

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE TROIS ECOTYPES DIFFÉRENTS (BLIDA, DJELFA ET M'SILA) SUR LA VARIATION DES PARAMÈTRES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU ROMARIN *ROSMARINUS OFFICINALIS L.*

MOUAS Yamina¹, DJEMAL Hanane¹, MEGDAD Fouzi¹, BENREBIHA Fatma Zohra¹

1. Laboratoire de recherche en Biotechnologie des Productions Végétales, Département des Biotechnologies, Université de Blida 1. B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie. Email : aminaagro@outlook.com

Reçu le 22 novembre 2015, accepté le 5 janvier 2016

Résumé

Le romarin (Rosmarinus officinalis L.) est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen qui pousse à l'état sauvage. Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques semi-aride et arides. Elle est utilisée en médecine traditionnelle et rentre dans l'industrie pharmaceutique. Dans cette étude nous avons étudié l'influence du facteur région sur certains paramètres physiologiques et biochimiques du romarin. Pour cela nous avons choisi trois zones d'étude : Blida, Djelfa et Msila, appartenant à des climats différents (humide, semi-aride et aride). Les paramètres que nous avons étudiés à savoir : la chlorophylle (a et b), la proline, et les sucres solubles ; nous ont permis de vérifier l'existence d'une corrélation entre la variation des conditions climatiques et la réponse des écotypes.

Mots clés : Chlorophylle totale, proline. *Rosmarinus officinalis L.*, sucres totaux solubles

INTRODUCTION

L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3 510 espèces dont 450 espèces sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays [1]. La flore médicinale naturelle est relativement abondante et compte plus de 300 espèces utilisées en médecines traditionnelle [2].

Les changements climatiques deviennent de plus en plus contraignants pour la croissance et le développement des plantes, où la sécheresse a conduit au processus de salinisation des sols [3][4]. Ces deux contraintes (sécheresse et salinité) ont modifié la stabilité des écosystèmes [5] et afin de préserver et d'améliorer les sols de ces régions, la valorisation des espèces spontanées (fourragères

et médicinales) connues pour leurs tolérances à la sécheresse et à la salinité telle que le romarin, s'avère indispensable.

Le but de ce travail est d'étudier l'influence du facteur région sur certains paramètres physiologiques et biochimiques du romarin. Ces paramètres sont considérés comme des marqueurs à la réponse à tout changement des conditions environnementales par la modification de la production des molécules impliqués dans le rétablissement de l'homéostasie cellulaire ; à savoir la chlorophylle (a et b) et les molécules d'osmorégulation (proline et sucres solubles). Pour cela nous avons choisi trois régions d'études : Blida, Djelfa et Msila appartenant à des étages bioclimatiques différents : humide, semi-aride et aride.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal utilisé est formé par des rameaux des sommités de romarin. Pour chaque région d'étude on a pris au hasard des arbustes sains, sur lesquels on a pratiqué l'échantillonnage qui a été effectué durant le printemps (15-20 Avril 2014). Les rameaux coupés sont les jeunes pousses de l'année. L'objectif de ce travail est l'étude des variations de certains paramètres physiologiques et biochimiques du romarin des trois régions Djelfa, Blida et Msila.

1. Paramètre physiologique

L'activité physiologique d'une plante soumise à un stress (salin ou hydrique) se caractérise par une diminution de l'activité photosynthétique.

Le dosage de la chlorophylle est réalisé selon la méthode de Francis 6, qui consiste en une macération de 100 mg de feuilles dans 10 ml d'un mélange de l'acétone et de l'éthanal (75% et 25% de volume et de 80% et 40% de concentration). Les feuilles sont coupées en petits morceaux et mises dans des tubes à essai fermés

et couverts par du papier aluminium (pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière). Les tubes sont mis au repos pendant 48 heures. Après le repos, on procède à la lecture des densités optiques des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes : 645 pour la chlorophylle (a) et 663 nm pour la chlorophylle (b).

