. Sci.*, 10, 19-31.

Delrot S., 1987.- Phloem loading: apoplastic or symplastic?. *Plant Physiol. Biochem.*, 25(5), 667-676.

Delrot S., Faucher M., Bonnemain J.L. and J. Bonmort, 1983.- Nycthermal changes in intracellular and apoplastic sugars in *Vicia faba* leaves. *Physiol. Vég.*, 21(3), 459-467.

Derridj S., Gregoire V., Boutin J.P. and Fiala V., 1989.- Plant growth stages in the interspecific oviposition preference of european corn borer and relation with chemicals present on leaf surface. *Entomol. Exp. Appl.*, 53, 267-276.

Derridj S., Fiala V. and Jolivet E., 1987.- Low molecular carbohydrates of *Zea mays* L. leaves and the egg-laying of *Ostrinia nubilalis* Hbn. Lepid. Pyralidae. In "Insects-Plants", Labeyrie V., Fabres G. and Lachaise D., ed., Dr Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands,

- Dietz K.-J., Hollenbach B. and Hellweg E., 1994.- The epidermis of barley leaves is a dynamic intermediary storage compartment of carbohydrates, amino acids and nitrate. *Physiol. Plant.*, 92, 31-36.
- Dische Z., 1962.- Color reactions of carbohydrates. In "Methods in Carbohydrate Chemistry", 1, Whistler R.L. and Wolfrom M.L. ed., Academic Press, New York, 477.
- Dittrich P. and Raschke K., 1977.- Uptake and metabolism of carbohydrates by epidermal tissue. *Planta*, 134, 83-90.
- Eigenbrode S.D., Espelie K.E. and Shelton A.M., 1991.- Behavior of neonate diamondback moth larvae [*Plutella xylostella* (L.)] on leaves and on extracted leaf waxes of resistant and susceptible cabbages. *Journal of Chemical Ecology*, 17(8), 1691-1704.
- Ferrandon M. and Chamel A., 1989.- Foliar uptake and translocation of iron, zinc, manganese. Influence of chelating agents. *Plant Physiol. Biochem.*, 27(5), 713-722.
- Fiala V., Boutin J.P., Barry P. and Derridj S., 1993.- Les métabolites de la surface foliaire (phylloplan): présence et rôle dans les relations plante-insecte. *Acta Bot. Gallica*, 140, 207-216.
- Fiala V., Glad C., Martin M., Jolivet E. and Derridj S., 1990.- Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytol.*, 115, 609-615.
- Fokema N.J., 1981.- Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental? In "Microbial Ecology of the Phylloplane", Blakeman P.J., ed., Academic Press, London, 433-439.
- Foyer C.H., 1987.- The basis for sucrose-sink interaction in leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, 25, 649-657.
- Fricke W., Leigh R.A. and Tomos A.D., 1994.- Concentrations of inorganic and organic solutes in extracts from individual epidermal, mesophyll and bundle-sheath cells of barley leaves. *Planta*, 192, 310-316.
- Frossard R., 1981.- Effect of guttation fluids on growth of microorganisms on leaves. In "Microbial Ecology of the Phylloplane", Blakeman P.J., ed., Academic Press, London, 213-226
- Giaquinta R., 1979.- Phloem loading of sucrose involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiol.*, 63, 744-748.



Geiger D.R., Sovonick S.A., Shock T.L. and Fellows R.J., 1974.- Role of the free space in translocation in sugar beet. *Plant Physiol.*, 54, 892-898.

Goffreda J.C., Mutschler M.A., Avé D.A., Tingey W.M. and Steffens J.C., 1989.- Aphid deterrence by glucose esters in glandular trichome exudate of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. *J. Chem. Ecology*, 15(7), 2135-2147.

Goffreda J.C., Steffens J.C. and Mutschler M.A., 1990.- Association of epicuticular sugars with aphid resistance in hybrids with wild tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115, 165-165.

Goodman R.N. and Addy S.K., 1963.- Penetration of excised apple cuticular membranes by radioactive pesticides and other model compounds. *Phytopathol. Z.*, 46, 1-10.

Gouret E., Rohr R. and Chamel A., 1993.- Ultrastructure and chemical composition of some isolated cuticles in relation to their permeability to the herbicide diuron. *New Phytol.*, 124, 423-431.

Grignon C. and Sentenac H., 1991.- pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 103-128.

Gülz P.G., Scora R.W., Müller E. and Marner F.J., 1987.- Epicuticular leaf waxes of *Citrus halimii* Stone. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 716-720.

Haas K. and Rentschler J, 1984.- Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in blackberry leaves: ultrastructure and chemical evidence. *Plant Sci. Lett.*, 36, 143-147.

Holloway P.J., 1994.- Plant cuticles: physicochemical characteristics and biosynthesis. In "Air pollutants and the leaf cuticles, Percy K.E., Cape J.N., Jagels R., and Simpson C.J., ed., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, NATO ASI Series, vol G 36, 1-13.

Jetty A. and Rao P.R., 1987.- Effect of fungicide zineb on the leaching of micronutrients from the leaves of *Zea mays* L.. *Current Sci.*, 56, 721-722.

