

Introduction :

Les 1^{res} civilisations ont utilisé les plantes et pratiqué l'agriculture pour assurer leur vie, depuis ce temps l'usage des plantes commence à dépasser la consommation quotidienne à des pratiques thérapeutiques plus larges, ce qui a ouvert la porte d'exploiter les fractions volatiles, et les extraits des plantes. Ce type des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire varient d'une plante à une autre et selon les conditions climatiques et édaphiques. Ils jouent un rôle dans la défense contre les herbivores, et de nombreux métabolites dits secondaires se sont avérés jouer des rôles essentiels dans les relations entre les plantes et leur environnement ; c'est l'exemple de plusieurs composés phénoliques qui participent à la filtration des UV, d'autres sont essentiels aux processus de pollinisation;

Ces rôles ont conduit au développement d'une discipline extrêmement féconde et absolument passionnante qu'on appelle la « Chemical Ecology ». Certains développements actuels de cette discipline concernent à la fois des aspects très fondamentaux des relations des plantes avec les champignons et les bactéries, mais rejoignent également les problématiques d'amélioration variétale et de synthèse des molécules d'intérêts puisque le rôle des métabolites secondaires dans la croissance et le développement est apparu de plus en plus évident (par exemple certains flavonoïdes régulent le transport de l'auxine). Dans ce sens la frontière entre certains métabolites dits secondaires et ce qu'on a appelé les phytohormones ou « substances de croissance » a en partie perdu de son étanchéité. Et cela passe en harmonie avec le métabolisme primaire (de base) des plantes.

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidée par la tradition ou les coutumes. La plupart de grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes (Goeb, 1999). Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignées dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles.

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique par exemple l'industrie cosmétique et

Introduction

dans les parfums. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux (Tchamdja, 1995).

Cette capacité thérapeutique des plantes est due principalement à des molécules qui interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction. Il faut noter que leurs concentrations variaient selon l'espèce et les conditions de l'environnement et aussi selon l'organe.

Par ailleurs, les sols sont généralement pauvres en oligo-éléments (bore, cuivre, fer, manganèse, molybdène, zinc) et ces oligo-éléments, lorsqu'ils sont présents dans le sol à des quantités convenables, jouent un rôle important dans la croissance des plantes et dans leur métabolisme. Par contre, à des concentrations élevées, ils peuvent constituer un stress métallique et entraver le bon fonctionnement des réactions biochimiques nécessaires au développement de la plante.

En outre, plusieurs auteurs ont montré l'importance de la symbiose mycorhizienne sur le métabolisme secondaire des plantes hôtes : sur les terpénoïdes (Akiyama et Hayashi 2002), les caroténoïdes (Maier *et al.*, 1995; Walter *et al.*, 2000; Fester *et al.*, 2002), flavonoïdes (Morandi 1996; Larose *et al.*, 2002), glucosinolates (Vierheilig *et al.*, 2000), les phénols (Zhu et Yao 2004, Benjelloun 2006) et phénylpropanoïdes (Weiss *et al.*, 1997). Guerrieri *et al.*, (2004) suggèrent que des champignons mycorhiziens peuvent également affecter les composés volatils produits dans les feuilles.

Dans ce travail, nous proposons une approche multidisciplinaire ayant pour objectifs majeurs d'évaluer les effets de quelques facteurs externes sur la synthèse des huiles essentielles aussi bien en ce qui concerne leurs compositions que leurs teneurs dans les plantes. Les facteurs étudiés sont les associations mycorhiziennes et les métaux lourds, phytohormones, stades phénologiques, stress hydrique.

L'effet de ces facteurs sur les teneurs en chlorophylles, en phénols totaux et en tanins condensés est également abordé.

Introduction

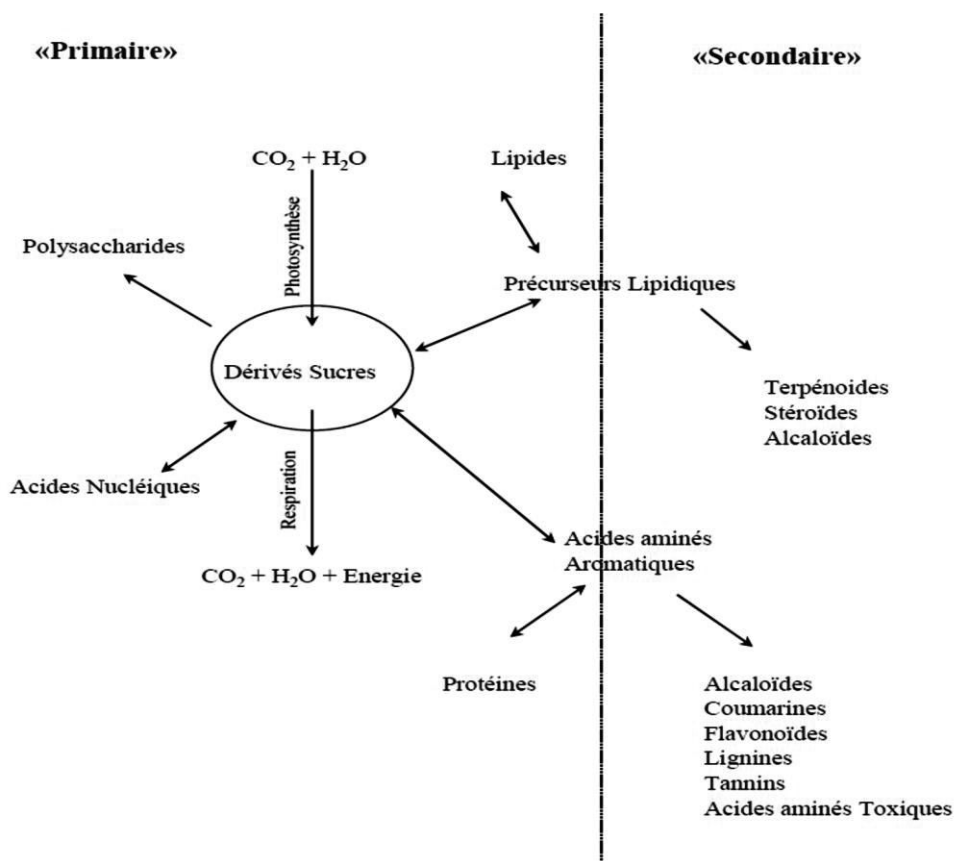


Figure 1 : récapitulation de la relation entre métabolisme primaire et secondaire des plantes

Cette thèse se divise en 7 chapitres :

Le 1^{er} chapitre consacré à des citations de la littérature d'une part, sur le métabolisme secondaire en général et des huiles essentielles en particulier et d'autre part des facteurs majeurs qui peuvent influencer sur la synthèse de ces huiles ainsi que sur les glandes de sécrétions et de stockage, avec une présentation des espèces étudiées dans ce travail.

Le 2^e chapitre est consacré à la méthodologie utilisée le long de ce travail.

Le 3^e chapitre donne quelques aperçus structuraux des différentes glandes de sécrétions bien que des huiles essentielles ou non (capitées et peltées) rencontrées chez les trois espèces étudiées dans ce travail.

Le 4^e chapitre se focalise sur l'effet des variations phénologiques des deux plantes *Salvia* et *Pélargonium*, sur l'évolution de certains paramètres à savoir les teneurs en eau, la chlorophylle, composés phénoliques, tanins condensés, jusqu'à la synthèse des huiles

Introduction

essentielles (rendement et composition), cette étude se prolonge le long de 4 phases de croissance.

Le 5^e chapitre s'intéresse à l'influence de certaines phytohormones aussi bien stimulatrices qu'inhibitrices sur des paramètres morphologiques, biochimiques ainsi que sur la synthèse des huiles essentielles et le nombre des glandes de sécrétions de ces huiles. Le basilic, la Sauge et pélargonium représentent l'espèce d'intérêt dans cette étude.

Le 6^e chapitre consiste à étudier l'effet du stress hydrique sur des plantes de basilic, et d'étudier le potentiel des champignons mycorhiziens à remédier les effets néfastes causés par le stress. Dans ce sens des multiples analyses biochimiques ainsi que des observations microscopiques sont réalisées.

Le 7^e chapitre traite le sujet des éléments métalliques (cuivre et zinc) sur les plantes, depuis la biochimie de la plante jusqu'à les glandes de sécrétions, ainsi on a essayé d'évaluer l'effet d'une concentration donnée sur différentes espèces, introduisant la notion de la concentration critique (qui détermine le point de différence entre le bénéfique et la toxicité d'un métal) pour chaque espèce dans la discussion de nos résultats.

D'après ces résultats et ces paramètres, nous avons essayé d'étudier d'une part l'adaptation de chaque espèce vis-à-vis des paramètres étudiés, et d'autre part d'évaluer les variations biochimiques, physiologiques et structurales causées par les facteurs étudiés. L'objectif principal consiste à renforcer la synthèse de certaines molécules d'intérêt (au sein des huiles essentielles), ou bien toute une famille de molécules (composés phénoliques et tanins condensés), autrement dit, avoir une idée sur l'exploitation optimale du rendement en huile chez une espèce à une phase végétative donnée ou suite à un traitement donné.

Chapitre 1

Revue Bibliographique

Étude bibliographique

I. Les métabolites secondaires

1. Évolution, diversité et fonction des métabolites secondaires

D'un point de vue biochimique, les plantes terrestres diffèrent des bactéries et des algues par l'expansion du métabolisme secondaire qui conduit à la synthèse d'une multitude de molécules secondaires aux propriétés et fonctions variées (lignines, cires, terpènes, tanins, alcaloïdes, flavonoïdes, anthocyanes...). Ces molécules participent aux réponses d'acclimatation des végétaux au milieu terrestre. La synthèse de ces molécules a un coût métabolique élevé (Rapior *et al* 1998).

Les fonctions remplies par ces molécules sont variées : la lignine joue un rôle dans le soutien, et est impliquée dans la réponse aux agressions biologiques ou physiques. Les cires et cutines imperméabilisent les parties aériennes (cuticules) et interviennent dans la réparation des lésions. Les tanins jouent un rôle défensif contre les herbivores et augmentent la résistance du bois aux moisissures. Les alcaloïdes sont considérés comme des défenses contre l'herbivore. Les flavonoïdes remplissent de nombreuses fonctions (pigments floraux, antifongiques, écrans UV, induction de nodulation, antioxydants...) et sont universellement présents chez les végétaux. De plus, la fonction de ces molécules est multiple et varie selon l'organe ou le cycle végétal : à titre d'exemple, la lutéoline (flavonoïdes, pigment jaune) joue un rôle d'écran UV au niveau des tissus floraux et des feuilles. Mais elle joue également un rôle comme antioxydant (piégeur de radicaux oxydants produits pendant la photosynthèse). Enfin au niveau des racines, elle a une fonction protectrice (antifongique) contre les pathologies des jeunes plantules, et chez les légumineuses, une fonction d'attraction des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (Rapiore *et al.*, 1998, Ceballos *et al.*, 2002). La multifonctionnalité des métabolites secondaires (leur aptitude à remplir plusieurs fonctions) constitue une de leurs caractéristiques essentielles, ce qui explique à la fois leur variabilité et leur répartition universelle (Ceballos *et al* 2002).

