

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

**Remédiation des effets négatifs du stress en zinc chez
*Ocimum gratissimum et Mentha suaveolens***

Présenté par :

- FAHSI ZEROUALI Oumaima

Encadré par :

- Mr DERRAZ Khalid

- Mme BENNIS Sanae

- Mlle ES-SBIHI Fatima Zohra

Soutenu le : 12/06/2019

Devant le jury composé de :

- Mr AMRANI JOUTEI Khalid
- Mme BOUCHAMMA El-Ouazna
- Mr DERRAZ Khalid
- Mme BENNIS Sanae

Année universitaire

2018/2019

Remerciements

Avant d'exposer ce modeste travail, il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail grâce à leur aide précieuse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent tout d'abord à Monsieur AMRANI JOUTEI Khalid, Professeur à la faculté des sciences et techniques, pour m'avoir bien accueilli au sein de son Laboratoire, pour sa disponibilité, ses orientations, ses remarques fructueuses et d'avoir eu l'amabilité d'accepter de faire partie du jury et de juger ce travail. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

C'est avec beaucoup de plaisir que j'exprime mes remerciements et ma vive reconnaissance à Monsieur DERRAZ Khalid, Professeur à la faculté des sciences et techniques et Madame BENNIS Sanae, professeur à la faculté de médecine, Fès, d'avoir accepté d'encadrer et de diriger mon projet de fin d'étude.

Je tiens à remercier profondément Mademoiselle ES-SBIHI Fatima Zohra, pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience et pour l'intérêt qu'elle a consacré pour ce travail.

Je remercie Madame BOUCHAMMA El-Ouazna, Professeur à la faculté des sciences et techniques, qui ma fait l'honneur de participer au jury en tant qu'examinateur. Qu'elle trouve ici, le témoignage de mes très profonds respects.

J'exprime mes remerciements à tous les enseignants de la FST de Fès qui m'ont transmis leur savoir.

Finalement, l'occasion m'est offerte de témoigner chaleureusement, ma vive gratitude à ma famille et tous mes ami(e)s et mes collègues pour leur amitié, encouragement et leur soutien précieux.

« Qu'est-ce donc qu'une mauvaise herbe, sinon une plante dont on n'a pas encore découvert les vertus ? »

Ralph Waldo Emerson (1803 – 1882)

Liste de figures

Figure (1) : variation du taux de germination des graines <i>Ocimum gratissimum</i> en fonction de différentes concentrations de zinc au cours du temps.	11
Figure (2) : variation du taux de germination chez <i>Ocimum gratissimum</i> en fonction de différentes concentrations d'acide salicylique en présence de Zn au cours du temps.	12
Figure (3) : Croissance en longueur des plantules de <i>Mentha suaveolens</i> traités par l'AS en présence de Zn.	12
Figure(4) : La teneur en chlorophylle (mg/g) des plantules de <i>Mentha suaveolens</i> traités par l'AS en présence Zn.	13
Figure(5) : La teneur en polyphénols totaux et en tanins condensés (mg/g) des plantules de <i>Mentha suaveolens</i> traités par AS en présence de Zn.	14
Figure(6) : La teneur en peroxyde d'hydrogène ($\mu\text{mol/g}$) des plantules de <i>Mentha suaveolens</i> traités par AS en présence de Zn.	15
Figure(7) : La teneur en proline ($\mu\text{g/g}$) des plantules de <i>Mentha suaveolens</i> traités par AS en présence de Zn.	15

Résumé

La pollution des sols par les métaux lourds est l'un des problèmes environnementaux le plus dangereux. Dans cet objectif, nous nous sommes intéressés d'étudier l'effet combiné de l'acide salicylique et du Zinc sur la germination des graines d'*Ocimum gratissimum* d'une part et la croissance de *Mentha suaveolens* d'autre part.

Les graines d'*Ocimum gratissimum* sont mises en germination en présence de 20 ; 40 ; 80 et 100 mM du Zinc. Nos résultats montrent que l'augmentation de la concentration du Zn retarde et ralentisse le taux final de la germination des graines. Sur la concentration inhibitrice du zinc (100 mM) trois concentrations d'acide salicylique sont testées (0,25 ; 0,5 et 1 mM). Nos résultats montrent que l'addition des concentrations croissantes d'acide salicylique améliore progressivement la germination en présence du zinc.

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons testé l'effet de l'acide salicylique (0,5 et 1 mM) sur la croissance et quelques paramètres biochimiques chez *Mentha suaveolens* cultivée en présence du zinc (40mM). Sous stress métallique on remarque une diminution de la longueur des parties aériennes et racinaires. Ainsi des perturbations biochimiques traduites par une diminution des concentrations des pigments chlorophylliens et une augmentation des teneurs en quelques marqueurs de stress étudiés notamment les phénols totaux, tanins condensés, proline et peroxyde d'hydrogène. Le traitement des plantes par l'acide salicylique en présence du zinc améliore la croissance aussi bien de la partie aérienne que de la partie racinaire avec une amélioration de la synthèse des pigments principalement à 0,5 mM. En outre, l'acide salicylique diminue les concentrations des phénols totaux, tanins condensés, proline et peroxyde d'hydrogène.

Mot clés : *Ocimum gratissimum*, *Mentha suaveolens*, zinc, acide salicylique, paramètre morphologique, paramètre biochimique.

Sommaire

Introduction	1
Etude bibliographique	
I. Le stress	2
1. Stress abiotiques	2
a. Métaux lourds : (Zinc)	2
b. Impact des métaux lourds sur les plantes.....	3
II. Acide Salicylique.....	4
1. Synthèse.....	4
2. Rôle.....	4
3. Acide salicylique et stress abiotiques	5
III. Plantes utilisées	6
1. <i>Mentha suaveolens</i>	6
2. <i>Ocimum gratissimum</i>	6
Matériel et méthodes	
I. Matériel végétal	7
II. Tests de germination.....	7
1. Installation de stress du Zinc	7
2. Application de l'acide salicylique	7
3. Taux de germination.....	7
III. Condition de culture	8
1. Paramètres étudiés	8
1.1. Dosage des chlorophylles	8
1.2. Dosage des composés phénoliques totaux	8
1.3. Dosage des tanins condensés	9
1.4. Dosage du peroxyde d'hydrogène.....	9
1.5. Dosage de la proline.....	10
Résultats	
I. Tests de germination	11
1. Influence du zinc sur le taux de germination.....	11
2. Influence de l'acide salicylique sur le taux de germination en présence du zinc.....	11
II. Effet de l'acide salicylique sur la croissance de <i>Mentha suaveolens</i> cultivée en présence de stress en Zinc.....	12

1. Croissance aérienne et racinaire	12
2. Teneurs en chlorophylles totale	13
3. Teneurs en polyphénols et en Tanins condensés	13
4. Teneur en peroxyde d'hydrogène	14
5. Teneur en proline	15
Discussion	16
Conclusion et Perspectives	18
Références bibliographiques	19

Introduction

Depuis quelques décennies, l'accroissement des activités humaines s'est accompagné de la dispersion dans l'environnement de quantités considérables de polluants comme les métaux lourds. L'accumulation des métaux lourds dans les écosystèmes a conduit, au fil des années, à la détérioration de la qualité de l'environnement, au déclin des forêts et à la diminution de la productivité agricole (Chappelka et Samuelson, 1998; Wahid, 2006).