Jeffree C.E., 1986.- The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants with reference to their structure, function and evolution. In "Insects and the Plant Surface", Juniper B.E. and Southwood T.R.E., ed., Edward Arnold, London, 23-64.

Juniper B.E., and Jeffree C.E.(ed.) 1983.- Plant surfaces. Edward Arnold, 93p.

Kannan S., 1969.- Penetration of iron and some organic substances through isolated cuticular membranes. *Plant Physiol.*, 44, 517-521.

Kerler F. and Schönherr J., 1988.- Permeation of lipophilic chemicals across plant cuticles : prediction from partition coefficients and molecular volumes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17, 12-17.

Kolattukudy P.E., 1984.- Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.*, 62 : 2918-2933.

Kursanov A.L. and Brovchenko M.I., 1970.- Sugars in the free space of leaf plates: their origin and possible involvement in transport. *Can. J. Bot.*, 48, 1243-1250;

Lendzian K.J., 1982.- Gas permeability of plant cuticles. Oxygen permeability. *Planta*, 155, 310-315.

M'Batchi B. and Delrot S., 1984.- Parachloromercuribenzenesulfonic acid: a potential tool for differential labeling of the sucrose transporter. *Plant Physiol.*, 75, 154-160.

Madore M. and Webb J.A., 1981.- Leaf free space analysis and vein loading in *Cucurbita pepo*. *Can. J. Bot.*, 59, 2250-2257.

Marentes E., Griffith M., Mlynarz A. and Brush R.A., 1993.- Proteins accumulates in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimatation. *Physiol. Plant.*, 87, 499-507.

Mengel K., Breininger M. TH. and Lutz H.J., 1990.- Effect of simulated acidic fog on carbohydrate leaching, CO<sub>2</sub> assimilation and development of damage symptoms in young spruce trees (*Picea abies* L. Karst). *Environ. Exp. Bot.*, 30(2), 165-173.

Merral G.T., 1981.- Physical factors that influence the behaviour the chemicals on leaf surfaces. In "Microbial Ecology of the Phylloplane", Blakeman P.J., ed., Academic Press, London, 265-281.

Mitterhuber E., Pfanz H. and Kaiser W.M., 1989.- Leaching of solutes by the action of acidic rain : a comparison of efflux from twigs and single needles of *Picea abies* (L. Karst). *Plant Cell Environ.*, 12, 93-100.

Morris C.E. and Rouse D.I., 1985.- Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations. In "Biological Control on the Phylloplane". St Paul, MN: AM. Phytopathol. Soc., 63-82.

Norris R.F., 1974.- Penetration of 2,4-D in relation to cuticle thickness. Amer. J. Bot., 61(1), 74-79.

Ohya I., Sinozaki Y., Tobita T., Takahashi H., Matsuzaki T. and Koiwai A., 1994. Sucrose esters from the surface lipids of *Nicotiana cavicola*. Phytochemistry, 37, 143-145.

Opaskornkul C, Greger M. and Tillberg J-E, 1994.- Effects of apoplastic sucrose on carbohydrate pools of mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*). Physiol. Plant., 90, 685-691.

Orgell W.H., 1955.- The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. Plant Physiol., 30, 78-80.

Peress J., 1994.- Etude du rôle de l'acide malique du phylloplan sur la ponte d'*Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptère, Pyralidae). Mémoire de fin d'étude ENITA-Bordeaux, 59p.

Pinedo M.L., Segarra C. and Conde R.D., 1993.- Occurrence of two endoproteinases in wheat leaf intercellular washing fluid. Physiol. Plant., 88, 287-293.

Price C.E., 1982.- A review of the factors influencing the penetration of pesticides through plant leaves. In "The Plant Cuticle", Cutler D.F., Alvin K.L. and Price C.E., ed., Academic Press, London, 237-252.

Reynhardt E.C. and Riederer M., 1994.- Structures and molecular dynamics of plant waxes. II Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L.. Eur. Biophys. J., 23, 59-70.

Riederer M. and Schneider G., 1990.- The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus* leaf cuticles. II. Composition of soluble cuticular lipids and correlation with transport properties. Planta, 180, 154-165.

Riederer M. and Schneider G., 1989.- Comparative study of the composition of waxes extracted from isolated cuticles and from whole leaves of *Citrus*: evidence for selective extraction. Physiol. Plant., 77, 373-384.



Riederer M. and Schönherr J., 1985.- Accumulation and transport of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in plant cuticles. II. Permeability of the cuticular membrane. *Ecotox. Environ. Safety*, 9, 196-208.

Schönherr J., 1976 a.- Water permeability of cuticular membranes. In "Problems and Modern Approaches", Lange O.L., Kappen L. and Schulze E.D., ed., Springer Verlag Berlin, 148-159.

Schönherr J., 1976 b.- Water permeability of isolated cuticular membranes : the effect of pH and cations diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. *Planta*, 128, 113-126.