Une façon de comprendre la notion de métabolisme secondaire est de passer par un détour historique. De très nombreuses plantes médicinales ou aromatiques contiennent des métabolites qui sont très spécifiques et à des teneurs parfois extrêmement élevées. Pour des

raisons économiques, l'étude biochimique de ces composés a fait l'objet d'intenses efforts, contribuant au développement de plusieurs pans entiers de la phytochimie ayant des rapports étroits avec la pharmacie, l'industrie des colorants, cosmétiques... Devant la quantité et la diversité, des molécules caractérisées s'est rapidement posé la question de leur rôle biologique éventuel. Dans la mesure où ces molécules ne sont retrouvées que chez quelques espèces uniquement, les scientifiques ont pensé au départ qu'elles ne pouvaient avoir aucun rôle réellement important en comparaison des métabolites universellement représentés comme les glucides, les protéines, les lipides ou les acides nucléiques et dont les fonctions biologiques commençaient déjà à être solidement établies. Une opposition s'est ainsi dessinée entre :

- d'un côté le métabolisme primaire, désignant un métabolisme à la fois universel et participant aux fonctions cellulaires,
- et de l'autre côté le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante.

À mesure de l'accumulation de données, il est apparu que la distribution taxonomique de certains composés était parfois centrée sur des groupes taxonomiques très ciblés. L'idée a alors germé d'utiliser ces composés comme des outils pour aider à la résolution de problèmes taxonomiques, ce qui a conduit à toute une série d'excellents développements dans le cadre de ce qu'on a appelé la « chimiotaxonomie ».

Si on veut souligner encore les limites de la notion de métabolisme secondaire, il faut noter que les caroténoïdes sont par exemple traités souvent dans le chapitre du métabolisme secondaire alors que certains sont notoirement impliqués dans la photosynthèse. Par ailleurs, la lignine est un composé extrêmement fréquent chez les plantes et clairement indispensable pour la plupart à leur croissance et développement. Elle ne correspond donc pas à l'idée que l'on se fait du métabolisme secondaire. Malgré tout, dans la mesure où il s'agit d'un polymère de phénylpropanoïdes, composés dont l'étude rentre historiquement dans le champ d'études du métabolisme secondaire.

2. Les huiles essentielles :

2.1 Définition d'une huile essentielle

Les huiles essentielles sont des substances volatiles non grasses sécrétées par les plantes aromatiques. Elles sont constituées d'un mélange souvent complexe de molécules organiques. Elles entrent dans la composition de parfums, de cosmétiques, de produits d'entretien et sont utilisées en aromathérapie.

Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes (fleur, feuille, tige, écorce, racine, fruit, graine). L'huile essentielle ne se compose que de substances aromatiques volatiles et il existe plusieurs techniques pour obtenir des huiles essentielles (distillation, extraction par solvant...).

2.2 Composition des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phenylpropane (Teisseire, 1991).

2.3 Origine biosynthétique de l'isoprène

L'unité de base des biosynthèses est en réalité l'isopentényl diphosphate (IPP = isopentényl pyrophosphate) et son isomère le diméthylallyl-diphosphate (DMAP). Ces deux composés sont associés en géranyl-diphosphate (précurseur des monoterpènes), en farnésyl diphosphate (précurseur des sesquiterpènes et des triterpènes) et en geranyl-geranyl diphosphate (précurseur des diterpènes et des tetraterpènes) par des isoprényl transférases. Deux voies de biosynthèse conduisent à ces unités de base à 5 carbones, mais généralement on trouve deux groupes majeurs de molécules en huiles essentielles.

2.4 Les terpénoïdes

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$ suivant les valeurs de n, on a les hémiterpènes (n=1), les monoterpènes (n=2), les sesquiterpènes (n=3), les triterpènes(n=6), les tétraterpènes (n=8) et les polyterpènes. Les constituants des huiles essentielles sont très

variés. On y trouve en plus de terpènes, hydrocarbonés, des terpènes oxygénés sous forme d'esters, de lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des oxydes et autres (Teisseire, 1991).

Alcools : menthol, géraniol, linalol,...

Aldéhydes : géraniol, citronellal,...

Cétones : camphre, pipéritone

Phénols: thymol, carvacrol ...

Esters : acétate de géranyle,...

Acides : acide gérannique,...

Oxydes : 1,8-cinéole,...

Phénylpropanoïdes ; eugénol.

Terpènes : limonène, para-cymène,...

Autres : éthers, composés soufrés, composés azotés, sesquiterpène...

2.5 Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important, car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle, ainsi présent chez certaines espèces de basilic (Teisseire, 1991).

2.6 Les composés d'origines diverses

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînables lors de l'hydro-distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés (Teisseire, 1991).

3. Biosynthèse

3.1 Voie des Phénylpropanoïdes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire, spécifique du règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine (Phe), à la synthèse d'une multitude de composés dont la nature peut varier suivant les espèces végétales. L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide trans-cinnamique, le premier phénylpropane formé à partir de la Phe grâce à l'action de la phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL). La PAL est l'enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate, qui conduit aux acides aminés aromatiques, et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. Ces composés secondaires sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la

pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques, ou encore la signalisation (Weisshaar et Jenkins, 1998). Les dérivés phénylpropanes possèdent tous le même squelette carboné issu de la Phe : un noyau aromatique et une chaîne latérale de trois carbones (C6-C3).

La synthèse des huiles essentielles par la voie des phenylpropanoïdes commence par un métabolite du fructose, le PEP (phosphoenolpurivate). Elle aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques, via une série d'acides, dont l'acide shikimique (d'où son nom, voie shikimique) et l'acide cinnamique (figure 2). Les métabolites terminaux, importants en thérapeutique, sont les acides aromatiques suivants : acides salicylique, cinnamique et benzoïque et leurs esters dont le salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols (eugénol) ainsi que les coumarines,... Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles, comme les tannoïdes et les flavonoïdes, se trouvent incluses dans cette voie (Spurgeon et Porter, 1981).

3.2 Voie des Terpénoïdes

L'unité de base est l'IPP (isopentyl pyrophosphohate), molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi-alvéolaire. Il est dérivé de l'Acétyl CoA, lui-même issu du PEP (phosphoenol purivate) provenant directement du fructose. La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu de la même manière par la juxtaposition "tête à queue" d'unités isopréniques, unités pentacarbonées ramifiées assemblées enzymatiquement. Ainsi on trouve des squelettes hydrocarbonés à dix carbones (monoterpènes), puis à quinze carbones (sesquiterpènes) et plus rarement, à vingt carbones (diterpènes) (figure 1). Le processus peut se poursuivre, mais dans d'autres buts que la synthèse des essences.

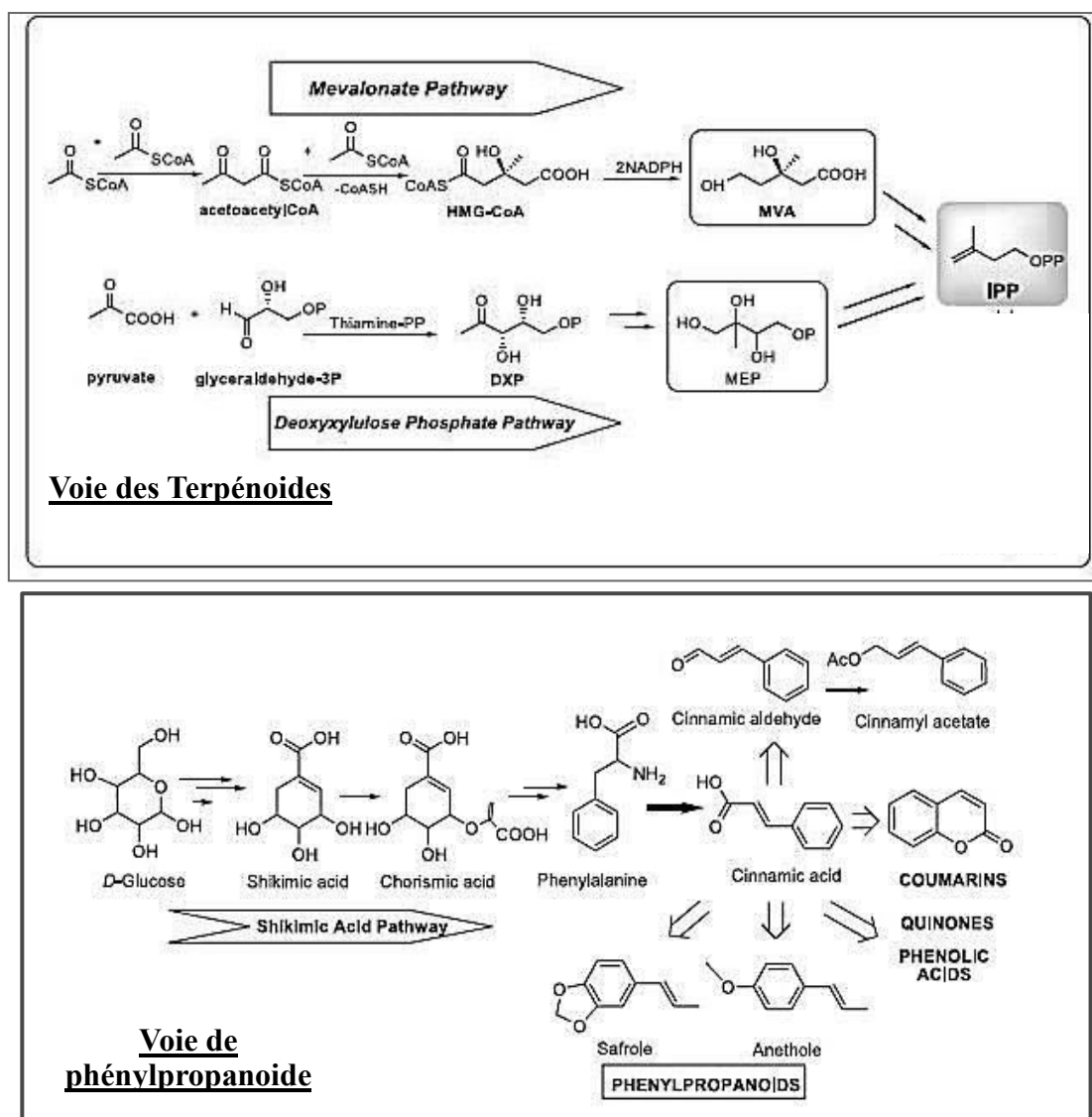


Figure 2 : les deux voies majeures de la biosynthèse des huiles essentielles

Monoterpènes

Composés à 10 carbones, souvent volatils, aromatiques et biologiquement actifs (bactériostatiques, signalisation plantes-insectes). Ils sont largement présents dans les résines et les huiles essentielles (exemple du pinène constituant majeur de l'essence de térébenthine et du menthol).