La détermination des teneurs en chlorophylle se réalise selon les formules suivantes :

$$\text{Chl a} (\mu\text{g/gMF}) = \frac{12.7 \cdot \text{DO}_{(663)} - 2.59 \cdot \text{DO}_{(645)} \cdot V}{(1000 \cdot W)}$$

$$\text{Chl b} (\mu\text{g/gMF}) = \frac{22.9 \cdot \text{DO}_{(645)} - 4.68 \cdot \text{DO}_{(663)} \cdot V}{(1000 \cdot W)}$$

$$\text{Chl (a+b)} (\mu\text{g/gMF}) = \text{chl a} + \text{chl b}$$

Où : V: volume solution extraite ; W : le poids de matière fraîche de l'échantillon.

2. Paramètres biochimiques

Pour surmonter un effet de stress, la plante accumule les sucres et la proline.

2.1. Dosage des sucres solubles

Nous avons procédé au dosage des sucres solubles dans les feuilles du romarin selon la méthode de Dubois *et al.* 7. Elle consiste à prendre 100 mg de matière végétale fraîche dans

des tubes à essai auquel on ajoute 2 ml d'éthanol à 80 %, et on laisse les tubes (fermés) au repos pendant 48h. Faire évaporer l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain-marie à 70°C. Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'eau distillée dans chaque tube à essai. Prendre 1ml de la solution et ajouter 1 ml de phénol à 5% et bien agiter. Ajouter 5 ml d'acide

sulfurique concentré dans chaque tube à essai puis les passer au vortex. Laisser au repos pendant 10min puis les passer au bain marie pendant 15 min à 30°C. Procéder à la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 490nm.

La détermination de la teneur des sucres solubles est réalisée selon la formule :

$$\text{Sucres solubles} (\mu\text{g/g MF}) = \text{DO}_{(490)} \times 1,657$$

2.2. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique utilisée par Troll et Lindseley (1955) simplifiée et mise au point par Dreiser et Goring (1974) et modifiée par Monneveux *et al.* 8. Le principe est la quantification de la réaction proline ninhydrine par mesure en

spectrophotomètre, la proline se couple avec la ninhydrine en formant un complexe coloré, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline dans l'échantillon.

La méthode consiste à mettre 100 mg de matière végétale fraîche dans des tubes à essai et on ajoute 2 ml de

méthanol à 40%. Les tubes couverts (pour éviter la volatilisation de l'alcool) sont portés à l'ébullition au bain marie à 85°C pendant 60 min. Après refroidissement, 1ml de la solution a été prélevé de chaque tube et mis dans de nouveaux tubes aux quel ; nous avons ajouté : 1ml d'acide acétique + 25mg de ninhydrine.

Ensuite, on ajoute, dans chaque tube 1ml d'un mélange contenant (120ml d'eau distillée : 300ml d'acide acétique : 80 ml d'acide ortho phosphorique). On porte les tubes à essai à ébullition en bain marie pendant 30min. Après

refroidissement des solutions on ajoute 5ml de toluène dans chaque tube, après agitation au vortex deux phases apparaissent. On prélève la phase supérieure à la qu'elle en rajoute 5 mg de sulfate de sodium, puis on les laisse au repos pendant

48h. On procède à la lecture de la densité optique des échantillons à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de (528nm).

La détermination de la teneur en proline est réalisée selon la formule :

$$\text{Proline } (\mu\text{g/gMF}) = DO_{(528)} \times 0,62$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Fluctuation des teneurs en Chlorophylle

Les résultats obtenus montrent que la teneur en chlorophylle varie selon l'écotype. D'après les résultats nous constatons que l'écotype Djelfa présente une teneur en chlorophylle

plus élevée que les deux autres écotypes (Blida et Msila) de l'ordre de : 3,32 $\mu\text{g/g M.F.}$ (Figure 1).