Schönherr J., 1982.- Resistance of plant surfaces to water loss : transport properties of cutin, suberin and associated lipids. In *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, 12B. *Physiological Plant Ecology*, Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B. and Ziegler H., ed., Springer Verlag Berlin, 153-179.

Schönherr J. and Huber R., 1977.- Plant cuticles are polyelectrolytes with isoelectric points around three. *Plant Physiol.*, 59, 145-150.

Schönherr J. and Riederer M., 1989.- Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.*, 108, 1-64.

Schreiber L. and Schönherr J., 1993.- Determination of foliar uptake of chemicals: influence of leaf surface microflora. *Plant Cell Environ.*, 16, 743-748.

Shafer W.E. and Schönherr J., 1985.- Accumulation and transport of phenol, 2-nitrophenol, and 4-nitrophenol in plant cuticles. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 10, 239-252.

Tetlow I.J. and Farrar J.F., 1993.- Apoplastic sugar concentration and pH in Barley leaves infected with brown rust. *J. Exp. Bot.*, 44(262), 929-936.

Tsumuki H., Kanehisa K. and Kawada K., 1989.- Leaf surface wax as a possible resistance factor of barley to cereal aphids. *Appl. Ent. Zool.*, 24(3), 295-301.

Tukey H.B. Jr., 1970.- The leaching substances from plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 21, 305-324.

Tukey H.B. Jr., 1971.- Leaching of substances from plants. In "Ecology of Leaf Surface Microorganisms", Preece T.F. and Dickinson C.H., ed., Academic Press, London, 67-80.

Tulloch A.P., 1976.- Chemistry of waxes of higher plants. In "Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes", Kolattukudy P.E., ed., Elsevier Amsterdam, 275-279.

Uematsu H. and Sakanoshita A., 1989.- Possible role of cabbage leaf wax bloom in suppressing diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Yponomeutidae) oviposition. Appl. Ent. Zool., 24(3), 253-257.

Yang G., Wiseman B.R., Isenhour D.J. and Espelie K.E., 1993.- Chemical and ultrastructural analysis of corn cuticular lipids and their effect on feeding by fall armyworm larvae. J. Chem. Ecol., 19(9), 2055-2074.

## **ANNEXES**



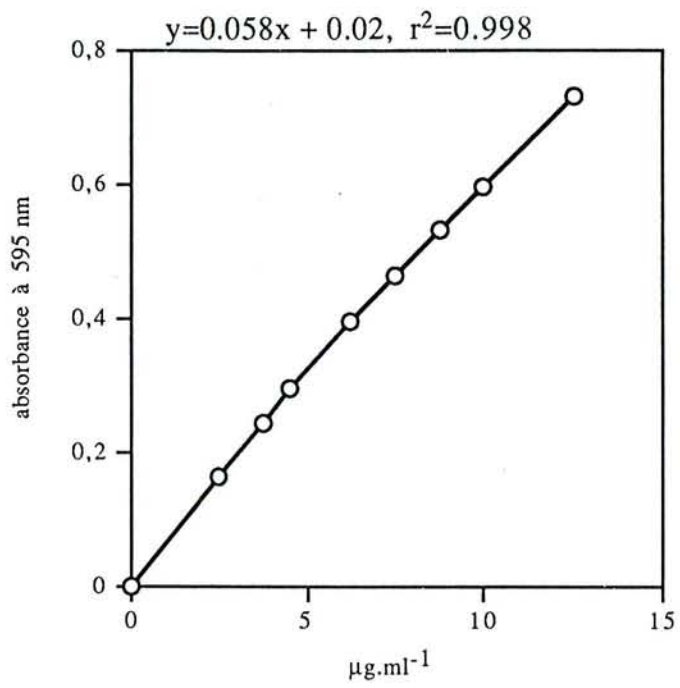
## Solution nutritive pour plantes neutrophiles:pH 5.8

- acide nitrique concentré (d=1,33; 36,0 degré Beaufort)	380 ml
- phosphate biammonique	120 g
- nitrate de magnésium (Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O)	80 g
- nitrate de potassium	495 g
- solution mère d'oligoéléments	100 ml
- mascolate de fer	30 ml
- qsp H <sub>2</sub> O	1000 l