On distingue les monoterpènes linéaires, des monoterpènes monocycliques et bicycliques.

Sesquiterpènes

Composés à 15 carbones assez universellement représentés chez les végétaux. Exemple : le farnésol un sesquiterpène linéaire de nombreuses huiles essentielles, abondamment utilisé en

parfumerie. On distingue également les sesquiterpènes monocycliques et polycycliques (exemple : le caryophyllène, un sesquiterpène bicyclique en partie responsable du piquant du poivre).

Diterpènes

Composés terpéniques à 20 carbones. On retrouve parmi les dérivés de diterpènes la queue phytol des chlorophylles a et b et les résidus terpéniques du tocophérol (vitamine E) et de la phylloquinone (vitamine K1).

Triterpènes

Cette famille regroupe des composés dérivés d'une unité à 30 carbones, le squalène. On distingue en fonction du nombre de cycles les monoterpènes pentacycliques des monoterpènes stéroïdiens (tétracycliques). Bien que les composés stéroïdiens soient largement représentés dans le monde animal, de nombreux phytostérols sont spécifiques des végétaux. Les saponosides et les cardénolides sont des hétérosides formés à partir d'un triterpène qui constitue la génine (fraction aglycone) et de résidus glucidiques.

Tétraterpènes

Cette famille de terpènes à 40 carbones, compte en particulier les caroténoïdes dont un pigment photosynthétique majeur (le bêta-carotène), mais également des pigments aux propriétés anti-oxydantes comme le lycopène de la tomate.

4. Les chémotypes

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle est fondamentale, car elle permet d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir ainsi que la pharmacocinétique et la biodisponibilité de cette huile essentielle.

Pour une même espèce botanique, la composition chimique de l'huile essentielle n'est pas immuable. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. La présence d'un facteur ou/et de plusieurs facteurs peuvent engendrer la synthèse d'une molécule donnée, ce qui pourra varier considérablement au sein d'une même espèce et devienne caractéristique de cette espèce dans une telle région. Par exemple, le basilic cultivé en pleine lumière à Madagascar a un taux de chavicol 57% alors que la même plante cultivée à l'abri de la lumière en contient 74% (Franchomme et Penoël, 1990). Cette variabilité peut être influencée également par la composition du sol et la position

géographique puisque le basilic d'Égypte se caractérise par l'eugénol comme chémotype (Azanlenko, 1995).

5. Coût biosynthétique

La synthèse des terpénoïdes chez les plantes peut être mesurée par le bénéfice de chaque molécule, ainsi que par le coût biosynthétique de ces réactions. Sur le plan biochimique, la synthèse de ces molécules coûte plus cher que le métabolisme primaire et la majorité des métabolismes secondaires (tableau 1 et 2), ce coût (molécules de terpénoïde / 1 gramme de glucose) est dû au nombre des enzymes impliquées dans les réactions, surtout que ces enzymes s'impliquent strictement dans la biosynthèse de ces genres des molécules et n'assurent pas une autre fonction dans le métabolisme de la plante. En fait, les cellules végétales peuvent même posséder plus d'un ensemble d'enzymes pour catalyser les étapes de base pour la formation des terpénoïdes. Ces derniers sont généralement séquestrés dans des structures sécrétrices multicellulaires complexes, et donc les coûts de stockage de ces substances sont également susceptibles d'être considérables. Cependant, la plante peut réduire ce coût biosynthétique en terpénoïde par des multiples réactions d'isomérisation et/ou cyclisation pour synthétiser une nouvelle molécule à partir d'une préexistante, ainsi par le catabolisme de certaines molécules dont la plante n'a besoin qu'à un court terme.

Le long de la biosynthèse des terpénoïdes, ces derniers subissent des multitudes réactions de condensations, oxydations, cyclisations, ou s'unissent à d'autres molécules afin de donner le squelette de chaque classe de molécules. Ce produit est l'objet d'autres transformations à savoir: oxydations, réductions et conjugaisons, selon la nécessité d'ATP ou bien NADPH. En bref, la synthèse de ces terpénoïdes varie en fonctions de l'abondance des acétyl-CoA ainsi que les cofacteurs ATP et NADPH comme matériel de départ.

Dans les années 1970, un jeune écologiste néerlandais nommé FWT Penning De Vries a développé une technique simple pour calculer les coûts des premiers matériaux impliqués dans la synthèse de métabolites de plantes, fondées sur des procédés pour estimer le rendement et l'efficacité dans la croissance des micro-organismes (Penning De Vries *et al.*, 1974). Cette méthode a été améliorée et rectifiée par Chiariello *et al.*, (1989) dans laquelle le coût est déterminé par le calcul de la quantité de glucose ou d'un autre glucide simple, nécessaire pour fournir tous les substrats et cofacteurs consommés dans la biosynthèse.

Tableau 1 Coûts biosynthétiques de certaines familles et molécules par gramme de glucose consommé selon Gershenzon, 1994

Molécules	Formule	Coût (g de glu/g)	Références
Monoterpènes			
α -Pinène	C ₁₀ H ₁₆	3.54	Gambliel and Croteau, 1984;
			Lewinsohn <i>et al.</i> , 1992
Limonène	C ₁₀ H ₁₆	3.54	Alonso <i>et al.</i> , 1992; Kjonaas and Croteau, 1984
Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	3.54	Gambliel and Croteau, 1984
Menthone	C ₁₀ H ₁₈ O	3.37	Croteau and Venkatachalam, 1986
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	3.12	Croteau and Gershenzon, 1994
Camphre	C ₁₀ H ₁₆ O	3.10	Croteau and Shaskus, 1985; Dehal
Iridoides glycosidés			
Aucubin	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	2.39	Jensen, 199; Damtoft <i>et al.</i> , 1993b
Antirrhinoside	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	2.32	Jensen, 199; Damtoft <i>et al.</i> , 1993a
Sesquiterpènes			
Caryophyllène	C ₁₅ H ₂₄	3.54	Jensen, 1991; Damtoff <i>et al.</i> , 1993b
Capsidiol	C ₁₅ H ₂₄ O	3.43	Jensen, 1991; Damtoft <i>et al.</i> , 1993a
Caryophylleneoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	3.35	Dehal and Cmteau, 1988
Germacmne	C ₁₅ H ₂₂ O	3.34	Threlfall and Whitehead, 1991
Patchoulol	C ₁₅ H ₂₅ O	3.25	Cane, 1990
Diterpènes			
Casbène	C ₂₀ H ₃₂	3.54	Croteau <i>et al.</i> , 1987a
Pachydictyol A	C ₂₀ H ₃₂ O	3.35	Dueber <i>et al.</i> , 1978
Manool	C ₂₀ H ₃₄ O	3.32	West, 1981
Acide Abietique	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	3.26	Seaman <i>et al.</i> , 1990; Funk and
Stevioside	C ₃₀ H ₆₀ O ₁₈	1.99	Croteau, 1994
Triterpènes			
β -Amyrin	C ₃₀ H ₅₀ O	3.46	Graebe, 1987
Acide Bryonolique	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	3.34	Goodwin and Mercer, 1983
Cucurbitacin B	C ₃₂ H ₄₆ O ₈	2.87	Tabata <i>et al.</i> , 1993
Acide Papyriferique	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	2.72	Balliano <i>et al.</i> , 1983
Polyterpènes			
Rubber	(C ₅ H ₈) _n	3.54	Cornish, 1992; Patterson-Jones

Les substrats et les cofacteurs dans le tableau 1 reflètent un coût biosynthétique qui varie de 1.99 g glucose/g pour le stevioside jusqu'à 3.54 g glucose/g d' α -pinène comme composé le plus couteux. Cette variation de coût biosynthétique est due au nombre d'oxydations,

puisque'un composé hautement oxygéné nécessite plus d'ATP et de cofacteurs, contrairement au composé terpénique qui est moins oxygéné ou bien non oxygéné.

Un autre facteur qui influence sur le coût de formation des terpénoïdes est le type de cellules dans laquelle aura lieu la biosynthèse, ainsi que la voie par laquelle la synthèse a été effectuée. Dans le tableau 1, la biosynthèse des terpénoïdes a été supposée se produire dans des cellules hétérotrophes avec NADPH résultant de glucose par l'intermédiaire de la voie de pentose phosphate est étant dérivées de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique couplé de transport d'électrons mitochondrial (Gershenzon, 1994).

Tableau 2 : Variation du coût biosynthétique de certains groupes de molécules avec le nombre des réactions et/ou de conversions impliquées dans cette voie (N)

		Coût (g de glucose/g de molécule)
Classe de molécules	N	Intervalle de variation
Métabolisme primaire		
Acide gras	2	3.01-3.18
Acide aminés	20	1.23-2.82
Nucléotides	4	1.27-1.80
carbohydrates	5	1.00-1.11
Acide organique	4	0.61-0.87
Métabolisme secondaire		
Terpénoïdes	23	1.99-3.54
Alcaloïdes	5	2.89-3.62
Composés phénoliques	9	1.28-3.39

Un autre facteur qui détermine le coût biosynthétique des différentes familles c'est le nombre moyen de réactions et/ou de conversion impliquée dans cette voie. Ce facteur explique pourquoi la plante dépense plus d'énergie dans le métabolisme secondaire par rapport au métabolisme primaire, puisque d'après le tableau 2, les terpénoïdes se trouvent au sommet avec 23 conversions et une variation entre 2 à 3.54 (g Glucose/g).

II. Lieu de synthèse et de stockage

L'accumulation de terpénoïdes dans les plantes est généralement limitée à des structures sécrétrices spécialisées dont il existe différents types à savoir des trichomes glandulaires qui sont des poils épidermiques multicellulaires, trouvés chez certaines familles comme les Lamiaceae, Asteraceae et Solanacées, qui sécrètent des terpènes dans une cavité

extracellulaire située à l'apex du trichome (Werker *et al*, 1993 Werker 1999). Le Stockage de terpénoïdes dans ces structures peut également servir à limiter le risque de toxicité de la plante elle-même, car il est prouvé que de nombreux terpénoïdes sont potentiellement toxiques pour les tissus de la plante, lorsque les monoterpènes sont libérés aux cellules avoisinantes (Loveys *et al*, 1992). Des blessures ont également été trouvées lorsque certains sesquiterpènes sont déposés artificiellement sur des feuilles lors des essais de leur capacité à dissuader les herbivores (Polonsky *et al*, 1989). Par conséquent, la séquestration de terpénoïdes dans des compartiments spécifiques par des processus métaboliques sensibles peut être essentielle pour éviter des effets nocifs. La morphologie de ces structures varie selon les conditions d'irrigation et aussi selon la toxicité de contenu intracuticulaire.

