

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
MÉLANIE BOUTOUR

PROTECTION CONTRE LE STRESS PHOTOOXYDANT CHEZ
DES FEUILLES D'ÉRABLE ARGENTÉ (*ACER SACCHARINUM* L.)
GRÂCE À L'OXYDATION DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES
CARACTÉRISÉE PAR VOLTAMMÉTRIE CYCLIQUE

AOÛT 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Guy Samson pour son précieux soutien à la réalisation des expérimentations et à la rédaction de l'article et du mémoire. Je suis aussi reconnaissante envers le professeur Benoit Daoust pour son aide avec la voltammétrie ainsi qu'envers le professeur Robert Carpentier et son équipe pour leur appui concernant les processus de photosynthèse. Finalement, je tiens à souligner la contribution du CRNSG pour le financement de certains équipements.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
RÉSUMÉ.....	ix
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte général et problématique	1
1.2 Objectifs et méthodologie.....	3
 CHAPITRE II	
REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 Aperçu des réactions photochimiques de la photosynthèse.....	5
2.2 La photoinhibition	6
2.3 Degré de photoinhibition estimé par fluorescence chlorophyllienne	7
2.4 Les radicaux libres.....	9
2.5 Mécanismes de photoprotection	11
2.5.1 Cycle des xanthophylles.....	12
2.5.2 Cycle Halliwell-Asada	12
2.5.3 Pouvoir antioxydant des composés phénoliques.....	13
2.6 Composés phénoliques	14
2.6.1 Propriétés des composés phénoliques.....	14
2.6.2 Détoxification des radicaux libres par les composés phénoliques	16
2.7 Voltammétrie cyclique.....	21
2.7.1 Utilisation de la voltammétrie cyclique pour caractériser l'oxydation <i>in planta</i> des composés phénoliques lors de stress oxydants	21
2.7.2 Paramètres de mesure de la voltammétrie	24
 CHAPITRE III	
PROTECTION AGAINST ACUTE PHOTOOXIDATIVE STRESS BY THE OXIDATION OF A POOL OF POLYPHENOLS IN SILVER MAPLE LEAVES (<i>ACER SACCHARINUM</i> L.)	28
3.1 Résumé en français	28
3.2 Article	29

CHAPITRE IV	
EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE L'AJOUT D'EXTRAIT DE FEUILLES D'ÉRABLE SUR L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE L'ÉPIGALLOCATECHINE GALLATE MESURÉE PAR VOLTAMMÉTRIE	55
4.1 Introduction.....	55
4.2 Matériel et méthode	58
4.2.1 Solutions	58
4.2.2 Voltammétrie	59
4.3 Résultats.....	60
4.3.1 Voltammogrammes de l'acide ascorbique	60
4.3.1.1 Voltammogrammes de l'acide ascorbique à différentes concentrations en absence d'extraits de feuilles d'érable argenté.....	60
4.3.1.2 Voltammogrammes de l'acide ascorbique à différentes concentrations en présence d'extraits de feuilles d'érable argenté.....	61
4.3.2 Voltammogrammes du gallate d'épigallocatechine.....	63
4.3.2.1 Voltammogrammes du gallate d'épigallocatechine à différentes concentrations en absence d'extrait de feuilles d'érable argenté	63
4.3.2.2 Voltammogrammes du gallate d'épigallocatechine à différentes concentrations en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté	65
4.4 Discussion.....	67
4.5 Conclusion.....	69
CHAPITRE V	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	71
PERSPECTIVES D'AVENIR.....	74
BIBLIOGRAPHIE.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
2.1 Processus de la photosynthèse (Meyer et coll. 2004)	6
2.2 Courbe de fluorescence chlorophyllienne typique (Maxwell & Johnson, 2000). MB = faible lumière modulée; SP = flash de lumière saturante; AL = lumière actinique	9
2.3 Cycle de détoxification du peroxyde par l'ascorbate peroxydase (Davey et coll. 2000)	13
2.4 Pouvoir antioxydant de 112 plantes médicinales chinoises en fonction de leur concentration en composés phénoliques solubles (Cai et coll. 2004). (DW = masse sèche)	15
2.5 Structure chimique typique (a) des flavonoïdes (Yamasaki et coll. 1997), (b) des Flavones (Dixon et Paiva 1995) et (c) des catéchines (Kilmartin et Hsu 2003).....	16
2.6 Mécanisme hypothétique de la détoxification du peroxyde d'hydrogène par les composés phénoliques (F), via l'enzyme guaïacol peroxydase (vPX) (Yamasaki et coll. 1997).....	17
2.7 Schéma de la diffusion du H ₂ O ₂ jusque dans l'épiderme où il pourra être détoxifié par les flavonoïdes (Yamasaki et coll. 1997)	18
2.8 Coupe transversale d'une feuille de <i>Phillyrea latifolia</i> L. acclimatée à l'ombre (à gauche) ou au soleil (à droite). Le jaune indique la présence de flavonoïdes (Tattini et coll. 2000)	19
2.9 Graphiques du quenching de la fluorescence (bleu) et de la fluorescence des flavonoïdes (jaune) en fonction de la position (0 : face adaxiale) dans la coupe transversale d'une feuille de <i>Phillyrea latifolia</i> L. acclimatée à l'ombre (en haut) ou au soleil (en bas) suite à un stress photooxydant (lumière bleue de 2800 µmol m ⁻² s ⁻¹) (Agati 2007)	20

2.10	Voltammogrammes de la catéchine à différentes concentrations mesurés à 100 mV s ⁻¹ avec une électrode de carbone de 3 mm à pH de 3,6. Le signal de base a été soustrait (Kilmartin et coll. 2001a).....	23
2.11	Voltammogramme de la lutéoline mesurée à 100 mV s ⁻¹ avec une électrode de carbone de 3 mm dans un tampon phosphate à pH 7 (Filipiak 2001).....	23
2.12	Graphique du courant du pic d'oxydation de la catéchine et de l'acide caféique en fonction de leur concentration. Les voltammogrammes ont été mesurés à 100 mV s ⁻¹ avec une électrode de carbone de 3 mm à pH de 3,6 (Kilmartin et coll. 2001a)	25
2.13	Relation linéaire (55 mV/pH) entre le potentiel d'oxydation et le pH de la lutéilone (Filipiak 2001).	26
2.14	Voltammogrammes de lutéoline dans un tampon McIlvain à un pH de 3.0 (courbe 1), un pH de 5.0 (courbe 2) ou un pH de 7.0 (courbe 3) (Filipiak 2001).....	26
2.15	Voltammogrammes de la lutéoline (courbe 2), de la quercétine (courbe 3) et d'un mélange de lutéoline et de quercétine (1 :1) (courbe 1) dans un tampon PBS à un pH de 5,1 (Filipiak 2001).....	27
4.1	Voltammogrammes de différentes concentrations d'AsA, soit 0,1 mM (courbe continue noire), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges) et 1,25 mM (courbe de traits et pointillés bleus). Le courant a été mesuré à 50 mV s ⁻¹ par une électrode de carbone vitrifiée de 3 mm de diamètre dans un tampon phosphate 100 mM à un pH final de 5,8	60
4.2	Graphique de la position du pic d'oxydation (potentiel d'oxydation) en fonction de la concentration de l'AsA	61
4.3	Graphiques (a) du courant du pic d'oxydation et (b) du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'AsA. a : $y = 8,0x + 1,7$; b : $y = 86x + 50$	61
4.4	Voltammogrammes d'extrait de feuilles d'érable argenté en présence de différentes concentrations d'AsA, soit 0,0 mM (courbe vert pâle), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges) et 1,25 mM (courbe de traits longs bleus).....	62

4.5	Graphique de la position du pic d'oxydation (potentiel d'oxydation) en fonction de la concentration de l'ASA, en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté	63
4.6	Graphiques (a) du courant du pic d'oxydation et (b) du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'AsA, en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté. a : $y = 8,6x + 6,1$; b : $y = 96x + 128$	63
4.7	Voltammogrammes de différentes concentrations d'EGCG, soit 0,1 mM (courbe continue noire), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges) et 1,25 mM (courbe de traits et pointillés bleus)	64
4.8	Graphiques de la position du deuxième pic d'oxydation (a) et du troisième pic d'oxydation (b) (potentiel d'oxydation) en fonction de la concentration de l'EGCG	65
4.9	Graphiques (a) du courant du deuxième (cercles pleins) et troisième pic d'oxydation (cercles vides) et (b) du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'EGCG. a : 2 ^{ème} pic : $y = 8,4x + 3,3$; 3 ^{ème} pic : $y = 3,0x + 5,2$; b : $y = 122x + 36$	65
4.10	Voltammogrammes d'extrait de feuilles d'érable argenté en présence de différentes concentrations d'EGCG, soit 0,0 mM (courbe vert pâle), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges), 1,25 mM (courbe de traits longs bleus) et 2,25 mM (courbe d'un trait et deux pointillés noirs)	66
4.11	Graphiques du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'EGCG, en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté. $y = 26x + 120$	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AsA	Acide ascorbique
ATP	Adénosine triphosphate
EGCG	Gallate d'épigallocatechine (de l'anglais epigallocatechin gallate)
Fm	Fluorescence chlorophyllienne maximale pour une feuille adaptée à l'obscurité
Fo	Fluorescence chlorophyllienne minimale en absence de lumière actinique
Fv	Fluorescence variable ($F_v = F_m - F_o$)
Ft	État stationnaire de la fluorescence
Fv/Fm	Rendement photochimique maximum du PSII
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
MV	Méthylviologène
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
P680	Chlorophylle--a spéciale du centre réactionnel du PSII
PBS	De l'anglais phosphate-buffered saline
Phéo	Phéophytine
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
O ₂ ^{•-}	Radical superoxyde
¹ O ₂	Oxygène singulet
•OH	Radical hydroxyle
Q ₀₋₁₂₀₀	Équivalents réducteurs (μC)
Q _A	Plastoquinone A
Q _B	Plastoquinone B

RÉSUMÉ

Problématique

Chez les végétaux, l'excès d'énergie lumineuse absorbée par rapport à la capacité d'assimilation de la photosynthèse favorise la production de radicaux libres pouvant causer des dommages oxydants et ainsi diminuer la productivité végétale. Le principal mécanisme de détoxification des radicaux libres dans les chloroplastes est le cycle Halliwell-Asada, une voie enzymatique utilisant notamment l'acide ascorbique comme donneur d'électrons. Plusieurs observations suggèrent l'existence d'une deuxième ligne de défense contre les dommages oxydants située principalement dans les vacuoles, par laquelle les composés phénoliques sont oxydés par des peroxydases de classe III pour détoxifier des radicaux libres. Cependant, l'importance de cette fonction physiologique des composés phénoliques est toujours matière à débat, principalement à cause de leur localisation dans les vacuoles, et particulièrement celles des cellules épidermiques, donc loin du principal site de production de radicaux libres. Aussi, à ce jour aucune étude n'a démontré une corrélation entre l'oxydation des composés phénoliques et les dommages oxydants engendrés lors de stress environnementaux.

Objectifs

Afin de démontrer l'implication des composés phénoliques dans la protection contre les dommages oxydants, le premier objectif de ce projet de maîtrise est de démontrer une corrélation temporelle entre les dommages photooxydants induits lors de la photoinhibition et les changements des propriétés d'oxydoréduction des composés phénoliques caractérisées par la voltammétrie cyclique. Puisque l'interprétation des résultats de voltammétrie peut être hasardeuse pour des mélanges complexes tels que les extraits de feuille d'érable compte tenu des interactions possibles entre les différents composés et l'électrode, le second objectif de ce mémoire est de caractériser les interactions entre les composés présents dans l'extraits de feuilles d'érable argenté et

deux antioxydants communs, soit l'acide ascorbique (AsA) et le gallate d'épigallocatechine (EGCG).

Méthodologie

Les expérimentations ont été menées sur des feuilles d'érable argenté (*Acer saccharinum* L.) développées en plein soleil. Dans une première expérience, les feuilles récoltées ont été infiltrées avec de l'eau ou une solution de méthylviologène (MV) (0,5 mM) puis exposées à une intense lumière bleue ($2800 \mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) pendant un temps variant entre 0 et 4 heures. Le degré de photoinhibition des feuilles a été estimé par le rendement photochimique maximum du photosystème II mesuré par fluorescence chlorophyllienne (Fv/Fm) alors que les dommages oxydants ont été estimés par la diminution de la concentration en chlorophylles $a + b$. La concentration en composés phénoliques a été mesurée par réactifs Folin-Ciocalteu et par la mesure de l'absorbance UV d'un extrait méthanolique de feuille, alors que les propriétés d'oxydoréduction des composés phénoliques ont été caractérisées par voltammétrie cyclique. Dans une deuxième expérience visant à mieux interpréter les voltammogrammes des mélanges complexes de composés phénoliques, les interactions entre les composés phénoliques présents dans les extraits de feuilles d'érable argenté ainsi que l'AsA et l'EGCG à différentes concentrations (0,1 mM à 2,25 mM), ont été caractérisées par voltammétrie.

Résultats

Le degré de photoinhibition est plus élevé chez les feuilles infiltrées par le MV que les feuilles non traitées. Seulement chez les feuilles traitées au MV, l'intense illumination a causé une diminution de la concentration des composés phénoliques suivie, après deux heures d'illumination, d'une diminution marquée de la concentration en chlorophylles. Les voltammogrammes révèlent l'oxydation de composés phénoliques ayant un faible potentiel d'oxydation (entre 0 et 400 mV) par rapport à électrode de référence Ag/AgCl.

Les voltammogrammes de l'acide ascorbique ou de l'EGCG purs (sans extrait de feuilles d'érable) montrent que la hauteur de leur pic d'oxydation ainsi que l'aire sous la courbe augmentent linéairement avec leur concentration. De plus, l'augmentation de la concentration déplace leur oxydation vers des potentiels plus élevés. En présence d'extrait de feuilles d'érable argenté, les composés de ces dernières retardent l'oxydation de l'AsA (le pic d'oxydation est déplacé vers des potentiels supérieurs), mais n'affecte pas la relation linéaire entre la quantité de molécules d'AsA oxydées (la hauteur du pic et l'aire sous la courbe) et leur concentration. Pour l'EGCG en présence de l'extrait de feuilles d'érable, son oxydation n'est pas seulement retardée, mais aussi fortement restreinte. La pente de la droite entre la concentration d'EGCG en solution en présence des composés des feuilles d'érable et la quantité de molécules oxydées correspond à seulement 25 % de celle mesurée en absence de l'extrait.

Discussion

Nos résultats suggèrent que les dommages photooxydants dans les feuilles d'érable argenté surviennent après qu'un groupe de composés phénoliques les plus facilement oxydables aient été employés pour détoxifier les radicaux libres. Le MV a favorisé l'utilisation du pouvoir antioxydant des composés phénoliques puisque ce traitement accentue le stress oxydant tout en désactivant le principal mécanisme de protection (cycle Halliwell-Asada). D'après les composés phénoliques présents habituellement dans les feuilles d'érable argenté, les spectres d'absorbance UV des extraits à l'étude (spectres sans chlorophylle) ainsi que les courbes des voltammogrammes, l'EGCG apparaît être le composé phénolique utilisé dans la protection contre le stress oxydant. Cependant, un certain décalage a été observé entre nos voltammogrammes et celui de l'EGCG pure, probablement dû à l'interaction entre les différents composés de l'extrait. Nous avons d'ailleurs observé que lorsque la concentration de la solution d'AsA ou d'EGCG augmente, ces composés sont davantage adsorbés sur l'électrode et retardent ainsi les oxydations subséquentes. Les composés de l'extrait de feuille d'érable argenté influencent très peu l'oxydation de l'AsA si ce n'est que de la retarder, alors qu'ils empêchent partiellement l'oxydation de l'EGCG, probablement parce que les composés de l'extrait interagissent avec l'EGCG rendent ces derniers indisponibles pour

l'oxydation sur l'électrode. Le voltammogramme final d'un mélange n'est donc pas la somme parfaite des voltammogrammes des différents composés.

Conclusion

À notre connaissance, la voltammétrie cyclique n'avait jamais été utilisée pour l'étude des stress oxydants en physiologie végétale. Bien que les voltammogrammes soient difficiles à interpréter pour des mélanges complexes, la voltammétrie nous a permis d'appuyer l'hypothèse selon laquelle le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est utilisé pour limiter les dommages photooxydants lorsque le principal mécanisme de protection ne suffit pas.

Mots-clés

Pouvoir antioxydant, composés phénoliques, acide ascorbique, gallate d'épigallocatechine, guaïacol peroxydase, stress oxydant, photoinhibition, voltammétrie, cycle Halliwell-Asada

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Contexte général et problématique

Les végétaux sont sensibles aux changements des conditions de leur environnement. Parmi les ressources du milieu, la lumière se distingue des autres (eau, minéraux, température) par ses larges et rapides variations. Pour survivre sous de telles conditions, les plantes doivent d'une part avoir une grande efficacité photochimique sous faibles intensités lumineuses. D'autre part, elles doivent protéger leur appareil photosynthétique contre les possibles dommages causés par l'absorption d'un excès d'énergie lorsque la lumière devient trop intense. Ainsi, les plantes utilisent différents mécanismes de photoprotection pour moduler la proportion de l'énergie lumineuse absorbée qui sera transformée par des réactions photochimiques en énergie chimique stable (glucides), en fonction de leur capacité d'assimilation du CO₂.

Cependant, leurs mécanismes de régulation ont leurs limites. Un excès de lumière peut survenir pendant plusieurs heures lors des journées ensoleillées, excès qui est amplifié par des conditions non-optimales telles qu'un déficit hydrique, des basses températures, etc... L'énergie lumineuse absorbée génère alors un pouvoir réducteur (flux d'électrons) supérieur à ce qui peut être utilisé par la phase biochimique de la photosynthèse (le cycle de Calvin) (Long et coll.1994). Le pouvoir réducteur en surplus favorise la production de radicaux libres pouvant causer des photodommages et une diminution de la photosynthèse (photoinhibition). Ce stress photooxydant provoque donc une baisse significative de la productivité végétale. Par exemple, il a été estimé que lors des journées ensoleillées, la culture du maïs peut subir une diminution de productivité de 12 % à 30 % pour des températures de 30 °C et 10 °C respectivement (Zhu et coll. 2004).

Les radicaux libres sont des molécules hautement réactives dont le pouvoir oxydant peut dénaturer les composantes des cellules (Halliwell 2006). Le principal mécanisme de détoxification des radicaux libres est le cycle Halliwell-Asada (Asada

1999). Il s'effectue dans les chloroplastes, directement aux sites de production des radicaux libres avant que ceux-ci ne diffusent et réagissent avec les composantes cellulaires. Le cycle Halliwell-Asada est bien caractérisé. Il implique plusieurs enzymes antioxydantes et des antioxydants solubles (acide ascorbique et glutathione). En support au cycle Halliwell-Asada, lorsque celui-ci ne suffit plus à détoxifier les radicaux libres, plusieurs observations soutiennent que des composés phénoliques pourraient prendre la relève. Ces composés forment un groupe important de métabolites secondaires dans les végétaux, tant par leur diversité, leur concentration et leurs fonctions dont possiblement un rôle photoprotecteur (Edreva 2005). Cependant, l'efficacité du processus de détoxification par les composés phénoliques n'est toujours pas établie, notamment parce que les radicaux libres sont principalement produits dans les chloroplastes et les mitochondries alors que les composés phénoliques s'accumulent principalement dans les vacuoles des cellules épidermiques. Pour certains auteurs (Yamasaki et coll. 1997), leur localisation ne serait pas une contrainte au processus de détoxification, car certains radicaux libres (H_2O_2) sont facilement translocables (long temps de vie) et pourraient donc rejoindre les composés phénoliques jusque dans l'épiderme. De plus, il est déjà bien connu que les composés phénoliques démontrent une forte capacité antioxydante. Plusieurs composés phénoliques ont même une capacité antioxydante supérieure, sur une base molaire, à celle de l'acide ascorbique (Rice-Evans 2001). Cette capacité antioxydante est responsable, en partie du moins, de leur rôle reconnu dans la prévention des cancers chez l'humain (Hertog et coll. 1993). Si l'importance de la capacité antioxydante des composés phénoliques dans notre alimentation est bien reconnue, il est curieux de constater que l'importance physiologique *in planta* de cette capacité de détoxification des radicaux libres par les composés phénoliques demeure l'objet d'un débat persistant (Hernández et coll. 2008). Selon Hernández, la démonstration d'un tel rôle antioxydant *in planta* des composés phénoliques nécessite tout d'abord l'observation d'une corrélation temporelle entre les dommages oxydants et les variations des caractéristiques des composés phénoliques, ainsi qu'une meilleure caractérisation de leurs produits d'oxydation lors de stress oxydant.

La compréhension du rôle des composés phénoliques dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique est donc nécessaire et pourrait permettre de minimiser les

effets négatifs de la photoinhibition et éventuellement diminuer les pertes de rendement occasionnées par ce stress.

1.2 Objectifs et méthodologie

Le principal objectif de ce mémoire est de démontrer l'implication du pouvoir antioxydant des composés phénoliques dans les plantes lors de stress oxydants, en établissant une corrélation temporelle entre d'une part, les dommages photooxydants induits lors de la photoinhibition avec d'autre part, les changements de propriétés d'oxydoréduction des composés phénoliques ce qui, à notre connaissance n'a jamais été rapporté. Pour ce faire, des feuilles d'érable argenté ont été soumises à une forte intensité de lumière bleue pendant différentes périodes. Puis, nous avons analysé les variations temporelles *i*) de l'efficacité photochimique du photosystème II (premier site de la photoinhibition), *ii*) des concentrations en chlorophylles (dommages photooxydants non-spécifiques de l'appareil photosynthétique) et *iii*) des propriétés des composés phénoliques (concentrations et état d'oxydation). De plus, l'infiltration de méthylviologène dans les feuilles avant la période de photoinhibition a permis d'accentuer le stress oxydant d'abord en accélérant la formation de radicaux libres puis en inhibant un des principaux mécanismes de détoxification des radicaux libres soit le cycle Halliwell-Asada. Pour démontrer le rôle antioxydant des composés phénoliques lors d'un stress aigu de photoinhibition, l'hypothèse générale qui devra être vérifiée est que l'oxydation des composés phénoliques ainsi que la diminution de leur concentration précèdent l'accélération du taux de dommages oxydant.

Le degré de photoinhibition a été évalué par le rendement photochimique maximal des photosystèmes II (PSIIs) estimé par fluorescence chlorophyllienne. Aussi, la concentration en chlorophylles *a* et *b* a été mesurée et considérée comme une indication des dommages oxydants non-spécifiques de l'appareil photosynthétique. De plus, la concentration en composés phénoliques a été évaluée par un dosage chimique avec le réactif Folin-Ciocalteu et par des mesures de l'absorbance UV d'extraits méthanoliques des feuilles d'érable argenté. Quant à la caractérisation des propriétés d'oxydoréduction des composés phénoliques, nous avons utilisé la voltammétrie cyclique pour la première

fois, à notre connaissance, dans l'étude des stress oxydants en physiologie végétale. La voltammétrie cyclique est une méthode largement utilisée en électrochimie pour caractériser les propriétés d'oxydoréduction de composés purs en solution. Cette méthode est aussi employée pour estimer le pouvoir antioxydant de produits végétaux tels que les thés, vins, etc. Cependant, l'interprétation des voltammogrammes de tels mélanges complexes demeure hasardeuse compte tenu des multiples interactions pouvant se produire entre les composés en solution et leurs interactions à la surface de l'électrode. Ainsi, le second objectif de ce mémoire est de caractériser les interactions entre les composés phénoliques présents dans les extraits de feuilles d'érable argenté avec deux antioxydants communs, l'acide ascorbique (AsA) et le gallate d'épigallocatechine (EGCG, présent en grandes concentrations notamment dans le thé).