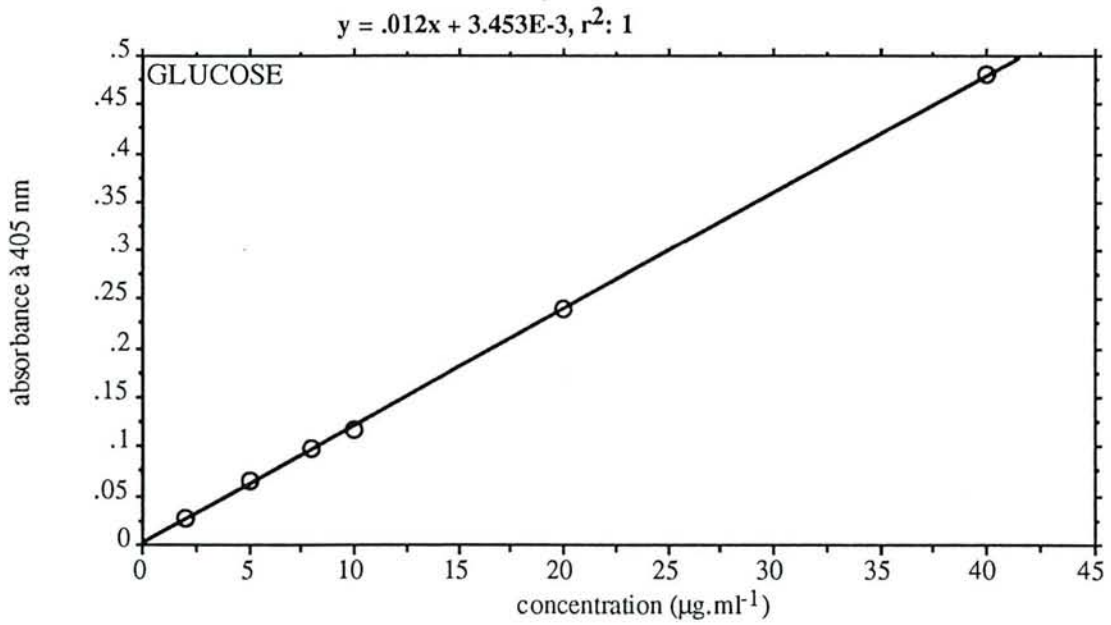
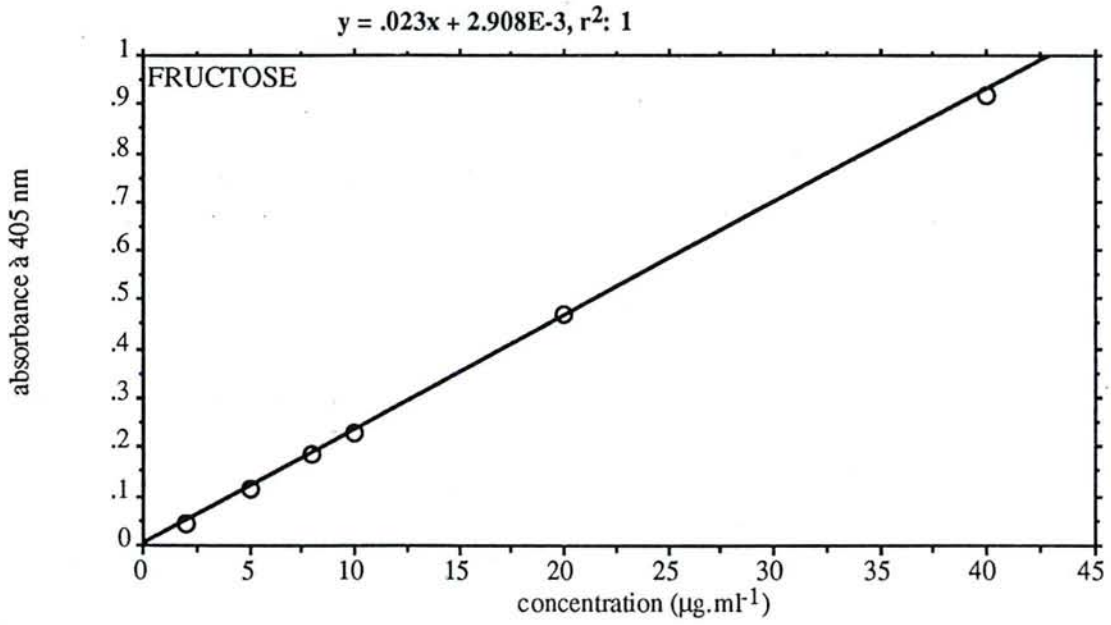
## solution mère d'oligoéléments:

- molybdate d'ammonium	0.5 g.l <sup>-1</sup>
- acide borique	15 g.l <sup>-1</sup>
- sulfate de manganèse	20 g.l <sup>-1</sup>
- sulfate de zinc	10 g.l <sup>-1</sup>
- sulfate de cuivre	20.5 g.l <sup>-1</sup>

Courbe étalon pour le dosage des protéines par colorimétrie (Bradford, 1976).



Courbes étalons pour les dosage du fructose et du glucose par colorimétrie (Dische, 1962).





**LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX**

- Figure 1: Facteurs abiotiques et biotiques impliqués dans la composition biochimique du phylloplan intervenant dans le choix de la plante hôte par un insecte. 3
- Figure 2: Présentation des différents niveaux de la feuille étudiés chez le laurier cerise et le maïs. 5
- Figure 3: Extraction des sucres solubles et des acides organiques à trois niveaux de la feuille: la surface, le milieu intercellulaire et le milieu intracellulaire chez le laurier cerise et le maïs. 6
- Figure 4: Effet de l'inhibition des invertases de l'apoplaste de laurier cerise sur la quantité et la proportion des sucres solubles récoltés dans le milieu intercellulaire (IWF) (-I, sans inhibiteur; +I, avec inhibiteur), (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types) 8
- Figure 5: Effet de l'inhibition des invertases de l'apoplaste de maïs sur la quantité et la proportion des sucres solubles récoltés dans le milieu intercellulaire IWF (-I, sans inhibiteur; +I, avec inhibiteur), tous niveaux foliaires confondus. Effet très hautement significatif de l'inhibiteur  $\alpha = 0.001$  : \*\*\*. (moyenne de 12 répétitions, barres : écarts types) 8
- Figure 6: Quantité (a) et proportion (b) des sucres solubles dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise. Différence entre les trois sucres significative: \* ( $\alpha = 0.05$ ) et très hautement significative: \*\*\* ( $\alpha = 0.001$ ). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types). 11
- Figure 7: Quantité des acides organiques dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise. Différence entre les trois acides organiques hautement significative: \*\* ( $\alpha = 0.01$ ) et très hautement significative: \*\*\* ( $\alpha = 0.001$ ). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types). 11
- Figure 8: Quantité (a) et proportion (b) de sucres solubles dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de maïs avec distinction des niveaux foliaires (E0+2, E0 et E0-2). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types). 12
- Figure 9: Quantité des acides organiques dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de maïs, niveau E0. Différence entre les trois acides organiques hautement significative: \*\* ( $\alpha = 0.01$ ) et très hautement significative: \*\*\* ( $\alpha = 0.001$ ). (moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types).(moyenne de 4 répétitions, barres : écarts types). 12



- Figure 10: Quantité (a) et proportion (b) de sucres solubles dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise et de maïs (tous niveaux foliaires confondus). Différence significative entre le laurier et le maïs  $\alpha = 0.05$  : \*, hautement significative  $\alpha = 0.01$  : \*\*, très hautement significative  $\alpha = 0.001$  : \*\*\*. (moyenne de 4 répétitions pour le laurier, 12 pour le maïs, barres : écarts types). 13
- Figure 11: Quantité d'acides organiques dans les milieux intracellulaire et intercellulaire (IWF) et dans le phylloplan des feuilles de laurier cerise et de maïs (niveau E0). Différence significative entre le laurier et le maïs  $\alpha = 0.05$  : \*, hautement significative  $\alpha = 0.01$  : \*\*, très hautement significative  $\alpha = 0.001$  : \*\*\*. (moyenne de 4 répétitions pour le laurier, 12 pour le maïs, barres : écarts types). 13
- Figure 12: Structure de la cuticule des plantes (d'après Jeffree, 1986). W: cires épicuticulaires, CP: cuticule primaire, CL: cuticule secondaire, P: pectine et lamelle moyenne, CW: paroi cellulaire, PL: plasmalemme. 21
- Figure 13: Protocole d'extraction des cires cuticulaires pour les expérimentations de perméabilité. 22
- Figure 14: Dispositif expérimental de la perméabilité cuticulaire. 23
- Figure 15: Cinétique de passage du fructose ( $2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ), glucose ( $4 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) et saccharose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) à travers les cuticules isolées. Qt la quantité de sucre qui traverse le cuticule et mesurée dans le receveur au temps t. Q0, la quantité de sucre dans le donneur à  $t = 0$ . Les expériences de perméabilité ont été conduites avec 5 à 7 cuticules. Barres: écarts types. 26
- Figure 16: Comparaison de la composition en sucres solubles du phylloplan de laurier cerise déterminée expérimentalement (exp.) et théoriquement (théo.) à partir des expériences de perméabilité des cuticules isolées. Différence significative, \* ( $\alpha = 0.05$ ) entre les deux déterminations. (moyenne de 4 répétitions, barres: écarts types). 27
- Figure 17: Cinétique de passage du fructose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans le donneur) à travers les cuticules isolées témoins (CM), strippées (SCM) et décirage (DCM). Qt la quantité de sucre qui traverse le cuticule et mesurée dans le receveur au temps t. Q0, la quantité de sucre dans le donneur à  $t = 0$ . Les expériences de perméabilité ont été conduites avec 6 à 8 cuticules. Barres: écarts types. 27
- Figure 18: Cinétique de passage du glucose ( $15 \text{ mg.ml}^{-1}$  dans le donneur) à travers les cuticules isolées témoins (CM), strippées (SCM) et décirage (DCM). Qt la quantité de sucre



qui traverse le cuticule et mesurée dans le receveur au temps  $t$ .  $Q_0$ , la quantité de sucre dans le donneur à  $t = 0$ . Les expériences de perméabilité ont été conduites avec 5 à 8 cuticules. Barres: écarts types. 27

Figure 19: Quantité de sucres solubles qui traverse les cuticules après 24 h d'expérimentation. DCM30, DCM100, 30 et 100 s de trempage dans le chloroforme. a: différence de passage entre DCM100 et le témoin, b: entre DCM30 et DCM100, \*\*: hautement significative ( $\alpha = 0.01$ ) et \*: significative ( $\alpha = 0.05$ ). (moyenne de 5 membranes, barres: écarts types). 29

Figure 20: Les classes principales de substances chimiques constituant les cires cuticulaires des plantes (modifié d'après Juniper et Jeffree, 1983). 35

Figure 21: Protocole de récupération des sucres dans les cires cuticulaires de laurier cerise. 37