Le trichome glandulaire est composé de plusieurs cellules assurant des fonctions différentes : les terpènes sécrétés dans les cellules sécrétrices passent dans un espace subcuticulaire situé à l'apex du trichome pour s'y accumuler, cependant les cellules basales assurent l'attachement de la structure à l'épiderme (figure 3) (Gershenzon et Maffei, 1994).



Figure 3 : Structure d'un trichome glandulaire (d'après Iriti, Colnaghi *et al*. 2006)

Les trichomes glandulaires varient morphologiquement entre les espèces et même au sein de la même feuille. Chaque type de trichomes glandulaire est constitué d'une cellule de base située dans l'épiderme, supportant une tige formée par une à trois cellules, et une tête formée soit par une seule cellule (type capitée) ou une tête plus complexe (type peltée). La densité de ces structures varie aussi avec l'ontogenèse et entre les différents tissus de la plante ; chez certaines espèces de lamiacées, la densité des glandes est plus élevée sur la partie ventrale de la feuille que sur la partie dorsale. Dans les feuilles de *M. piperita*, la densité de trichomes peltés est plus grande sur la partie adaxiale que sur la surface abaxiale (Maffei *et al.*, 1986).

1. La localisation des glandes dépend de la fonction

Les glandes de sécrétions sont localisées dans tous les organes de la plante, feuilles, tiges et même au niveau racinaire. La localisation de ces structures dépend de l'organe dans lequel se situent ainsi que la fonction et la nature des substances stockées et sécrétées par ces glandes.

En raison de l'énorme diversité de ces structures, morphologie, origine, taille, emplacement, microstructure de la tête, capacité sécrétoire, mode de sécrétion, fonction, etc, leur classification est rendue difficile. L'utilisation de l'un de ces critères rend la classification incomplète ce qui nécessite une méthode basée sur différents types de critères pour classer ces glandes.

La classification majeure subdivise les glandes en deux groupes : des trichomes glandulaires et trichomes non glandulaires. La principale caractéristique de distinction entre ces deux types est la morphologie ainsi que la nature des substances à sécréter.

2. Trichome non glandulaire

Les trichomes non glandulaires diffèrent dans la morphologie, l'anatomie et la microstructure. Essentiellement, ils sont classés en fonction de leur morphologie. Ils peuvent être unicellulaires ou multicellulaires, ramifiés ou non ramifiés. Les trichomes multicellulaires non ramifiés peuvent être unisériés, bisériés ou multisériés. Ils peuvent être distinctement articulés entre des cellules ou des parois transversales ce qui rend la distinction de ces structures impossibles sur la surface. Ils peuvent différer en longueur, taille et forme des cellules, et peuvent être symétrique ou asymétrique. Ce type de glande assure une fonction de protection comme barrière mécanique et n'assure pas une sécrétion d'une substance quelconque.

3. Trichome glandulaire

Le terme "trichomes glandulaires" se réfère à une grande variété de glandes. Ils diffèrent selon la composition chimique des substances qu'elles sécrètent, accumulent ou absorbent, selon leur mode de production, structure et emplacement, et selon leurs fonctions. Toutes ces différences servent à un certain niveau, qui se chevauchent souvent des niveaux, de la classification.

Dans un grand nombre des Lamiacées, deux principaux types de trichomes glandulaires sont rencontrés, les capités et les peltées. Ils diffèrent selon la forme de leur tête sécrétrice, selon la morphologie ainsi que la nature des substances à sécréter. La tête des glandes capitées se compose de 1 à 4 cellules sécrétrices plus ou moins arrondies, généralement orientées

horizontalement, une tige, une à plusieurs cellules longues, et une cellule basale. La cellule de tête peut parfois être très grande, comme dans certaines espèces de *Salvia* (Werker *et al.*, 1985 c). La tête des glandes peltées (échelles glandulaires) se compose de 4 à 18 cellules plus aplaties sur un plan horizontal, une cellule de tige et une cellule basale. Ainsi, des formes intermédiaires peuvent être rencontrées.

4. Variabilité et classification

Il existe une grande variabilité dans les matières sécrétées des trichomes glandulaires :

- Les polysaccharides, les sucres, les sels, les lipides, les huiles essentielles, les résines, les protéines, etc. Uphof (1962) a proposé de classer les trichomes glandulaires selon la nature de leurs produits de sécrétion. Fahn (1979) a classé les substances de sécrétion dans les plantes en général en deux groupes :

(1) les substances non modifiées ou légèrement modifiées, comme les sels sécrétés par certaines glandes, ainsi que le nectar.

(2) les substances synthétisées par les cellules de sécrétions. Cela peut être hydrophile (comme dans les trichomes qui sécrètent du mucilage, et trichomes glandulaires digestives de plantes carnivores) ou lipophile (comme par exemple, dans les trichomes glandulaires de Lamiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Solanaceae et Cannabaceae).

La difficulté avec ce type de classification est que certaines glandes sécrètent plus d'un type de substance. Par exemple, les glandes d'*Inula viscosa* sécrètent des substances lipophiles, des polysaccharides et des protéines, à différents stades au cours de la vie et par différents organites (Werker, 2000). Dans certaines plantes carnivores, les mêmes poils glandulaires produisent à la fois des substances séduisantes (nectar) et digestives (enzymes).

Chez les Lamiacées, en plus de substances lipophiles, des quantités relativement importantes de polysaccharides, qui varient en quantité entre les espèces, sont sécrétées par certaines glandes capitées (Werker 2000). Un bon nombre de ces matières sécrétées sont phytotoxiques.

5. Fonctions de trichomes

La fonction des trichomes glandulaires varie en fonction de leur emplacement, les substances qu'elle sécrète et le moment de sécrétion. Structurellement, des trichomes similaires peuvent produire des matériaux différents, mais même lorsque des matériaux similaires sont produits, quand les trichomes sont situés différemment, ils peuvent avoir des fonctions différentes. Par

exemple, les fonctions de trichomes de mucilage des semences diffèrent considérablement de celles des feuilles.

Différents types de trichomes glandulaires peuvent différer selon le stade de développement de l'organe. Chez les Lamiacées, d'un point de vue fonctionnel et en fonction de leur mode de sécrétion, les matériaux de sécrétion de certains types de glandes capitées sont largués à l'extérieur juste après leur production, quand les feuilles sont encore jeunes et en développement, souvent par une cuticule poreuse ou par une rupture mécanique. La fraction lipophile agit comme un répulsif sur les jeunes feuilles avant même d'être touchée. Dans les glandes peltées, le matériel de sécrétions est progressivement sécrété à partir des cellules glandulaires dans un espace formé par élévation de la cuticule. La cuticule peut se rompre par un prédateur, libérant les matières sécrétées, qui peuvent alors agir comme répulsifs. Les poils glandulaires peuvent également être classés en "court terme" correspondant avec le premier groupe de glandes capitées et "à long terme" correspondant avec les glandes peltées (Werker *et al.*, 1993).

- a) **Protection** : La plante a besoin de protection contre divers facteurs externes : herbivores et pathogènes, températures extrêmes, perte excessive d'eau, allélopathie contre les plantes concurrentes, etc. Lorsque les trichomes non glandulaires sont densément répartis (formant parfois un tapis plus épais que la feuille elle-même, que l'on trouve dans de nombreuses plantes qui poussent dans des conditions arides), ils peuvent servir de barrière mécanique contre la plupart des facteurs externes. Une corrélation entre la densité des trichomes et résistances contre les insectes nuisibles a été démontrée par Levin (1973). Les glandes, qui sécrètent des substances lipophiles, peuvent servir dans la protection chimique contre divers types d'herbivores et pathogènes en les décourageant ou en les empoisonnant. Le mucilage sécrété peut piéger les insectes par collage.
- b) **Absorption de l'eau** : assurent une fonction permanente d'absorption d'eau et les minéraux du sol. Ils sont généralement de courte durée, unicellulaires, non ramifiées et bien allongée, ou avec un ou plusieurs gonflements.

Les plantes épiphytes, qui n'ont pas de contact avec le sol, ainsi que les plantes qui poussent dans des conditions xériques, possèdent parfois d'autres types de glandes

pour la collecte de l'eau du brouillard comme l'*Ananas comosus* (Sakai et Sanford, 1980).

- c) **Sécrétion de sel** : sont constitués de cellules qui sécrètent activement une solution de différents minéraux.
- d) **Trichomes séduisants** : glandes de sécrétion de certains nectares, comme les glandes unicellulaires de *Lonicera Tropaeolum*, et les multicellulaires d'Abutilon. L'exemple le plus frappant sont les plantes carnivores qui ont des exigences particulières pour attraper leur proie, ils ont besoin de séduire, et de piéger les différentes proies (déclenchement sensoriel, digestion et dispositifs d'absorption). Ces fonctions sont principalement remplies par les trichomes (Thomson, 1991).

6. Développement des glandes

Le développement de trichome commence à un stade précoce du développement de la feuille, souvent avant le développement des stomates, et parfois même avant l'apparition de l'ébauche de feuille. Par exemple les trichomes non glandulaires sur les feuilles de certaines espèces, atteignent presque leur pleine taille lorsque la feuille est d'environ 1cm. A ce stade, ils sont orientés vers la pointe de la feuille, couvrant la jeune feuille. Les apex sont ainsi protégés physiquement par ces longs poils. Avec la poursuite du développement de la feuille, ces poils deviennent orientés verticalement.

Pour les trichomes glandulaires, trois phases de développement ont été distinguées (Ascenso et Pals, 1998): pré-sécrétion, sécrétion et post-sécrétoire.

Chez les Lamiacées, certains auteurs ont suggéré que le nombre de trichomes glandulaires est établi au début lors de la différenciation de la feuille (Ascenso et Pais, 1987), tandis que d'autres ont conclu qu'il augmente à tous les stades de développement de la feuille (Unzelman et Healey, 1974; Turner *et al.* , 1980; Croteau *et al.*, 1981;.. Maffei *et al.*, 1986, 1989). Chez *Ocimum basilicum* (Werker *et al.*, 1993) les trichomes glandulaires commencent à être produits à des stades très précoces de développement des feuilles et le taux de leur différenciation est rapide. La feuille elle-même a son propre modèle de différenciation, à des rythmes différents dans les diverses régions. Tant que des divisions cellulaires se produisent dans la feuille, de nouveaux poils glandulaires peuvent être produits. Les jeunes régions de la feuille sont, par conséquent, densément couvertes de poils glandulaires, mais une fois que ses

cellules commencent à élargir les trichomes glandulaires deviennent progressivement plus espacés.

Les trichomes non glandulaires sont peu étudiés puisque leur rôle reste paradoxal. Leurs rôles dans la protection contre les agents pathogènes et dans la régulation de la température pendant les situations de stress thermique sont mal élucidées.