En plus, la contamination par les métaux lourds a des effets néfastes sur la mobilisation des ressources minérales et des réserves biologiques et sur la croissance des plantes et provoque de nombreux problèmes sur la santé humains. Parmi ces métaux lourds on trouve le zinc (Zn), l'un des microéléments essentiels, est requis par les plantes en petites quantités. Par contre, des fortes concentrations du zinc peut être toxique comme la plupart des oligoéléments (Broadly *et al.*, 2007). Dans cette optique, plusieurs auteurs ont montré que la plante synthétise des molécules de signalisation, non toxique comme l'acide salicylique. Cette molécule joue un rôle très important dans la défense contre les conditions de stress soit biotiques ou abiotiques (Raskin 1992; Klessig *et al.*, 2000; Shah 2003; Halim *et al.*, 2006). Dans cet objectif, notre travail consiste à étudier l'effet de l'acide salicylique sur la germination des graines d'*Ocimum gratissimum* et la croissance du *Mentha suaveolens*

Ce travail comporte trois grandes parties:

- La première partie concerne la synthèse bibliographie.
- La deuxième partie est consacrée au protocole expérimental adopté pour la réalisation de notre travail.
- Enfin la troisième partie concerne les résultats et discussion.

I. Le stress

Le physiologiste canadien Hans Selye, qui a inventé le terme les années 1936 (Lupien, 2015). (Chernyad'ev, 2005) a défini le stress comme une « réponse non spécifique de l'organisme à toute sollicitation ». D'origine anglaise, le mot « stress » était employé en mécanique et en physique et voulait dire « force, poids, tension, charge ou effort ». Ce n'est qu'en 1963 que Hans Selye a utilisé ce mot en médecine et le définit comme étant « des tensions faibles ou fortes, éprouvées depuis toujours et déclenchées par des événements futurs désagréables ou agréables ».

Les organismes sont généralement soumis à deux types de stress : les stress biotiques (dus à une agression par autres organismes) et les stress abiotiques (qui sont dus principalement à des facteurs environnementaux) (Zhu, 2002 ; Vincent, 2006).

1. Stress abiotiques

Les stress environnementaux sont qualifiés d'abiotiques, comme : la salinité des sols, la sécheresse, les températures extrêmes, le froid, le gel, les vents, l'excès d'eau, les radiations et les produits chimiques comme les pesticides ou les métaux lourds, par opposition aux stress biotiques induits par des organismes vivants. Sont tous des conditions qui affectent la croissance et le rendement des plantes (Hopkins, 2003 ; Rhodes et Orczyk, 2001).

a. Métaux lourds : (Zinc)

La présence de métaux lourds dans les sols peut être bénéfique ou toxique pour l'environnement. L'excès de métaux peut produire des effets communs de différents métaux sur différentes plantes (par exemple à la fois macro- et microflore). Le biote peut exiger certains de ces éléments en quantités infimes, mais des concentrations plus élevées il peut y avoir des problèmes de toxicité. La toxicité des métaux dans les plantes ont été rapporté par divers auteurs (Bollard et Majordome, 1966; Brown *et al.*, 1972; Brown et Jones, 1975; Foy *et al.*, 1978; Gerloff, 1963). En général, le zinc est un élément essentiel qui appartient au Groupe II du tableau périodique. Il agit comme un élément nutritif des plantes (Shier, 1994; Welch, 1995) mais à des concentrations plus élevées, il est toxique. (Cette toxicité dépend du pH).

b. Impact des métaux lourds sur les plantes

- Sur la germination

Le zinc est un élément nutritif essentiel pour la croissance des plantes. Bien que des concentrations élevées du Zn conduisent à l'inhibition de la croissance et à l'apparition des symptômes de toxicité.

D'autres auteurs ont rapporté que sa présence dans le milieu de culture ne modifie pas la germination des graines, mais aide dans le développement de plumule et racelles. Boulanger (1978) a rapporté que les graines de *Silene maritima* étaient germées mieux et plus rapidement sur le nitrate de calcium contenant différentes concentrations de zinc.

- Sur la racine :

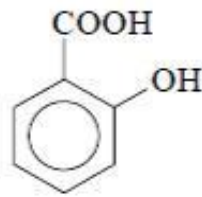
Zinc est un élément essentiel pour la croissance des plantes, mais elles ont montré des symptômes de toxicité à des concentrations élevées inhibant la croissance des racines (Boulanger, 1978; Bradshaw et McNeilly, 1981). Toxicité du zinc a été marquée dans le système racinaire en particulier dans la racine émoussé, et l'épaississement provoqué retenue à la fois sur la division cellulaire et l'élongation cellulaire (Barcelo et Poschenrieder, 1990; Wainwright et Woolhouse, 1976). En outre, Sresty et Madhava (1999) basé sur microscopie électronique à transmission, ont conclu que l'allongement des racelles était plus affecté négativement que l'extension de plumule. L'allongement de la racine de *Cajanus cajan* cv. Elle était complètement inhibée après le traitement de 24 h avec 7,5 mM zinc. Ils ont également rapporté que les cellules corticales profondes ont été largement endommagées et des changements majeurs ont eu lieu dans le noyau des cellules de pointe de racine traités avec le zinc.

- Sur la croissance de la production

Les plantes sensibles aux métaux ont des grandes difficultés à atteindre la phase de reproduction lors de l'exposition aux métaux. Les espèces végétales poussent sur des sols enrichis en une très faible concentration en métal (Ernst, 1974; Lepp et Dickison, 1994). Par contre, Ernst (1998) a rapporté que lorsque la concentration de zinc dépasse une concentration critique, elle entraîne l'apparition des plantes sans fleurs chez *Silene vulgaris*.

II. Acide Salicylique

L'acide salicylique (AS) ou l'ortho-hydrox benzoïque est un constituant de l'aspirine (acide acétylsalicylique), en faible quantités. Il est considéré comme une phytohormone en raison de ses fonctions de réglementation dans divers métabolismes de la plante. A nature phénolique avec un cycle aromatique (Raskin., 1992). De plus, il est utilisé comme conservateur alimentaire et comme un antiseptique, s'il est ingéré en grandes quantités, il peut être toxique pour les êtres vivants (Raskin *et al.*, 1987).



acide salicylique

1. Synthèse

Deux voies de biosynthèse de l'acide salicylique sont possibles chez les plantes :

- La première est la voie des phénylpropanoïdes, ou de l'acide benzoïque (Lepoivre, 2003).
- Une voie alternative de synthèse existe chez les bactéries et dans les chloroplastes de plantes. Cette voie implique les enzymes isochorismate synthase (EC 5.4.99.6) et isochorismate pyruvate lyase qui catalysent les deux étapes de synthèse à partir de l'acide chorismique (Vasyukova et Ozeretskorskaya, 2007).