Figure 22: Résultat d'une séparation des cires cuticulaires par chromatographie sur couche mince (gel de silice G, solvant benzène, sauf spécification) ; les constituants des cires sont comparés à des standards connus, leur morphologie cristalline est indiquée (d'après Jeffree, 1986). 38

Figure 23: Cinétique d'extraction des lipides solubles cuticulaires de laurier cerise, avec représentation des quatre classes: alcools primaires (AOH laires), alcanes (AK), acides gras libres (AGI), acides gras estérifiés (AGe) et leur somme (Total). 40

Figure 24: Cinétique d'extraction des alcanes avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes, de C18 à C25 et chaînes longues de C26 à C35. 41

Figure 25: Cinétique d'extraction des alcools primaires avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes de C22 à C25, chaînes longues de C26 à C34. 42

Figure 26: Spectre de masse du triméthylsilyléther du pentacosanol. 42

Figure 27: Cinétique d'extraction des acides gras libres avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes de C16 à C24 et chaînes longues de C26 à C30. 42

Figure 28: Cinétique d'extraction des acides gras estérifiés avec distinction des longueurs de chaînes. Chaînes courtes de C16 à C25 et chaînes longues de C26 à C32. 43

Figure 29: Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide pentacosanoïque. 43

Figure 30: Comparaison de l'extraction des SCL par percolation de chloroforme et par trempage dans le chloroforme pour un même temps d'application du solvant (210 s) et pour quatre classes chimiques constituant les SCL et leur total (AK: alcanes, AOH Iaires: alcools primaires, AGe: acides gras estérifiés, AGI: acides gras libres). Différence entre la percolation et le trempage significative \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significative \*\*:  $\alpha = 0.01$ , et très hautement significative \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (Moyenne de 4 répétitions pour la percolation et 3 pour le trempage ; barres = écarts types). 44

Figure 31: Comparaison de l'extraction des chaînes courtes et des chaînes longues des SCL par percolation de chloroforme et par trempage dans le chloroforme pour un même temps d'application du solvant (210 s) et pour quatre classes chimiques constituant les SCL (AK: alcanes, AOH Iaires: alcools primaires, AGe: acides gras estérifiés, AGI: acides gras libres). Différence entre la percolation et le trempage significative \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significative \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significative \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (Moyenne de 4 répétitions pour la percolation et 3 pour le trempage ; barres = écarts types). 44

Figure 32: Quantification de quatre classes de cires extraites par trois méthodes: le stripping, la percolation de chloroforme et le trempage dans le chloroforme pendant 30 et 100 s a: différence d'extraction entre le stripping et la percolation, b: entre 30 s de trempage et le stripping, c: entre 100 s de trempage et le stripping, d: entre 30 s de trempage et la percolation, e: entre 100 s de trempage et la percolation. Les différences sont significatives \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significatives \*\*:  $\alpha = 0.01$ , et très hautement significatives \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (moyenne de 5 répétitions pour les trempages, et 4 pour la percolation et le stripping, barres: écarts types) 45

Figure 33: Quantification des chaînes courtes des quatre classes de cires extraites par trois méthodes: le stripping, la percolation de chloroforme et le trempage dans le chloroforme pendant 30 et 100 s. a: différence d'extraction entre le stripping et la percolation, b: entre 30 s de trempage et le stripping, c: entre 100 s de trempage et le stripping, d: entre 30 s de trempage et la percolation, e: entre 100 s de trempage et la percolation. Les différences sont significatives, \*:  $\alpha = 0.05$ , hautement significatives \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significatives \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (moyenne de 5 répétitions pour les trempages et 4 pour la percolation et le stripping, barres: écarts types). 46

Figure 34: Quantification des chaînes longues des quatre classes de cires extraites par trois méthodes: le stripping, la percolation de chloroforme et le trempage dans le chloroforme



- pendant 30 et 100 s. a: différence d'extraction entre le stripping et la percolation, b: entre 30 s de trempage et le stripping, c: entre 100 s de trempage et le stripping, d: entre 30 s de trempage et la percolation, e: entre 100 s de trempage et la percolation. Les différences sont hautement significatives \*\*:  $\alpha = 0.01$  et très hautement significatives \*\*\*:  $\alpha = 0.001$ . (moyenne de 5 répétitions pour les trempages et 4 pour la percolation et le stripping, barres: écarts types). 46
- Figure 35: Cinétique de libération des sucres solubles dans les cires cuticulaires de laurier cerise. 47
- Figure 36: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des alcanes avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes, de C18 à C25 et chaînes longues de C26 à C35. 48
- Figure 37: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des alcools primaires avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes, de C22 à C25 et chaînes longues de C26 à C34. 48
- Figure 38: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des acides gras libres avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes, de C16 à C24 et chaînes longues de C26 à C30. 49
- Figure 39: Comparaison de la cinétique d'extraction des sucres solubles totaux et des acides gras estérifiés avec distinction des longueurs de chaînes dans les cires cuticulaires de laurier cerise. Chaînes courtes, de C16 à C25 et chaînes longues de C26 à C32. 49
- Figure 40: Solubilité de différentes classes chimiques à 20°C dans le chloroforme (d'après Riederer et Schneider, 1989). 50
- Figure 41: Modèle d'alignement moléculaire des cires intracuticulaires (dimensions non réelles); les chaînes aliphatiques s'ordonnent perpendiculairement par rapport à la surface foliaire. Les points en de chaîne correspondent aux groupes fonctionnels des molécules (d'après Riederer et Schneider, 1990). 52
- Figure 42: Études réalisées aux différents niveaux de la feuille de laurier cerise. 54