III. Effet de quelques facteurs biotiques et abiotiques sur les huiles essentielles

Au cours de leur évolution, les plantes terrestres ont dû s'adapter pour faire face à de nombreuses contraintes. Les plantes sont des organismes sédentaires, et dans leur environnement, elles sont sujettes à une multitude de stress de nature abiotique et biotique (Fig. 4). Parmi les facteurs abiotiques, on trouve notamment les températures extrêmes, les rayonnements UV, les carences ou les excès en éléments minéraux essentiels ou toxiques.

Les végétaux se trouvent également en contact avec des micro-organismes tels que les champignons, les bactéries et les virus, dont certains sont pathogènes. Cependant, au cours de l'évolution, les plantes ont su élaborer des systèmes d'adaptation et de défense efficaces leur permettant le plus souvent de tolérer et de résister à toutes ces agressions extérieures. Les plantes se sont perpétuellement adaptées au milieu environnant, notamment en modelant leur métabolisme et en synthétisant de nouvelles molécules. Les voies biochimiques essentielles à la vie de la plante telle que la photosynthèse, la glycolyse ou encore la synthèse des acides aminés ont conduit au cours de l'évolution à la mise en place de nouvelles étapes enzymatiques donnant naissance à leur tour à des molécules aux fonctions nouvelles. Par la suite nous allons essayer de décrire les facteurs majeurs qui peuvent influencer sur la croissance et le métabolisme de la plante.

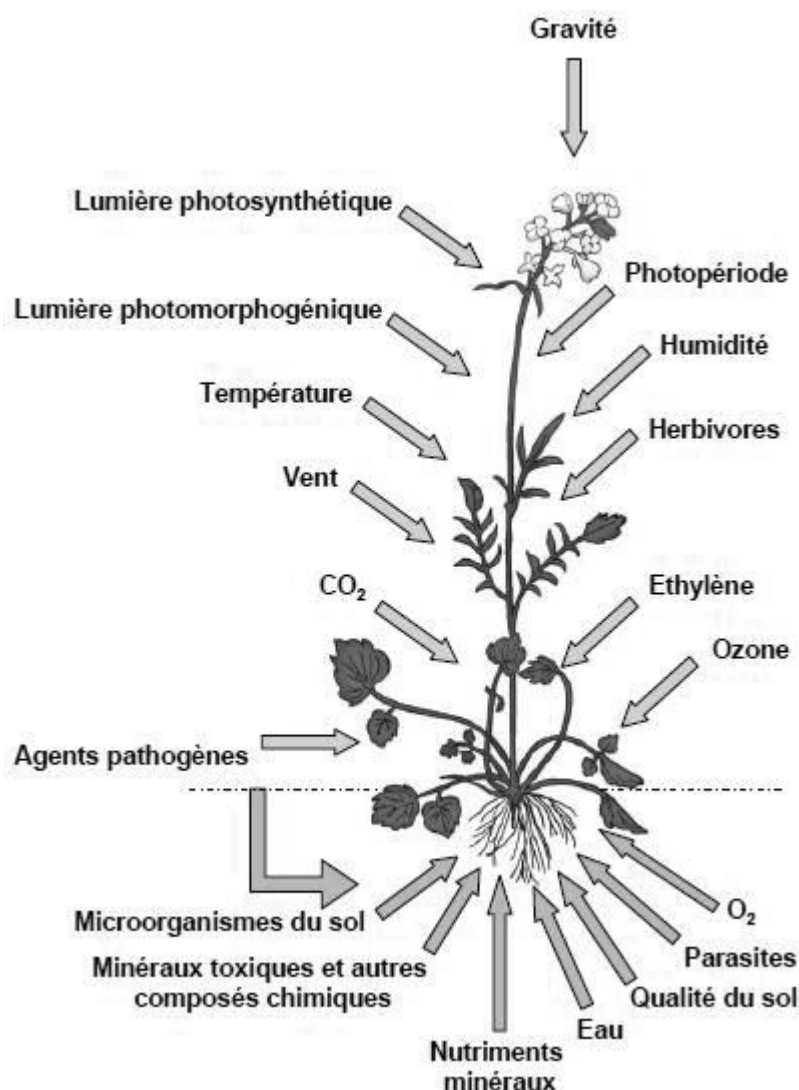


Figure 4 : Signaux environnementaux de nature physique, chimique ou biologique, pouvant affecter la croissance et le développement des plantes (Buchanan *et al.*, 2001)

1. Effet de la phénologie

La phénologie peut être définie comme l'étude de certains événements périodiques (annuels le plus souvent) sur le monde vivant. Elle influence fortement de multitudes aspects physiologiques et biochimiques des êtres vivants. En botanique, la phénologie des végétaux comporte plusieurs événements majeurs : la dormance, début de floraison, floraison, la feuillaison, la chute des feuilles ... Ces variations sont liées directement aux conditions climatiques (chaleurs, précipitations...), photopériodes, nature du sol, facteurs abiotiques. Ce qui influence sur le métabolisme de la plante qu'il soit primaire ou secondaire.

Ces variations touchent le rendement en huiles essentielles ainsi que la composition et la gamme des molécules constitutives de ces dernières. Chez les plantes d'eucalyptus, les jeunes

feuilles contiennent plus d'huile essentielle que les feuilles âgées (Weiss 1997). Selon le même auteur, le rendement et la composition peuvent varier d'une plante à une autre, même lorsqu'on réalise l'extraction sur des feuilles dont l'âge est similaire.

Une variation qualitative et quantitative du rendement en huiles essentielles est observée en fonction des organes concernés et même selon la phase phénologique. Francis (1971) a enregistré un maximum de rendement lors de l'extraction des fleurs par rapport aux feuilles chez pélargonium et le maximum de rendement a été enregistré en pleine floraison ; cette phase se caractérise par diverses réactions de conversions de molécules.

Selon Lemberkovics *et al* (1995), le rendement en huile essentielle de basilic augmente depuis la phase de floraison, avec une stabilité au niveau de la composition, puisque les sesquiterpène restent la famille majoritaire avec des teneurs situées entre 40% à 60%. Vers la fin de floraison, les teneurs en cette famille diminuent atteindre 25% à 30%.

2. La photosynthèse

La photosynthèse joue un rôle primordial dans les différents processus physiologiques et biochimiques des plantes, puisqu'elle assure la synthèse de la matière première ; par exemple le triose phosphate, qui est impliqué dans la synthèse des huiles essentielles, en lien avec le glycéraldéhyde-3-phosphate, ou bien avec le pyruvate (selon la compartimentation de biosynthèse) Sangwan *et al.*, (2001).

Chez *Mentha piperita*, la synthèse des huiles essentielles est estimée en corrélation avec l'activité 1,5.ribulose biphosphate carboxylase (RuBPCase) et glycolate oxydase. L'activité des ces derniers ainsi que les teneurs des monoterpènes augmentent en fonction de l'âge des feuilles (Sangwan *et al.*, 2001).

Des études réalisées sur deux espèces de citrus, *C. citratus* et *C. flexuosus* soumis à différents régimes photopériodiques, ont révélé que la biosynthèse du composé majoritaire (cital) augmente en fonction de l'augmentation de l'activité photosynthétique des plantes.

3. Variations climatiques

Les variations saisonnières ainsi que la dispersion géographique représentent des facteurs primordiaux qui influencent sur la synthèse des huiles essentielles. Les plantes sont immobiles, et leur adaptation aux conditions difficiles dépend de toute une gamme des

molécules, synthétisées en fonction de ces variations climatiques. Selon Prakasa *et al.*, (1995) les fortes précipitations augmentent les teneurs en géraniol chez les plantes de *Pélargoniums*.

Le déficit hydrique, permanent ou temporaire engendré par la sécheresse et la rareté des précipitations joue un rôle important dans la distribution de la végétation naturelle et dans les performances des plantes cultivées plus que tous les autres facteurs environnementaux (Shao *et al.*, 2008). Il limite la croissance et entraîne des changements dans le métabolisme des plantes. Le stress hydrique entraîne l'accumulation des phénols chez *Bermuda Grass* (gazon) et chez le cotonnier Baslam, M *et al* (2011).

(Wahid et Ghazanfar 2006 ; Wahid 2007) ont confirmé ces données chez d'autres espèces végétales, avec une synthèse accrue des composés phénoliques, des flavonoïdes et des phenylpropanoïdes. Le stress induit l'augmentation de l'activité de phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qu'on peut considérer comme début de l'acclimatation des cellules face à un stress hydrique. Il agit d'une manière négative sur les teneurs en chlorophylles, ce qui induit une diminution de la photosynthèse suite à une perturbation du métabolisme du carbone et de certaines enzymes impliquées dans la régulation de ces réactions photosynthétiques (Cornic *et al.*, (2002); Kim *et al.*, 2000).

Des études menées sur l'osmorégulation indiquent que la proline joue un rôle significatif dans le processus de lutte contre le déficit hydrique. Ain-Lhout *et al.*, (2001) rapportent que les teneurs de ces molécules augmentent de façon très significative chez *Pistacia lentiscus* L et *Halimium halimifolium* L en cas de stress hydrique. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Delauney et Verma (1993), ainsi que ceux de Heuer (1994).

D'autres études ont montré qu'un stress hydrique très sévère exerce une action négative sur la synthèse des métabolites secondaires Wahid (2007) : chez le tabac il provoque l'arrêt de la synthèse des anthocyanes dans les fleurs et des polyphénols dans les feuilles Sheppard Peterson (1976) (Allen *et al* 1981). Un phénomène analogue est observé pour les fleurs et les feuilles de *Begonia gracilis* Zubek, *et al.*, (2012).

Le stress hydrique entraîne des changements considérables au niveau du rendement et de la composition des huiles essentielles chez plusieurs plantes aromatiques (Petropoulos *et al.*, 2008). On assiste à une diminution du rendement chez le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et l'anis (*Pimpinella anisum* L.) (Zehtab-Salmasi *et al*, 2001) suite à un déficit en eau.

Chez *Ocimum basilicum*, le stress augmente le rendement en huiles essentielles ainsi que les teneurs en composés majoritaires (linalol et méthyle chavicol). Khalid (2006), Hendawy et Khalid (2005) ont confirmé ces résultats chez *Salvia officinalis*. Dans le même sens, Solinas et Deiana (1996), ont confirmé que le stress hydrique affecte fortement le métabolisme secondaire des plantes d'une façon générale et des huiles essentielles d'une manière spécifique.

4. Mycorhization

Les conditions défavorables, spécifiquement le problème de dessiccation est l'un des principaux obstacles que les plantes ont rencontré sur terre depuis l'éternité. Il affecte la morphologie ainsi que la physiologie et la biochimie des plantes. L'incapacité des végétaux à se déplacer ouvre la voie sur d'autres modes d'adaptation pour remédier à ces aléas climatiques, la mycorhization représente une stratégie d'adaptation développée par les plantes pour les aider à supporter ces conditions défavorables. Ces associations ont permis la constitution d'un sol plus résistant aux intempéries ; ayant la capacité de mieux stocker l'eau, tout en améliorant la résistance des plantes au stress (hydrique, froid, ou bien manque d'azote et de phosphore).