2. Rôle

Dans les mécanismes de défense de la plante : parmi tous les composés phénoliques pouvant être impliqués dans la résistance des végétaux aux parasites, l'acide salicylique peut être présent sous plusieurs forme dans la plante : d'abord l'acide lui même, plus ou moins dissocié selon le pH du milieu, ensuite sous forme d'un β -glucoside qui est probablement une forme de stockage, enfin le salicylate de méthyle qui pourrait être un signal volatil relâché dans l'air ambiant. Bien qu'il puisse intervenir directement, au même titre que les autres composés phénoliques, dans la résistance des plantes aux micro-organismes, l'acide salicylique joue

simultanément un rôle important comme messenger intracellulaire déclenchant l'induction de l'ensemble des mécanismes qui permettent à la plante de se défendre vis-à-vis (cas du tabac), des champignons ou des bactéries (Kunkel et Brooks, 2002).

L'acide salicylique est nécessaire pour activer la plupart des réactions de défense de la plante et on observe souvent une rapide augmentation de sa concentration suite à l'attaque par des agents pathogènes (Smith *et al.*, 1998) ou en réponse à divers stress (UV, ozone, blessure...). Par ailleurs, il existe généralement une bonne corrélation entre la capacité de résistance de la plante et sa teneur en acide salicylique (Gozzo, 2003).

L'acide salicylique joue un rôle primaire pour induire l'expression de nombreux gènes, qu'il s'agisse ou non de gènes du métabolisme phénolique. La conséquence en est l'activation des systèmes de défense de la plante, se traduisant par l'accumulation de composés phénoliques et la mise en place des protéines PR (Delaney *et al.*, 1994; Ryals *et al.*, 1996).

3. Acide salicylique et stress abiotiques

La corrélation observée entre la concentration d'acide salicylique et la résistance de la plante laisse supposer aux auteurs que l'acide salicylique est une molécule de signal commune à la plante, et responsable d'inciter sa tolérance à un certain nombre de stress biotiques et abiotiques (Nicole *et al.*, 1998).

L'application exogène de l'acide salicylique a un effet sur une large gamme de processus physiologique en condition défavorables externe, il a été prouvé dans plusieurs recherches que l'acide salicylique participent à la régulation de plusieurs voies métaboliques et physiologiques, mais son mécanisme d'action n'est pas encore bien clair et toujours en cours d'étude (Shakirova *et al.*, 2003).

En l'additionnant aux milieux d'irrigation ou par pulvérisation foliaire, l'acide salicylique joue chez certaines plantes, et sous différentes conditions climatiques, un rôle de molécule signal pour induire la résistance ou la tolérance chez ces plantes aux différents stress abiotiques (Korkmaz *et al.*, 2007).

III. Plantes utilisées

1. *Mentha suaveolens*

Mentha suaveolens est une plante aromatique médicinale de la famille des Lamiaceae (Labiées), qui pousse dans plusieurs régions du Maroc, ont été caractérisés par la présence de l'huile essentielle et par leur activité anti-microbienne.

Le genre *Mentha* de plante herbacée vivace, l'un des éléments importants de la famille des Lamiaceae. Ce genre comprend de nombreuses espèces (d'environ 25 espèces), Il est originaire d'Europe de sud et de l'ouest, d'Afrique du nord et d'Asie tempérée.

M. suaveolens a plusieurs usage soit domestique, médicinale ou dans les industries alimentaires, aussi elle peut-être utilisée dans la médecine traditionnelle des régions méditerranéennes pour le traitement de la dyspepsie flatulente et les coliques intestinales en raison de ses propriétés antispasmodiques et carminatives (Abbaszadeh *et al.*, 2009).

2. *Ocimum gratissimum*

Ocimum gratissimum est une plante herbacée qui appartient à la famille des Labiées. La plante est indigène dans les zones tropicales en particulier l'Inde et elle est aussi en Afrique de l'Ouest.

Cette plante est caractérisée par des activités antibactériennes, antifongiques...Avec la richesse de leurs fleurs et feuilles en huiles essentielles.

O. gratissimum est l'une des plantes aromatiques, qui a été largement utilisée dans le système traditionnel de la médecine (Ethnopharmacologie) dans de nombreux pays, elle est aussi utilisée dans la cuisine comme condiment... (Prabhu *et al.*, 2009).

En plus, de nombreux travaux ont été réalisés sur cette plante dans le but d'amélioration du rendement en huiles essentielle (Hazzoumi *et al.*, 2014).

I. Matériel végétal

❖ *Ocimum gratissimum*

Règne : Plantae
Sous-règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Ordre : lamiale
Famille : Lamiaceae
Sous famille : Nepetoideae
Genre : Ocimum
Espèce : *Ocimum gratissimum*

❖ *Mentha suaveolens*

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae
Genre : Mentha
Espèce : *Mentha suaveolens*

II. Tests de germination

Dans chaque essai, 50 graines de basilic (*Ocimum gratissimum*) sont désinfectées à l'eau de javel, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Ensuite elles sont mises à germer dans des boîtes de pétri couvertes de papier filtre imbibé par la solution selon le traitement puis mises dans l'étuve réglée à une température de 26°C.

1. Installation de stress du Zinc

Les graines d'*Ocimum gratissimum* sont mises en germination en présence de 100 ; 80 ; 40 ; 20 mM du Zinc.

2. Application de l'acide salicylique

Sur la concentration inhibitrice du Zn trois concentrations d'acide salicylique sont testé selon le dispositif suivant :

- Zn(100mM)+AS(1mM)
- Zn(100mM)+AS(0,5mM)
- Zn(100mM)+AS(0,25mM)

3. Taux de germination

$$\text{Taux de germination} = \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre totale des graines testées}} \times 100$$

III. Condition de culture

Des boutures de *Mentha suaveolens* de 10 cm de longueur, comprend au moins 2 entre nœuds sont mise en culture dans des pots en plastique sous serre. Après 30 jours de croissance on arrose les plantes par différent traitement du Zn et d'AS selon dispositif suivant :

- Témoin : Non traité
- 0,5 et 1 mM d'acide salicylique
- 40 mM du Zn
- 40 mM de Zn+ 0,5 mM d'acide salicylique
- 40 mM de Zn+ 1 mM d'acide salicylique

1. Paramètres étudiés

1.1. Dosage des chlorophylles

1 g de feuille est broyé avec une pincée de carbonate de magnésium et 5g de sulfate de sodium anhydre. Ensuite, 10 ml d'acétone à 80% sont versés dans le broyat, qui est filtré sur Büchner, le résidu est récupéré dans des tubes à essai. Des nouvelles extractions sont réalisées avec l'acétone jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore auquel on précise le volume final (Inskeep et Bloom, 1985).