Tableau 1: Dosage de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et des protéines dans le liquide de lavage du milieu intercellulaire (IWF) et le l'extrait soluble total de feuille (TLSE) chez le laurier cerise et le maïs (moyenne de 4 répétitions ± écarts types).....	7
Tableau 2: Conditions d'analyse chromatographiques des sucres solubles et des acides organiques.....	9
Tableau 3: Sucres solubles contenus dans l'apoplaste et le milieu intracellulaire de différentes espèces, en référence à la littérature.....	17
Tableau 4: Perméance des cuticules isolées (CM, témoin) de la feuille de laurier cerise au fructose (2 mg.ml <sup>-1</sup> ), au glucose (4 mg.ml <sup>-1</sup> ) et au saccharose (15 mg.ml <sup>-1</sup> ) dans la solution du donneur.....	26
Tableau 5: Perméance des membranes cuticulaires témoins (CM), strippées (SCM) et décirées (DCM) au glucose et au fructose à 15 mg.ml <sup>-1</sup> dans la solution du donneur.....	28
Tableau 6: Conditions d'analyse chromatographiques des alcanes et des alcools primaires. ....	39
Tableau 7: Conditions d'analyse chromatographiques des acides gras.....	39
Tableau 8: Conditions d'analyse chromatographiques en CPG-SM.....	39
Tableau 9: Proportions relatives des 4 classes extraites à 210 s de trempage dans le chloroforme.....	40
Tableau 10: Pourcentage des homologues constituants 4 classes chimiques des lipides solubles cuticulaires extraits à 210 s de trempage dans le chloroforme.....	41
Tableau 11: Pourcentages relatifs de quatre classes de lipides solubles cuticulaires extraits des cuticules de laurier cerise par percolation et trempage pendant 210 s d'application du chloroforme.....	44
Tableau 12: Pourcentages relatifs de quatre classes de lipides solubles cuticulaires extraits des cuticules de laurier cerise par percolation et trempage pendant 210 s d'application du chloroforme.....	45

Tableau 13: Pourcentage des homologues constituant 4 classes chimiques des lipides solubles cuticulaires extraits selon différentes techniques. .... 46

Tableau 14: Coefficients de corrélation calculés sur toute la cinétique d'extraction des cires et des sucres avec distinction des longueurs de chaînes pour les cires (CC: chaînes courtes, CL: chaînes longues). .... 48

Tableau 15: Différentes méthodes d'extraction des cires cuticulaires (d'après Riederer et Schneider, 1989). ns: non spécifié..... 51

**Résumé:** La qualité de l'environnement biochimique de la surface des feuilles est importante pour la reconnaissance et la colonisation d'une plante par les insectes et les micro-organismes. La composition en métabolites primaires analysée dans le phylloplan a été mise en relation avec celle des deux compartiments foliaires sources: les milieux intracellulaire et intercellulaire ou "apoplaste" chez le laurier cerise et le maïs. Quantitativement, les métabolites primaires recueillis en surface représentent 0.5 à 5% de ceux analysés dans l'apoplaste et 1/20 000ème de ceux du milieu intracellulaire. Qualitativement, les proportions en sucres solubles de la surface ressemblent à celles du compartiment intracellulaire, et pour les deux espèces, pouvant donner aux insectes ou aux micro-organismes une information sur l'état physiologique de la plante. La qualité et la quantité des métabolites primaires détectés dans le phylloplan dépendent de caractéristiques chimiques et des propriétés de la cuticule, principale barrière à leur passage vers la surface. L'étude du passage de ces composés a été réalisée sur des cuticules isolées de laurier cerise. La perméabilité de ces cuticules aux sucres est sélective. La perméabilité au glucose est plus importante que celle au fructose et au saccharose. Les cires épicuticulaires n'influent pas sur ce passage, contrairement aux cires intracuticulaires. Le rôle de la qualité de la cuticule en relation avec le passage des sucres a été étudié en utilisant comme paramètres les lipides solubles cuticulaires. La libération des sucres contenus dans la cuticule est liée à l'extraction des composés les plus polaires des cires, les acides gras libres et estérifiés. L'extraction de ces mêmes substances lors des expériences de perméabilité paraissent augmenter le passage des sucres.

**Mots clés:** *Prunus laurocerasus*, *Zea mays*, sucres solubles, phylloplan, apoplaste, milieu intracellulaire, cuticule isolée, perméabilité, lipides cuticulaires solubles.