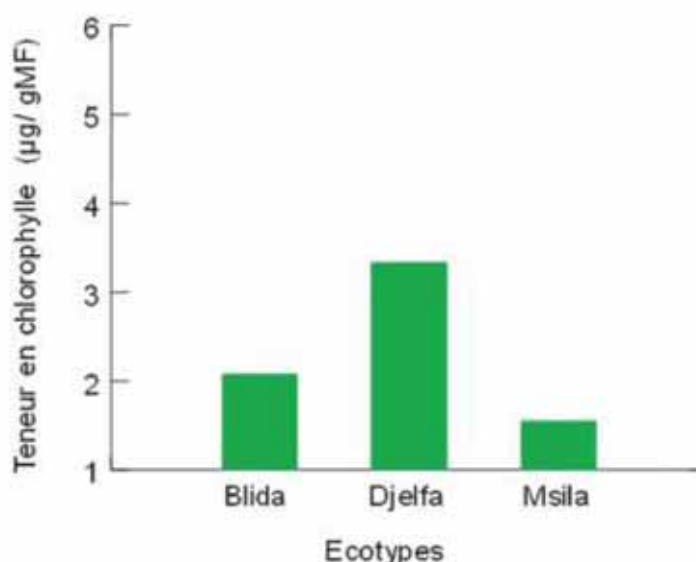


Figure 1 : Teneur en chlorophylle selon les écotypes

Les résultats montrent une diminution de la teneur en chlorophylle enregistrée chez les écotypes Blida et Msila avec des valeurs de: 2,06 $\mu\text{g/ g. M.F.}$ et 1,54 $\mu\text{g/ g. M.F.}$ respectivement. La photosynthèse, facteur primaire de la production totale en matière végétale, constitue un meilleur indicateur du fonctionnement hydrique de la plante au cours d'un déficit hydrique. La diminution de

la quantité de chlorophylle est liée à la diminution de la quantité relative en eau qui est due essentiellement, à la réduction des échanges du CO_2 , limitée par une fermeture des stomates. Ce phénomène engendre par conséquence la résistance de la feuille à la diffusion du CO_2 .⁹

2. Fluctuation des teneurs en sucres solubles

Les résultats obtenus montrent que

la teneur la plus élevée en sucres solubles est enregistrée chez l'écotype Djelfa avec une valeur de l'ordre de : 3,71 $\mu\text{g/ g. M.F.}$, suivi par l'écotype Msila avec une valeur de : 3,66 $\mu\text{g/ g. M.F.}$; tandis que la teneur la plus faible a été enregistrée chez l'écotype Blida avec une valeur de : 3,3 $\mu\text{g/ g. M.F.}$ (Figure 2).

Ensuite, on ajoute, dans chaque tube 1ml d'un mélange contenant (120ml d'eau distillée : 300ml d'acide acétique : 80 ml d'acide ortho phosphorique). On porte les tubes à essai à ébullition en bain marie pendant 30min. Après

refroidissement des solutions on ajoute 5ml de toluène dans chaque tube, après agitation au vortex deux phases apparaissent. On prélève la phase supérieure à laquelle on rajoute 5 mg de sulfate de sodium, puis on les laisse au repos pendant

48h. On procède à la lecture de la densité optique des échantillons à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de (528nm).

La détermination de la teneur en proline est réalisée selon la formule :

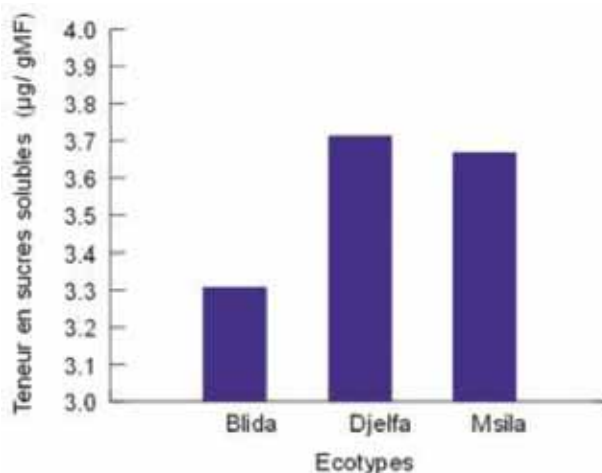


Figure 2 : Teneur en sucres solubles selon les écotypes

L'augmentation de la teneur en sucres chez les plantes des deux écotypes Djelfa et Msila par rapport à l'écotype Blida peut provenir de l'hydrolyse de l'amidon 10. Les sucres ont un rôle dans l'ajustement osmotique et ils participent également à la préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines. 10. En effet, les plantes du romarin des deux écotypes Djelfa et Msila

peuvent se retrouver face à un stress hydrique et salin car elles poussent sur des surfaces sèches où on enregistre des températures très élevées et de faibles précipitations.

3. Fluctuation des teneurs en proline

Nous avons enregistré une quantité plus élevée en proline pour l'écotype Djelfa comparée aux deux autres écotypes de Blida et Msila.