Les mesures de DO sont faites au spectrophotomètre aux longueurs d'ondes de l'ordre de 663 nm pour la chlorophylle a et 645 nm pour la chlorophylle b.

Arnon et McKinney (1941) ont établi des systèmes d'équations qui permettent de calculer les concentrations (g/l) en chlorophylle à partir d'absorbance à 663 et 645 nm d'un extrait acétonique à 80%:

$$\text{Chlorophylle totale} = (0,0202 \text{ D.O } 645) + (0,00802 \text{ D.O } 663)$$

1.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Principe de dosage

Ce dosage repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-ciocalteau (Singleton et al., 1999). Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique.

L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques Oxydés.

Extraction des composés phénoliques totaux

- 0,5g de feuilles ou de racines sont broyées dans 5ml dans une solution hydro-alcoolique à 50% d'éthanol.
- Les extraits sont récupérés dans des tubes puis laissés sous agitation pendant une nuit pour permettre l'extraction de la totalité de phénol.
- Chlorophylle des feuilles est éliminée en ajoutant à 3ml d'extrait 0,5ml de chloroforme suivie d'une centrifugation à 5000 trs/min pendant 5min.

Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques est réalisé en ajoutant à 0,5 ml d'extrait 3 ml d'eau, 0,5ml de Na₂CO₃ à 20 %. 3 min après agitation, on ajoute 0,5 ml de réactif de Folin-ciocalteu. Les tubes sont et placés à 40°C pendant 30 min. l'absorbance est lue à 760 nm.

1.3. Dosage des tanins condensés

Il est basé sur la propriété que les tannins se transforment en anthocyanes par chauffage en milieu acide (Ribereau-Gayon et Stonnestreet, 1966)

Dans ce dosage une partie de l'extrait éthanolique est utilisée pour le dosage des tanins condensés. Dans deux tubes, on met 3 ml de l'extrait éthanolique auquel on rajoute 3 ml d'HCl concentré. Le Tubes 1 est placé dans le bain marie à 100°C pendant 30 minutes, suivi d'un refroidissement rapide, le Tube 2 est maintenu à température ambiante. Après 30 min, on rajoute 0.5ml d'éthanol dans les deux tubes. La lecture est réalisée à 550nm

1.4. Dosage du peroxyde d'hydrogène

L'extraction et le dosage de peroxyde d'hydrogène sont réalisés selon la méthode décrite par Sergieve *et al.*, (1997). 1 g de feuilles et de racines sont broyées dans 15 ml de l'acide trichloracétique 0,1%, le broyat est centrifugé pendant 20 min à 4500 trs/min. Le dosage est réalisé en ajoutant à 0,5 ml de surnageant, 0,5 de tampon phosphate 10mM et 1 ml d'iodure de potassium 1mM puis la densité optique des tube est lue à 390 nm.

1.5. Dosage de la proline

Extraction et le dosage de la proline sont réalisés selon la méthode décrite par Bates *et al.*, (1973). 100 mg de feuilles ou de racines sont broyés dans 2 ml d'une solution hydro alcoolique à 40% de méthanol puis portés au bain marie à 85°C pendant une heure puis centrifugés à 1200 trs/min pendant 15 min. Le dosage de la proline est réalisé en ajoutant à 1 ml de l'extrait, 1 ml d'acide acétique, 25 mg ninhydrine et 1ml d'un mélange constitué par 12 ml d'eau distillé, 30 ml d'acide acétique et 8 ml acide ortho phosphorique 6M. Les tubes sont incubés dans un bain-marie pendant 1h à 100°C. 3 ml de toluène sont ensuite ajoutés et le tout subit une homogénéisation de quelques minutes. Deux phases se séparent, la phase supérieure contenant la proline. La densité optique des tubes est lue à 528 nm.

I. Tests de germination

1. Influence du zinc sur le taux de germination

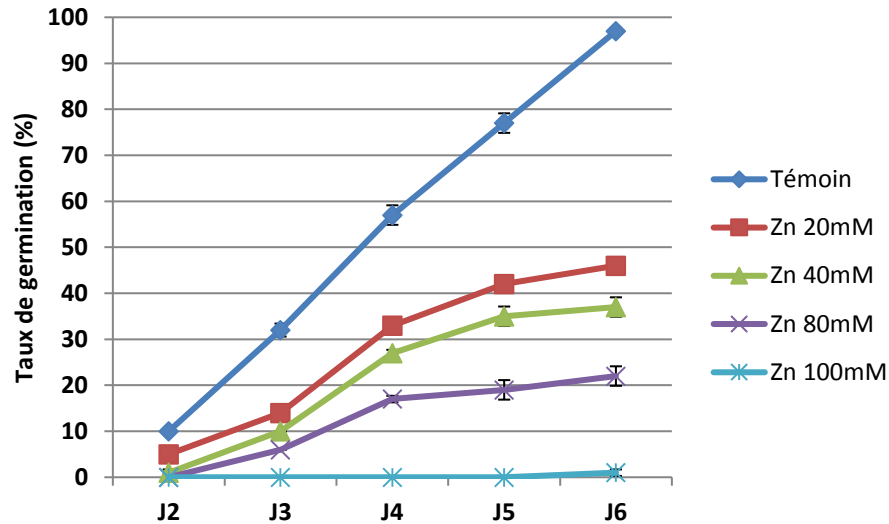


Figure1 : variation du taux de germination des graines *Ocimum gratissimum* en fonction de différentes concentrations de zinc au cours du temps

En absence du stress métallique, on observe que le taux de germination des graines évolue d'une manière croissante à partir du 2^{ème} jour, il se poursuit jusqu'au 6^{ème} jour (fig.1). Ce taux diminue avec l'augmentation de la concentration du zinc, et on remarque que la germination à 100mM ne commence qu'à partir du 6^{ème} jour avec un taux pratiquement nul.

2. Influence de l'acide salicylique sur le taux de germination en présence du zinc

Dans le cas du Zn 100 mM : La germination se tarde jusqu'à 6^{ème} jour, mais quand on ajoute une faible concentration de l'acide salicylique (0,25mM), cette germination commence à partir du 3^{ème} jour. Par contre elle commence au 2^{ème} jour pour des concentrations élevées de l'AS (0,5mM et 1mM) surtout à 1mM le taux de germination est très important avec des valeurs près de témoin (fig.2).