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Aperçu des réactions photochimiques de la photosynthèse

La lumière est vitale aux végétaux puisque sa transformation en énergie photochimique permet de générer le transport d'électrons et de protons qui résulteront en la synthèse de molécules énergétiques (ATP et NADPH) permettant de réduire le dioxyde de carbone (CO_2) en carbone organique (glucide) lors de la phase biochimique de la photosynthèse.

Tout d'abord, les photons sont absorbés par les pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes chez les algues vertes et les plantes supérieures) présents dans les antennes collectrices (Fig. 2.1). La majeure partie de l'énergie lumineuse absorbée sera transférée sous forme d'excitons aux centres réactionnels des photosystèmes I (PSIs) et photosystèmes II (PSIIs) pour être utilisée dans les réactions photochimiques primaires. Au cours de son transfert vers les centres réactionnels, une fraction de l'énergie d'excitation sera perdue et réémise sous forme de chaleur ou de fluorescence. Dans les antennes du PSII, l'énergie d'excitation est canalisée vers la chlorophylle-*a* spéciale dénotée P680 au niveau du centre réactionnel. Son excitation provoque une réaction photochimique primaire, c.-à-d. la photooxydation de P680 en P680^+ , et la réduction de l'accepteur primaire d'électron, la phéophytine (Phéo^-). Cette séparation de charges ($\text{P680}^+\text{Phéo}^-$) initie un transfert d'électrons par lequel P680^+ regagne un électron en oxydant (photolyse) une molécule d'eau via la tyrozine Z au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. Pendant ce temps, la Phéo^- cèdera son électron aux accepteurs plastoquinones Q_A et Q_B . La Q_B , après avoir accepté deux électrons et pris deux protons du stroma, se détache de son site et migre dans les membranes internes des chloroplastes (les thylacoïdes) vers les complexes du cytochrome $\text{b}_6\text{-f}$ où elle sera oxydée. L'électron est ensuite transféré via la plastocyanine vers le centre réactionnel du PSI. Grâce à cet électron et à un photon provenant de l'antenne du PSI, un électron du centre réactionnel du PSI chemine jusqu'à la ferrédoxine, une protéine présente dans le stroma qui réduira le NADP^+ en NADPH à

l'aide d'une enzyme. En plus de produire le NADPH, le transport photosynthétique d'électrons génère un gradient de protons (ΔpH) qui s'accumulent dans le lumen des thylacoïdes suite à la photolyse de l'eau (en H^+ et O_2) et lors de l'oxydation des plastoquinones au niveau du cytochrome b_6-f . L'énergie de ce ΔpH est dissipée par le facteur de couplage (F-ATPase ou ATPsynthase) pour produire des molécules d'ATP. Les molécules de NADPH et d'ATP sont ensuite utilisées comme source d'énergie par le cycle de Calvin afin de réduire le CO_2 en glucides lors de la phase biochimique de la photosynthèse (Melis 1999). Ainsi, la phase biochimique de la photosynthèse est dépendante de la phase photochimique qui lui fournit les molécules de NADPH et d'ATP, tandis que la phase photochimique est dépendante de la phase biochimique qui régénère le $NADP^+$, l'ADP et le phosphate inorganique, essentiels au maintien du transport photosynthétique d'électrons (Chen et coll. 1992).

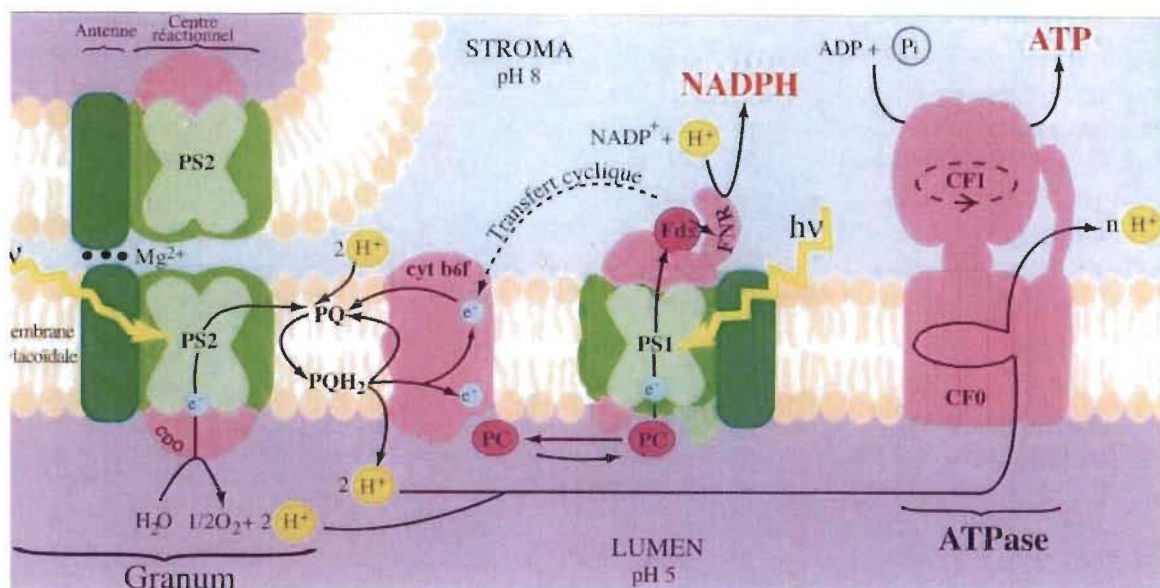


Figure 2.1 : Processus de la photosynthèse (Meyer et coll. 2004).

2.2 La photoinhibition

Lors de la photosynthèse, les PSII sont continuellement endommagés et remplacés. Lorsque le taux de photodommages excède le taux de photoréparation, il y a une accumulation de PSII inactifs et donc photoinhibition. Le taux de photodommages est directement proportionnel à l'intensité lumineuse absorbée par les PSII. La lumière, en

particulier les ultraviolets et la lumière bleue, inactive le complexe de dégagement d'oxygène du PSII en provoquant le relâchement des atomes de manganèse qui y sont liés. Cette photoinactivation du complexe de dégagement d'oxygène inhibe le transfert d'électrons de l'eau vers le centre réactionnel. Ceci prolonge le temps de vie de la forme oxydée de P680 dont l'accumulation augmente les chances que des molécules du PSII soient endommagées par oxydation (Nishiyama et coll. 2006; Hakala et coll. 2005).

Parallèlement aux photodommages, les PSIIs inactifs seront réparés en différentes étapes. L'étape limitante est le remplacement de la protéine D1 faisant partie du centre réactionnel du PSII (Allakhverdiev et Murata 2004). Si le taux de photodommage est déterminé par le taux d'excitation des PSIIs (plus précisément, le taux d'absorption de la lumière par le complexe de dégagement d'oxygène), le taux de réparation des PSIIs inactifs dépend quant à lui de différents facteurs physiologiques et environnementaux (Melis 1999). En effet, il est maintenant bien admis que le remplacement de la protéine D1 est accentué par l'augmentation de la production des radicaux libres lors de divers stress environnementaux comme une sécheresse, de basses températures, une carence minérale ou un surplus de lumière. Donc, les stress environnementaux augmentent les risques de photoinhibition non pas en favorisant les photodommages mais plutôt en ralentissant la réactivation des PSIIs (Murata et coll. 2007; Takahashi 2008).

2.3 Degré de photoinhibition estimé par fluorescence chlorophyllienne

Puisque le PSII constitue la principale composante de la chaîne photosynthétique à être affectée par la photoinhibition, la mesure de son efficacité photochimique maximale, soit la proportion de PSIIs opérationnels, est un bon moyen d'estimer le degré de photoinhibition de la plante. Une façon rapide et non destructive de déterminer l'efficacité photochimique maximale des PSIIs est la mesure du ratio de fluorescence chlorophyllienne F_v/F_m . (Maxwell et Johnson 2000).

Tel que mentionné plus haut, l'énergie lumineuse absorbée par les chlorophylles peut être utilisée soit lors des réactions photochimiques pour la photosynthèse où être réémise sous forme de chaleur ou de fluorescence. Lorsqu'une plante saine est adaptée à l'obscurité, les mécanismes de photoprotection régulant la dissipation de l'énergie sous

forme de chaleur sont désactivés (Li et coll. 2002). Dans ces conditions, l'efficacité du transfert de l'énergie absorbée et de son utilisation par les réactions photochimiques du PSII est alors maximale tandis que la portion de l'énergie dissipée sous forme de chaleur et perdue sous forme de fluorescence est minimale. Ainsi, lorsque l'on éclaire une feuille préalablement adaptée à l'obscurité avec une lumière non-actinique (c.-à-d. d'une trop faible intensité pour induire la photosynthèse), les PSIIs sont ouverts (c.-à-d tous les accepteurs d'électrons Q_A et Q_B sont oxydés) et leur efficacité photochimique est maximale. Dans cet état, la fluorescence chlorophyllienne est minimale (F_o) (Fig. 2.2). Si on éclaire la plante adaptée à l'obscurité avec une lumière saturante pendant un court moment (1-2 secondes), les Q_A deviennent réduites et les PSIIs deviennent fermés (c.-à-d. incapables de compléter les réactions photochimiques primaires). L'énergie absorbée par les PSIIs fermés ne pouvant pas passer en photochimie, la fluorescence est alors maximale (F_m). L'efficacité photochimique maximales des PSIIs peut être estimée par le paramètre F_v/F_m ($(F_m - F_o) / F_m$) (Maxwell et Johnson 2000). Le F_v/F_m est habituellement de 0,83 pour les plants sains. Cette valeur diminuera selon la proportion des PSIIs endommagés, et donc est représentative du degré de photoinhibition de la plante.

Si l'on soumet une feuille de façon prolongée à une lumière actinique, les accepteurs Q_A initialement réduits seront oxydés progressivement suite à la « réadaptation » de la feuille à la lumière par la réactivation du cycle de Calvin et l'ouverture des stomates. De plus, le mécanisme de dissipation de l'énergie par la chaleur se remet en place (voir section 2.4.1). La portion de l'énergie allant en photochimie et en dissipation par la chaleur augmente progressivement, se traduisant par la baisse de la fluorescence.

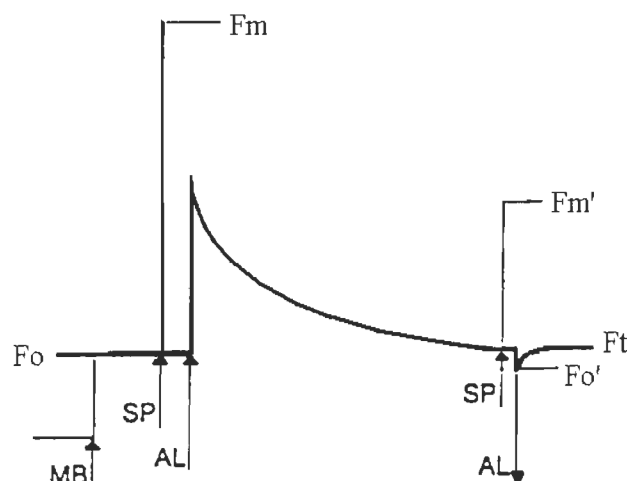


Figure 2.2 : Courbe de fluorescence chlorophyllienne typique (Maxwell & Johnson, 2000). MB = faible lumière modulée; SP = flash de lumière saturante; AL = lumière actinique.

2.4 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules produites par différentes réactions du métabolisme cellulaire. Ils peuvent avoir des effets néfastes sur l'intégrité des différentes composantes de la plante à cause de leur forte réactivité. Les radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et hydroxyle ($\cdot OH$) sont extrêmement réactifs, alors que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est le plus abondant est le moins oxydant.

Depuis longtemps, les radicaux libres ont donc été considérés comme des sous-produits métaboliques indésirables qui doivent être désactivés pour éviter des dommages oxydants non-spécifiques dans les cellules. Cette vue un peu simpliste s'est transformée récemment par les évidences montrant que les radicaux libres peuvent aussi jouer un rôle important en agissant comme des molécules signal impliquées dans la régulation de plusieurs processus biologiques, dont la réponse des végétaux aux stress environnementaux. En effet, une faible augmentation de la concentration des radicaux libres, notamment le H_2O_2 , peut induire la tolérance à un stress tandis que de fortes accumulations peuvent activer le processus de mort cellulaire programmée. Ainsi, la balance entre l'acclimatation aux stress ou la mort cellulaire dépend d'interactions complexes entre d'une part la production et l'utilisation du pouvoir réducteur des

radicaux libres générés par le flux d'électrons dans les chloroplastes, et d'autre part des antioxydants qui détoxifient ces radicaux libres et donc influe sur leur pouvoir de signalisation (Foyer et Noctor 2009; Mittler et coll. 2004).

Le transport d'électron de la photosynthèse est générateur de radicaux libres. Leur formation s'accélère lorsque le flux d'électrons est supérieur à la capacité d'assimilation de la photosynthèse c'est-à-dire la capacité du cycle de Calvin à renouveler l'accepteur terminal d'électrons NADP^+ (faible ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$), par exemple lors de certains stress limitant la capacité d'assimilation du CO_2 (basses températures, déficit hydrique, etc.) et/ou lors d'un excès de lumière. Les transporteurs d'électrons se retrouvent dans un état réduit et la chaîne photosynthétique devient saturée. La probabilité que le pouvoir réducteur soit acheminé vers un autre élément que ceux de la chaîne photosynthétique augmente. Il y a deux principaux sites de formation d'espèces réactives d'oxygène, soit au niveau du PSII et la réaction de Mehler du côté accepteur du PSI (Aro et coll. 1993; Forti et coll. 2006).

Dans le premier cas, soit au niveau du PSII, la réduction de la Q_A se fait plus rapidement que leur oxydation par la Q_B . Les Q_A et les phéophytines ne pouvant être réoxydées du côté accepteur du PSII, il y aura entrave à la circulation des électrons subséquents. Lors de la séparation de charge suivante au niveau du PSII, l'électron produit ne pourra pas aller vers les phéophytines. Les chlorophylles maintenant à l'état triplet réagiront avec l'oxygène ambiant pour former de l'oxygène singlet ($^1\text{O}_2$).

Dans le deuxième cas, les radicaux libres se forment au niveau du passage d'un électron entre la ferrédoxine du PSI et le NADP^+ . Les électrons pourront réagir avec l'oxygène moléculaire pour former des ions superoxydes qui seront en partie transformés en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase. Ces deux formes pourront aussi interagir entre elles pour former des radicaux hydroxyles très réactifs.

Les radicaux libres peuvent arracher des électrons aux molécules organiques, détruisant des composantes de la cellule tels des pigments photosynthétiques. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages oxydants en cascade et dégrader des lipides membranaires, des protéines et de l'ADN ce qui pourra entraîner la destruction des cellules (Halliwell 2006). Le PSII est particulièrement sensible aux radicaux libres.

De par leur potentiel oxydant, les radicaux libres inhibent certaines réactions, dont la synthèse du précurseur de la protéine D1 du centre réactionnel du PSII, puisqu'ils inhibent l'élongation des peptides durant l'étape de la translation (Takahashi 2008). De tous les radicaux libres, c'est particulièrement le H_2O_2 qui entrave la synthèse de la protéine D1 (Nishiyama 2001).

Une approche pour étudier les différents aspects de la photoinhibition causée par les dommages photooxydants est l'utilisation de l'inhibiteur méthylviologène (MV) (le principe actif de l'herbicide paraquat) puisque l'application d'une solution de MV sur les feuilles d'une plante favorise les photodommages. Le produit agit doublement sur la photoinhibition, d'abord en accélérant la formation de radicaux libres lors de la réaction de Mehler du côté accepteur du PSI, puis en inhibant un des principaux mécanismes de détoxification des radicaux libres soit le cycle Halliwell-Asada par la désactivation de l'ascorbate peroxydase (Mano et coll. 2001; Miyagawa et coll. 2000). Le méthylviologène est d'ailleurs souvent utilisé pour induire un stress photooxydant qui s'est révélé être similaire à la photoinhibition naturelle (Allen et coll. 1997).

En bref, les radicaux libres, bien qu'indispensables pour la plante, sont responsables de la photoinhibition, et donc de la diminution de leur rendement.

2.5 Mécanismes de photoprotection

Les causes de la photoinhibition sont nombreuses et les dommages qu'elle engendre peuvent être importants, mais il existe des moyens de la prévenir ou d'en limiter les effets. En effet, au cours de son évolution la plante a développé différents mécanismes de photoprotection. Sous un excès de radiation lumineuse, la feuille peut éviter le stress en s'enroulant sur elle-même et en déplaçant les chloroplastes parallèlement à la lumière incidente afin de minimiser l'absorption de la lumière (Brugnoli & Bjorkman 1992; Larcher 2003). De plus, une fois l'énergie lumineuse absorbée, l'appareil photosynthétique peut limiter les dommages potentiels, notamment A) par l'augmentation de la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (cycle des xanthophylles) et B) par un système de détoxification des radicaux libres (cycle Halliwell-Asada).

2.5.1 Cycle des xanthophylles

La première ligne de défense de la plante contre l'excès de lumière absorbée est la dissipation, dans les antennes, de l'énergie sous forme de chaleur. Lorsqu'il y a un surplus d'énergie absorbé, le renouvellement du NADP⁺ par le cycle de Calvin se fait plus lentement que leur réduction par les électrons de la chaîne de transport photosynthétique. La phosphorylation de l'ADP en ATP utilisant le gradient de H⁺ des thylacoïdes devient insuffisante ce qui amène une acidification du lumen. Cette acidité sert de premier signal permettant d'activer le cycle des xanthophylles associées à l'antenne du PSII. La violaxanthine dé-époxydase provoque de manière réversible, la dé-époxydation de la violaxanthine en anthéroxanthines puis en zéaxanthine (Li et coll. 2002). Cette dernière molécule est beaucoup moins efficace pour transférer l'énergie d'excitation aux autres pigments de l'antenne des photosystèmes. Elle la dissipe plutôt sous forme de chaleur, diminuant ainsi la proportion de l'énergie atteignant la voie photochimique. Puisque ce mécanisme diminue la pression d'excitation sur le PSII, la formation de radicaux libres est atténuée.

Le cycle des xanthophylles est principalement efficace pour limiter les effets des variations rapides de lumière. En effet, Külheim et coll. (2002) ont démontré qu'un mutant *Arabidopsis* incapable de procéder au cycle des xanthophylles subit plus de dommage qu'un plant normal lors de variations rapides de l'intensité lumineuse, mais pas sous une forte intensité si elle est constante. Ces observations impliquent qu'un mécanisme autre que la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur serait responsable de la protection de la plante contre des conditions chroniques de photoinhibition, soit la détoxification des radicaux libres.

2.5.2 Cycle Halliwell-Asada

La formation de radicaux libres peut servir de « soupape de sécurité » au surplus d'énergie en autant que ces radicaux libres soient détoxifiés efficacement. Sinon, leur accumulation occasionnera des dommages photooxydants. La deuxième ligne de défense contre l'excès de radiations lumineuses est donc la détoxification de ces radicaux libres. Pour ce faire, la plante utilise certaines enzymes antioxydantes et des antioxydants

présents dans les chloroplastes (Pignocchi et coll. 2003). Le principal mécanisme de détoxification des radicaux libres est le cycle Halliwell-Asada. Ce procédé, via la superoxyde dismutase, transforme l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), molécule moins toxique pour la cellule. Par la suite, l'ascorbate peroxydase pourra scinder le H_2O_2 en eau et en oxygène. L'acide ascorbique (vitamine C) utilisé sera régénéré par une série de réactions utilisant du NADPH (Fig. 2.3 : Davey et coll. 2000).

MW Davey et al

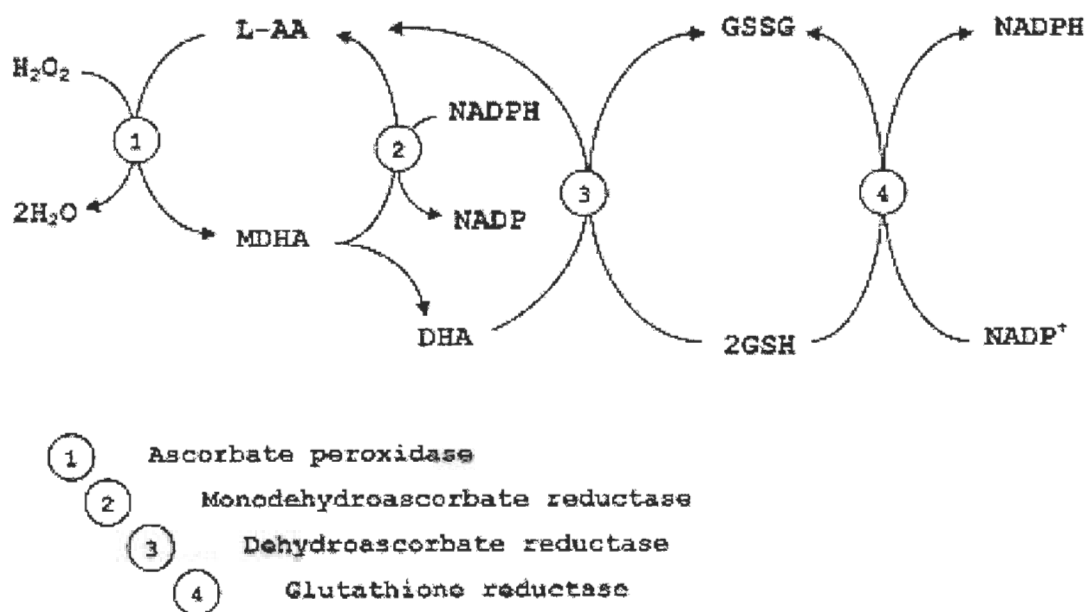


Figure 2.3 : Cycle de détoxification du peroxyde par l'ascorbate peroxydase (Davey et coll. 2000).

2.5.3 Pouvoir antioxydant des composés phénoliques

L'importance du cycle Halliwell-Asada dans la détoxification des radicaux libres produits dans les chloroplastes n'est plus à démontrer. Cependant, en plus de l'acide ascorbique et de l'ascorbate peroxydase, il existe dans les feuilles d'autres peroxydases (peroxydase de classe III, souvent dénotée guaïacol peroxydase) capables de détoxifier le H_2O_2 en oxydant d'autres types d'antioxydants, les composés phénoliques (Edreva, 2005). Certains chercheurs ont donc proposé que lorsque le cycle ne suffit plus à détoxifier dans les chloroplastes les radicaux libres produits lors d'un stress oxydant, certains d'entre eux (surtout le H_2O_2) peuvent diffuser jusqu'aux vacuoles où ils peuvent

dégradés dans des réactions impliquant les composés phénoliques et les peroxydases-classe III. Ainsi, les composés phénoliques pourraient avoir un rôle photoprotecteur, non seulement en raison de leur forte absorption des UV au niveau de l'épiderme, mais aussi de leur fort pouvoir antioxydant (Edreva 2005).

2.6 Composés phénoliques

2.6.1 Propriétés des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires ayant comme base un cycle benzoïque avec un ou plusieurs groupements hydroxyle (OH). À cette base peut s'ajouter plusieurs cycles benzoïques et divers groupements comme des méthyles, des méthoxys, des amines et des glycosyles. Leur synthèse se fait principalement suite à la voie de l'acide shikimique par la dé-amination de la phénylalanine (produisant l'acide cinnamique précurseur des composés phénoliques) et en faible partie, par la voie de l'acide malonique (Guidi et coll. 2005). Les composés phénoliques s'accumulent habituellement dans les vacuoles des cellules où ils sont gardés sous forme réduite. Les deux principaux groupes de composés phénoliques sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques). Les principales classes des flavonoïdes sont les flavonols (quercétine, kaempférol), les flavones (lutéoline), les flavanols (catéchines) et les isoflavones (génistéine). Les acides phénoliques sont des dérivés d'acide benzoïque (acide gallique) ou des dérivés d'acide cinnamique (dont les acides coumarique, férulique, sinapique, qui servent de précurseurs aux unités de base de la lignine) (Dixon et Paiva 1995).