D'après les résultats, l'écotype Djelfa présente une teneur en proline la plus élevée de l'ordre de : 0,86 µg/ g. M.F., comparée aux deux autres écotypes Blida et Msila avec : 0,05 µg/ g. M.F. et 0,16 µg/ g. M.F. respectivement (Figure 3)

L'accumulation de la proline permet aux plantes de supporter le manque d'eau, en maintenant leur turgescence relative foliaire le moins perturbée que possible et leur intégrité cellulaire préservée 11.

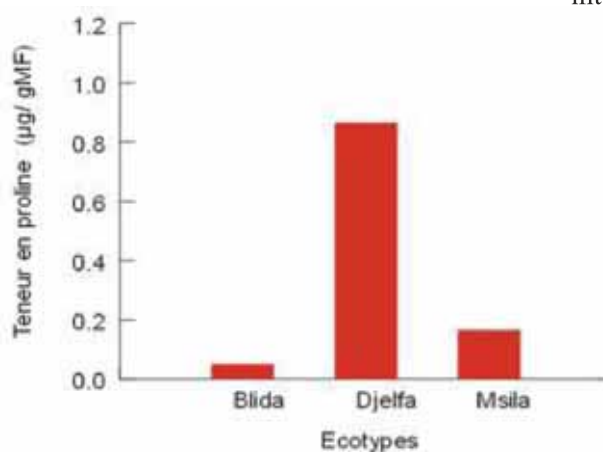


Figure 3 : Teneur en proline selon les écotypes

CONCLUSION

Les régions arides et semi-arides caractérisées par une salinité des sols, des températures très élevée et de faibles précipitations ; sont une contrainte pour le développement des plantes.

Le dosage des paramètres physiologiques et biochimiques des trois

écotypes (Blida, Djelfa et Msila) a révélé l'existence d'une corrélation entre la variation des conditions climatiques et la réponse des écotypes.

Les paramètres étudiés nous ont permis de vérifier que les teneurs en proline et en sucres solubles accumulés permettent d'ajuster

l'osmolarité interne (osmo-régulateurs). Ce phénomène permet d'éviter une déshydratation rapide des tissus végétaux qui entraîne par la suite la mort des plantes. En effet la plante accumule les sucres, proline et protéines pour surmonter un effet de stress (hydrique ou salin).

RÉFÉRENCES

- 1 Quezel et Medail, 1995 in Benmokadem N., (2003). « Contribution à l'étude des profils des huiles essentielles produites chez quelques espèces spontanées algériennes du genre *Artemisia* », thèse de magister, USD Blida, ,76 p.
- 2 Abed L., (1997). « *La plante médicinale de la tradition à la science* », Ed. Michel Grancher, France, pp 120-140.
- 3 Quezel P., Babero M., (1993) « Variations climatiques au Sahara et en Afrique sèche depuis le Pliocène » : enseignement de la flore et de la végétation actuelle, *Bull. Ecol.*, 24 :191-202.
- 4 Ozenda P., (1954) . « Observation sur la végétation d'une région semi-aride : les hauts plateaux du Sud Algérois ». *Bull Soc Hist Nat AFN*,; 45:189-224.
- 5 Hamdy A., (1999) .« Saline irrigation and management for a sustainable use. In : Advanced Short Course on Saline Irrigation Proceedings », Thèse de doctorat, Agadir Marocco,; 152-227.
- 6 Francis M., (1970).« Cooper enzymes in isolated plantes », *plant physiol*, 24, 1949 ; pp 1-15.
- 7 Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rbers P.A. and Smith E., (1956). « Colorimetric method for determination of sugar and related substances », *Allal. Chem.*, , 28,350-356.
- 8 Monneveux Ph., Nemmar M., (1986). « Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, 6, pp 583-590.
- 9 Friedman J., (2001). « Folding of newly translated in-vitro : the role of molecular chaperons ». *Annu. Rev. Biochem* , 70 : 603-47.
- 10 Martin P., Gagnard J. et Gaytier P., (1987). « *Plant analysis as guide the nutrient requirement of temperate and tropical corps* », Ed. Lavoisier, Paris, , 122p.
- 11 Ben Salem M., (1988). « *Etude comparative de l'adaptation à la sécheresse du blé, de l'orge et du triticale* », Ed. INRA, Paris, colloque n° 64, pp 276-297