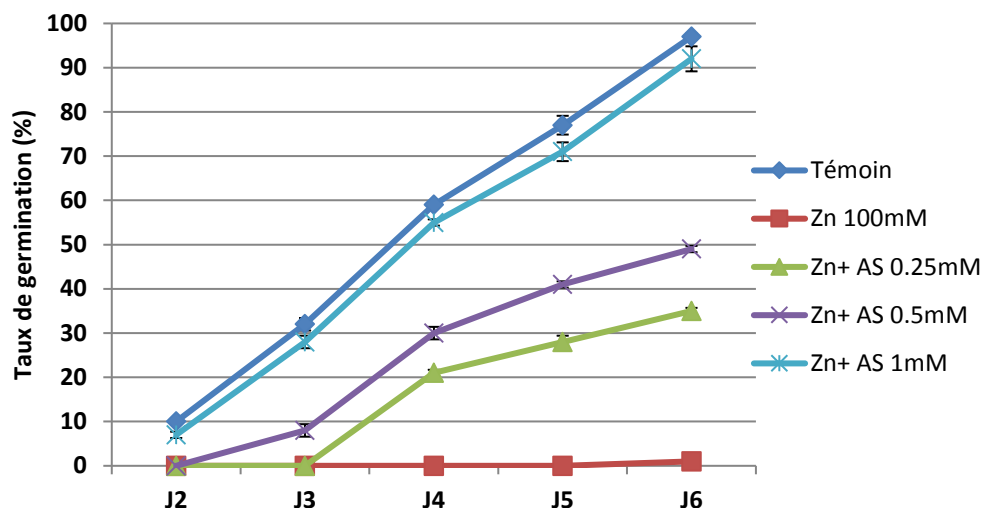


Figure 2: variation du taux de germination chez *Ocimum gratissimum* en fonction de différentes concentrations d'acide salicylique en présence de Zn au cours du temps

II. Effet de l'acide salicylique sur la croissance de *Mentha suaveolens* cultivée en présence de stress en Zinc

1. Croissance aérienne et racinaire

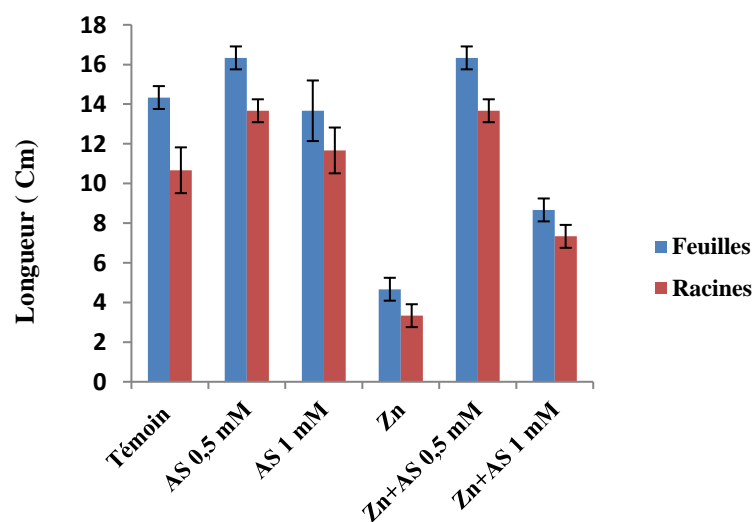


Figure 3: Croissance des plantules de *Mentha suaveolens* traitées par l'AS en présence de Zn

Chez le témoin on note une croissance de la partie aérienne et racinaire estimée à 14 cm et 10 cm respectivement (fig.3). Les plantules de *Mentha suaveolens* traitées par l'AS (0,5 mM) présentent une augmentation estimée à 16 cm et 13,5cm au niveau des feuilles et des racines.

L'irrigation avec le Zinc entraîne une chute en longueur des parties aériennes et racinaires jusqu'à 4,5 cm et 3 cm respectivement (fig.3). Par contre, le traitement par l'acide salicylique corrige cette diminution principalement à 0,5 mM.

2. Teneurs en chlorophylles totale

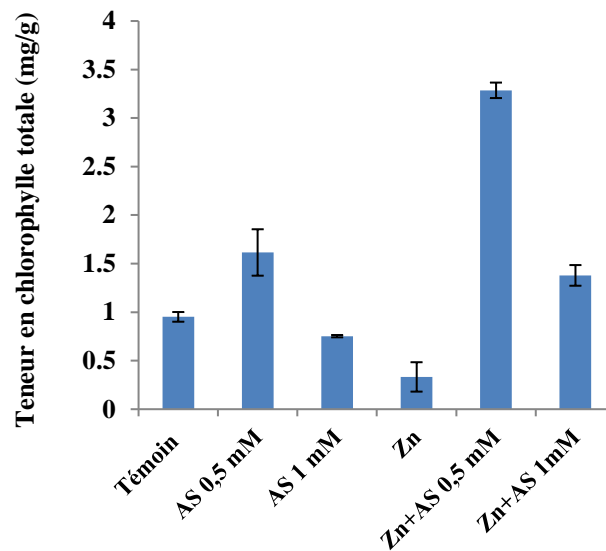


Figure 4 : La teneur en chlorophylle (mg/g) des plantules de *Mentha suaveolens* traités par l'AS en présence Zn

En absence de stress métallique dans le milieu, on note une augmentation de la teneur en chlorophylle chez *Mentha suaveolens* traitée par l'acide salicylique (fig.4). Cette augmentation est plus prononcée lors le traitement est effectué avec l'AS à 0,5mM. Lorsqu'en ajoutant le Zn au milieu de culture la teneur en chlorophylle diminue fortement à une valeur minimale estimée à 0,33 mg/g (fig.4).

Par ailleurs, le traitement par l'acide salicylique corrige cette diminution, puisque on observe une forte augmentation jusqu'une valeur maximale estimée à 3,28 mg/g à 0,5mM.

3. Teneurs en polyphénols et en Tanins condensés

D'après les résultats, en absence de stress métallique, les teneurs en polyphénols (fig. 5a) augmente en fonction de l'augmentation des concentrations d'AS (0,5mM et 1mM) dans les parties aériennes et racinaires par rapport au témoin.

L'ajout du métal (Zn) dans le milieu de culture augmente fortement la teneur en polyphénols totaux aussi bien dans la partie aérienne que dans les racines (fig. 5a). Par contre, ces teneurs diminuent lorsqu'on applique un traitement avec l'acide salicylique (0,5 et 1mM).

Les tanins condensés appartiennent à la famille des polyphénols. En présence d'AS et l'absence de Zn, ces teneurs augmentent légèrement au niveau des feuilles et des racines en fonction de la concentration (fig. 5b).

Après l'addition du zinc et en absence de traitement par l'acide salicylique, les teneurs en tanins augmentent d'une manière remarquable (fig. 5b). Cependant, ces teneurs diminuent fortement lorsqu'on applique l'acide salicylique (0,5 et 1mM).