Les composés phénoliques ont longtemps été considérés comme n'ayant aucun rôle précis pour la plante. Cependant, nous savons maintenant qu'ils sont importants, notamment pour la protection de la plante contre les rayons ultraviolets (UV), pour sa défense (protections chimique et physique) contre les herbivores et les pathogènes ainsi que pour certaines interactions biotiques comme la dispersion du pollen et des graines par leur rôle dans la coloration des fleurs et des fruits (Edreva 2005). Une autre propriété intéressante des composés phénoliques, plus particulièrement ceux de la classe des flavonoïdes, est leur facilité à céder un électron. Plusieurs de ces composés ont même un

pouvoir antioxydant supérieur, sur une base molaire à l'acide ascorbique (Rice-Evans 2001). Ce pouvoir antioxydant pourrait donc être utilisé pour réduire les radicaux libres et ainsi les rendre non dommageables. Il a d'ailleurs été montré qu'il existe une relation linéaire entre le pouvoir antioxydant des végétaux et la concentration en composés phénoliques (Fig. 2.4 : Cai et coll. 2004). Ce pouvoir antioxydant est imputable aux groupements hydroxyles des composés phénoliques. Leur potentiel de réduction est fonction de la structure catéchol de l'anneau benzoïque (B), de la position des doubles liaisons et de la quantité de groupements hydroxyles (Fig. 2.5 : Yamasaki et coll. 1997). Les composés phénoliques avec un groupement diphenol en position ortho ou para comme les catéchines ont un potentiel d'oxydation plus faible, donc sont plus facilement oxydés, que ceux avec des diphenols en position méta ou des phénols seuls comme les flavones qui sont moins réactives (Kilmartin et coll. 2001a).

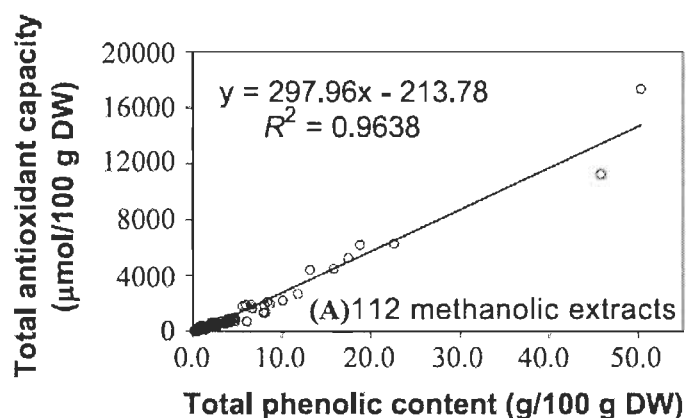


Figure 2.4 : Pouvoir antioxydant de 112 plantes médicinales chinoises en fonction de leur concentration en composés phénoliques solubles (Cai et coll. 2004). (DW = masse sèche).

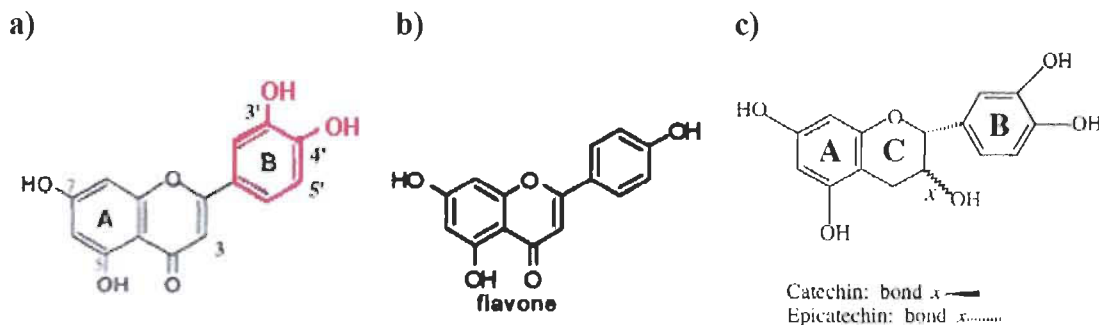


Figure 2.5 : Structure chimique typique (a) des flavonoïdes (Yamasaki et coll. 1997), (b) des Flavones (Dixon et Paiva 1995) et (c) des catéchine (Kilmartin et Hsu 2003).

2.6.2 Détoxification des radicaux libres par les composés phénoliques

Lors d'un stress oxydant comme la photoinhibition, il a été proposé que les composés phénoliques pourraient contribuer à détoxifier les radicaux libres (Takahama, 2004). Les composés phénoliques joueraient le rôle de donneurs d'électrons et d'un atome d'hydrogène afin de réduire le peroxyde d'hydrogène pour les scinder en H_2O et O_2 (Castelluccio et coll. 1995; Yamasaki et coll. 1997). Cette réaction est catalysée par les peroxydases de classe III, le plus souvent dénotée guaiacol peroxydase, qui se retrouvent dans les vacuoles et l'apoplaste (parois cellulaires) (Almagro et coll. 2009). Les composés phénoliques qui ont été oxydés dans cette réaction peuvent être réduits par l'acide ascorbique pour reprendre leur état d'oxydoréduction initial (Fig. 2.6). L'acide ascorbique pourra être de nouveau réduit à l'aide de l'enzyme dehydroascorbate réductase pour être réutilisé. Si les composés phénoliques ne sont pas régénérés par l'acide ascorbique, ils seront polymérisés et seront responsables du noircissement de l'épiderme observable sous conditions de stress photooxydants (Yamasaki et coll. 1997).

H₂O₂-Scavenging Function of Flavonoids

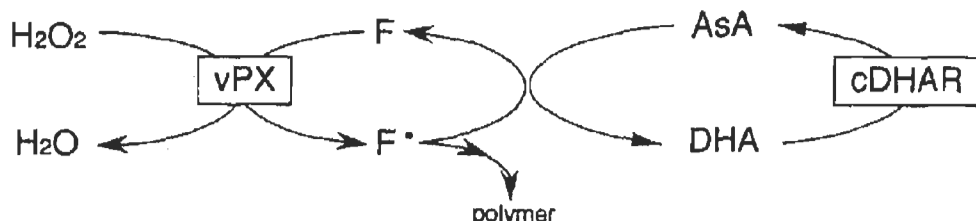


Figure 2.6 : Mécanisme hypothétique de la détoxification du peroxyde d'hydrogène par les composés phénoliques (F), via l'enzyme guaiacol peroxydase (vPX) (Yamasaki et coll. 1997).

L'utilité du pouvoir antioxydant des composés phénoliques dans la plante (*in planta*) n'a pas encore été clairement démontrée, bien qu'il existe des peroxydases de classe III capables de réduire les H₂O₂ en utilisant le pouvoir antioxydant des composés phénoliques. Cela est ironique puisque la capacité des composés phénoliques à détoxifier les radicaux libres est déjà démontrée en alimentation, réduisant ainsi les risques de cancers (Hertog et coll. 1993).

Les réserves de certains chercheurs quant à la pertinence du pouvoir antioxydant des composés phénoliques *in planta* reposent en grande partie sur la différence de localisation entre les principaux sites de production des radicaux libres (chloroplastes, mitochondries) et le site d'accumulation des composés phénoliques, soit les vacuoles, et plus particulièrement celles des cellules épidermiques. Cet argument n'est pas irréfutable car le H₂O₂ étant peu réactif (long temps de vie), il peut facilement diffuser sur de longues distances dans la feuille et donc rejoindre les composés phénoliques jusque dans l'épiderme (Fig. 2.7) (Iriti & Faoro, 2003; Yamasaki et coll. 1997). De plus, comme le montre la figure 2.8 (Tattini et coll. 2000), les composés phénoliques ne sont pas confinés à l'épiderme et peuvent aussi s'accumuler jusque dans le mésophylle pour les plantes adaptées à une forte intensité lumineuse. Aussi, bien que les composés phénoliques s'accumulent principalement dans des vacuoles, ils sont aussi présents dans les chloroplastes (Hernandez et coll. 2008). D'après ces observations, la localisation des

différents composés dans la plante ne semble pas être un obstacle à ce processus de détoxification.

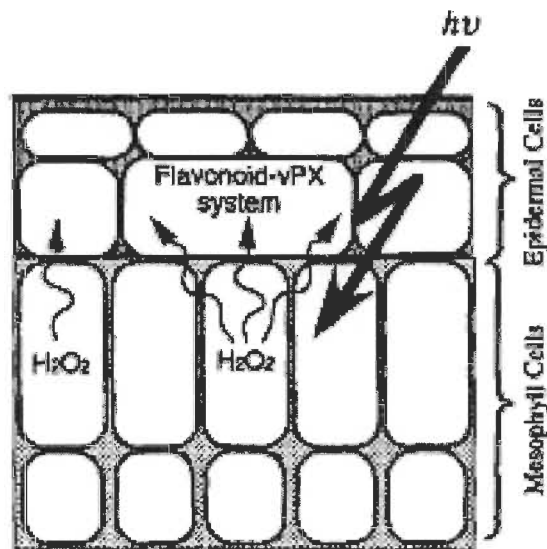


Figure 2.7 : Schéma de la diffusion du H_2O_2 jusque dans l'épiderme où il pourra être détoxifié par les flavonoïdes (Yamasaki et coll. 1997).

La synthèse des composés phénoliques se fait durant le développement normal de la plante, ils sont donc présents de façon constitutive. Cependant, leur concentration peut augmenter fortement en conditions de stress oxydants comme lors d'excès de radiations lumineuses, de basses températures, des carences nutritives, d'absorption de métaux lourds ou d'attaque par des herbivores ou des pathogènes. Cette accumulation en conditions de stress est une autre observation suggérant que les composés phénoliques peuvent détoxifier des radicaux libres (Beckman, 2000; Dixon & Paiva, 1995). De plus, les composés phénoliques accumulés lors de ces stress ont un pouvoir antioxydant particulièrement élevé. Par exemple, Tattini et coll. (2004) ont observé que sous de fortes radiations solaires, l'arbuste *Ligustrum vulgare* accumule davantage de quercétine, lutéoline et d'échinacoside, trois composés phénoliques très antioxydants.

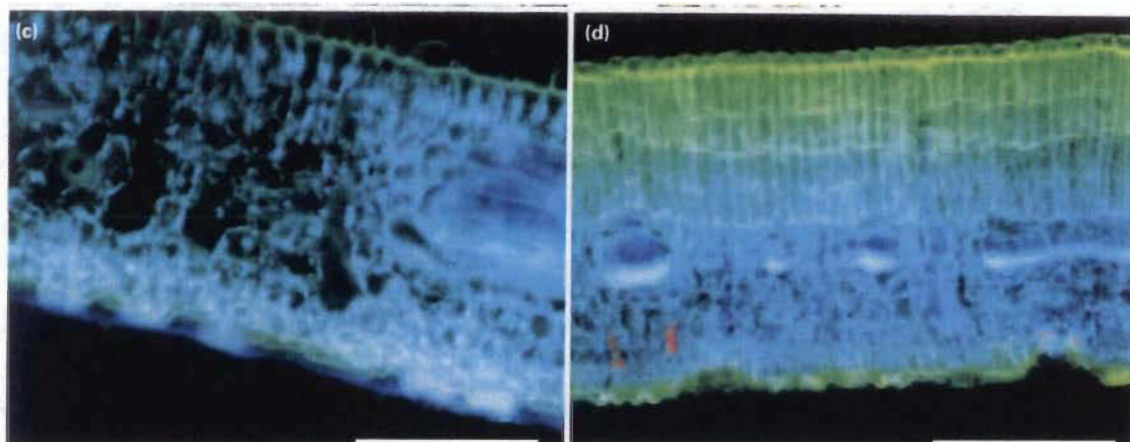


Figure 2.8 : Coupe transversale d'une feuille de *Phillyrea latifolia* L. acclimatée à l'ombre (à gauche) ou au soleil (à droite). Le jaune indique la présence de flavonoïdes (Tattini et coll. 2000).

Une autre observation qui vient appuyer le rôle antioxydant des composés phénoliques *in planta* a été fournie par Agati et coll. 2007. Dans la coupe transversale d'une feuille de *Phillyrea latifolia* L. exposée à une forte lumière, ces auteurs ont démontré une relation inverse entre la localisation d'une part des radicaux libres détectés principalement près de la face abaxiale, (c.-à-d. inférieure; en bleu sur les figures 2.8 et 2.9) et d'autre part des composés phénoliques situés principalement près de la face adaxiale (c.-à-d. supérieure; en jaune sur les figures 2.8 et 2.9). Ils ont interprété ces résultats en proposant qu'il y avait peu de radicaux libres en face adaxiale puisque les composés phénoliques présents en grande quantité les ont détoxifiés. Cependant, cette conclusion n'est pas clairement démontrée, car une autre raison pourrait contribuer à la plus faible concentration de radicaux libres dans la face adaxiale. En effet, ces cellules qui reçoivent la lumière directe du soleil (face adaxiale) sont davantage acclimatées à de fortes lumières que les cellules situées en profondeur dans le mésophylle puisqu'elles ont une plus grande capacité photosynthétique et une plus grande dissipation de l'énergie sous forme de chaleur car elles contiennent plus de xanthophylles. Les cellules en face adaxiale auraient donc été moins affectées par la lumière projetée de façon uniforme sur la coupe transversale et auraient donc produit moins de radicaux libres. Justement, lors de leur essai avec des feuilles d'ombre, toutes les cellules étant acclimatées à de faibles lumières (adaxiales et abaxiales) ont produit plus de radicaux libres.

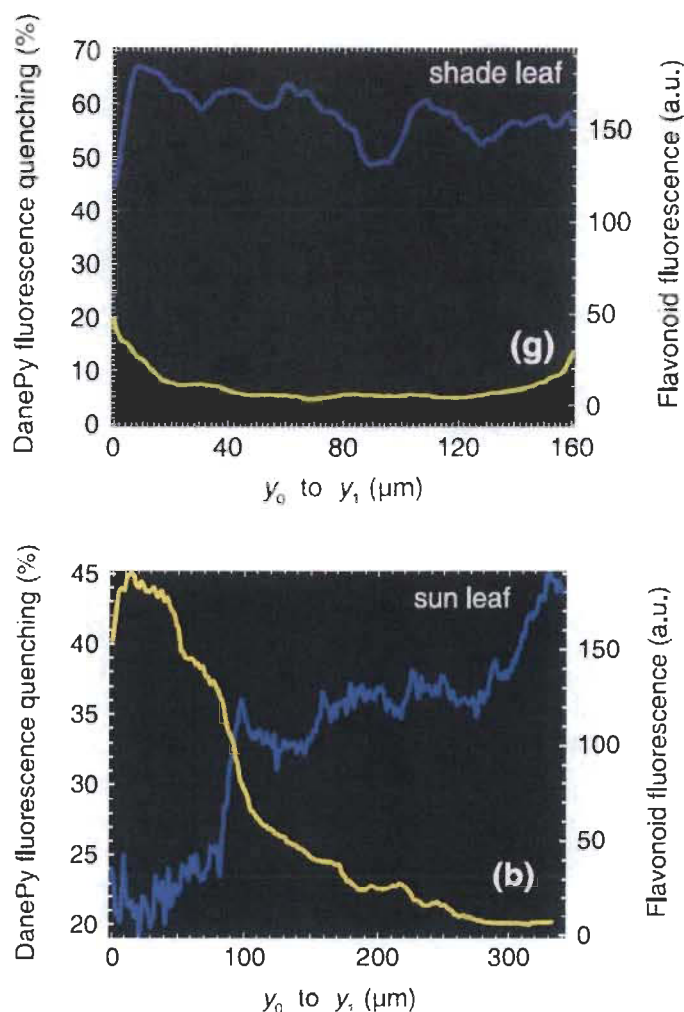


Figure 2.9 : Graphiques du quenching de la fluorescence (bleu) et de la fluorescence des flavonoïdes (jaune) en fonction de la position (0 : face adaxiale) dans la coupe transversale d'une feuille de *Phillyrea latifolia* L. acclimatée à l'ombre (en haut) ou au soleil (en bas) suite à un stress photooxydant (lumière bleue de $2800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Agati 2007).

Globalement, les résultats rapportés par ces différentes études suggèrent fortement que les composés phénoliques peuvent contribuer à la détoxification des radicaux libres dans les feuilles. Cependant, plusieurs interrogations persistent. Selon Hernández et coll. (2008), il manque toujours certaines observations nécessaires à démontrer le rôle antioxydant *in planta* des composés phénoliques. Tout d'abord, il importe d'établir une relation causale entre les stress oxydants et l'accumulation des composés phénoliques en démontrant une corrélation temporelle entre les dommages oxydants et les variations des concentrations des composés phénoliques. De plus, les produits d'oxydation des

composés phénoliques formés lors de stress oxydants sont encore peu caractérisés. Mentionnons finalement, que les substrats phénoliques utilisés par les peroxydases de classe III pour détoxifier le H_2O_2 demeurent méconnus, et les résultats obtenus avec certains types de flavonoïdes (quercétine) ne peuvent pas être extrapolés aux autres composés phénoliques.

2.7 Voltammétrie cyclique

2.7.1 Utilisation de la voltammétrie cyclique pour caractériser l'oxydation *in planta* des composés phénoliques lors de stress oxydants

Afin de vérifier l'oxydation des composés phénoliques dans les plantes lors d'un stress photooxydant, on doit pouvoir observer la variation de leurs propriétés d'oxydoréduction. Plusieurs des méthodes conventionnelles pour mesurer la concentration ou le pouvoir antioxydant des composés phénoliques reposent sur leur habilité à réduire chimiquement un réactif précis (dont le réactif de Folin-Ciocalteu ou le radical stable ABTS^{•+}). Ces méthodes permettent d'estimer de façon globale la concentration ou le pouvoir antioxydant des composés phénoliques mais ne permettent pas de caractériser les fines variations de leur potentiel d'oxydoréduction.

À cette fin, une méthode largement utilisée en électrochimie pour caractériser les propriétés d'oxydoréduction de composés purs en solution est la voltammétrie cyclique. Cette méthode est aussi appliquée dans l'estimation du pouvoir antioxydant de mélanges complexes d'extraits de feuilles de différentes espèces de plantes médicinales (Naik et coll. 2003) ou de feuilles de morphes différents (feuilles rouges vs vertes) (Neill et coll. 2002), de produits d'origine végétale comme les thés, le vin, ou les jus et même la capacité antioxydante du plasma sanguin (Chevion et Chevion 2000; Bourassa et coll. manuscrit en préparation; Kilmartin et coll. 2001a). Cependant, à notre connaissance, la voltammétrie cyclique n'a jamais été utilisée pour caractériser l'évolution des propriétés d'oxydoréduction des composés phénoliques dans les plantes à la suite d'un stress photooxydant (chapitre 3).

Lors des mesures de voltammétrie, un potentiel variant à un taux fixe (ex. 50 mV/s) est appliqué aux composés en solution afin d'arracher des électrons aux

molécules oxydables. Les électrons sont captés par une électrode de travail, habituellement en carbone vitrifié, utilisée conjointement avec une contre-électrode en platine. Ces électrons produisent un courant positif (anodique) qui est mesuré par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl. La hausse de courant produite par l'oxydation des molécules peut être représentée par un pic sur un graphique du courant en fonction du potentiel (voltammogramme). La hauteur du pic dépend du nombre d'électrons captés à un potentiel donné et est donc fonction de la concentration des molécules à l'étude (Fig. 2.10). Le potentiel d'oxydation représente l'énergie nécessaire pour qu'un électron soit arraché. Plus il est bas, plus le composé donne facilement l'électron et plus fort est sa capacité antioxydante. Seulement certaines structures moléculaires permettent de faibles potentiels d'oxydation vers les 400 mV. Il s'agit, entre autres, des groupements de deux ou trois phénols en position ortho et para comme la quercétine, l'acide gallique, l'acide caféique et les épicatechines (Kilmartin et coll. 2001a). D'autres composés phénoliques sont oxydés à un plus haut potentiel. La voltammétrie permet de constater que certaines molécules, comme des flavones, sont oxydées à de plus hauts potentiels et donc moins disponibles pour détoxifier les radicaux libres *in vivo*, contrairement aux mesures par dosage avec réactif. Certaines molécules comprennent plusieurs groupements pouvant être oxydés ce qui se traduit par plusieurs pics de courant anodique. Pour certaines molécules comme la lutéoline, lorsque le potentiel est inversé, les formes précédemment oxydées des composés phénoliques sont réduites à leur état original ce qui crée un courant négatif (cathode). Cette réduction est représentée par un pic vers le bas sur le voltammogramme (Fig. 2.11 : Filipiak 2001).

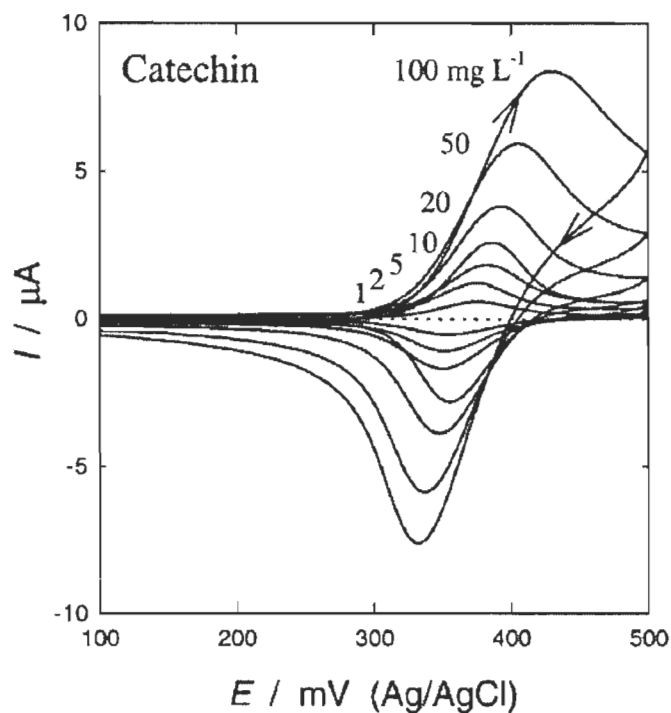


Figure 2.10 : Voltammogrammes de la catéchine à différentes concentrations mesurés à 100 mV s^{-1} avec une électrode de carbone de 3 mm à pH de 3,6. Le signal de base a été soustrait (Kilmartin et coll. 2001a).

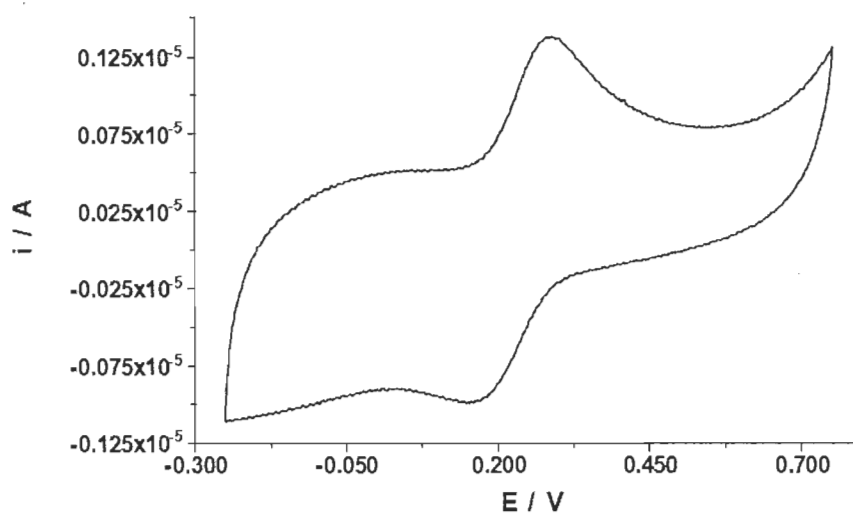


Figure 2.11 : Voltammogramme de la lutéoline mesurée à 100 mV s^{-1} avec une électrode de carbone de 3 mm dans un tampon phosphate à pH 7 (Filipiak 2001).