**Abstract:** The quality of the biochemical environment of the surface of the leaves is important for the recognition and the colonisation of the host plant by insects and micro-organisms. The primary metabolites composition has been related to that of the two source compartments: the intracellular and intercellular medium in cherish laurel and in maize. Quantitatively, the primary metabolites found on the leaf surface represent 0.5 to 5 % of those analysed in the apoplast and 1/20000 of those in the intracellular compartment. Qualitatively, the proportions of soluble carbohydrates of the surface seem similar to that of the intracellular compartment for the two species, thus giving the insects or micro-organisms an information about the physiological state of the plant. Quality and quantity of the primary metabolites detected at the leaf surface level also depend on the chemical characteristics and properties of the cuticle, which is the main barrier of their passage to the surface. The study of the passage of these compounds has been carried out on isolated cuticles of cherish laurel leaves. The permeability of these cuticles to sugars is selective. Permeability to glucose is more important than that to fructose and to sucrose. Epicuticular waxes do not influence this passage, unlike intracuticular waxes. The role of the quality of the cuticle related to the passage of sugars has been studied using soluble cuticular lipids as parameters. The release of sugars contained in the cuticle is linked to the extraction of the polar compounds of the cuticle, the free fatty acids and esterified fatty acids. The extraction of these same substances during the permeability experiments seems to increase the passage of the sugars.

**Key words:** *Prunus laurocerasus*, *Zea mays*, soluble carbohydrates, phylloplane, apoplast, intracellular medium, isolated cuticle, permeability, soluble cuticular lipids.



Nom : STAMMITTI

Prénom : Linda

DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY-I  
en BIOLOGIE VÉGÉTALE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 18 AVR. 1995 - 40128

Le Président de l'Université





**Résumé:** La qualité de l'environnement biochimique de la surface des feuilles est importante pour la reconnaissance et la colonisation d'une plante par les insectes et les micro-organismes. La composition en métabolites primaires analysée dans le phylloplan a été mise en relation avec celle des deux compartiments foliaires sources: les milieux intracellulaire et intercellulaire ou "apoplaste" chez le laurier cerise et le maïs. Quantitativement, les métabolites primaires recueillis en surface représentent 0,5 à 5% de ceux analysés dans l'apoplaste et 1/20 000ème de ceux du milieu intracellulaire. Qualitativement, les proportions en sucres solubles de la surface ressemblent à celles du compartiment intracellulaire, et pour les deux espèces, pouvant donner aux insectes ou aux micro-organismes une information sur l'état physiologique de la plante. La qualité et la quantité des métabolites primaires détectés dans le phylloplan dépendent de caractéristiques chimiques et des propriétés de la cuticule, principale barrière à leur passage vers la surface. L'étude du passage de ces composés a été réalisée sur des cuticules isolées de laurier cerise. La perméabilité de ces cuticules aux sucres est sélective. La perméabilité au glucose est plus importante que celle au fructose et au saccharose. Les cires épicuticulaires n'influent pas sur ce passage, contrairement aux cires intracuticulaires. Le rôle de la qualité de la cuticule en relation avec le passage des sucres a été étudié en utilisant comme paramètres les lipides solubles cuticulaires. La libération des sucres contenus dans la cuticule est liée à l'extraction des composés les plus polaires des cires, les acides gras libres et estérifiés. L'extraction de ces mêmes substances lors des expériences de perméabilité paraissent augmenter le passage des sucres.

**Mots clés:** *Prunus laurocerasus*, *Zea mays*, sucres solubles, phylloplan, apoplaste, milieu intracellulaire, cuticule isolée, perméabilité, lipides cuticulaires solubles.

**Abstract:** The quality of the biochemical environment of the surface of the leaves is important for the recognition and the colonisation of the host plant by insects and micro-organisms. The primary metabolites composition has been related to that of the two source compartments: the intracellular and intercellular medium in cherry laurel and in maize. Quantitatively, the primary metabolites found on the leaf surface represent 0.5 to 5% of those analysed in the apoplast and 1/20000 of those in the intracellular compartment. Qualitatively, the proportions of soluble carbohydrates of the surface seem similar to that of the intracellular compartment for the two species, thus giving the insects or micro-organisms an information about the physiological state of the plant. Quality and quantity of the primary metabolites detected at the leaf surface level also depend on the chemical characteristics and properties of the cuticle, which is the main barrier of their passage to the surface. The study of the passage of these compounds has been carried out on isolated cuticles of cherry laurel leaves. The permeability of these cuticles to sugars is selective. Permeability to glucose is more important than that to fructose and to sucrose. Epicuticular waxes do not influence this passage, unlike intracuticular waxes. The role of the quality of the cuticle related to the passage of sugars has been studied using soluble cuticular lipids as parameters. The release of sugars contained in the cuticle is linked to the extraction of the polar compounds of the cuticle, the free fatty acids and esterified fatty acids. The extraction of these same substances during the permeability experiments seems to increase the passage of the sugars.

**Key words:** *Prunus laurocerasus*, *Zea mays*, soluble carbohydrates, phylloplane, apoplast, intracellular medium, isolated cuticle, permeability, soluble cuticular lipids.