Le sol en général se caractérise par une forte hétérogénéité de microflore ce qui influence sur la relation entre les champignons mycorhiziens et les Rhizobiums, d'une part, selon la nature des espèces de champignons considérées et d'autre part, en fonction de la variété de la plante hôte. Selon cette dernière, les champignons peuvent présenter un mode de vie symbiotique, parasitaire ou indifférent. Du même selon la nature de microorganismes impliqués dans l'association (bactéries et champignons), ils peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance de la plante hôte. Il a été signalé à cet effet qu'une amélioration de la disponibilité et l'assimilation de l'azote et du phosphore, la protection contre certains pathogènes et de même la tolérance des plantes hôtes à la sécheresse et à la salinité. Par ailleurs, il a été aussi signalé une synergie, un antagonisme ou une absence d'interaction entre les souches de la population indigène et les espèces de champignons mycorhiziens.

Par ailleurs, la mycorhization affecte fortement le métabolisme des plantes aboutissant à l'induction d'une défense chimique (Gange *et al.* 2007, Pozo et Azcón-Aguilar 2007). Ce changement touche la synthèse de plusieurs familles de molécules, les terpénoides (Rapparini

et al., 2008), les huiles essentielles (Copetta *et al.*, 2006), et les glucosinolates (Vierheilig *et al.*, 2000).

Chez *Mentha arvensis* L., Gupta *et al.*(2001) ont rapporté que l'inoculation mycorhizienne augmente de façon significative la teneur en huile. Freitas *et al.*(2004) ont également observé que l'inoculation de *M. arvensis* avec des champignons mycorhizien conduits à une augmentation de 89% les teneurs en huiles essentielles ainsi que le composé majoritaire (menthol).

5. Effet des phytohormones

Les phytohormones ou hormones végétales (auxines, gibbérellines, cytokinines...) sont des substances produites par la plante elle-même (substances endogènes) pour réguler sa croissance, et entrent dans plusieurs processus qui concernent le passage d'une phase végétative à une autre ainsi que dans les conditions de stress. Salah el Deen et M.Mahmoud (1996) ont étudié l'influence de l'AG, l'AIA et la kinétine sur le rendement et la composition en huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* et ont montré que l'AG entraîne la diminution du rendement en huile essentielle alors que la kinétine et l'AIA permettent de l'augmenter. Cette variation est accompagnée par un changement dans les teneurs du composé majoritaire (Méthyle chavicol) ainsi que les composés secondaires. La même observation a été réalisée par Fraternali *et al.*, (2003) qui ont montré que la pulvérisation des plantes de *Thymus mastichina* par une cytokinine entraîne l'augmentation des teneurs en huiles essentielles.

Princes *et al.*, (2010), Gershenzon *et al.*, (1994), Erbilgin *et al.*, (2006) ont attribué cette variation de rendement directement au nombre des glandes sécrétrices : l'AG entraîne une réduction du nombre de ces structures alors qu'un traitement avec la BAP (benzylaminopurine) augmente le nombre de ces glandes au niveau des feuilles chez plusieurs espèces (*Lavandula dentata*, *Thymus mastichina* et *Picea abies*).

Kim *et al.*, (2006) et Li *et al.*, (2007) ont montré que les teneurs en monoterpènes et particulièrement le méthyle chavicol changent au sein des huiles essentielles de basilic (*Ocimum basilicum* L) après pulvérisation de méthyle jasmonate. Rodriguez-Saona *et al.*, (2001) ont constaté également que l'AG change les teneurs en monoterpènes chez *Gossypium hirsutum* L.

Ces auteurs ont attribué cette variation aux gènes responsables de la régulation de la voie métabolique des monoterpènes par un changement au niveau des enzymes catalytiques de ces réactions comme la lipooxygénase (LOX), l'acide cinnamique 4-hydroxylase (C4H), la prephenate dehydrogenase (PDH), la polyphenoloxidase (PPO), l'acide phosphatase (APase), et la pentatricopeptide-repeat (PPR) qui jouent un rôle essentiel dans la synthèse des métabolites secondaires.

Un exemple frappant de l'effet des traitements hormonaux sur le changement des teneurs d'un composé majoritaire, est celui proposé par Lewinshon *et al.*, (2000) qui ont distingué deux chemotypes chez le Basilic (*Ocimum basilicum* L.) : le méthyle chavicol (ou estragole) et le méthyle eugénol. L'isomérisation entre ces deux molécules est due principalement à un complexe enzymatique l'**O-méthyle transférase**.

Chez le fenouil (*Foeniculum vulgare*) (figure 5), ce complexe enzymatique est présent dans les tissus avec une bi-spécificité, la 1^{re} appelée COMT donne le méthyl chavicol à partir du chavicol, la seconde appelée AOMT donne le trans- l'anéthole à partir du trans-anol (Gross *et al.*, 2002).

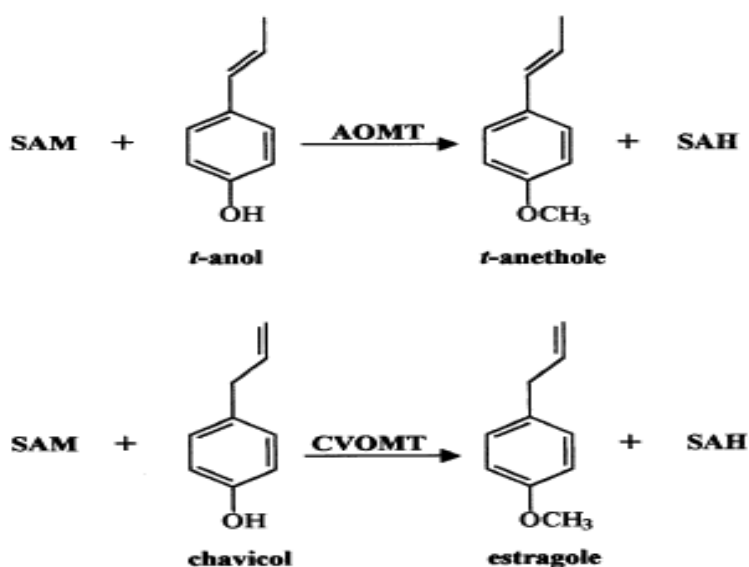


Figure 5 :l'activité d'O-méthyle transférase chez *F.vulgare* Selon Gross *et al* (2002)

L'o-méthylation de t-anol à t-anéthole avec SAM O-méthyl transférase (AOMT) et la Méthylation de chavicol à méthyle chavicol avec (COMT)

SAM: S-adenosyl-L-méthionine, SAH: S-adenosyl-homocysteine

Chapitre 1 : Étude bibliographique

Tableau 3: Effet des phytohormones (selon la littérature) sur le métabolisme des huiles essentielles chez certaines espèces (variation et mode d'action) : (X= pas d'effet) ; (+= effet positif) ; (-=effet négatif) ; (0= manque d'investigation) ;(ns=non signalé) Selon Prins *et al* 2010

Espèce	P.H	Effet observé		Mode d'action	Référence
		quantitatif	qualitatif		
<i>Artemisia annua</i>	GA	0	X	L'activation de la conversion des molécules	Zhang <i>et al.</i> 2005
<i>Catharanthus roseus</i>	CYT	+	X	L'augmentation de l'activité enzymatique	Decendit <i>et al.</i> 1993; Papon <i>et al.</i> 2005; Oudin <i>et al.</i> 2007
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	ET	0	X	L'activation des enzymes	Haque <i>et al.</i> 2007
<i>Cymbopogon citratus</i>	CYT	+	0	ns	Craveiro <i>et al.</i> 1989
<i>Gossypium hirsutum</i>	JA	+	X	L'activation des enzymes	Rodriguez-Saona <i>et al.</i> 2001
<i>Iva frutescens</i>	JA	0	X	L'activation des terpènes synthase et nouvelle voie de synthèse	Degenhardt and Lincoln 2006
<i>L. dentata</i>	CYT	+	0	Augmentation du nombre des feuilles. Développement des glandes	Sudriá <i>et al.</i> 2004
<i>L. dentata</i>	AUX	-	0	Développement des glandes	Sudriá <i>et al.</i> 2004
<i>L. dentata</i>	CYT	+	X	L'augmentation de l'activité enzymatique	Sudriá <i>et al.</i> 1999
<i>S. officinalis</i>	GA	+	X	Augmentation du nombre des feuilles	Poyh and Ono 2006
<i>S. officinalis</i>	CYT	+	X	L'augmentation de l'activité enzymatique	El-Keltawi and Croteau 1987
<i>Salvia fruticosa</i>	CYT	+	X	-----	Arikat and others 2004
<i>Thimus mastichina</i>	CYT	+	0	Développement des structures de sécrétions	Fraternale <i>et al.</i> 2003
<i>Ocimum basilicum</i>	JA	+	X	L'activation de la transcription des enzymes	Kim <i>et al.</i> 2006; Li <i>et al.</i> 2007
<i>Melissa officinalis</i>	CYT	0	X	L'action sur les réactions biochimiques	Silva <i>et al.</i> 2005

6. Les éléments métalliques

La composition du sol reste un facteur essentiel qui influence sur les plantes, parmi les constituants majeurs du sol les éléments métalliques tels que le Cu et le Zn, qui sont essentiels pour la croissance et le développement des plantes, car ils entrent dans la constitution d'un grand nombre d'enzymes et des protéines. Cependant, des concentrations élevées de ces deux métaux dans le sol peuvent entraîner une toxicité et une inhibition de la croissance de la plupart des plantes. La différence entre l'effet bénéfique des plantes à ces métaux et leur toxicité varie selon la nature et la concentration du métal, ainsi que de l'espèce végétale. Par ailleurs, certains facteurs liés au sol comme la texture, pH, microflore (spécifiquement les champignons mycorhiziens) peuvent augmenter la tolérance des plantes dans le cas des concentrations élevées.

6.1 Cuivre

C'est un oligo-élément indispensable à la vie, mais qui se trouve présent en proportions très faibles dans les tissus biologiques (Graham E.R.1973). Le cuivre généralement fixé dans les niveaux supérieurs du sol est relativement peu toxique.

La teneur en cuivre dans les sols non pollués est généralement de l'ordre de 2 à 40 mg/kg. Cette teneur peut atteindre 1000 mg de cuivre/kg dans les sols pollués. Dans les plantes les teneurs en cuivre sont en général comprises entre 2 et 20 mg/kg de matière sèche. (Baize 1997).

Chez les plantes traitées par le cuivre, Macfarlane et Burchett (2002) ont enregistré une stimulation des paramètres physiologiques et biochimiques à des concentrations inférieures à 100 µg/g. À partir de cette concentration, les activités physiologiques de la plante commencent à diminuer.