2.7.2 Paramètres de mesure de la voltammétrie

Les courbes des voltammogrammes dépendent des caractéristiques des molécules à l'étude et des conditions (pH, solvant, force ionique...) dans lesquels s'effectuent les mesures.

D'abord, la hauteur des pics est fonction de la concentration des molécules à l'étude, mais pas toujours de façon linéaire. Kilmartin et coll. (2001a) ont observé que pour la catéchine et l'acide caféique, la hauteur du pic d'oxydation (courant) augmente plus lentement que la concentration lorsque le courant dépasse 2 μA (Fig. 2.12). De plus, lorsque la concentration des composés en solution augmente, un plus haut potentiel est nécessaire pour induire l'oxydation des molécules (Fig. 2.10). Ces phénomènes seraient attribuables à l'adsorption des molécules et de leurs produits d'oxydation sur l'électrode de travail ce qui empêche les oxydations subséquentes (Makhotkina et Kilmartin 2010). Makhotkina et Kilmartin (2009) ont remarqué que l'adsorption des molécules sur l'électrode ne se produit pas seulement au cours de la mesure, mais dès que l'électrode entre en contact avec la solution. Par exemple, lorsque l'électrode de travail est plongée dans une solution de rutine 0,1 mM pendant 30 secondes puis rincée, le voltammogramme de cette électrode mesurant une solution exempte de composés phénoliques présente 75 % du signal du voltammogramme de rutine 0,1 mM. Afin d'avoir une oxydation optimale des composés, les solutions doivent donc être faiblement concentrées, les mesures doivent être prises peu de temps après que l'électrode de travail ait été placée dans la solution et l'électrode doit être adéquatement polie après chaque mesure. Il est aussi nécessaire d'effectuer une courbe de calibration pour chaque molécule à l'étude dans chacune des conditions de mesure si l'on souhaite estimer la concentration d'une solution à partir des voltammogrammes.

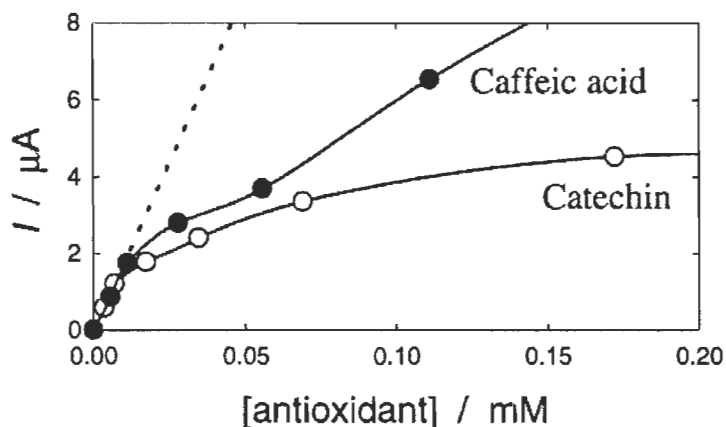


Figure 2.12 : Graphique du courant du pic d'oxydation de la catéchine et de l'acide caféique en fonction de leur concentration. Les voltammogrammes ont été mesurés à 100 mV s^{-1} avec une électrode de carbone de 3 mm à pH de 3,6 (Kilmartin et coll. 2001a).

Un autre paramètre qui peut influencer les voltammogrammes est le pH de la solution. Le pH affecte les réactions d'oxydoréduction puisque ces dernières impliquent la libération ou l'utilisation de protons en plus des électrons (Filipiak 2001). Lorsque le pH augmente, les potentiels d'oxydation diminuent de façon proportionnelle, mais suivant une pente différente selon la molécule et le type de tampon utilisé. Par exemple, la pente du potentiel d'oxydation en fonction du pH est de 55 mV/pH pour la lutéoline (Fig. 2.13) et de 73 mV/pH pour la quercétine. Bien que ce paramètre influence grandement le potentiel d'oxydation, son effet est prévisible, ce qui permet de comparer des voltammogrammes mesurés à différents pH. Toutefois, un autre effet du pH de la solution qui cette fois ne varie pas de façon linéaire, est la hauteur des pics d'oxydation ou de réduction (Fig. 2.14). Ainsi, la hauteur des pics diminue ou augmente selon le pH optimal. Certains pics peuvent même devenir imperceptibles, comme le pic cathodique de la lutéine à des pH élevés, probablement parce que les *o*-quinones générées lors de l'oxydation de la molécule sont instables et ne pourront pas être réduites (Hapiot et coll. 1996).

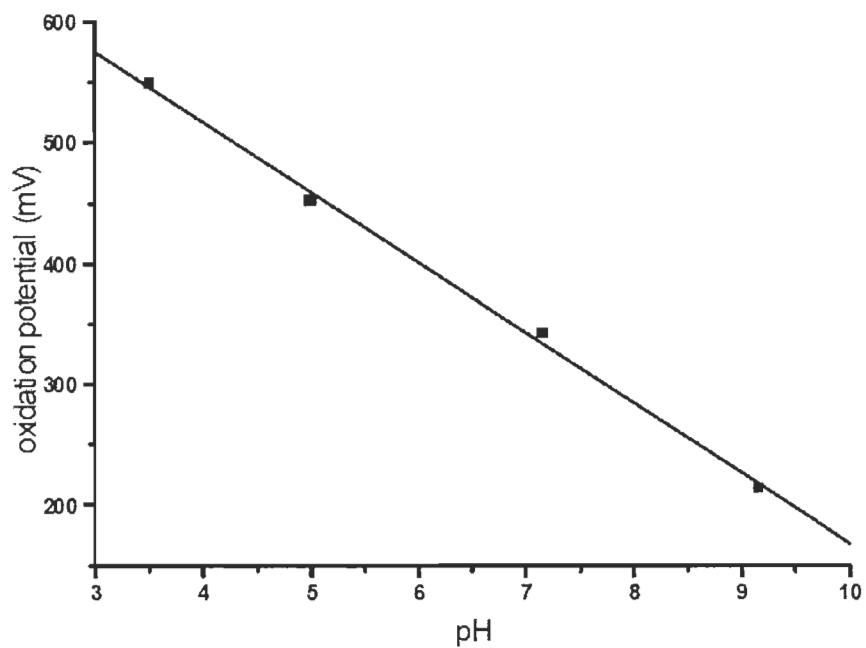


Figure 2.13 : Relation linéaire (55 mV/pH) entre le potentiel d'oxydation et le pH de la lutéilone (Filipiak 2001).

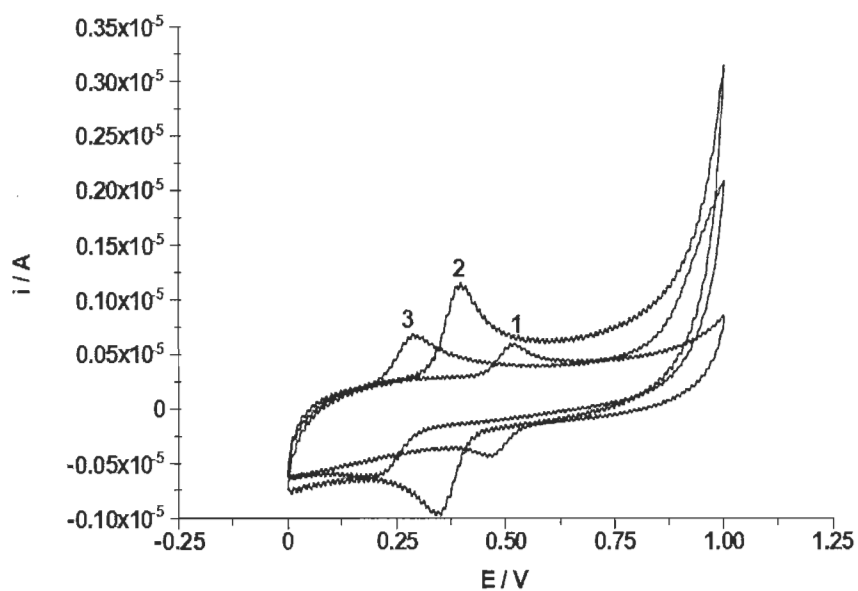


Figure 2.14 : Voltammogrammes de lutéoline dans un tampon McIlvaine à un pH de 3.0 (courbe 1), un pH de 5.0 (courbe 2) ou un pH de 7.0 (courbe 3) (Filipiak 2001).

Enfin, si la molécule à mesurer fait partie d'un mélange, des interactions peuvent se produire entre les différents composés et modifier les potentiels d'oxydoréduction et la hauteur des pics. Par exemple, si on ajoute de la quercétine à la luteoline, les pics de chacun apparaissent, mais la hauteur des pics d'oxydation n'est pas cumulative et les pics de réduction diminuent (Fig. 2.15). L'étude des voltammogrammes de deux composés n'est pas simple, mais il est encore plus difficile, voire impossible d'interpréter les voltammogrammes de mélanges complexes comme les extraits de feuilles.

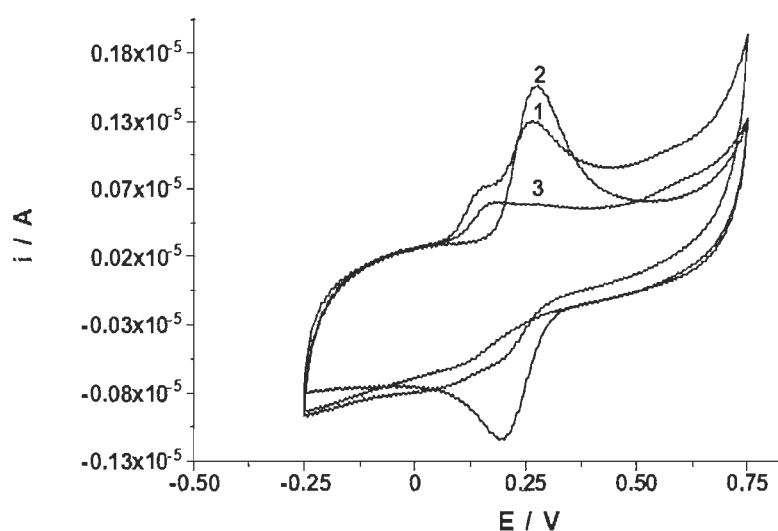


Figure 2.15 : Voltammogrammes de la lutéoline (courbe 2), de la quercétine (courbe 3) et d'un mélange de lutéoline et de quercétine (1 :1) (courbe 1) dans un tampon PBS à un pH de 5,1 (Filipiak 2001).

CHAPITRE III

PROTECTION AGAINST ACUTE PHOTOOXIDATIVE STRESS BY THE OXIDATION OF A POOL OF POLYPHENOLS IN SILVER MAPLE LEAVES (*ACER SACCHARINUM* L.)

3.1 Résumé en français

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires connus pour leurs propriétés antioxydantes dans la plante alors que ceux qui ont un pouvoir antioxydant élevé s'accumulent lors de stress oxydants. En dépit de ces évidences circonstanciées, le pouvoir antioxydant des composés phénoliques dans la plante reste sujet au débat et nécessitent davantage de preuves expérimentales. Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser et corréler l'oxydation des composés phénoliques avec les dommages photosynthétiques induits lors d'une période de forte intensité lumineuse chez des feuilles d'érable argenté (*Acer saccharinum* L.) infiltrées ou non par du méthylviologène (MV). Comme prévu, les résultats montrent que le MV augmente la photoinhibition du photosystème II (diminue le Fv/Fm). Seulement pour les plants traités au MV, nous avons observé une petite, mais significative (15 %) diminution de la concentration des composés phénoliques estimée par absorbance UV et par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette diminution a lieu dans les premières 60 à 120 min d'illumination. L'analyse des propriétés d'oxydoréduction de l'extrait méthanolique de feuille d'érable par voltammétrie cyclique indique que la diminution de la concentration des composés phénoliques est attribuable à l'oxydation d'un petit groupe de composés phénoliques ayant un faible potentiel d'oxydoréduction (< 400 mV, pH 5,8, mesuré par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl) avec deux pics d'oxydation près de 170 et 350 mV. Ce qui est particulièrement intéressant, c'est que l'oxydation de ce groupe de composés phénoliques précède l'accélération des dommages non-spécifiques sur l'appareil photosynthétique estimés par la dégradation de la chlorophylle. Ces observations suggèrent que ces composés phénoliques seraient utilisés comme antioxydants et protégeraient la plante contre les dommages photooxydants. Nous discuterons aussi de la nature des composés phénoliques oxydés suite à l'illumination des feuilles.

3.2 Article

**Protection against acute photooxidative stress by the oxidation of a pool of
polyphenols in silver maple leaves (*Acer saccharinum* L.)**

Mélanie Boutour and Guy Samson*

Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières QC, Canada G9A 5H7

*Corresponding author :

Département de Chimie-biologie,
Université du Québec à Trois-Rivières,
C.P. 500, Trois-Rivières QC, Canada G9A 5H7
Tél. : 819-376-5011, ext. 3374
FAX : 819-376-5084
Email : guy.samson@uqtr.ca

Abstract

Polyphenols (PPs) are secondary metabolites reputed to act as antioxidant in plants since they accumulate under oxidative stress and many of them have strong antioxidant capacities. Despite these circumstantial evidences, the PP putative antioxidant function *in planta* remains a matter of debate and needs to be further supported experimentally. In this study, we aimed to characterize and correlate the oxidation of PPs with photooxidative damages induced during intense illumination in silver maple leaves (*Acer saccharinum* L.) infiltrated or not with methylviologen (MV). The results showed that MV enhanced as expected the extent of Photosystem II photoinhibition (lower Fv/Fm). We detected only in MV-treated leaves small but significant decreases (15%) of PP concentrations estimated by UV absorbance of chlorophyll-less spectra. These decreases occurred during the first 60 to 120 min of intense illumination. Analyses by cyclic voltammetry of the redox profile of methanolic leaf extracts indicated that the lowered concentrations of PPs were due to the oxidation of a small pool of PPs characterized by low redox potentials (< 400 mV, pH 5.8), with oxidation peaks near 170 and 350 mV. Interestingly, the oxidation of that small pool of PPs shortly preceded the acceleration of non-specific photodamages to the photosynthetic apparatus estimated by chlorophyll losses. These observations suggest that a pool of PPs served as antioxidants that are oxidised prior to the components of the photosynthetic apparatus, thereby protecting it against photooxidative damage. The nature of the PPs oxidised in our MV-treated leaves is discussed.

Abbreviations:

AsA, ascorbate; APX, ascorbate peroxidases; Chl, chlorophyll; DHA, dehydroascorbate; EC, epicatechin; ECG, epicatechin gallate; EGC, epigallocatechin; EGCG, epigallocatechin gallate; Fv/Fm, the maximum photochemical yield of photosystem II; GSH, glutathione; GuPX, guaiacol peroxidases; MDA, monodehydroascorbate; MV, methylviologen; OEC, oxygen evolving complex; PPs, polyphenols; PSII and PSI, photosystem II and I; ROS, reactive oxygen species.

Introduction

Energy conversion by photosynthetic electron transport chains unavoidably produces reactive oxygen species (ROS) as byproducts. Under environmental conditions such as mineral deficiencies and low temperatures where absorbed light energy exceeds the capacities of the Calvin cycle and of the regulated non-photochemical energy quenching, the increased production of ROS may overwhelm the capacity of the scavenging ROS system. This excess of ROS causes the oxidation of target molecules leading to the photoinhibition of the photosynthetic apparatus (Foyer et al. 1994, Long et al. 1994, Murata et al. 2007). Recent results indicate that the extent of photoinhibition depends on the balance between the rate of photodamages of photosystem II (PSII) and the rate of PSII repair: whereas the rate of PSII photodamage is linearly related to the amount of absorbed light, PSII repair rate is variable as it decreases in presence of chloroplastic ROS produced under sub-optimal environmental conditions (Sarvikas et al. 2006, Murata et al. 2007, Takahashi et al. 2010).

Because of their high reactivity, ROS generated under light stress must be scavenged near their site of production, prior to their diffusion toward target molecules. To this end, chloroplasts possess efficient stromal and thylakoical scavenging systems. In brief, superoxide $O_2^{\cdot -}$ is disproportionated by superoxide dismutases into hydrogen peroxide, whose reduction by ascorbate (AsA) is catalyzed by ascorbate peroxidases (APX). The resulting monodehydroascorbate radical (MDA) is reduced either by ferredoxin in photosystem I (PSI) or by NADPH in the stroma in a reaction catalyzed by MDA reductase. Alternatively, MDA may spontaneously disproportionate to dehydroascorbate (DHA) that will be reduced to AsA by glutathione (GSH) with the help of the DHA reductase (Asada 1999).

Complementary to the AsA/GSH scavenging systems, plant polyphenols (PPs) could also contribute to the photoprotection of the photosynthetic apparatus. This role is inferred first by the increase of PP content commonly observed in plants under photoinhibitory conditions (e.g. high light, low temperatures, N deficiency) (Dixon and Paiva 1995, Edreva 2005), and also, by the spectral properties and antioxidant capacity of PPs. Some PPs, the anthocyanins, are non-photosynthetic pigments that can accumulate in leaves and stems of some species to absorb a fraction of incident light

intensity that would be otherwise in excess to the requirements of the light reactions of photosynthesis. There is however a lasting debate concerning the light screening function of anthocyanins, which remains unsettled as recent observations strongly support (Gould et al. 2010) and infer (Nikiforou and Manetas 2010, Nikiforou et al. 2010) this hypothesis.

Concerning the photoprotective function of PPs based on their antioxidant capacities, it is noteworthy that many PPs are stronger antioxidants than AsA on a molar basis (Rice-Evans 2001) and close linear correlations between PP concentrations and total antioxidant capacities in different plant extracts were reported (Cai et al. 2004, Yaakoubi et al. 2010). Also, a model was proposed (Yamasaki et al. 1997, Sgherri et al. 2003) where class III peroxidases (guaiacol peroxidases, GuPX) oxidize PPs in cell vacuoles to scavenge H_2O_2 that can diffuse owing to its long lifetime within the cell or even within the leaf. Then, oxidised PPs can be re-reduced either directly by AsA (Sgherri et al. 2003) or in a reaction catalyzed by monodehydroascorbate reductase (Sakihama et al. 2000). Even if most of the PPs in leaves are present in vacuoles of epidermal cells (Yamasaki et al. 1997), thus far from the main sites of ROS production, their presence also in chloroplasts is well documented (Saunders and McClure 1976, Zaprometov and Nikolaeva 2003) and scavenging of singlet oxygen (1O_2) by chloroplast-located PPs (flavonoids) was demonstrated in cross-sections of *Phillyrea latifolia* leaves (Agati et al. 2007).

Despite accumulating observations, the physiological importance of the PP to scavenge ROS is still a matter of debate (Hernández et al. 2008, Almagro et al. 2009), particularly in regard to their ability to protect against photooxidative damages. As pointed out by Hernandez et al. (2008), observations showing correlations between oxidative stress occurrence with the changes of PP concentrations and of their oxidation status are needed to support the relevance of PPs as antioxidants *in planta*. Therefore, our objectives in this report were to characterize and correlate the oxidation of PPs with the photooxidative damages in silver maple leaves infiltrated with and without methylviologen (MV). Our results indicated that intense illumination of MV-treated silver maple leaves caused the oxidation of a small pool of PPs characterized by low

redox potential (< 400 mV, pH 5.8) that preceded the acceleration of non-specific photodamages estimated from chlorophyll losses.

Material & methods

Silver maple leaves (*Acer saccharinum* L.) developed under full sunlight were sampled from trees growing on our campus. Shortly after sampling, leaves were infiltrated under vacuum with water containing 0 or 0,5 mM MV. Then, leaves with their petiole maintained in water were exposed to an intense blue light ($2800 \mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by a 20 x 20 cm LED panel SL 3500-B (PSI Instrument, Czech Rep.).

After different times of illumination, leaves were maintained in the dark for 40 min and then the extent of photoinhibition was estimated by the Chl-*a* fluorescence ratio F_v/F_m (corresponding to the maximum photochemical yield of photosystem II, PSII) measured with a Xe-PAM (Walz, Germany). To estimate the extents of photodamage non-specific to the PSII reaction centers, leaf chlorophyll *a+b* were extracted by two successive incubations of 30 min in pure methanol at 70°C , and their concentrations measured according to Lichtenthaler (1987).

Concentrations of soluble PPs were first estimated from their contribution to the UV absorbance spectra of the methanolic extracts used to measure the Chls *a+b* concentrations. Based on Chl concentrations in each sample and on spectra of pure Chls *a* and *b* previously measured in methanol, the total Chl *a+b* spectrum was calculated and subtracted from the crude extract absorption spectrum as in Ounis et al. (2001). The resulting Chl-less spectrum corresponds to the UV absorbance of the PPs, whose concentration was estimated from the absorbance value at 262 nm.

Concentrations of soluble PPs present in the same leaf samples used to measure Chl concentrations and UV absorbance spectra were also estimated by the Folin-Ciocalteu colorimetric method as in Cai et al. (2004). Following the two successive extractions in 10 ml of methanol at 70°C for 20 min, a third incubation of the leaf material was made in 50% methanol for 30 min at room temperature. The filtered extracts were combined and then PPs in a sample were oxidized with 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent. Five min later, the reaction was neutralized with saturated sodium carbonate (200 g L^{-1}). After incubation for 2 hrs at room temperature, the sample was

centrifuged and the absorbance was measured at 760 nm. PP quantification was based on a standard curve made with tannic acid. Results were expressed as mg of tannic acid equivalent per cm² of leaf area.

The redox profiles of the soluble PPs in a sample of the same methanolic/water leaf extracts used in the Folin-Ciocalteu method were characterized by cyclic voltammetry. Voltammograms were recorded from 70 to 1200 mV at a scanning rate of 50 mV s⁻¹ with a potentiostat (model 362, Princeton Appl. Res. USA), using a glassy carbon electrode (BAS MF-2012, 3 mm diameter). Before each measurement, the electrode was gently polished with an aluminum powder solution and then sonicated, both for 2 min. The potentials were measured versus an Ag/AgCl reference electrode and the current of the buffer solution was subtracted. Samples (2 ml) were placed in a cell with an equal volume of 100 mM phosphate buffer containing 5 mM KCl. The final pH was adjusted to 5.8. In addition, voltammograms of pure compound solutions (all from Sigma-Aldrich) were recorded similarly as leaf extracts: catechins and ascorbate were dissolved in pure methanol and quercetin was dissolved in methanol with 1.5% acetone.

To detect effects of MV and illumination time on the measured parameters, ANOVAs were performed with SYSTAT 11 (SPSS, Chicago IL). When the MV effect was significant ($p < 0.05$), mean comparisons (with and without MV) for each illumination time were made by a two-sample t-test. The analyses are based on 3 to 6 replicates.

Results

The presence of MV in infiltrated maple leaves significantly increased the extents of photoinhibition, as seen by the larger decreases of the PSII maximum photochemical yield (Fv/Fm) in illuminated MV-treated leaves relative to MV-untreated leaves (Fig. 1). In the latter, no general photooxidative damages to the photosynthetic apparatus (non-specific to the PSII reaction centers) were apparent as Chl*a+b* concentrations remained unaffected by up to 240 min of light treatment (Fig. 2). In MV-treated leaves, there were significant losses of Chl*a+b*, which became apparent only after the first 2 hrs of illumination.