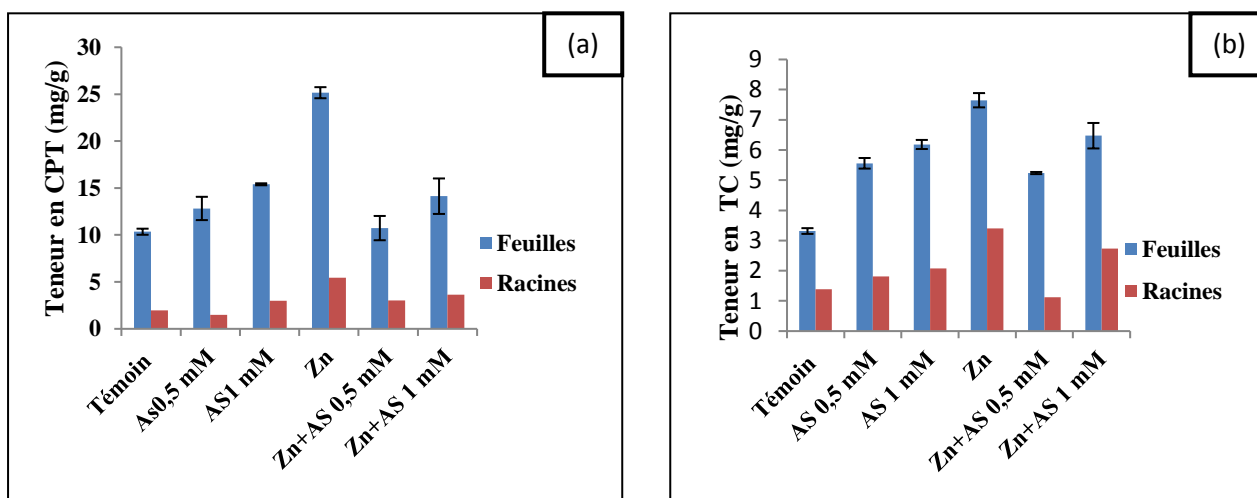


Figure 5 : La teneur en polyphénols totaux (CPT) (a) et en tanins condensés (TC) (b) (mg/g) chez *Mentha suaveolens* traités par AS en présence de Zn

4. Teneur en peroxyde d'hydrogène

En absence de stress métallique, les teneurs en peroxyde d'hydrogène augmentent au niveau des feuilles et des racines avec l'augmentation de la concentration en acide salicylique (fig.6). Par ailleurs, le zinc augmente fortement ces teneurs Jusqu'à 71,59 μ mol/g. Cependant, l'effet néfaste de Zn s'atténue avec l'application de l'AS principalement à 0,5 mM.

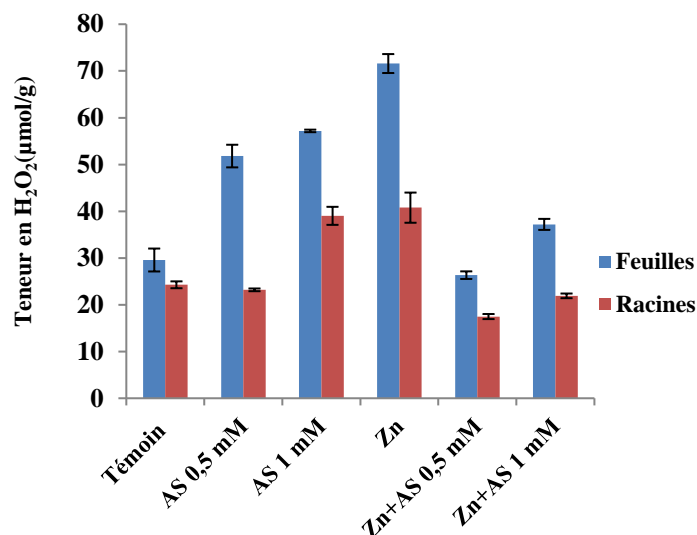


Figure 6: La teneur en peroxyde d'hydrogène ($\mu\text{mol/g}$) des plantules de *Mentha suaveolens* traités par AS en présence de Zn

5. Teneur en proline

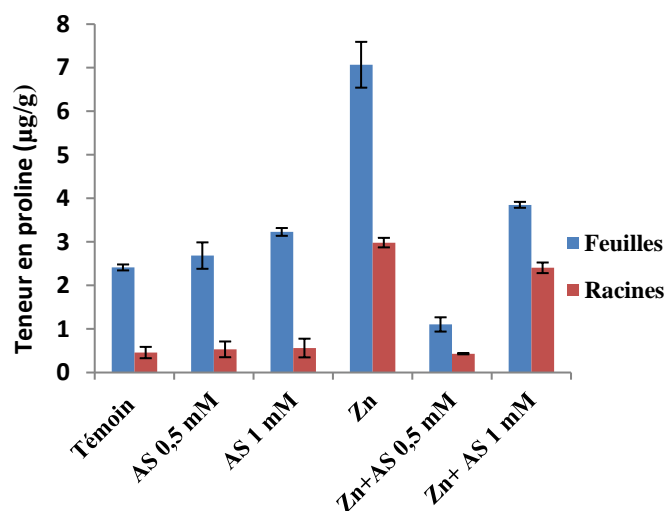


Figure 7: La teneur en proline ($\mu\text{g/g}$) des plantules de *Mentha suaveolens* traités par AS en présence de Zn

En absence de stress, les teneurs en proline au niveau des feuilles et des racines augmentent progressivement avec l'application des concentrations d'AS (0,5 et 1mM), par rapport au témoin. Par ailleurs en présence de stress métallique et en absence de l'AS la teneur en proline augmente fortement, puis diminue avec l'application des concentrations en acide salicylique (0,5 et 1mM). Surtout avec l'application d'AS à 0,5mM.

Discussion

Nos résultats montrent que la germination des graines d'*Ocimum gratissimum* est inhibée après l'application du zinc à forte concentration (100 mM). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Kranner et Colville (2011) qui affirment que des fortes concentrations des métaux entraînent un déclin des taux de germination. En revanche, cette inhibition est totalement enlevée par l'addition des concentrations croissantes de l'acide salicylique. Afzal *et al.*, (2006) ont rapporté que l'acide salicylique a réduit l'effet inhibiteur du stress salin sur la germination.

Le zinc exerce un effet négatif sur la croissance, les résultats obtenus montrent que la croissance ralentit après une application du stress métallique. Par contre le traitement de ces plantes stressées avec l'AS accélèrent la croissance des parties aériennes et racinaires. Ces résultats concordent avec ceux de Hamada et Al-hakimi (2001) qui ont rapporté que l'acide salicylique a réduit l'effet inhibiteur du stress salin sur la croissance du blé. Cet effet néfaste du Zinc est corrigé par l'addition de l'acide salicylique sur ces plantes stressées. Sakhabutdinova *et al.*, (2003) ont également montré que le prétraitement avec l'AS à 0,05 mM réduit les dommages de la salinité sur la croissance du blé.