Selon Kabara-Pendias and Pendias (1992), la concentration critique du cuivre dans le sol est de 120 mg/kg. Cette concentration dépend du taux d'accumulation de l'espèce végétale : A 20 mg/kg du poids sec de la plante, le cuivre engendre des effets néfastes (Gupta 1975, Mackinol and Beckett 1985).

Les travaux de Zheljaskov *et al.*, (2006) ont indiqué que le traitement de basilic, l'anis et la menthe par le cuivre à 100 mg/l a engendré une augmentation du rendement en huile essentielle chez le basilic. Chez l'anis et la menthe, il engendre une diminution du rendement.

6.2 Zinc

Le zinc est un oligo-élément essentiel à toutes les espèces vivantes. Généralement fixé dans les horizons supérieurs des sols, il se fixe sur la matière organique, les hydroxydes de fer et les argiles.

Une surconsommation de zinc chez les plantes entraîne divers symptômes tels qu'un ralentissement de la croissance, des malformations des feuilles et des tiges, et une chlorose (Kabata-Pendias, 1992).

Les symptômes de toxicité observés en présence de quantités excessives de métaux peuvent être dus à une gamme d'interactions au niveau moléculaire cellulaire. La toxicité peut résulter de la liaison de métaux aux protéines, conduisant à l'inhibition de certaines activités ou de perturbation de la structure ou du déplacement d'un élément essentiel. En outre, l'excès de métal peut stimuler la formation de radicaux libres et les espèces d'oxygène réactif. Dans ce volet, de multitudes recherches ont été focalisées sur l'effet des métaux sur l'agriculture, les aspects morphologiques et des fois biochimiques des plantes ainsi que les méthodes adéquates pour dépolluer un sol toxique (phytoremédiation). Michalak (2006) a indiqué que les métaux affectent directement la biochimie de la plante, spécifiquement les composés phénoliques. Ces derniers augmentent dans le cas d'un stress métallique puisqu'ils peuvent agir comme des chélateurs de métaux et certains phénols peuvent directement piéger les radicaux libres et l'oxygène réactif.

Macfarlane et Burchett (2002) ont démontré une corrélation entre les teneurs en éléments métalliques et les paramètres morphologiques photosynthétiques. Selon ces auteurs le traitement des plantes d'*Avicennia marina* par des concentrations croissantes de zinc montrent qu'à 125 µg/g du sol, le zinc joue un rôle stimulateur de ces paramètres. À partir de 500µg/g le zinc devient toxique pour la plantes et inhibe presque la totalité des activités physiologiques et biochimiques.

Gupta (1975), Mackinol et Beckett (1985) ont montré que le zinc exerce des effets néfastes sur certaines plantes aromatiques (*Genera aremisia, Draccocephalum, inula, ruta et symphytum*) lorsque le sol contient des concentrations comprises entre 200 mg/kg et 400 mg/kg. Chez d'autres espèces, même à une concentration légèrement supérieure à 100 mg/kg, les symptômes de toxicité apparaissent.

La variation de la concentration et de la disponibilité des éléments métalliques dans le sol, influence fortement sur la synthèse des huiles essentielles. Abu-Darwish (2009) a indiqué une augmentation des teneurs en huiles essentielles chez *Thymus vulgaris* L, *Thymus serpyllum* L, et *Salvia officinallis* L cultivées dans des sols qui contiennent des teneurs élevées en zinc. Misra et Sharma (1991) ont également montré des variations de rendement à des concentrations différentes de la concentration critique du zinc dans les feuilles qui est de 28µg/g chez *Mentha arvensis*; A des concentrations inférieures, le zinc augmente le rendement de l'huile essentielle et à des concentrations supérieures le zinc abaisse le rendement. Dans des études réalisées sur géranium, Misra *et al.*, (2005) ont indiqué qu'au-delà des concentrations critiques, le zinc met la plante sous un stress métallique et entraîne une perturbation de l'équilibre nutritionnel de la plante, et il provoquant ainsi une perturbation de la synthèse des huiles essentielles et la diminution du rendement.

7. Les mécanismes impliqués dans l'assimilation des métaux

Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent aider les plantes à tolérer des fortes concentrations en éléments métalliques, à savoir, mécanismes de transport membraire de la famille ZIP, (transporteurs dépendants d'ATPase de type P), et transporteurs d'ions de la famille (Nramp). Le stockage dans certains organes, souterrains ou aériens (vacuoles des cellules racinaires et des cellules des tissus photosynthétiques). Ainsi certaines espèces possèdent des petites molécules organiques nommées les phytochélatines, qui sont capables de chélater les métaux toxiques. La chélation est un processus physicochimique qui conduit à la formation d'un complexe entre un ion métallique positif et une substance organique. Les phytochélatines sont des polymères du glutathion (γ -Glu-Cys-Gly), grâce aux fonctions thiol des résidus soufrés établissent des liaisons de coordination avec le métal (cadmium ou le zinc par exemple) et le séquestrent. Le complexe formé, le chélat, est alors transporté dans la vacuole. Le transport est assuré par un transporteur spécifique de phytochélatines complexées à un métal. Le passage vers la vacuole est ATP-dépendant, c'est-à-dire qu'il nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. A l'arrivée dans la vacuole, si le complexe n'est pas protégé, il est attaqué par l'acidité de la vacuole et les phytochélatines libèrent les ions métalliques. Le métal ainsi libéré peut se lier à des acides organiques. Les phytochélatines, dégradées ensuite en acides aminés migrent vers le cytosol.

IV. Présentation des espèces végétales :

1. Basilic

1.1 Présentation de l'espèce :

Le terme basilic, vient du grec basilikos, petit roi, car son arôme est royal ainsi, ou qu'il faisait traditionnellement partie d'un onguent ou d'un médicament magistral.

Cette plante originaire d'Inde, où elle est connue sous le nom de Tulsi ou basilic sacré, est un élément important de la tradition et de la vénération des dieux en Inde.

1.2 Différentes utilisations du basilic :

La plante est une source de vitamines (K), de Fer et de composants antioxydants (jouant un rôle dans la prévention de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et des maladies liées au vieillissement). La plante est dotée de propriétés antispasmodique, sédative, carminative et antiseptique. En médecine moderne, le basilic est employé comme sédatif nerveux et en Homéopathie, les feuilles fraîches servent à fabriquer une teinture employée comme antispasmodique. En médecine traditionnelle, les feuilles fraîches sont recommandées, en infusion, en cas de douleurs gastriques et en cas de douleurs des règles.

1.3 Diététique officielle

Les fines herbes sont réputées riches en antioxydants, qui combattent les radicaux libres (molécules impliquées dans le vieillissement et le développement des maladies cardiovasculaires et de certains cancers). L'antioxydant principal présent dans le basilic est l'acide rosmarinique. Des études in vitro et chez des animaux ont montré une diminution de l'oxydation des lipides avec un extrait de basilic. Il aurait également un pouvoir hypoglycémiant pour le diabète du rat.

1.4 Diététiques alternatives

La phytothérapie (traitement par les plantes) et l'aromathérapie (traitement par les huiles essentielles de plantes) sont très utilisées par les adeptes des médecines douces et des diététiques alternatives. Les feuilles fraîches de basilic sont considérées comme stimulantes, antispasmodiques et sédatives. Froissées, elles calmeraient les irritations cutanées. Le basilic serait recommandé dans les spasmes gastriques des nerveux, les migraines d'origine digestive ou nerveuse.

1.5 Pharmacologie des extraits et huiles essentielles

L'huile essentielle de *basilic* contient l'eugénol ou bien le méthyle chavicol et il possède une activité leishmanicide Oliveira *et al.*, (2009), ainsi il montre des signes d'activité antibactérienne Oboh *et al.*, (2009). Par ailleurs une préparation polyherbal d'un extrait de l'eau obtenue à partir des feuilles de *Latifolia gongronema*, *Vernonia amygdalina* et *Ocimum gratissimum* a montré une activité analgésique Iroanya *et al* (2009), Heldwein *et al* (2010). Cette huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* a un potentiel pour une utilisation comme conservateur alimentaire Dakole *et al* (2009).

1.6 Composition

Généralement les plantes de basilic enregistrent des rendements en huile essentielle plus au moins faible puisque, ce se situent aux alentours de 0,22%, chez le basilic de l'Égypte (Salah el Deen et Mahmoud, 1996). Le basilic de la Turquie et d'Iran ont un rendement plus élevé qui touche une valeur de 0,5% (Telci *et al.*, 2006, Ebrahim S, 2006).

Les monoterpènes oxygénés représentent la famille majoritaire avec des teneurs supérieures par rapport aux sesquiterpènes hydrocarbonés qui représentent la 2^e famille de ses huiles essentielles. Les monoterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés sont également présents avec des teneurs très faibles (Telci *et al.*, 2006 ; Salah el Deen et Mahmoud, 1996). Le méthyle chavicol (estragol) avec son isomère le trans-anéthol, est le composé majoritaire dont les teneurs atteignent des fois les 85%. Par ailleurs, selon les mêmes auteurs, on trouve des fois l'eugénol ou bien le méthyle eugénol comme composé majoritaire.

2. Salvia

2.1 Présentation de l'espèce :

Salvia vient du latin *salvare* qui signifie « sauver », « guérir » ; c'est une plante sacrée des anciens. Utilisée dans la pharmacopée traditionnelle au Maroc comme dans d'autres pays. Ses effets dus à son huile essentielle et la présence de plusieurs molécules dans son extrait. Le genre *Salvia* (la sauge) qui appartient à la famille des Lamiaceae, inclut presque 900 espèces dispersées dans le monde et se caractérisent par une variabilité dans la morphologie ainsi que la composition biochimique et les principes actifs constituant ses huiles essentielles et le métabolite secondaire en général Chalchat *et al* (1998), cette variation au niveau de la composition et du rendement est due principalement à la distribution géographique et les conditions climatiques.

2.2 Propriétés médicinales

Elle est antiseptique, stimulante, tonique et stomachique. Elle possède aussi à divers degrés des propriétés antispasmodiques, emménagogues (action bénéfique sur les menstruations), fébrifuges, antisudorales. En usage externe (en décoction), ses propriétés sont résolutes, vulnérinaires, antiseptiques et cicatrisantes. En tisane ou en aromate, elle facilite la digestion. Elle est aussi utilisée dans le traitement du diabète, car elle diminue la glycémie dans le sang.

Dans la médecine traditionnelle autrichienne, *S. officinalis* a été utilisée pour le traitement des troubles des voies respiratoires, la bouche, le tractus gastro-intestinal et de la peau Vogl S *et al* (2013).

Des enquêtes ont eu lieu dans l'utilisation de la sauge comme un traitement pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. (Akhondzadeh *et al.*, (2003) Dos.Santos *et al.*, (2006). L'extrait de feuilles peut être efficace dans le traitement de l'hyperlipidémie Iuvone *et al.*, (2006).