To determine if the intense illumination under our experimental conditions affected the PPs in silver maple leaves, we first examined the Chl-less UV absorbance spectra of methanolic extracts made from MV-untreated and in MV-treated leaves (see Material and methods). All the calculated UV spectra had a major peak near 278 nm and a minor one around 350 nm (results not shown), suggesting that the main PPs in our extracts from silver maple leaves were glycosylated flavanones (Cerovic et al. 2002). PP concentrations in our extracts were estimated by measuring the absorbance at 262 nm, away from the peak at 278 nm to avoid saturation of the signal in some samples. During the photoinhibitory treatment, the concentrations of soluble PPs remained constant in MV-untreated leaves whereas it decreased slightly but significantly in MV-treated leaves (Fig. 3A). In those leaves, most of the absorbance decreased within the first hour of treatment, and thereafter it decreased at a slower rate. To support these changes in UV absorbance, we also estimated the PP concentrations in methanol-water extracts made from the same leaves by the Folin-Ciocalteu method. The results shown in Fig. 3B are similar to those observed by the absorbance at 262 nm. However, the ANOVA did not detect significant effect of neither MV nor of the illumination time on the PP concentrations estimated by the Folin-Ciocalteu method, even if the values from the MV-treated leaves seemed to decrease during the first hour by about 15% of the initial value.

The observed decreases of PPs concentrations detected in MV-treated leaves suggest the oxidation of PPs in those leaves during illumination. To verify this possibility, we characterized by cyclic voltammetry the redox profiles of samples from the same extracts used to estimate PP concentration by the Folin-Ciocalteu method. Fig. 4A presents an averaged voltammogram of crude methanolic extracts (pH 5.8) from untreated silver maple leaves. All the voltammograms showed a major oxidation wave around 600 mV accompanied by minor waves near 170, 350, and 750 m. There was no reduction wave, indicating that the oxidised PHENs by the electrode rapidly reacted in solution and could not be re-reduced (Makhotkina and Kilmartin 2009).

Examination of the voltammograms of extracts from leaves infiltrated with or without MV indicates that the intense illumination affected the redox profiles between 0 and 400 mV (i.e. compounds more easily oxidised), but not between 400 and 850 mV

(i.e. compounds requiring higher potential to be oxidised, see below) : compared to the averaged voltammogram from intact leaves (not exposed to high light), 4 hrs of intense illumination caused a decrease of the current signal profiles between 0 and 400 mV in extracts from MV-treated leaves exposed to 4 hrs of intense illumination whereas the current increased slightly in extracts from MV-untreated leaves (Fig. 4B). More specifically, differences between the voltammograms related to MV-untreated and MV-treated leaves after 4 hrs of illumination show a main current wave 350 mV and a minor one near 170 mV (Fig. 4C).

To better quantify the effects of intense illumination and MV on the redox profiles of leaf extracts, we estimated the amount of reducing equivalents ($\mu\text{C}=\mu\text{A}\cdot\text{s}$) having redox potentials between 70 and 400 mV (Q_{70-400}) and those between 400 and 850 mV ($Q_{400-850}$) by dividing the selected area under the curve ($\mu\text{A}\cdot\text{mV}$) with the scan rate ($50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) (Kilmartin et al. 2001). In agreement with Fig. 4B, the values of Q_{70-400} significantly decreased during illumination in MV-treated leaves (by about 22% relative to 0 min) whereas it slightly increased (by about 21%) in MV-untreated leaves (Fig. 5A). In contrast, the $Q_{400-850}$ values remained constant during illumination in both MV-untreated and MV-treated leaves (Fig. 5B). It is noteworthy that the $Q_{400-850}$ values are about ten times larger than those of the Q_{70-400} .

In attempt to identify the nature of the most likely compound that was oxidised during the photooxidative stress of silver maple leaves, we measured the voltammograms of pure solutions of possible antioxidants having among the lowest redox potentials as found in the literature (Kilmartin et al. 2001): AsA, quercetin (a flavonol), and 4 different catechins (flavane-3-ols) (Fig. 6). Under our experimental conditions, AsA (0,1 mM) showed a single oxidation peak near 177 mV whereas the flavonoids (quercetin and catechins) had two or three peaks. At potentials lower than 400 mV, the oxidation of the catechol moiety (2 OHs on the B ring) is associated to the observed current peaks near 275 mV of quercetin and of epicatechin (EC) whereas for the epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG), the first current peak near 200 mV is related to the pyrogallol moiety (3 OHs on the B ring). Interestingly, EGCG shows also a second peak, at 317 mV, corresponding to the oxidation of the gallate group. In case of the epicatechin gallate (ECG), the oxidations of the gallate and

the catechol moieties occur at similar potentials, resulting in a broad oxidation wave near 350 mV. Concerning the current waves observed at potentials higher than 650 mV for the five flavonoids, they can be attributed to the oxidation of the resorcinol moiety.

We also measured the voltammograms of the hesperitin (and its glycosylated form hesperidin), that are representative of the flavonones, believed to be the dominant polyphenol group in our extracts based on their similarities of their UV-absorbance spectrum. As expected from their chemical structure (presence and absence of the resorcinol and catechol moieties respectively), we observed only a large current wave between 650 and 800 for these two compounds (results not shown).

In short, among the different compounds tested, only EGCG displays two oxidation peaks at low potential (208 and 315 mV), which are close but still different to the oxidation peaks (170 and 350 mV) of the unknown compound photooxidized in MV-treated silver maple leaves.

Discussion

Photoprotection of the photosynthetic apparatus is a multifaceted concept, in which plant PPs may play different roles, notably the scavenging of chloroplastic ROS. We aimed to better support this function by demonstrating the presence of a temporal relationship between photooxidative damages and PP oxidation in silver maple leaves exposed to intense blue light in presence or not of MV. The results presented here showed that MV enhanced as expected the extent of PSII photoinhibition (lower F_v/F_m) and the losses of $Chl a+b$, an indication of general photodamage to the photosynthetic apparatus. These MV effects were accompanied by a significant oxidation of a small pool of PPs, as demonstrated by cyclic voltammetry of leaf extracts. Importantly, most of the PP oxidation occurred during the first 60 or 120 min, after which the rate of chlorophyll losses markedly increased. These observations suggest that a pool PPs served as antioxidants that are oxidised prior to the components of the photosynthetic apparatus, thereby protecting it against photooxidative damage. The oxidation of PP observed by cyclic voltammetry was supported by the decreases of PP concentrations estimated by UV- absorbance and by the Folin-Ciocalteu method.

Indeed, oxidised PP have lower absorbance peaks in the UV (Timbola et al. 2006) and of course they cannot reduce the Folin-Ciocalteu reagent (Appel et al. 2001).

These results should be considered in a context where PPs could complement the antioxidant function of AsA and GSH. Our photoinhibitory treatment caused the oxidation of PPs only in leaves treated with MV. The latter is known to intercept electrons from PSI and to catalyze the photoreduction of O₂ (Lawlor 1995). Mano et al. (2001) demonstrated that the primary effects of MV were the inactivation of the chloroplastic APX isoforms. Then, rapid accumulation of H₂O₂ under these conditions caused the inactivation of superoxide dismutase and NADP⁺-glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase. Interestingly, GuP_x and the photosynthetic electron transport chain (notably Fv/Fm) were by far less sensitive to H₂O₂ than the APX isoforms. This indicates first that during an acute photooxidative stress induced by intense light plus MV, both higher production rate of H₂O₂ and the inactivation of APX provided the conditions in which PPs can act as antioxidants. These observations, considered in the new paradigm of photoinhibition (Nishiyama et al. 2006, Takahashi and Murata 2008), also indicate that the larger decreases of Fv/Fm observed in MV-treated silver maple leaves is most likely due to the inactivation of PSII repair mechanisms by ROS rather than their direct effects on PSII reaction centers.

Besides their role as antioxidants that can contribute to protect the photosynthetic apparatus against ROS, PPs have also a well-established role as UV-screening in leaf epidermis. This photoprotective function of PPs was clearly demonstrated by the use of mutants or transgenic plants having depressed or enriched levels of PPs (flavonoids or hydroxycinnamic acids), which determined plant's UV-sensitivity (growth inhibition and DNA lesions) (reviewed in Edreva 2005). In addition to the protection against these general UV deleterious effects, PPs in leaf epidermis could play a more specific role by protecting PSII. Indeed, it was demonstrated that the action spectrum of photodamage does not correspond to the absorbance spectra of chlorophylls and carotenoids but rather to that of Mn compounds present in the PSII oxygen evolving complex (OEC): flat in red and green regions of the spectrum and it increases in the blue to reach a maximum in the UV (Sarvikas et al. 2006, Murata et al. 2007). Since Mn compounds in OEC (Sarvikas et al. 2006) and PPs (Cerovic et al. 2002) have similar absorbance

spectra, and since PP concentrations in leaves and leaf epidermal UV-absorbance both increase linearly with the ambient light intensity (Bidel et al. 2007), then we can suggest that PP accumulation in leaf epidermis is a significant plant response against blue-UV induced PSII photodamages.

The use of cyclic voltammetry in this study was useful to characterize the oxidation of a specific pool of PPs in leaves exposed to acute photooxidative stress. Firstly, comparison of the voltammograms of methanolic extracts from photoinhibited leaves infiltrated or not with MV indicated that only PPs with low midpoint redox potentials (< 400 mV) were oxidized in presence of MV. Naturally, these PPs were more susceptible to oxidation than those having higher redox potentials (400-850 mV). And since these PPs with high redox potentials were about ten times more abundant than the low potentials PPs, we may suggest that the high potential PPs correspond to the larger pool that is located in the epidermis (Yamasaki et al. 1997). Their primary function would be to shield the mesophyll against the deleterious effects of incident UV radiations. On the other hand, the small pool of low redox potential PPs would be present mostly in the mesophyll, where they would be more likely involved in ROS scavenging.

Secondly, the use of cyclic voltammetry provided a hint about the nature of the compounds oxidised during the photoinhibitory treatment in MV-treated silver maple leaves. The difference between the voltammograms from photoinhibited leaves infiltrated or not with MV indicated that the oxidized PPs were characterised by a main oxidation peak near 350 mV and a minor one near 170 mV. When compared to the voltammograms of the main antioxidants in plants known to have the lowest redox potentials (< 400 mV at pH 5.8) (Kilmartin et al. 2001), it appeared that EGCG, with its two oxidation peaks at 208 and 315 mV, was the closest to our unknown oxidised compound. Although EGCG is best known to be abundant in tea leaves, its presence in silver maple leaves is likely. Indeed, the presence of catechins in maple syrup was reported (Abou-Zaid et al. 2008) and it was recently shown that methyl gallate is a natural constituent of maple (genus *Acer*) leaves (Abou-Zaid et al. 2009). Also, chemical evidences were provided of the presence in leaves of *Acer rubrum* L. of glycosylated O-galloyl moiety. Finally, the maximum UV absorbance of EGCG at

275 nm (data not shown) is close to the one observed in the Chl-less UV absorbance spectra of our samples. Besides EGCG, another possibility would be a concomitant decrease of AsA (oxidation peak at 177 mV) and ECG (broad oxidation peak around 350 mV).

Even though the voltammogram of EGCG is the most similar to that of the unidentified oxidised compound, their oxidation peaks still differ substantially. In contrast to absorbance spectra, voltammograms from complex mixtures like leaf extracts, teas or wines are not the sum of their different components (Makhotkina and Kilmartin 2009). Detailed interpretation of those voltammograms is complicated notably by the adsorption of PPs at the electrode surface and by possible interactions in solution between reduced compounds and those that have been oxidised by the electrode. For instance, the presence of PP in wines and orange juice impedes the oxidation at the electrode of AsA, which occurs at an “overpotential” relative to its real potential (Kilmartin et al. 2008). Also, sulfur dioxide increased the anodic (oxidative) current and decreased the cathodic current for different PPs and wines, indicating a rapid interaction of SO₂ with the oxidized PP quinones (Makhotkina and Kilmartin 2009).

Cyclic voltammetry is a method that is widely used to characterize the redox properties of pure compounds and also to estimate the antioxidant capacity of plants extracts (Naik et al. 2003, Neill et al. 2002a, b) or other complex mixtures such as teas (Kilmartin and Hsu 2003), wines (Kilmartin et al. 2001), and even human plasma (Chevion and Chevion 2000). Here we showed that cyclic voltammetry can also be useful in plant stress physiology by characterizing the oxidation of PPs in silver maple leaves exposed to an acute photo-oxidative stress. It will be interesting in future studies to characterize the changes of PP redox properties in plants during their acclimation to chronic and sub-lethal oxidative stresses. These stresses commonly cause the accumulation of PPs in plants (Dixon and Paiva 1995), and may also change in their composition. For instance, in plants exposed to high light, water stress, and/or low temperatures may preferentially accumulate quercetin (Tattini et al. 2004, Edreva 2005) or anthocyanins (Close and Beadle 2003). These compounds with their catechol moiety

(o-dihydroxy in the B-ring) are strong antioxidants. How these preferential accumulations affect the overall antioxidant capacity remains to be determined.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Benoit Daoust for helpful discussions concerning cyclic voltammetry. This study was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

References

- Abou-Zaid MM, Lombardo DA, Nozzolillo C (2009) Methyl gallate is a natural constituent of maple (Genus *Acer*) leaves. *Nat Prod Res* 23: 1373-1377.
- Abou-Zaid MM, Nozzolillo C, Tonon A, Coppens M, Lombardo DA (2008) High-performance liquid chromatography characterization and identification of antioxidant polyphenols in maple syrup. *Pharm Biol* 46: 117-125.
- Agati G, Matteini P, Goti A, Tattini M (2007) Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytol* 174: 77-89.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377-390.
- Appel HM, Govenor HL, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz JC (2001) Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *J Chem Ecol* 27: 761-778.
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 50: 601 - 639.
- Bidel LPR, Meyer S, Goulas Y, Cadot Y, Cerovic ZG (2007) Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: In vivo qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species *J Photochem Photobiol B*: 88: 163-179.
- Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
- Cerovic ZG, Ounis A, Cartelat A, Latouche G, Goulas Y, Meyer S, Moya I (2002) The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant Cell Environ* 25: 1663-1676.

- Chevion S, Chevion M (2000) Antioxidant status and human health. Use of cyclic voltammetry for the evaluation of the antioxidant capacity of plasma and of edible plants. *Ann NY Acad Sci* 899: 308-325.
- Close DC, Beadle CL (2003) The ecophysiology of foliar anthocyanin. *Bot Rev* 69: 149-161.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Edreva A (2005) The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agr Ecosyst Environ* 106: 135-146.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696-717.
- Gould KS, Dudle DA, Neufeld HS (2010) Why some stems are red: Cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *J Exp Bot* 61: 2707-2717.
- Hernández I, Alegre S, Van Breusegem F, Munné-Bosch S (2008) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends Plant Sci* 14: 125-132.
- Kilmartin PA, Hsu CF (2003) Characterization of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chem* 82: 501-512.
- Kilmartin PA, Martinez A, Bartlett PN (2008) Polyaniline-based microelectrodes for sensing ascorbic acid in beverages. *Curr App Phys* 8: 320-323.
- Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL (2001) A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J Agr Food Chem* 49: 1957-1965.
- Lawlor DW (1995) Photosynthesis, productivity and environment. *J Exp Bot* 46: 1449-1461.

- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382.
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann Rev Plant Phys* 45: 633-662.
- Makhotkina O, Kilmartin PA (2009) Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *J Electroanal Chem* 633: 165-174.
- Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K (2001) Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: Its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *BBA-Bioenergetics* 1504: 275-287.
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *BBA-Bioenergetics* 1767: 414-421.
- Naik GH, Priyadarsini KI, Satav JG, Banavalikar MM, Sohoni DP, Biyani MK, Mohana H (2003) Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. *Phytochem* 63: 97-104.
- Neill SO, Gould KS, Kilmartin PA, Mitchell KA, Markham KR (2002a) Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant Cell Environ* 25: 539-547.
- Neill SO, Gould KS, Kilmartin PA, Mitchell KA, Markham KR (2002b) Antioxidant capacities of green and cyanic leaves in the sun species, *Quintinia serrata*. *Funct Plant Biol* 29: 1437-1443.
- Nikiforou C, Manetas Y (2010) Strength of winter leaf redness as an indicator of stress vulnerable individuals in *Pistacia lentiscus*. *Flora* 205: 424-427.

- Nikiforou C, Zeliou K, Kytridis VP, Kyzeridou A, Manetas Y (2010) Are red leaf phenotypes more or less fit? The case of winter leaf reddening in *Cistus creticus*. *Environ Exp Bot* 67: 509-514.
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *BBA-Bioenergetics* 1757: 742-749.
- Ounis A, Cerovic Z, Briantais J-M, Moya I (2001) Dual-excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Remote Sens Environ* 76: 33-48.
- Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8: 797-807.
- Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K, Yamasaki H (2000). Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem Biophys Res Comm* 279: 949-954.
- Sarvikas P, Hakala M, Pätsikkä E, Tyysjärvi T, Tyysjärvi E (2006) Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and npq1-2 and npq4-1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47: 391-400.
- Saunders JA, McClure JW (1976) The distribution of flavonoids in chloroplasts of twenty five species of vascular plants. *Phytochem* 15: 809-810.
- Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant* 118: 21-28.
- Takahashi S, Milward SE, Yamori W, Evans JR, Hillier W, Badger MR (2010) The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiol* 153: 988-993.
- Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci* 13: 178-182.

- Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D, Agati G (2004) Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytol* 163: 547-561.
- Timbola AK, De Souza CD, Giacomelli C, Spinelli A (2006) Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. *J Brazil Chem Soc* 17: 139-148.
- Yaakoubi H, Samson G, Ksontini M, Chaibi W (2010) Localised increases of polyphenol concentration and antioxidant capacity in relation to the differential accumulations of copper and cadmium in roots and in shoots of sunflower. *Botany* 88: 901-911.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikebara N (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2 . *Plant Physiol* 115: 1405-1412.
- Zaprometov MN, Nikolaeva TN (2003) Chloroplasts Isolated from Kidney Bean Leaves Are Capable of Phenolic Compound Biosynthesis. *Russ J Plant Physiol* 50: 623-626.

Figures legends

Fig. 1. The maximum photochemical yield of photosystem II estimated by the ratio F_v/F_m measured in dark adapted leaves of *Acer saccharinum* L. infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after different illumination times. ANOVA indicates that both factors had significant effects on F_v/F_m ($p \leq 0.001$). More specifically, mean comparisons (MV-untreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 60 ($p=0.026$) and 240 min ($p=0.047$) of illumination.

Fig. 2. Chlorophyll $a+b$ concentrations in *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, close circles) after different illumination times. ANOVA indicates that the MV effect is significant ($p \leq 0.001$). Mean comparisons (MV-untreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 240 min of illumination ($p=0.011$).

Fig. 3. Concentrations of soluble phenolic compounds of *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after different illumination times. A) Concentrations estimated by UV absorbance at 262 nm of chlorophyll-less spectra. ANOVA indicates that the MV effect is significant ($p = 0.003$). Mean comparisons (MV-untreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 120 min ($p=0.006$) and 240 min ($p=0.006$). B) Concentrations estimated according to the Folin-Ciocalteu method. ANOVA indicates no significant effect of MV and illumination time.

Fig. 4. A) Mean cyclic voltammogram between 0 and 1200mV (background subtracted) of methanolic extracts from untreated *Acer saccharinum* L. leaves, measured at a scan rate of 50 mV s^{-1} with a 3 mm glassy carbon electrode in phosphate buffer, pH 5.8. B) Mean voltammograms between 0 and 400 mV (background subtracted) of methanolic extracts from *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after 240 min of illumination. C) Difference between the mean voltammograms of methanolic extracts from

Acer saccharinum L. leaves infiltrated with 0 mM and 0.5 mM methylviologen after 240 min of illumination.

Fig. 5. Numbers of reducing equivalents A) between 70 and 400 mV (Q_{70-400}) and B) between 400 and 850 mV ($Q_{400-850}$) calculated from the voltammograms of methanolic extracts of *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after different illumination times. ANOVA indicates that the MV effect is significant ($p = 0.004$) for Q_{70-400} but not for $Q_{400-850}$. Mean comparisons (Q_{70-400} of MV-untreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 240 min ($p=0.022$).

Fig. 6. Mean cyclic voltammograms of 0.1 mM (a) epicatechin, (b) epicatechin gallate, (c) epigallocatechin, (d) epigallocatechin gallate, (e) ascorbate and (f) quercetin. Voltammograms were measured at a scan rate of 50 mV s^{-1} with a 3 mm glassy carbon electrode in phosphate buffer, pH 5.8. The background was subtracted.

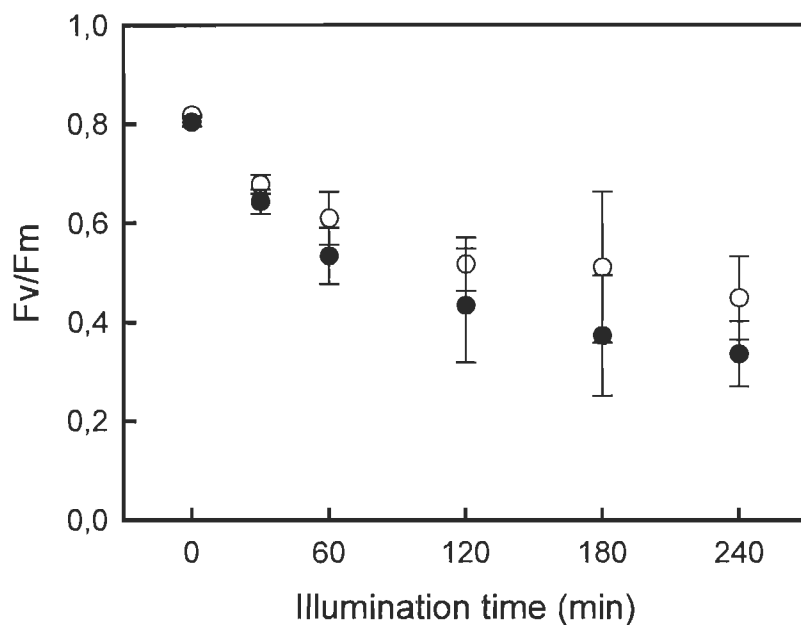


Fig. 1. The maximum photochemical yield of photosystem II estimated by the ratio F_v/F_m measured in dark adapted leaves of *Acer saccharinum* L. infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after different illumination times. ANOVA indicates that both factors had significant effects on F_v/F_m ($p \leq 0.001$). More specifically, mean comparisons (Mvuntreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 60 ($p=0.026$) and 240 min ($p=0.047$) of illumination.

295x217mm (96 x 96 DPI)

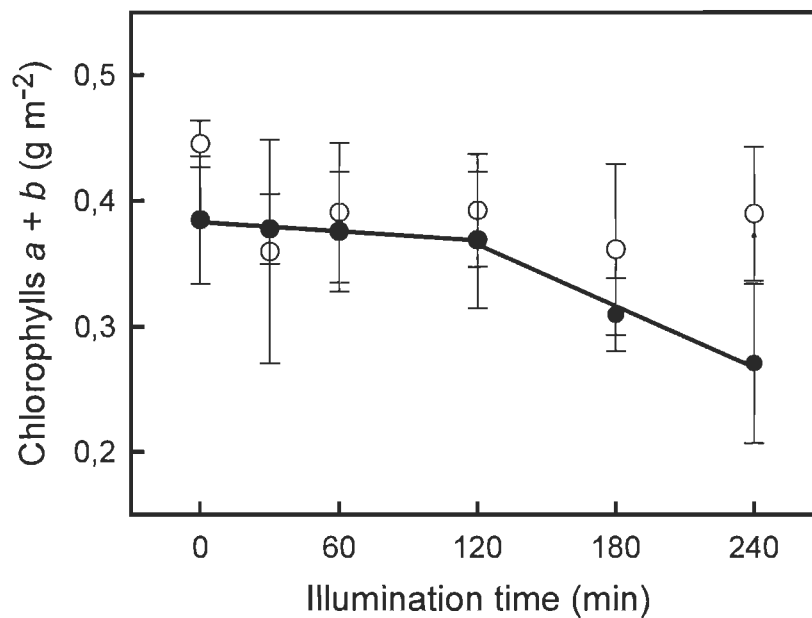


Fig. 2. Chlorophyll a+b concentrations in *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methyviologen (MV, close circles) after different illumination times. ANOVA indicates that the MV effect is significant ($p \leq 0.001$). Mean comparisons (MV-untreated vs MVtreated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 240 min of illumination ($p=0.011$).