Par ailleurs, l'accumulation de la chlorophylle est liée à la teneur du milieu de culture en zinc puisque nous avons constaté une baisse considérable de ces teneurs en présence de Zn. De même, des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs qui montrent que la salinité provoque un effet néfaste sur la production des feuilles, et diminue nettement la teneur en chlorophylles totale de deux variétés de blé dur (Acila, 2003) sur le tournesol (Muller *et al.*, 1978) et sur le blé tendre (Hamad 1996). Par contre le traitement de ces plantes stressées avec l'AS augmente ces teneurs principalement à 0,5 mM. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Ünlü *et al.*, (2009) qui montrent que les teneurs en chlorophylle totale augmentent en présence de l'acide salicylique par rapport aux plantes non traitées chez l'haricot.

Concernant la teneur en polyphénols, chez les plantes la synthèse et l'accumulation des métabolites secondaires tels les polyphénols est généralement une réponse aux stress abiotiques (Naczki et Shahidi, 2004 ; Chanwitheesuk *et al.*, 2005) tels que : les métaux lourds, la salinité (Navaro *et al.*, 2006). Dans cette optique, notre étude montre que le stress métallique augmente la teneur en polyphénols au niveau des organes foliaires et racinaires.

ces résultats sont pareil à ceux de Muthukumarasamy *et al.*, (2000) chez l'orge. En plus et selon nos résultats, l'acide salicylique a un effet sur les polyphénols en réduisant la teneur en ces molécules ce qui est en accord avec Dong *et al.*, (2010) sur *Salvia miltiorrhiz*.

Concernant le peroxyde d'hydrogène, on remarque que la présence de Zn augmente les teneurs en H₂O₂ d'une façon notable. Ces résultats concordent avec ceux de Matsuda *et al.*, (1994) et Es-sbihi *et al.*, (2016) qui ont montré que le peroxyde d'hydrogène s'accumule lors d'un stress salin. Le traitement avec l'acide salicylique entraîne une baisse de la teneur en peroxyde d'hydrogène chez les plantes stressées. Es-sbihi *et al.*, (2016) ont également rapporté que les teneurs en H₂O₂ diminuent après le traitement avec l'AS en présence de stress salin.

La proline est un acide aminé souvent considéré comme un biomarqueur de stress (Szabados *et al.*, 2009; Djerroudi-Zidane *et al.*, 2010; Boublenza 2012). L'existence du stress métallique provoque une accumulation très remarquable de la proline au niveau des feuilles et des racines par rapport au témoin. Ce phénomène d'accumulation a été démontré chez de nombreuses espèces et dans différentes situations de stress (salins, osmotiques, hydriques, thermiques, métallique...) (Panda., 2003 ; Leprince *et al.*, 2004). D'autre part, on observe que la teneur en proline diminue lors de l'ajout de différentes concentrations d'acide salicylique en présence de stress. ces résultats concordent avec d'autres travaux qui impliquent l'acide salicylique dans la réalisation de différents programmes d'antistress (Hayat *et al.*, 2010 ; Aftab *et al.*, 2011 ; Jayakannan *et al.*, 2013).

Il résulte de notre expérience que différentes concentrations de Zn retardent et diminuent le taux germination. La concentration la plus élevée du Zinc inhibe totalement la germination. Par ailleurs, l'AS exerce un effet positif sur la germination en présence du Zinc à 100mM. Nous avons noté une augmentation progressive du taux de germination avec l'augmentation de la concentration d'AS.

Concernant l'autre partie de notre étude, le stress métallique provoque une diminution des paramètres morphologiques de la plante. Mais le traitement par l'acide salicylique corrige cette diminution principalement à 0,5 mM. Selon notre étude, le taux de la chlorophylle diminue sous l'action de stress métallique en comparaison avec le témoin. Cependant, nous avons remarqué une augmentation remarquable des pigments chlorophylliens après l'addition de l'AS principalement à 0,5 mM par rapport les plantes stressées et non traitées.

D'autre part, Nous avons enregistré une augmentation des teneurs des marqueurs de stress étudiées notamment les polyphénols, tanins condensés, peroxyde d'hydrogène et la proline.

Le traitement des plantes stressées avec l'acide salicylique montre une diminution des teneurs de ces marqueurs de stress étudiés principalement à 0,5 mM. L'utilité de l'AS dépend de la concentration et du stade de développement de la plante.

Compte tenu des résultats que nous venons de commenter pour mettre en évidence l'effet combiné du zinc et de l'acide salicylique sur la germination, la réponse morphologique, et biochimique des plantes aromatiques et médicinales, il est possible d'orienter ces travaux vers d'autres axes pour apporter des informations supplémentaires dans le domaine de la résistance des plantes aux stress abiotiques pour la recherche des moyens de protection avec des moyens économiques disponibles.

- ❖ Etudier l'accumulation d'autres composés tels que les protéines totales solubles, les polyamines, les flavonoïdes ; la glycine bétaine...
- ❖ Procéder à l'étude des paramètres morphologiques tels que la matière sèche, la rétention d'eau et la conductivité stomatique pour évaluer le rôle de ces composés dans la croissance des plantes sous stress.
- ❖ Appliquer le traitement sur d'autres plantes.
- ❖ Etudier des différents types de stress abiotique tels que : Stress hydrique, salin, ionique...

Abbaszadeh B, et al., (2009). Studying of essential oil variations in leaves of *Mentha* species. *Afr. J. Plant Sci.* 3:217.

Aftab T, Khan M.M.A, Teixeira DA Silva J.A, Idrees M, Naeem M. et Moinuddin (2011). Role of Salicylic Acid in Promoting Salt Stress Tolerance and Enhanced Artemisinin Production in *Artemisia annua* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, Volume 30, Issue 4, pp 425-435.

Afzal I, Basra S.M.A., Farooq M, Nawaz A (2006). Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid. *Int. J. Agric. Biol.*, 8:23–28.

Bates LS, Waldren RP, Teare JD (1973). Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205–207.

Barcelo J, Poschenrieder Ch (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress: review, *J. Plant Nutr* 13 :1–37.

Bollard E.G, Butler G.W (1966). Mineral nutrition of plants, *Ann. Rev. Plant Physiol* 17 :77–112.

Bradshaw A.D, McNeilly T (1981). *Evolution and Pollution*. Edward Arnold, London.

Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A (2007). Zinc in plants. *New Phytol* 173(4) : 677-702.

Brown J.C, Jones W.E (1975). Heavy metal toxicity in plants. 1. A crisis in embryo. *Commun, Soil Sci. Plant Anal* 6 :421–438.

Brown J.C, Ambler, J.E, Chaney, R.L, Foy, C.D (1972). Differential responses of plant genotypes to micronutrients, in: Mortvedt J.J., Giordano P.M., Lindsay W.L. (Eds.), *Micronutrients in Agriculture*, Madison, WI, Soil Sci. Soc. Am., pp. 389–418.