295x217mm (96 x 96 DPI)

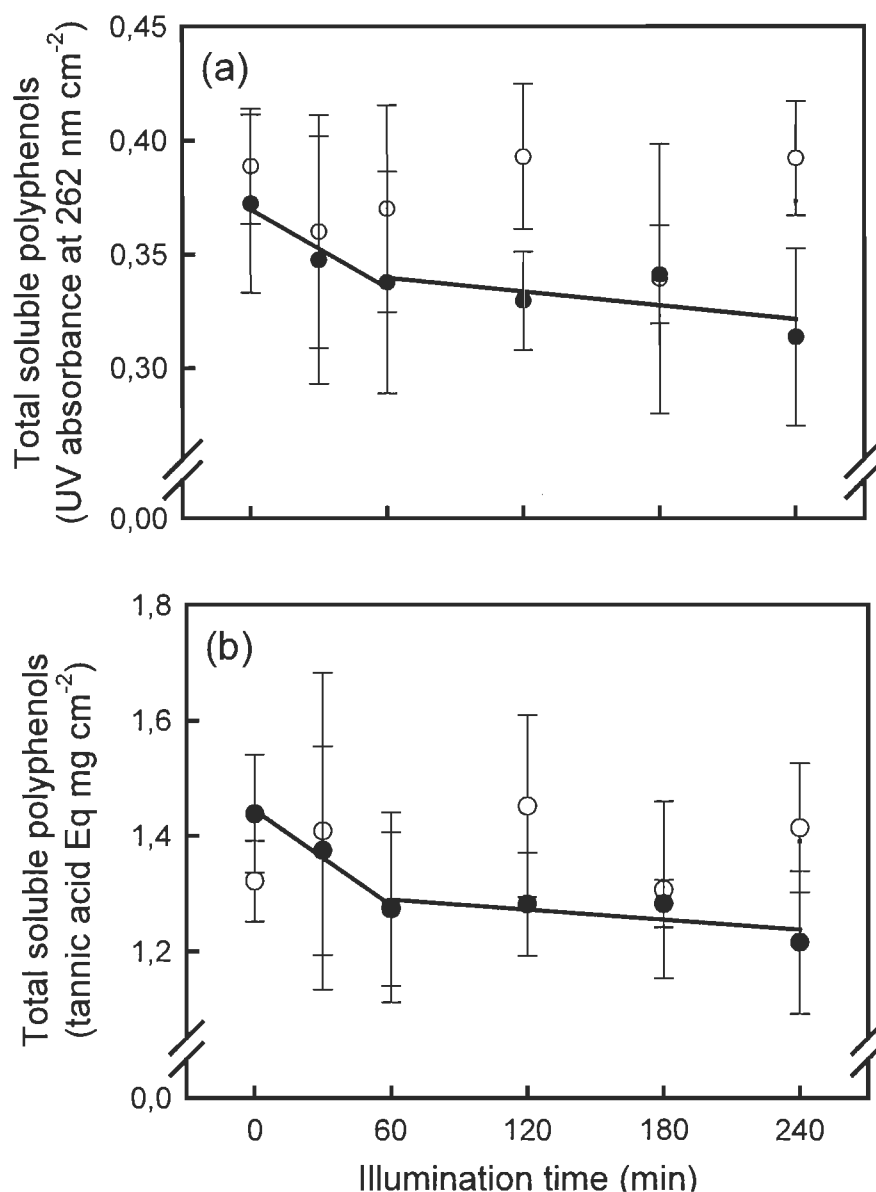


Fig. 3. Concentrations of soluble phenolic compounds of *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after different illumination times. A) Concentrations estimated by UV absorbance at 262 nm of chlorophyll-less spectra. ANOVA indicates that the MV effect is significant ($p = 0.003$). Mean comparisons (MV-untreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 120 min ($p=0.006$) and 240 min ($p=0.006$). B) Concentrations estimated according to the Folin-Ciocalteu method. ANOVA indicates no significant effect of MV and illumination time.

218x293mm (96 x 96 DPI)

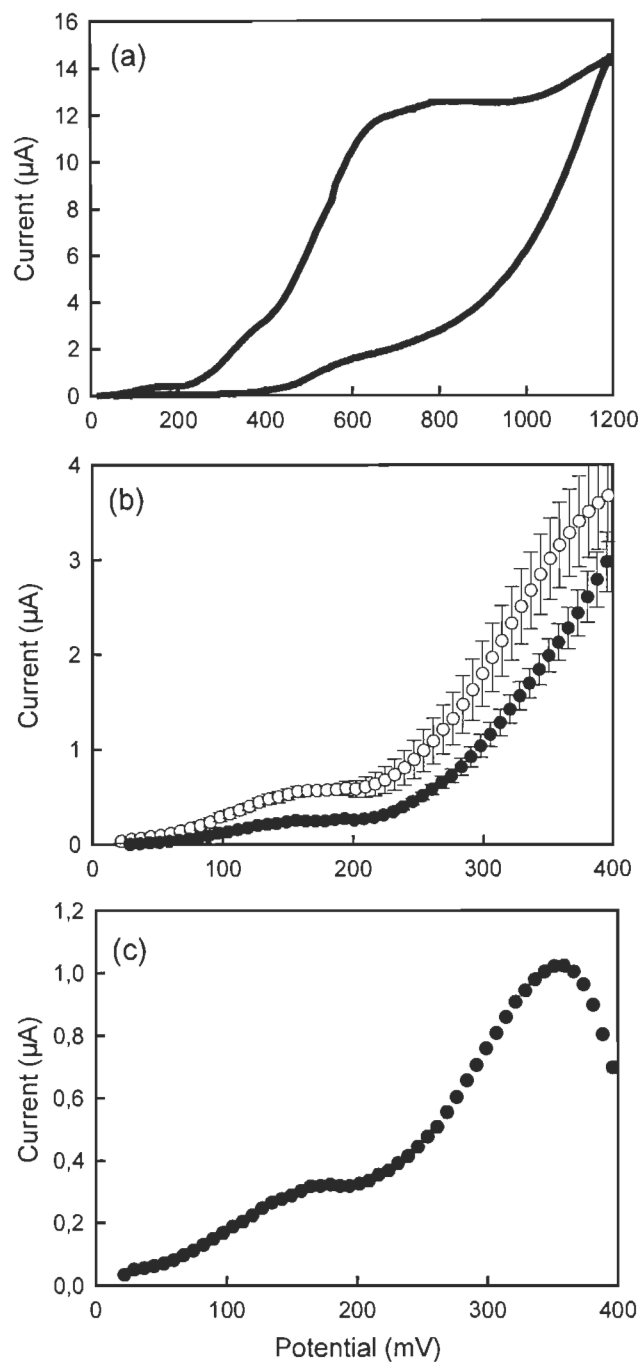


Fig. 4. A) Mean cyclic voltammogram between 0 and 1200mV (background subtracted) of methanolic extracts from untreated *Acer saccharinum* L. leaves, measured at a scan rate of 50 mV s⁻¹ with a 3 mm glassy carbon electrode in phosphate buffer, pH 5.8.

B) Mean voltammograms between 0 and 400 mV (background subtracted) of methanolic extracts from *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after 240 min of illumination.

C) Difference between the mean voltammograms of methanolic extracts from *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM and 0.5 mM methylviologen after 240 min of illumination.

153x294mm (96 x 96 DPI)

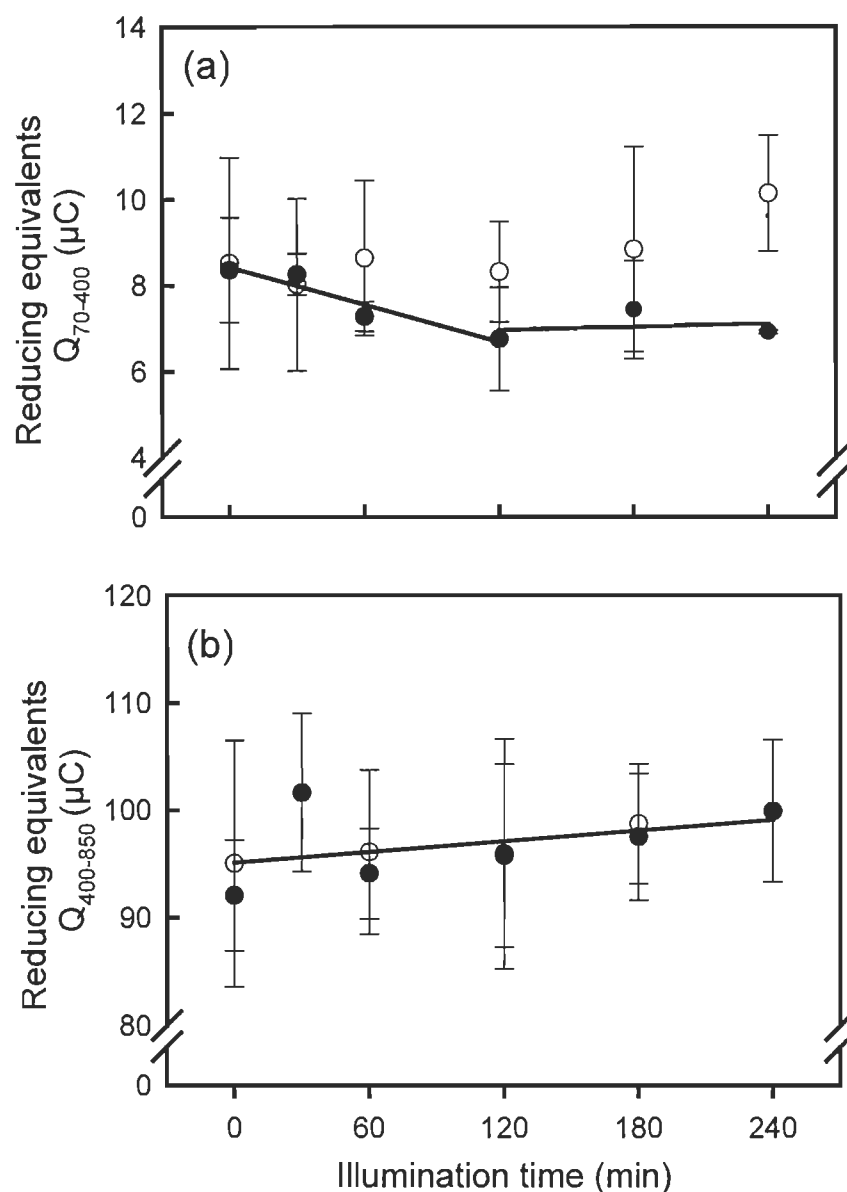


Fig. 5. Numbers of reducing equivalents A) between 70 and 400 mV (Q_{70-400}) and B) between 400 and 850 mV ($Q_{400-850}$) calculated from the voltammograms of methanolic extracts of *Acer saccharinum* L. leaves infiltrated with 0 mM (open circles) and 0.5 mM methylviologen (MV, closed circles) after different illumination times. ANOVA indicates that the MV effect is significant ($p = 0.004$) for Q_{70-400} but not for $Q_{400-850}$. Mean comparisons (Q_{70-400} of MV-untreated vs MV-treated) made by two-sample t-tests indicate the presence of significant differences at 240 min ($p=0.022$).
214x295mm (96 x 96 DPI)

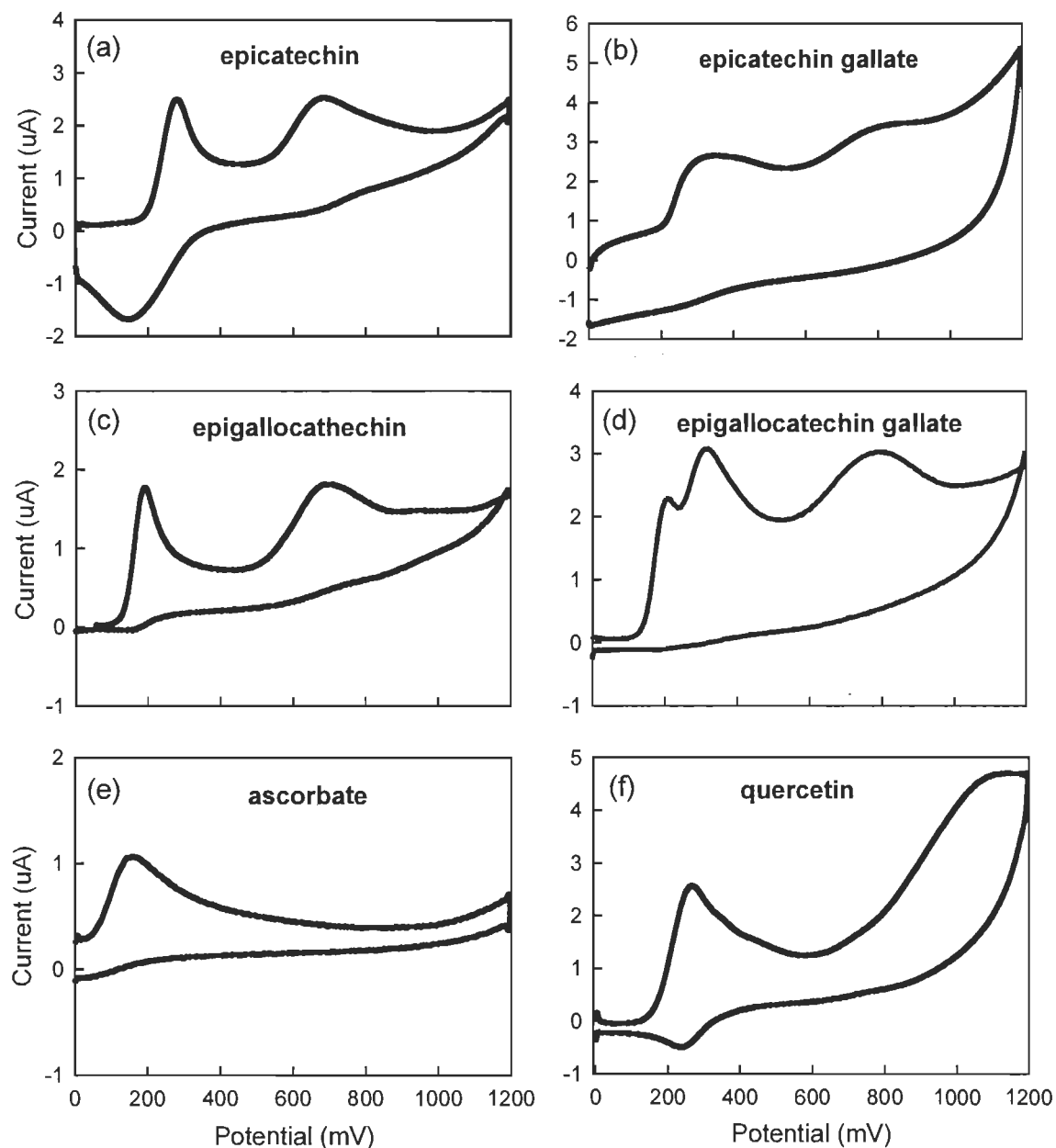


Fig. 6. Mean cyclic voltammograms of 0.1 mM (a) epicatechin, (b) epicatechin gallate, (c) epigallocatechin, (d) epigallocatechin gallate, (e) ascorbate and (f) quercetin. Voltammograms were measured at a scan rate of 50 mV s⁻¹ with a 3 mm glassy carbon electrode in phosphate buffer, pH 5.8. The background was subtracted.

268x293mm (96 x 96 DPI)

CHAPITRE IV

EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE L'AJOUT D'EXTRAIT DE FEUILLES D'ÉRABLE SUR L'OXYDATION DE L'ACIDE ASCORBIQUE ET DE L'ÉPIGALLOCATECHINE GALLATE MESURÉE PAR VOLTAMMÉTRIE

4.1 Introduction

En raison de leur pouvoir antioxydant, les composés phénoliques des plantes présentent un intérêt en alimentation pour la prévention des cancers et des troubles cardiovasculaires (Hertog et coll. 1993). En effet, les composés phénoliques contribuent à la relation inverse entre la consommation de fruits et de légumes et l'incidence de ces maladies (Foyer et Noctor 2009).

Il est étonnant de constater que malgré l'effet bénéfique reconnu de leur pouvoir antioxydant sur la santé humaine, il existe toujours un débat sur l'importance physiologique *in planta* du pouvoir antioxydant des composés phénoliques dans la défense des plantes contre les dommages oxydants engendrés lors de stress environnementaux. Pourtant, il est admis que plusieurs composés phénoliques ont, sur une base molaire, une capacité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique (Rice-Evans 2001). Il est d'ailleurs bien documenté que la concentration des composés phénoliques augmente dans les végétaux soumis à divers stress environnementaux (Dixon et Paiva 1995). De plus, considérant que certaines peroxydases (classe III, ou guaïacol peroxidase) sont capables de dégrader le H_2O_2 en utilisant des composés phénoliques comme donneur d'électrons (c.-à-d. antioxydants) (Almagro et coll. 2009; Foyer et Noctor 2009), un modèle physiologique a été proposé dans lequel le H_2O_2 peut diffuser hors des chloroplastes pour être dégradés dans les vacuoles des cellules du mésophylle et même de l'épiderme (Sgherri et coll. 2003; Yamasaki et coll. 1997). Cependant, des revues récentes maintiennent que l'importance physiologique de ces réactions demeure incertaine (Almagro et coll. 2009; Hernández et coll. 2008).

Une des évidences expérimentales toujours manquante qui pourrait supporter le rôle *in planta* du pouvoir antioxydant des composés phénoliques est la caractérisation

des changements de leurs propriétés d'oxydoréduction causés par les stress environnementaux. Tel que démontré au chapitre précédent, les stress oxydants aigus peuvent causer une oxydation des composés phénoliques à un taux supérieur à leur réduction ou leur resynthèse. Lors de stress chroniques, mais modérés, tels les fortes intensités lumineuses et le stress hydrique, il y a non seulement une augmentation globale de la concentration de composés phénoliques dans les plantes (Dixon et Paiva 1995), mais aussi une accumulation de composés comme la quercétine (Tattini et coll. 2004) et les anthocyanines (Gould et coll. 2010), réputées comme excellents antioxydants de par leur groupement catéchol (*o*-dihydroxybenzène).

Les méthodes traditionnelles de mesure de la capacité antioxydante comme celles impliquant le réactif Folin-Ciocalteu ou le radical stable ABTS en équivalent trolox (TEAC), permettent seulement de mesurer la quantité de composés phénoliques ou de groupements phénoliques pouvant être oxydés par le réactif utilisé, donc à un potentiel d'oxydoréduction donné (Appel et coll. 2001). Au contraire, la voltammétrie, encore peu utilisée en physiologie végétale, est une méthode électrochimique qui permet d'obtenir un « spectre » des potentiels d'oxydoréduction des différents composés présents en solution (Chevion et Chevion 2000). La voltammétrie est une méthode rapide et relativement peu coûteuse par laquelle un courant positif (ou négatif) produit suite à l'oxydation (ou la réduction) de composés en solution est mesuré selon le potentiel appliqué sur l'électrode qui varie à un taux constant (ex. 50 mV s^{-1}). La courbe du courant mesuré en fonction du potentiel appliqué sur l'électrode (voltammogramme; voir Fig. 4a chap. 3) montre généralement un ou plusieurs pics (anodiques) correspondant à l'oxydation d'un composé. La hauteur du pic (μA) dépend du nombre d'électrons captés par l'électrode à un potentiel donné, et est donc fonction de la concentration du composé oxydé. Quant à la position du pic, elle correspond à son potentiel d'oxydation (mV), c'est-à-dire le potentiel nécessaire pour qu'un électron soit transféré. Plus le pic apparaît à un bas potentiel, plus le composé donne facilement un électron et plus forte est sa capacité antioxydante (Kilmartin 2001b). Lorsque le potentiel sur l'électrode est inversé (phase de réduction), les molécules précédemment oxydées peuvent, dans certains cas (si elles sont suffisamment stables), être réduites à leur état original ce qui crée du courant négatif (pic cathodique). Pour des

voltammogrammes obtenus à partir de solutions contenant un seul composé, la hauteur des pics anodiques et cathodiques, leur position (potentiel), la différence de potentiel entre ceux-ci, la hauteur relative de ces pics ainsi que l'aire sous la courbe sont les principaux paramètres utilisés pour décrire les propriétés d'oxydoréduction du composé à l'étude (Kilmartin 2001b).

La voltammétrie peut être utilisée non seulement avec des solutions de produits purs, mais aussi avec des mélanges complexes d'origine végétale tels que les thés (Bourassa et coll. manuscrit en préparation; Kilmartin et Hsu 2003), vins (Kilmartin et coll. 2001a) et des extraits de plantes médicinales (Naik et coll. 2003) ou de différents écotypes (Neill et coll. 2002). Jusqu'à présent, le principal intérêt des voltammogrammes de telles solutions complexes est l'estimation de leur pouvoir antioxydant global, estimé à partir de l'aire sous la courbe (correspondant au nombre d'équivalents réducteurs dans une gamme donnée de potentiels). Cependant, comme il a été mentionné dans le chapitre 3, il est difficile de faire une analyse détaillée des voltammogrammes provenant de mélanges puisque la courbe mesurée n'est pas nécessairement la somme de l'oxydation de chacune des molécules en solution. Des interactions complexes entre les molécules du mélange peuvent également affecter le voltammogramme. Par exemple, les molécules oxydées par l'électrode peuvent être re-réduites par des molécules en solutions pour être oxydées à nouveau. De plus, certaines molécules du mélange peuvent être adsorbées sur l'électrode de travail et créer ainsi une barrière réduisant l'accès à l'électrode pour d'autres molécules. Les autres molécules en solution requièrent alors un potentiel plus élevé (sur-potentiel) pour être oxydées (Makhotkina et Kilmartin 2010). Ce type d'interactions est particulièrement évident pour l'acide ascorbique lorsqu'il est en présence de composés phénoliques puisque son oxydation par l'électrode se produit à des potentiels supérieurs à celui mesuré en absence de tels composés (Makhotkina et Kilmartin 2010). Lorsque l'oxydation de l'acide ascorbique est mesurée à un potentiel fixe (ex. électrode spécifique à l'acide ascorbique), la présence de composés phénoliques dans des vins et jus d'orange entrave son oxydation ce qui diminue le courant et de ce fait, diminue l'estimation de sa concentration (Kilmartin et coll. 2008).

Afin d'interpréter les voltammogrammes de mélanges complexes pour éventuellement mieux comprendre l'oxydation des composés phénoliques lors d'un stress oxydant, nous avons voulu caractériser l'importance du sur-potentiel créé par la présence en solution des composés phénoliques d'un extrait de feuilles d'érable argenté pour deux antioxydants bien connus, l'acide ascorbique (AsA) et le gallate d'epigallocatechine (EGCG). Plus spécifiquement, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- Un tel sur-potentiel diminue-t-il la quantité d'antioxydants pouvant être oxydés par l'électrode ou retarde-t-il seulement leur oxydation (c.-à-d. déplace l'oxydation vers des potentiels plus élevés)?
- L'oxydation de l'AsA et celle de l'EGCG sont-elles affectées de la même façon par la présence des composés phénoliques des feuilles d'érable argenté?

Nos résultats indiquent qu'en estimant le nombre d'équivalents réducteurs, les composés phénoliques des feuilles d'érable argenté diminuent fortement l'oxydation de l'EGCG alors qu'ils ne font que déplacer l'oxydation de l'AsA vers des potentiels plus élevés.

4.2 Matériel et méthode

4.2.1 Solutions

L'EGCG et l'AsA ont été dissous dans le méthanol pur. L'EGCG a été choisi puisqu'il est possiblement le principal composé oxydé chez l'érable argenté lors d'un stress photooxydants (chapitre 3). L'AsA a été choisi puisqu'il est facilement oxydable, qu'il pourrait être impliqué dans la détoxification des radicaux libres et que son oxydation semble peu affectée par la présence d'autres composés.

Des feuilles d'érable argenté (*Acer saccharinum* L.) développées en plein soleil ont été prélevées d'un arbre sur le campus de l'Université du Québec à Trois-Rivières. 0,51 g de feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide. Les composés phénoliques ont été extraits par deux incubations successives dans 10 ml de méthanol pur à 70 °C

pendant 20 minutes suivi d'une dernière extraction dans du méthanol à 50 % à température ambiante pendant 30 minutes.

Deux ml de cet extrait de feuilles ont été mélangés à un volume égal de tampon phosphate 100 mM au pH initial de 5,5 et contenant 5 mM de KCl. Le pH final de cette solution d'extrait a été ajusté à 5,8 avec du HCl 1 N.

4.2.2 Voltammétrie

Les voltammogrammes ont été enregistrés de 0 à 1200 mV à un taux de balayage de 50 mV s^{-1} par un potentiostat de model 362 (Princeton Appl. Res. USA), en utilisant une électrode de travail en carbone vitrifiée (BAS MF-2012, 3 mm de diamètre) et une contre-électrode de platine. Le potentiel a été mesuré par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. Avant chaque mesure, l'électrode de travail a été polie doucement avec de la poudre d'aluminium en solution, puis a été déposée dans un bain à ultrason pendant 2 minutes afin d'enlever tout résidu. Les électrodes ont été placées dans la solution environ 10 secondes avant la mesure. Le courant de la solution tampon a été soustrait aux voltammogrammes. Les voltammogrammes présentés sont la moyenne de 3 à 4 mesures.

Nous avons examiné l'effet de différentes concentrations (0,1 mM, 0,25 mM, 0,50 mM, 1,25 mM et 2,25 mM) d'AsA et d'EGCG sur la hauteur (courant) et la position (potentiel) du pic d'oxydation ainsi que sur le nombre d'équivalents réducteurs (électrons) Q_{0-1200} (μC) calculés par l'aire sous la courbe entre 0 et 1200 mV divisée par la vitesse de balayage (50 mV s^{-1}). Nous avons aussi mesuré ces paramètres pour des solutions d'AsA et d'EGCG ajoutées à un volume égal de l'extrait méthanolique de feuilles d'érable argenté (section 4.2.1).

4.3 Résultats

4.3.1 Voltammogrammes de l'acide ascorbique

4.3.1.1 Voltammogrammes de l'acide ascorbique à différentes concentrations en absence d'extraits de feuilles d'érable argenté

Le voltammogramme de l'AsA mesuré à un pH de 5,8 présente un seul pic d'oxydation (Fig. 4.1). Ce pic se déplace de 174 mV jusqu'à 364 mV lorsque la concentration augmente de 0,1 mM à 0,5 mM, puis reste au même potentiel pour des concentrations plus élevées (Fig. 4.2). Il est intéressant de constater que la hauteur du pic d'oxydation (μA) et le Q_{0-1200} sont linéairement corrélés avec la concentration de l'AsA (Fig. 4.3) avec un R^2 de 0,98.

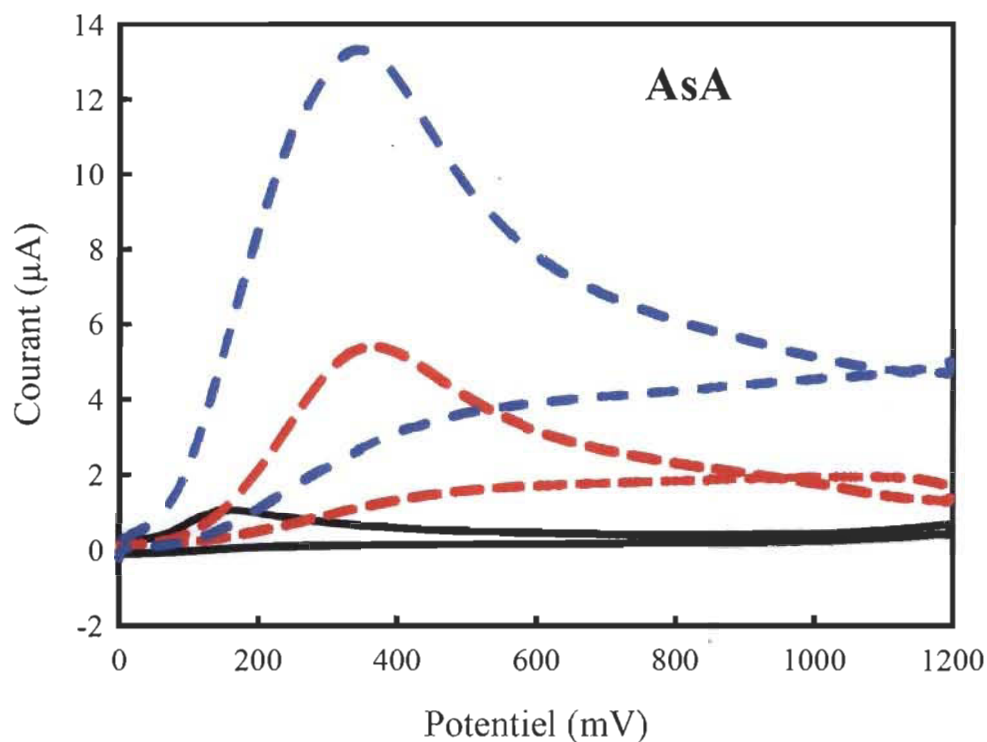


Figure 4.1 : Voltammogrammes de différentes concentrations d'AsA, soit 0,1 mM (courbe continue noire), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges) et 1,25 mM (courbe de traits et pointillés bleus). Le courant a été mesuré à 50 mV s^{-1} par une électrode de carbone vitrifiée de 3 mm de diamètre dans un tampon phosphate 100 mM à un pH final de 5,8.

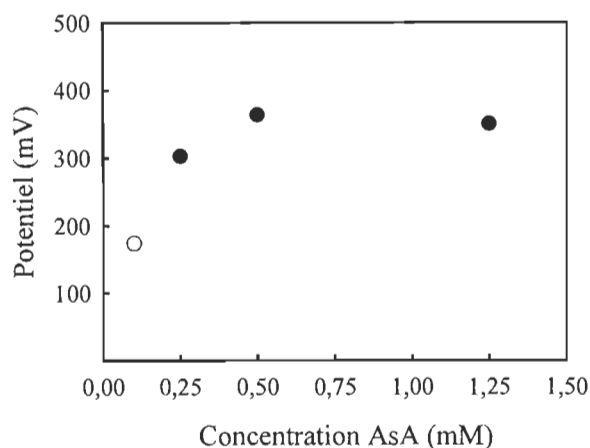


Figure 4.2 : Graphique de la position du pic d'oxydation (potentiel d'oxydation) en fonction de la concentration de l'AsA.

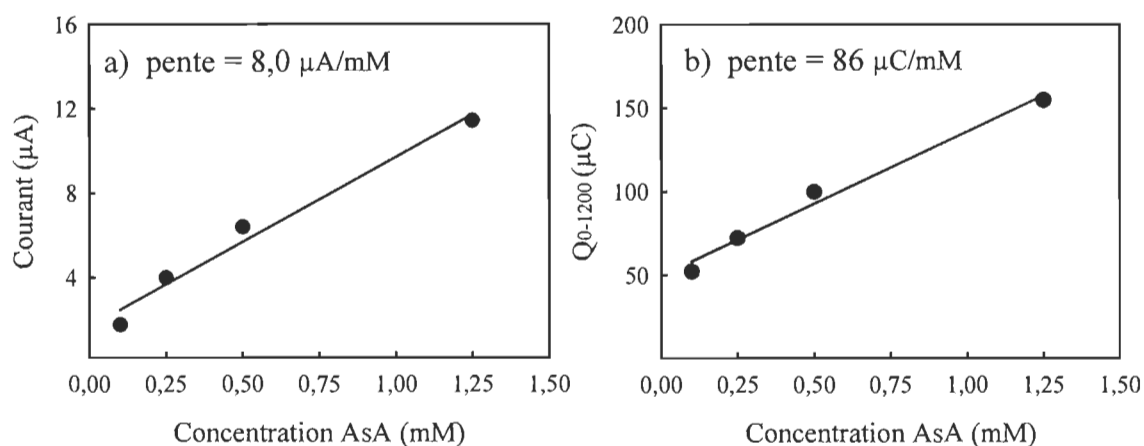


Figure 4.3 : Graphiques (a) du courant du pic d'oxydation et (b) du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'AsA. **a :** $y = 8,0x + 1,7$; **b :** $y = 86x + 50$.

4.3.1.2 Voltammogrammes de l'acide ascorbique à différentes concentrations en présence d'extraits de feuilles d'érable argenté

Pour ce qui est des voltammogrammes de l'AsA mesurés en présence de l'extrait de feuille d'érable argenté, on remarque que le pic d'oxydation de l'AsA reste visible quoique moins bien défini, en particulier pour de faibles concentrations (Fig. 4.4). La présence des composés phénoliques de l'extrait de feuilles d'érable causent un déplacement d'environ 100 mV du potentiel d'oxydation de l'AsA par rapport aux

solutions pures d'AsA (Fig. 4.5). Comme pour l'AsA sans extrait, le potentiel d'oxydation augmente très peu pour des concentrations supérieures à 0,5 mM.

Dans l'extrait de feuilles d'érable, le courant du pic d'oxydation de l'AsA augmente linéairement avec la concentration, avec une pente de $8,6 \mu\text{A mM}^{-1}$ (Fig. 4.6a) soit légèrement supérieure à la pente pour l'AsA sans extrait d'érable de $8,0 \mu\text{A mM}^{-1}$. De même, les valeurs du Q_{0-1200} en présence d'extrait d'érable varient linéairement avec la concentration d'AsA ajouté (Fig. 4.6b), avec une pente de $96 \mu\text{C/mV}$, soit un peu plus élevé que pour l'AsA sans extrait ($86 \mu\text{C/mV}$). La présence des composés phénoliques de l'extrait de feuilles d'érable augmente le Q_{0-1200} de l'AsA d'environ $80 \mu\text{C}$.

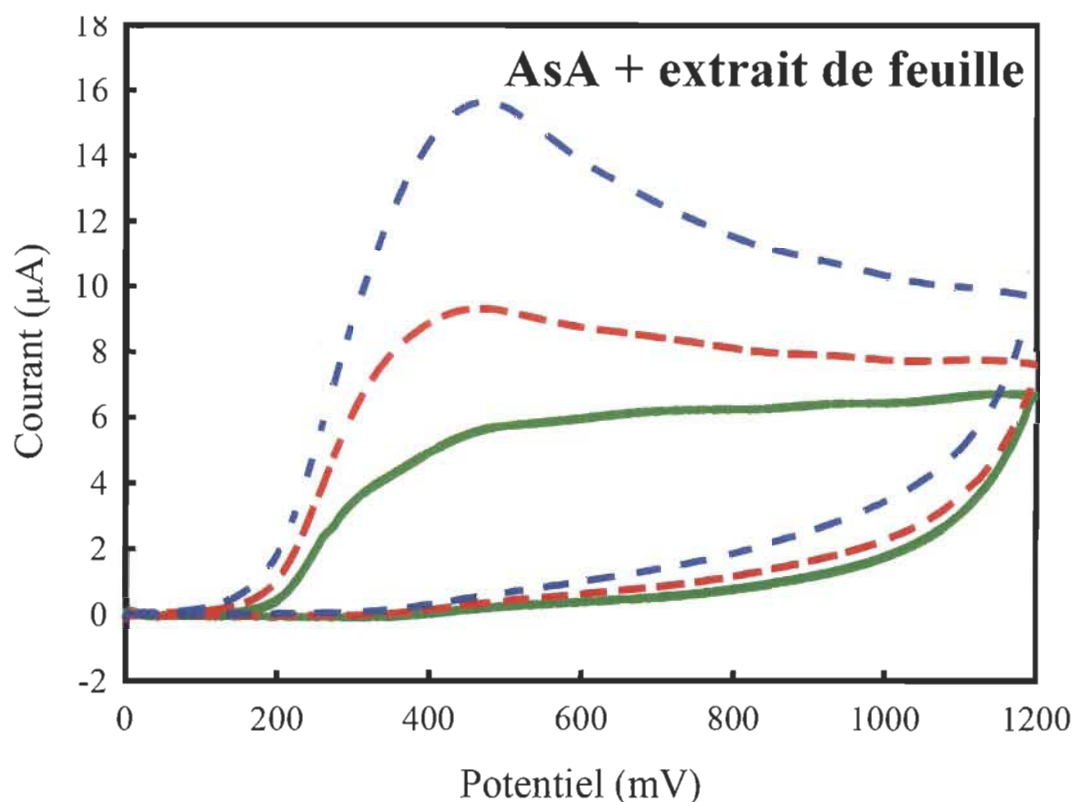


Figure 4.4 : Voltammogrammes d'extrait de feuilles d'érable argenté en présence de différentes concentrations d'AsA, soit 0,0 mM (courbe vert pâle), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges) et 1,25 mM (courbe de traits longs bleus).

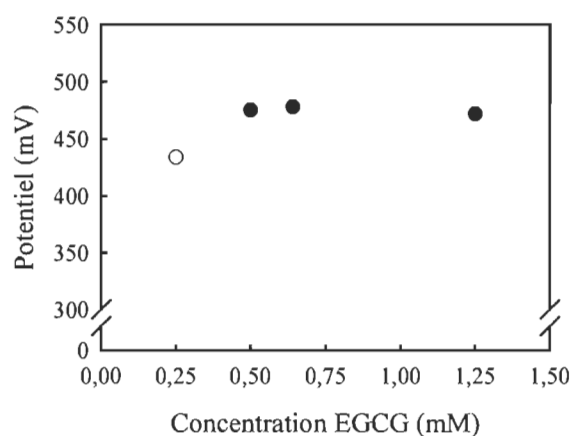


Figure 4.5 : Graphique de la position du pic d'oxydation (potentiel d'oxydation) en fonction de la concentration de l'ASA, en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté.

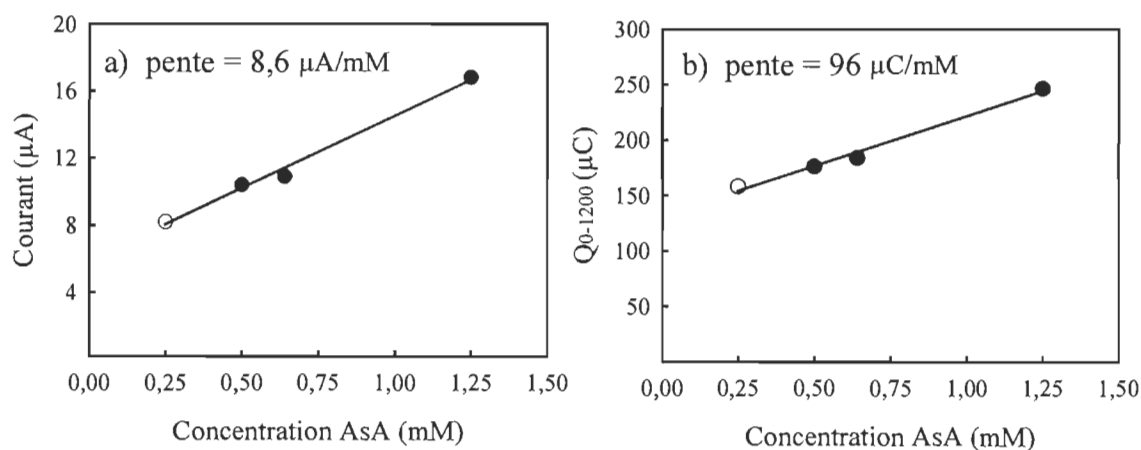


Figure 4.6 : Graphiques (a) du courant du pic d'oxydation et (b) du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'AsA, en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté. **a** : $y = 8,6x + 6,1$; **b** : $y = 96x + 128$.

4.3.2 Voltammogrammes du gallate d'épigallocatechine

4.3.2.1 Voltammogrammes du gallate d'épigallocatechine à différentes concentrations en absence d'extrait de feuilles d'érable argenté

Le voltammogramme de l'EGCG à pH 5,8 présente trois pics d'oxydation (Fig. 4.7). Les deux premiers pics se déplacent vers des potentiels plus élevés lorsque la concentration augmente. Le deuxième pic passe de 317 mV pour une concentration de

0,1 mM à 400 mV pour une concentration de 1,25 mM, sans plafonner après 0,5 mM contrairement à l'AsA. Puisque le premier pic se déplace vers le début du deuxième pic, il se fond au deuxième et devient indéfinissable (Fig. 4.7), il ne sera donc pas analysé. Étonnamment, le potentiel du troisième pic diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration, en passant de 829 mV à 754 mV (Fig. 4.8b).

Comme pour l'AsA, nous avons observé que la hauteur du deuxième pic d'oxydation (μA) et le Q_{0-1200} sont linéairement corrélés avec la concentration de l'EGCG entre 0,1 mM et 1,25 mM avec un R^2 de 0.99 (Fig. 4.9), avec des pentes de $8,4 \mu\text{A}/\text{mV}$ et $126 \mu\text{C}/\text{mV}$, à peine plus élevée que celle de l'AsA ($8,0 \mu\text{A}/\text{mV}$; $122 \mu\text{C}/\text{mV}$). Cependant, la hauteur du troisième pic d'oxydation de l'EGCG augmente rapidement jusqu'à une concentration de 0,25 mM, puis avec une pente beaucoup plus faible pour des concentrations supérieures.

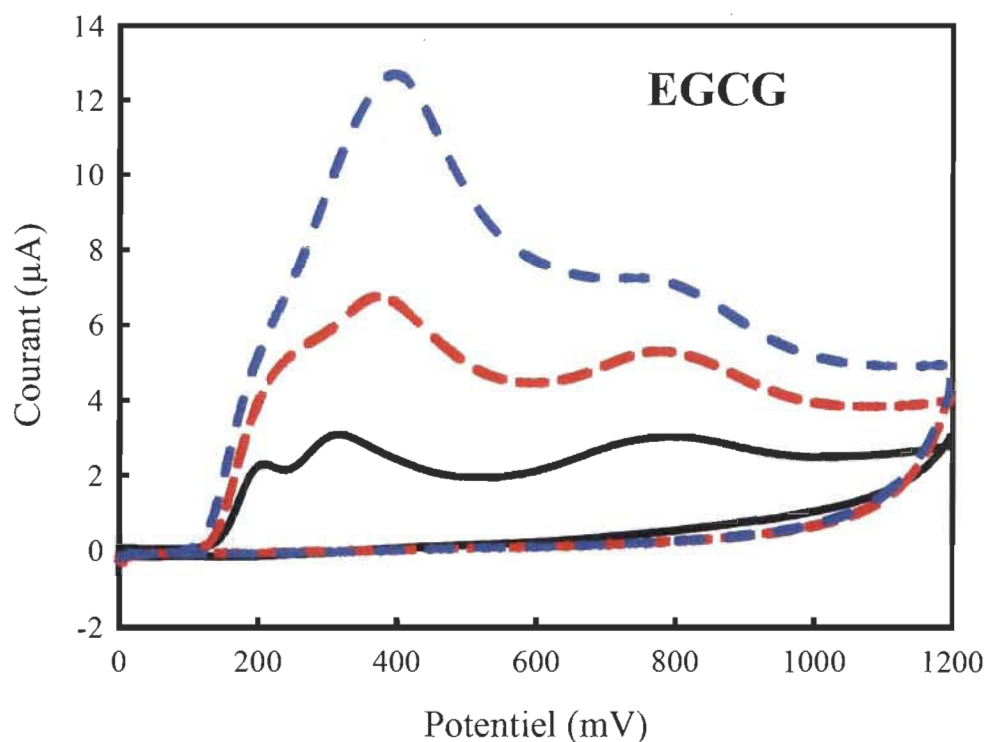


Figure 4.7 : Voltammogrammes de différentes concentrations d'EGCG, soit 0,1 mM (courbe continue noire), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges) et 1,25 mM (courbe de traits et pointillés bleus).

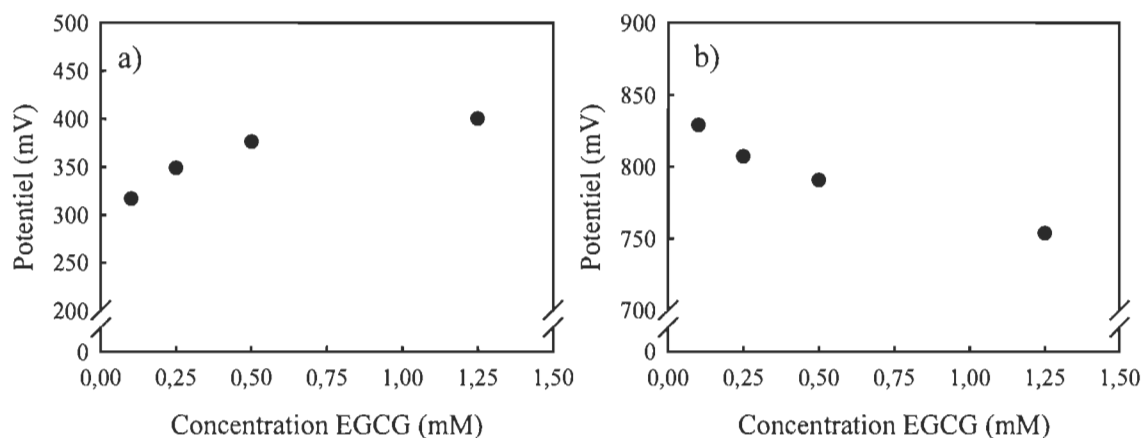


Figure 4.8 : Graphiques de la position du deuxième pic d'oxydation (a) et du troisième pic d'oxydation (b) (potentiel d'oxydation) en fonction de la concentration de l'EGCG.

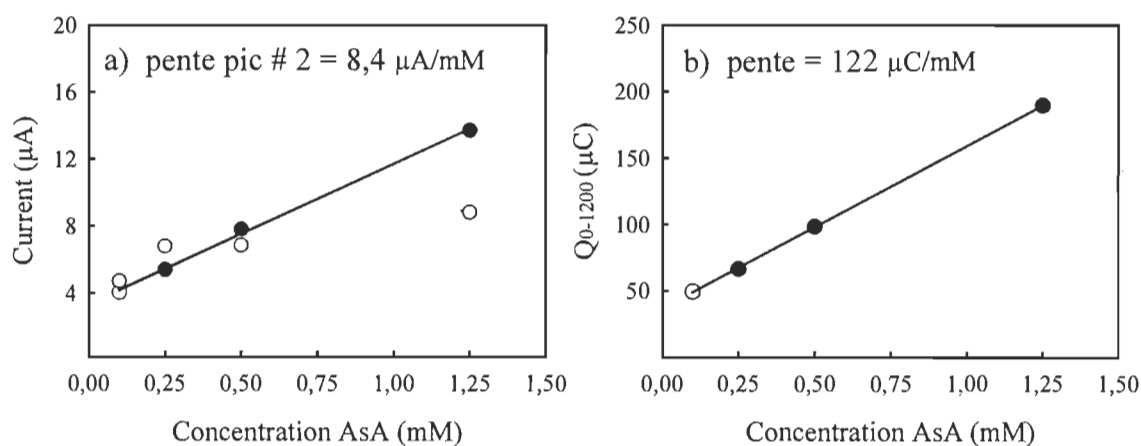


Figure 4.9 : Graphiques (a) du courant du deuxième (cercles pleins) et troisième pic d'oxydation (cercles vides) et (b) du nombre d'équivalents réducteurs (Q₀₋₁₂₀₀) en fonction de la concentration de l'EGCG. **a :** 2^{ème} pic : $y = 8,4x + 3,3$; 3^{ème} pic : $y = 3,0x + 5,2$; **b :** $y = 122x + 36$.