Chappelka, A.H, Samuelson, L.J (1998). Ambient ozone effects on forest trees of the eastern United States: A review. *New Phytol.* doi:10.1046/j.1469-8137.1998.00166.x

Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem.* 92: 491-497.

Delaney TP, Uknes SJ, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto, Gaffney T, Gut RM, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, pp. 1247-1250.

Dong J, G Wan, Z Liang, (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology* 148: 99– 104.

Es-sbihi FZ, Hazzoumi Z, Moustakim Y, El-harachil H and Amrani Joutei K (2016). Effect of salicylic acid and salt stress on the growth and some biochemical parameters of *Mentha suaveolens*.

Ernst W.H.O, Schwermettallvegetation der Erde. Stuttgart. G. Fischer Verlag (1974).

Ernst W.H.O (1998). Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level, in: Schuurmann G., Markert B. (Eds.), *Bioaccumulation and Biological Effects of Chemicals*. Wiley/Spektrum Akademischer Verlags, New York/Heidelberg, pp. 587–620.

Foy C.D, Chaney R.L, White M.C (1978). The physiology of metal toxicity in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol* 29 :511–566.

Gerloff G.C (1963). Comparative mineral nutrition of plants, *Ann. Rev. Plant Physiol* 14 :107–124.

Gozzo F (2003). Systemic acquired resistance in crop protection : from nature to a chemical approach, *J. Agric. Food chem.* 51, pp. 4487-4503.

Hamada AM, Al-Hakimi AMA (2001). Salicylic acid versus salinity-drought-induced stress on wheat seedlings. *Rostl Vyr* 47:444–450.

Hazzoumi Z, Moustakime Y, Amrani Joutei K (2014). Effect of gibberellic acid (GA), indole acetic acid (IAA) and benzylaminopurine (BAP) on the synthesis of essential oils and the isomerization of methyl chavicol and trans-anethole in *Ocimum gratissimum* L. *Springer Plus* 3:321

HOPKINS, W.G (2003). *Physiologie végétale*. Edition de Boeck, Université de Bruxelles, Belgique, 532 p.

Jayakannan M, Bose J, Babourina O, Rengel Z, et Shabala S (2013). Salicylic acid improves salinity tolerance in *Arabidopsis* by restoring membrane potential and preventing salt-induced K⁺ loss via a GORK channel. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 64, No 8: 2255–2268

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot*, 68(1), 14-25.

Klessig et al., (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2000, pp. 8849-8855.

Korkmaz A, Uzunlu M, Demirkiran AR (2007). Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. Franciszed Gorski institute of plant physiologie. Polish academy of science. Krakaow. Tyrkey.

Kranner, I, Colville, L (2011). Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. Environ. Exp. Bot. 72, 93–105. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.05.005

Kunkel B.N, Brooks D.M (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense, Curr. Opin. Plant Biol. 5, 2002, pp.325-331.

Lepp N.W, Dickison N.M (1994). Fungicide-derived copper on plan-tation crops, in: Ross S.M. (Ed.), Toxic Metals in Soil-Plant Systems. Wiley, Chichester, L. K, pp 367–393.

Lupien, S.J (2015). The history of the Science of Stress: rom Hans Selye to discovery of anti-inflammatory medication. Santé mentale Québec, vol. 40, No 2: 275-286.

Mckinney (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem 140:315–332

Muthukumarasamy M, S.D. Gupta, R. Pannerselvam (2000). Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by tridimefon in NaCl stressed Raphanus sativus L, Biol. Plant, 43: 317-320.

Naczk M, F. Shahidi (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, J, Chromatograph 1054:95-111.

Navarro J.M, Flores P, C. Garrido, V. martinez (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity, Food Chem 96: 66-73.

Nicole.M et al., (1998). The hypersensitive reaction of cotton to Xanthomonas campestris pv. Malvacearum. Recent Research Developments in Microbiology 2 : 641-654.

Prabhu et al., (2009). Ocimum gratissimum: A Review of its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. The Open Complementary Medicine Journal, 2009, 1, 1-15.

Raskin I.,(1992). Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol., 43, 439–463.

Raskin LA, Ehrmann W, Melander R et Meeuse B J D (1987). Salicylic acid: A natural inducer of heat production in Arum lilies.Scienc 237(4822):1601-1602.

Rhodes et Orczyk AN (2001). Stress factors, their influence on plant metabolism and tolerance or resistance to stress. Purdue Univ, West lafayette, Indiana USA.

Ribereau-Gayon P, Stonestreet E (1966). Les composes phénoliques des végétaux.

Sakhabutdinova A. R, Fatkhutdinova D. R, Bezrukova M. V, et Shakirova F. M, (2003). Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. BULG. J. PLANT PHYSIOL., SPECIAL ISSUE, 314–319.

Ryals J.A. et al., (1996). Systemic acquired resistance. Plant Cell 8, pp. 1809-1819.

Sergiev.L, Alexieva E. et karanov.E (1997). Effect of spermine ,atrazine and combination combination between them on some endogenous protective system and markers in plants ,compt .rend.Acad .Bulg Sci 51 :121-124 .

Shah J (2003). The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology 6 :365-371.

Shakirova, F.M, A.R. Sakhabutdinova, V. Bezrukova, R.A. Fatkhutdinova et D.R. Fatkhutdinova (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Sci 164: 317-322.

Shier W.T (1994). Metals as toxins in plants, J. Toxicol. -Toxin Rev 13: 205–216.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Reventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Method. Enzymol 299: 152-178.

Smith et al., (1998). Accumulation of salicylic acid and 4 hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient in phenylalanine ammonia lyase activity in petioles and stems.Plant Physiol ,116, pp. 231-238.

Sresty TVS, Madhava Rao KV (1999). Les modifications ultrastructurales en réponse à un stress zinc et de nickel dans les cellules de la racine de pois de pigeon, Environ. Exp. Bot. 41 :3-13.

Ünlü et al., (2009). Effect of salicylic acid on salinity stress in cowpea.In international Symposium on sustainable Development ,jun 9-10 ,2009 Sarajevo Bosnia and Herzegovina.

Vasyukova, N.I, Ozeretskoykaya, O.L (2007). Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology 43: 367–373.

Vincent, R (2006). Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune Laminaria digitata. Thèse de doctorat. Biologie. Université de Rennes 1.

Wainwright SJ, Woolhouse HW (1976). Physiological mechanisms of Heavy metal tolerance, in: Chadwicks M.J., Goodman G.T. (Eds.), The Ecology of Resource Degradation and Re-newal, Br. Ecol. Soc. Symp., Blackwell, Oxford, 15, 1976, pp. 231–257.

Wahid, A (2006). Influence of atmospheric pollutants on agriculture in developing countries: A case study with three new wheat varieties in Pakistan. Sci. Total Environ. 371, 304–313.

Welch R.M (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Critical Rev, Plant Sci* 14 :49–82.

Zhu, J-K (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *An. Rev. Of Plant Biol* 53: 247- 73.