4.3.2.2 Voltammogrammes du gallate d'épigallocatechine à différentes concentrations en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté

Lorsque l'on ajoute de l'EGCG à de l'extrait de feuilles d'érable, les pics d'oxydation de l'EGCG ne sont plus distincts (Fig. 4.10). Nous n'avons donc pas été en mesure d'évaluer les effets de la concentration sur la hauteur des pics ou sur le potentiel d'oxydation. Il est cependant possible de mesurer la variation du Q₀₋₁₂₀₀. La présence de l'extrait augmente la valeur initiale du Q₀₋₁₂₀₀ d'environ 80 μC, puis les valeurs sont

linéairement reliées à la concentration de l'EGCG ($R^2 = 0,80$; Fig. 4.11). La pente de $26 \mu\text{C}/\text{mV}$ est nettement plus faible que pour l'EGCG sans extrait d'érable ($122 \mu\text{C}/\text{mV}$).

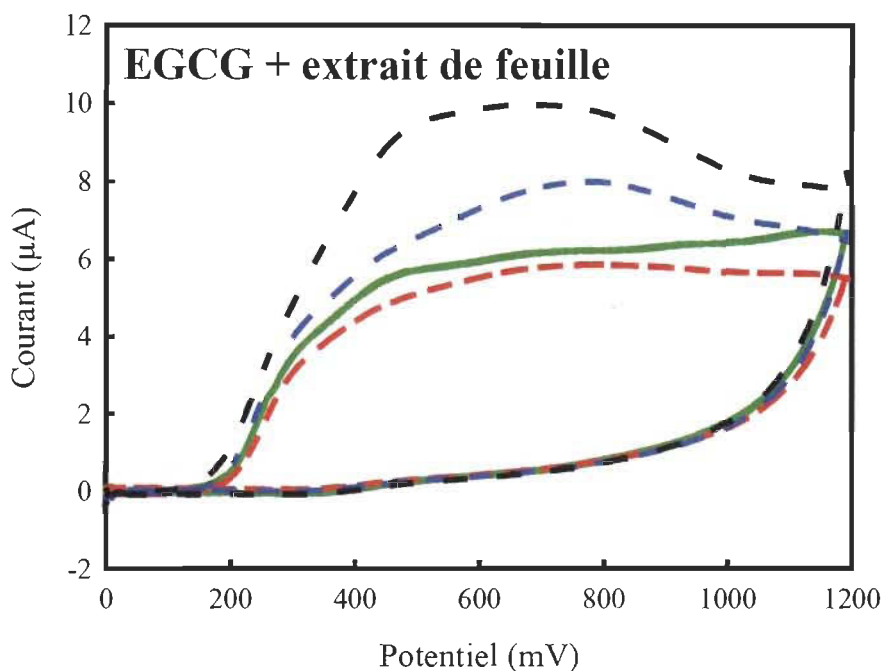


Figure 4.10 : Voltammogrammes d'extrait de feuilles d'érable argenté en présence de différentes concentrations d'EGCG, soit 0,0 mM (courbe vert pâle), 0,25 mM (courbe de pointillés verts), 0,50 mM (courbe de traits rouges), 1,25 mM (courbe de traits longs bleus) et 2,25 mM (courbe d'un trait et deux pointillés noirs).

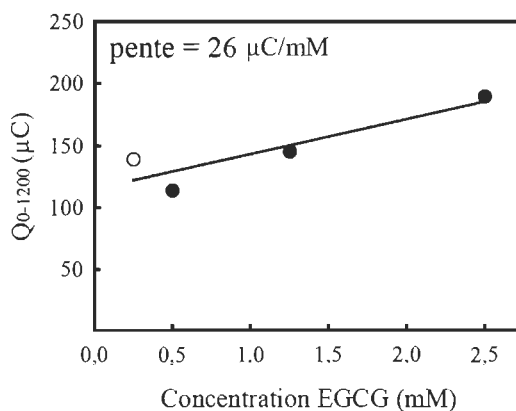


Figure 4.11 : Graphiques du nombre d'équivalents réducteurs (Q_{0-1200}) en fonction de la concentration de l'EGCG, en présence d'extrait de feuilles d'érable argenté. $y = 26x + 120$.

4.4 Discussion

La voltammétrie cyclique est une méthode commune en électrochimie pour caractériser les propriétés d'oxydoréduction de composés purs. L'application de cette méthode en physiologie végétale est prometteuse mais demeure compliquée puisqu'elle est influencée par certains facteurs dont la concentration des molécules oxydables et l'interaction entre certaines molécules en solution. En effet, les molécules en solution ainsi que leurs produits d'oxydation peuvent être adsorbés à l'électrode de travail et ainsi nuire aux oxydations subséquentes ou encore interagir entre elles et modifier leur propriété d'oxydoréduction. Il était donc important de mieux caractériser ces effets afin d'interpréter plus adéquatement les voltammogrammes de mélanges complexes. Ainsi, nous avons observé que la concentration des composés et la présence de composés phénoliques de l'extrait de feuille d'érable argenté affectent différemment l'oxydation de l'AsA et de l'EGCG.

Pour l'AsA, il est difficile d'expliquer pourquoi l'oxydation s'effectue à des potentiels plus élevés lorsque la concentration augmente entre 0,1 mM et 0,5 mM, alors qu'elle se stabilise à vers des potentiels de 350 mV pour des concentrations plus élevées. Il est peu probable que l'adsorption de l'AsA sur l'électrode entrave les oxydations subséquentes comme pourrait le provoquer l'adsorption d'un composé électroinactif présent dans un mélange. On peut penser que cette observation pourrait plus probablement être attribuable à la diffusion des molécules et une accessibilité à l'électrode plus faciles pour des concentrations plus faible d'AsA, alors qu'à des concentrations de plus de 0,5 mM cet effet deviendrait négligeable. Cette augmentation du potentiel d'oxydation n'a toutefois pas d'effet négatif important sur la quantité de molécules d'AsA oxydées puisqu'elle reste linéairement corrélée avec la concentration d'AsA en solution.

La présence des composés phénoliques de l'extrait de feuilles d'érable argenté influence peu l'oxydation de l'AsA si ce n'est que d'augmenter le courant, le Q_{0-1200} et le potentiel d'oxydation d'une valeur fixe. Comme pour la solution pure, l'oxydation de l'AsA n'est plus retardée pour des concentrations supérieures à 0,5 mM puisque l'augmentation du courant et du Q_{0-1200} en fonction de la concentration d'AsA reste

pratiquement la même avec ou sans extrait d'érable. Nous pouvons donc en conclure que la présence des composés de l'extrait n'empêche pas l'oxydation de l'AsA. Au contraire, la quantité de molécules oxydées augmente légèrement avec la concentration d'AsA, possiblement parce que l'AsA et certains composés de l'extrait réagissent ensemble pour être réduits puis être oxydés de nouveau au cours de la lecture du voltammogramme. D'après Buettner (1993), le faible potentiel d'oxydation de l'AsA lui permettrait de réduire les formes oxydées de certains composés phénoliques afin de les régénérer et leur permettre de s'oxyder à nouveau. Il serait cependant aussi possible que l'AsA oxydé une première fois reçoive rapidement un électron d'un composé phénolique et soit oxydé de nouveau.

Pour l'EGCG en solution, on constate que l'augmentation de sa concentration cause un déplacement des deux premiers pics d'oxydation de l'EGCG vers des potentiels supérieurs, possiblement puisque des concentrations plus élevées entraînent une diffusion plus lente des molécules vers l'électrode comme pour l'AsA. Cependant, contrairement à l'AsA, le potentiel d'oxydation est retardé même à des concentrations supérieures à 0,5 mM. La troisième oxydation de l'EGCG ne semble pas être affectée négativement par l'augmentation de la concentration. Au contraire, cette oxydation s'effectue à des potentiels plus bas lorsque la concentration augmente. Cela pourrait être attribuable à des interactions entre l'EGCG ou les produits d'oxydations des deux premières oxydations qui facilitent la troisième oxydation. Nous avons aussi observé que l'augmentation de la concentration n'empêche pas l'oxydation totale (Q_{0-1200}) de l'EGCG ou la valeur de courant de son deuxième pic d'oxydation. Néanmoins, au-delà de 0,5 mM, la troisième oxydation ne s'effectue pas en totalité. Il est probable que cette troisième oxydation soit plus sensible à l'adsorption sur l'électrode de travail. Il serait aussi possible qu'après la deuxième oxydation, une portion de l'EGCG réagisse avec certains composés en solution, le rendant ainsi impossible à oxyder une troisième fois. D'ailleurs, lors de précédentes mesures de voltammogrammes de différentes catéchines présentes dans le thé qui contient une grande quantité d'EGCG, il a été observé que la présence de l' α - et la β - caséines, 2 protéines du lait déplacent les pics d'oxydation vers des potentiels plus élevés en affectant différemment les pics d'oxydation de l'EGCG. (Bourassa et coll. manuscrit en préparation).

Contrairement à l'AsA, la présence des composés de l'extrait de feuilles d'érable argenté diminue sensiblement l'oxydation de l'EGCG. Les trois pics d'oxydation deviennent indiscernables même pour une concentration d'EGCG de 2,25 mM. Il n'est donc pas possible de vérifier si l'oxydation des composés de l'extrait ou leur interaction avec l'EGCG influence le potentiel d'oxydation. Cependant, on constate que, outre l'oxydation d'environ 80 μC attribuable aux composés de l'extrait, l'oxydation totale (Q_{0-1200}) de l'EGCG augmente linéairement avec sa concentration. Cependant, l'augmentation du Q_{0-1200} pour l'EGCG en présence de l'extrait est 78 % plus faible qu'en son absence. L'oxydation de l'EGCG est probablement entravée par une interaction avec les composés de l'extrait le rendant ainsi moins disponible pour l'oxydation. Il est peu probable que la baisse de l'oxydation de l'EGCG soit attribuable seulement au ralentissement de la diffusion des molécules d'EGCG vers l'électrode, puisque dans ce cas, les pics typiques à l'EGCG seraient toujours visibles sur le voltammogrammes, ce qui n'est pas le cas.

4.5 Conclusion

Nous avons observé que lorsque la concentration de la solution d'AsA ou d'EGCG augmente, l'oxydation est retardée sans pour autant être limitée. Bien qu'il soit possible d'estimer la quantité de molécules oxydées avec les voltammogrammes pour la gamme de concentrations à l'essai, il est préférable d'utiliser des solutions peu concentrées, soit de moins de 0,5 mM, afin de réduire la variation des potentiels d'oxydation. En présence des composés de l'extrait de feuille d'érable argenté, l'oxydation de l'AsA est très peu influencée par l'adsorption sur l'électrode ou par les interactions avec les molécules du mélange ou leur produit d'oxydation. À l'inverse, l'oxydation de l'EGCG est considérablement diminuée et modifiée par les interactions avec ces composés.

L'étude de la variation des propriétés d'oxydation de l'EGCG dans un extrait n'est donc pas facile. Cependant l'oxydation totale estimée par le Q_{0-1200} reste représentative de la concentration d'EGCG oxydable dans le mélange. La voltammétrie est donc une méthode intéressante pour l'étude des propriétés d'oxydoréduction de composés phénoliques suite à leur utilisation lors d'un stress oxydant comme nous

l'avons d'ailleurs utilisée pour l'expérimentation présentée au chapitre 3. Il reste cependant des études supplémentaires à réaliser afin d'obtenir un maximum d'information des voltammogrammes de mélanges complexes.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

Chez les plantes, les composés phénoliques ont les caractéristiques requises pour détoxifier les radicaux libres produits lors d'un stress oxydant. Ils ont un pouvoir antioxydant suffisant, dans plusieurs cas supérieurs à celui de l'acide ascorbique utilisé dans le cycle Halliwell-Asada, principal mécanisme de détoxification des radicaux libres. Cependant, certains détails importants dont leur localisation principalement dans l'épiderme, leur réaction enzymatique peu caractéristique (plutôt spécifique), l'absence de relation causale entre leur oxydation et les dommages oxydants, font que plusieurs auteurs doutent de leur rôle réel d'antioxydant *in planta*.

Nos expérimentations avaient donc comme objectif principal de vérifier l'hypothèse selon laquelle les composés phénoliques protègent la plante contre les stress photooxydants.

Lorsque soumises à de fortes lumières, les feuilles d'érable argenté n'ont pas présenté de baisse de la concentration en composés phénoliques ou de signes de leur oxydation qui nous auraient permis de confirmer notre hypothèse. Puisque ces feuilles se sont développées sous des conditions ensoleillées durant l'été, les 2800 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auxquels nous les avons exposées pendant 4 heures sont à peine plus élevées que les 2 000 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ qu'offre une journée ensoleillée. Les feuilles étant déjà bien acclimatées à ces conditions, le stress appliqué fut de faible ampleur. La première ligne de défense (Halliwell-Asada) serait donc suffisante pour protéger ces feuilles contre ce stress photooxydant.

L'ajout de méthylviologène aux feuilles d'érable argenté a permis d'augmenter la production de radicaux libres tout en court-circuitant le principal mécanisme de détoxification. Les composés phénoliques ont donc subi une pression oxydative supérieure ce qui nous a permis d'observer leur utilisation lors de la détoxification des radicaux libres. Après deux heures de photoinhibition, les composés phénoliques

utilisables ont tous été oxydés. Privée de cette protection, la détérioration de l'état photosynthétique de la plante s'est accélérée.

L'utilisation de la voltammétrie pour étudier l'état d'oxydoréduction des composés phénoliques à la suite d'un stress oxydant était une première. C'est un outil rapide et peu coûteux, mais l'interprétation des voltammogrammes peut être hasardeuse pour des mélanges complexes comme les extraits de feuille. Lorsque nous avons mesuré les voltammogrammes de différents composés phénoliques ajoutés à un extrait de feuilles d'érable, nous avons observé qu'il existe des interactions entre les molécules d'un mélange ainsi qu'entre l'électrode de travail et les molécules en solution ou leur produit d'oxydation selon le type de molécules et leur concentration. En utilisant les mêmes paramètres pour chacune des mesures des extraits de feuilles d'érable photoinhibées, nous avons été en mesure d'observer que certains composés phénoliques ont été oxydés, probablement suite à leur utilisation pour la détoxification des radicaux libres produits lors de la photoinhibition. De plus, ce sont les composés phénoliques facilement oxydables qui sont impliqués, soit à un potentiel de moins de 400 mV. L'utilisation de la voltammétrie cyclique a donc été très nécessaire à la validation de nos conclusions et pourra devenir un outil très utile pour l'étude des stress oxydants. Cependant, les paramètres de mesures restent à être optimisés. Déjà, nous avons constaté que l'utilisation d'un extrait de feuilles beaucoup plus dilué aurait permis de favoriser l'oxydation rapide des composés, rendant ainsi les voltammogrammes mieux définis.

Pour mieux comprendre le mécanisme de protection des composés phénoliques, il serait important d'identifier le ou les composés phénoliques impliqués dans la protection contre le stress photooxydant. Par l'examen des voltammogrammes de l'extrait d'érable et de composés phénoliques spécifiques, des spectres d'absorbance UV ainsi que de la revue de littérature, nous avons pu proposer le gallate d'épigallocatechine comme étant le principal composé phénolique qui aurait été oxydé lors de la photoinhibition. Cependant, cela reste à être validé.

Il serait intéressant d'effectuer les mêmes recherches avec des feuilles d'érable argenté développées à l'ombre, et ainsi d'observer l'utilisation des composés phénoliques pour la détoxification des radicaux libres alors que le cycle Halliwell-

Asada est toujours en fonction. Cette étude se rapprocherait davantage des conditions naturelles et d'un stress chronique plutôt que le stress aigu occasionné par l'infiltration de méthylviologène. Finalement, afin de bonifier nos résultats et d'entériner notre hypothèse, il serait pertinent d'effectuer des recherches complémentaires avec des feuilles d'espèces différentes contenant une variété de concentrations et de types de composés phénoliques.

PERSPECTIVES D'AVENIR

Notre étude apporte des éléments nouveaux supportant l'hypothèse selon laquelle les composés phénoliques peuvent être utilisés dans la plante pour détoxifier les radicaux libres produits lors de stress oxydants comme la photoinhibition. La validation de ce rôle des composés phénoliques n'est pas seulement pertinente pour la connaissance physiologique de la plante, mais aussi parce que cela pourrait permettre de renforcer la protection des plantes cultivées contre la photoinhibition et contre d'autres stress oxydants pouvant être provoqués notamment par des métaux lourds, des températures extrêmes ou l'attaque par des pathogènes (Larcher 2003). La protection de la plante contre l'effet oxydant de ses stress est d'autant plus importante puisqu'ils sont difficiles à contrôler au champ et peuvent occasionner une perte de rendement importante. Par exemple, puisque plusieurs cultures québécoises se trouvent à la limite nord de leur distribution, elles doivent subir des basses températures qui amplifient le phénomène de la photoinhibition, ce qui peut diminuer leur productivité jusqu'à 30 % (Zhu et coll. 2004). Il serait possible d'augmenter la concentration de composés phénoliques des plants afin de bénéficier de leur effet protecteur, entre autres par l'application d'acide salicylique qui est connue pour accélérer leur production, et ainsi minimiser les pertes de rendement (Chitra et coll. 2008). Afin de vérifier si cette protection est envisageable, il reste encore plusieurs études à mener, d'abord pour s'assurer que l'application d'acide salicylique permet d'augmenter la concentration en composés phénoliques sans avoir des effets négatifs importants sur le rendement de la plante, et ensuite pour vérifier que ce traitement permet effectivement de diminuer les effets des stress oxydants aux champs.

BIBLIOGRAPHIE

Agati G, Matteini P, Goti A, Tattini M (2007) Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174: 77-89.

Allakhverdiev SI, Murata N (2004) Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1657: 23-32.

Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defences. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 473-479.

Almagro L, Ros LVG, Belchi-Navarro S, Bru R, Barcelo AR, Pedreno MA (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60: 377-390.

Appel HM, Govenor HL, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz JC (2001) Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of Chem Ecology* 27: 761-778.

Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem-2 – Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134.

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 50: 601-639.

Beckman CH (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 101-110.

Bourassa et coll., manuscrit en préparation.

Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, R-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 535-543.

Brugnoli E, Bjorkman O (1992) Chloroplast movements in leaves – Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light- Induced absorbency changes related to delta-pH and zeaxanthin formation. *Photosynthesis Research* 32: 23-35.

Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H (2004) Antioxidant activity phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science* 74: 2157-2184.

Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Riceevans C (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher-plants. *Febs Letters* 368: 188-192.

Chen GX, Kazimir J, Cheniae GM (1992) Photoinhibition of Hydroxylamine-Extracted Photosystem II Membranes: Studies of the Mechanism. *Biochemistry* 31: 11072-11083.

Chevion S, Chevion M (2000) Antioxidant status and human health. Use of cyclic voltammetry for the evaluation of the antioxidant capacity of plasma and of edible plants. *Annals of the New York academy of sciences* 899: 308-325.

Chitra K, Ragupathi N, et al. (2008) *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 41: 50-56.

Davey MW, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the science of food and agriculture* 80: 825-860.

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097.

Edreva A, (2005) The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 135-146.

Filipiak M. (2001) Electrochemical Analysis of Polyphenolic Compounds. *Analytical Sciences* 17: 1667-1670.

Foyer C & Noctor G. (2009) Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 861-905.

Forti G, Agostiano A, Barbato R, Bassi R, Brugnoli E, Finazzi G, Garlaschi FM, Jennings RC, Melandri BA, Trotta M, Venturoli G, Zanetti G, Zannoni D, Zucchelli G (2006) Photosynthesis research in Italy: a review. *Photosynthesis Research* 88: 211-240.

Guidi L, Degl'Innocenti E, Genovesi S, Soldatini GF (2005) Photosynthetic process and activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in resistant and sensitive genotypes of *Lycopersicon esculentum* L. exposed to ozone. *Plant Science* 168: 153-160.

Gould KS, Dudle DA, Neufeld HS (2010) Why some stems are red: Cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress *Journal of Experimental Botany*: 2707-2717.

Hakala M, Tuominen I, Keränen M, Tyystjärvi T, Tyystjärvi E (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706: 68-80.

Halliwell B (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

Hapiot P, Neudeck A, Pinson J, Fulcrand H, Neta P, Rolando C (1996) Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 405: 169-176.

Hernandez I, Alegre L, van Breusegem F, Munné-Bosch S (2008) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14: 125-132.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D, (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, 342: 1007-1011.

Iriti M, Faoro F (2003) Benzothiadiazole (BTH) Induces Cell-Death Independent Resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology* 151: 171-180.

Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL (2001a) A cyclic voltammetric method suitable to characterise antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1957-1965.

Kilmartin PA (2001b) Electrochemical detection of natural antioxidants: principles and protocols. *Antioxidants and Redox Signalling* 3: 941-955.

Kilmartin PA et Hsu CF (2003) Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. *Food Chemistry* 82: 501-512.

Kilmartin PA, Martinez A, Bartlett PN (2008) Polyaniline-based microelectrodes for sensing ascorbic acid in beverages. *Current Applied Physics* 8: 320-323.

Külheim C, Agren J, Jansson S (2002) Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297: 91-93.

Larcher W (2003) *Physiological plant Ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups*, (4th Ed.). Springer.

Li XP, Müller-Moulé P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 15222–15227.

Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 45: 633-662.

Makhotkina O, Kilmartin PA (2009) Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 633: 165-174.

Makhotkina O, Kilmartin PA (2010) The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Analytica Chimica Acta* 668: 155–165.

Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K (2001) Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biophysica Acta* 1504: 275-287.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.

Melis A (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage? *Trends Plant Science*. 4: 130–135.

Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R (2004) *Botanique, Biologie et Physiologie Végétales*. Maloine, Paris, 2-224-02767-2, 461 p.

Miyagawa Y, Tamoi M, Shigeoka S (2000) Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiology* 33:311-320.

Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767: 414-421.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science* 9: 491-498.

Naik GH, Priyadarsini KI, Satav JG, Banavalikar MM, Sohoni DP, Biyani MK, Mohana H (2003) Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in ayurvedic medicine. *Phytochemistry* 63: 97-104.

Neill SO, Gould KS, Kilmartin PA, Mitchell KA, Markham KR (2002) Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant Cell Environment* 25: 539-547.

Nishiyama Y, Yamamoto H, Allakhverdiev SI, Inaba M, Yokota A, Murata N, (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery, *EMBO Journal* 20 5587-5594.

Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 742-749.

Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH (2003) The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology* 132: 1631-1641.

Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8: 797-807.

Sgherri C, Cosi E, Navari-Izzo F (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum* 118: 21-28.

Takahama U (2004) Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3: 207-219.

Takahashi S, Murata N (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Science* 13: 178-182.

Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A (2000) Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148: 69-77.

Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D, Agati G (2004) Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547–561.

Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N (1997) Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Plant Physiology 115: 1405-1412.

Zhu XG, Ort DR, Whitmarsh J, Long SP (2004) The slow reversibility of photosystem II thermal energy dissipation on transfer from high to low light may cause large losses in carbon gain by crop canopies: a theoretical analysis. *Journal of Experimental Botany* 55: 1167-1175.