2.3 Compositions chimiques

La sauge est riche en saponines, tanins, vitamines. Ses huiles essentielles contiennent cinéole, bornéol, thujone. pinène, thuyone, cinéol, camphène.... Les feuilles de *Salvia* contiennent de l'acide tannique, l'acide oléique, l'acide ursolique, le carnosol, l'acide carnosique, l'acide fumarique, l'acide chlorogénique, acide caféique, niacine, nicotinamide, flavones, glycosides flavonoides et substances oestrogéniques Abu-Darwish *et al* (2013).

Selon Peter Rogers (2014), les extraits de sauge peuvent améliorer les performances cognitives. Cela est opposé à l'effet de la caféine dans le thé et le café.

La sauge marocaine se caractérise par un rendement important en huiles essentielles. Puisqu'il peut atteindre 1.6%, avec comme composés majoritaires le naphthalenone, camphorquinone et 1,8-Cinéole. Ce rendement est supérieur à celui enregistré chez la sauge algérienne qui atteint 1.2%. Cette différence concerne les teneurs, mais également la composition puisque cette dernière est riche en 1.8 cinéol et en carvacrol (Kheyar.N *et al.*, 2014). Chez *Salvia officinalis* variété Regula cultivée à Arbaz et à Butzberg en Suisse, ces teneurs se situent entre les 1.7% et 2.39%, ces rendements dépendent de la nature d'organe (feuille ou tige) ainsi que de l'âge des plantes (Carlen *et al.*, 2006). Le rendement varie de 1.3% à 2.5% en France, de 2.2% à 3.1% en Hongrie, de 2.4% à 3.2% au Portugal et de 1.8% à 2.7% en République de tchèque.

Les espèces les plus abondantes sont *Salvia common* (Dalmatian), *Salvia officinalis*, *S. triloba* (sauge de la Grèce) et *S. Lavandulae folia* (sauge de l'Espagne) Ain *et al* (2007). Les huiles essentielles de *Salvia* enclavent une forte hétérogénéité, qui se présente par une variation au niveau des familles majoritaires au sein de ces huiles Kheyar.N *et al.*, 2014.

3. Pélargonium

3.1 Présentation de l'espèce

Pélargonium est un genre important au sein de la famille Geraniaceae, qui a une distribution mondiale dans les régions tempérées aux zones subtropicales avec quelques 800 espèces principalement herbacées (Potter et Held 1999). Pelargonium lui-même est originaire d'Afrique du Sud (y compris la Namibie) et de l'Australie. L'Afrique du Sud contient 90% du genre, avec seulement environ 30 espèces trouvées ailleurs, principalement la vallée du rift (est-africain) et le sud de l'Australie (environ 20 espèces) (Potter et Held, 1999). Les quelques espèces restantes se trouvent dans le sud de Madagascar, le Yémen, Irak, l'Asie mineure, au nord de la Nouvelle-Zélande, les îles isolées de l'océan Atlantique et le sud de l'océan Indien (Potter et Held, 1999). Le centre de la diversité est en Afrique du Sud sud-ouest, où les précipitations se limitent en l'hiver, contrairement au reste du pays où les précipitations sont principalement dans les mois d'été. La plupart des plantes Pelargonium cultivées en Afrique du Nord, Europe et en Amérique du Nord sont originaires d'Afrique du Sud (Usherwood, 1994).

3.2 Propriétés médicinales

En phytothérapie, Pelargonium a été utilisé pour des problèmes intestinaux, les blessures et les maladies respiratoires, mais les espèces Pelargonium ont également été utilisées pour les fièvres, troubles rénaux et d'autres conditions. Les huiles de Pelargonium sont considérées comme un décontractant en aromathérapie, et ces dernières années, les remèdes respiratoires froids fabriqués à partir de *P. sidoides* et *P. reniforme* ont été vendus en Europe et aux États-Unis (Held et Potter, 2003). L'espèce *P. sidoides* est utilisée contre les blessures de la bronchite (Ranger *et al.*, 2011). *P. odoratissimum* est utilisé pour ses propriétés astringentes, toniques et antiseptiques. Il est utilisé en interne pour asthénie, la gastro-entérite, et l'hémorragie et à l'extérieur pour les affections de la peau, les blessures et les infections de névralgies et de la gorge. Elles sont également utilisées pour équilibrer le système hormonal, le flux menstruel, et nettoyer le corps des toxines.

3.3 Compositions chimiques

le rendement en huile essentielle de *Pelargonium sp.*, varie en fonction des conditions climatiques ainsi que l'âge de la plante et peut atteindre 1.4% (Dasuki, 2002, Angadi *et al.*, 1995). Cette variation touche même les molécules majoritaires qui peuvent caractériser la composition de cette huile. On peut rencontrer le menthol, l'isogéranol, l'eremophilène, le menthène et l'isobornéol. Pelargonium marocain enregistre un rendement maximal de 0,7% ce qui est supérieur à celui de la variété algérienne (0.3%) et celui d'Égypte (0,4%) (Dasuki, 2002). Ces variétés possèdent comme composés majoritaires le citronellol et le géranol avec des teneurs sont respectivement de 29et 9% chez la variété Egyptienne et de 33et 5% chez la variété algérienne.

Les plantes de pélargonium se caractérisent ainsi par des teneurs élevées en composés phénoliques, spécifiquement la famille des tanins condensés (Latte et Kolodziej, 2004).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Germination des graines et bouturages des plantes

- Les graines de basilic (*Ocimum gratissimum*. L) désinfectées par un passage dans l'éthanol 95° (30 sec à 1 min) puis dans une solution d'hypochlorite de mercure (1 %) pendant 3 à 4 minutes, sont mises à imbiber dans l'eau distillée stérile en boîtes de pétri. Les graines sont ensuite placées à germer à l'obscurité à une température de 26°C dans un incubateur. Après germination, les plantules sont transplantées dans des pots en plastique d'une capacité de 3 kg, à raison de 50 à 60 plantes par pot, et mises en culture en serre à une température comprise entre 25 et 30°C.
- Des fragments de sauge et de pélargonium d'environ 14 cm de longueur et comprenant 3 entrenœuds sont bouturés dans des pots en plastiques et placés en serre.
- Différents traitements sont appliqués au début de la phase de croissance des plantules de basilic et des bourgeons latéraux des boutures de sauge et de pélargonium. Ces traitements sont appliqués à partir du stade 3 feuilles.

1-Application des traitements hormonaux

Au cours de la croissance, les plantes sont traitées par pulvérisation des phytohormones (AG, AIA, BAP et ABA) à une concentration de 70 ppm. Une première pulvérisation est appliquée au stade 3 feuilles sur les plantules de basilic et sur les boutures de sauge et de pélargonium. Deux autres pulvérisations sont appliquées avec un intervalle de 20 jours.

2-Inoculation des plantes par les champignons mycorhiziens

- Nous avons utilisé comme inoculum, *Glomus intraradices* (qui nous a été gracieusement offert par une société canadienne sous forme d'une poudre qui contient des spores). L'inoculation des plantes est réalisée en mélangeant l'inoculum au sol à la base de la graine pour le basilic ou en contact direct avec les jeunes racines au moment de la transplantation pour la sauge et le pélargonium.

- Les plantes témoins ne sont pas inoculées. Nous avons utilisé un sol ayant subi trois cycles de stérilisation (séparés de 24h), sous une pression de 1 bar et une température de 121°C pendant 30 min.

Les plantes témoins, cultivées sur sols stérilisés, sont arrosées avec un extrait du filtrat de l'inoculum mycorhizien pour assurer une microflore bactérienne comparable à celle des plantes inoculées. Ce filtrat est préparé en mélangeant un volume de sol inoculé à deux volumes d'eau. Après agitation pendant 30 min, le mélange est filtré sur papier filtre. Chaque plante témoin reçoit 50 ml de ce filtrat.

- Technique d'estimation des paramètres de mycorhization, de vitalité et de fonctionnalité de la symbiose

Nous avons utilisé la technique décrite par Trouvelot et *al.* (1986), qui permet de juger l'état de la mycorhization et reflète les potentialités du système symbiotique. Les racines colorées sont découpées en fragments d'environ un centimètre de longueur. Trente fragments pris au hasard sont montés et écrasés entre lame et lamelle dans du lactoglycérol, à raison de 15 fragments par lame. L'estimation de l'infection endomycorhizienne est faite par observation au microscope photonique. Plusieurs paramètres sont ainsi évalués :

- (F%) : La fréquence de mycorhization reflète l'importance et le pourcentage de fragments de racines infectées
- (M%) : L'intensité de colonisation du cortex exprime la portion du cortex colonisé par rapport à l'ensemble du système racinaire
- (A%) : La fréquence des arbuscules dans le système racinaire.

- Fréquence de la mycorhization:

$$\%F = (\text{Nombre de fragments mycorhizés} / N) \times 100$$

Avec : N = Nombre total de fragments racinaires observés.

- Intensité globale de mycorhization :

$$\%M = (95 n_5 + 70 n_4 + 30 n_3 + 10 n_2 + n_1) / N$$

Avec : $n_5, n_4 \dots n_1$ = nombre de fragments notés respectivement 5, 4, ..1.

- Intensité de mycorhization des fragments mycorhizés :

$$\%m = M \times (\text{nombre total}) / (\text{nombre de fragments mycorhizés}) = M \times 100 / F$$

Intensité arbusculaire de la partie mycorhizée :

$$\% a = (100 m_{A3} + 50 m_{A2} + 10 m_{A1}) / 100$$

Où m_{A3} , m_{A2} , m_{A1} sont les % de m respectivement affectés des notes A3, A2, A1. Avec :

$$m_{A3} = ((95n_{5A3} + 70n_{4A3} + 30n_{3A3} + 5n_{2A3} + n_{1A3}) / \text{nombre mycorhizé}) \times 100 / m.$$

De même pour A2 et A1

Intensité arbusculaire du système racinaire :

$$\%A = a \times (M/100)$$

3- Installation du stress hydrique

Les plantes de basilic, (M) ou (NM), sont arrosées quotidiennement. Après le 50^e jour, les plantes sont soumises à différents régimes hydriques :

- a. Régime hydrique témoin non stressé (NS): les plantes ne sont pas privées d'eau tout au long de leur croissance.
- b. Application de stress hydrique (S): les plantes sont privées d'eau pendant deux semaines

Pour réaliser les différents dosages, les plantes sont récoltées à la fin de la période de stress, et les parties aériennes et racinaires sont rincées à l'eau du robinet, séchées puis pesées.

4-Application des traitements métalliques

Préparation des solutions

Deux éléments métalliques ont été choisis pour évaluer leur effet sur certains paramètres morphologique et biochimique ainsi sur la qualité des huiles essentielles, le cuivre sous forme de sulfate de cuivre (CuSO_4) et le zinc sous forme de sulfate de zinc (ZnSO_4). Pour chaque métal, nous avons préparé des solutions de 100 mg/l.

Chaque pot est alors arrosé par le même volume d'eau distillée (100 ml d'eau pour chaque pot). Les solutions métalliques sont appliquées une fois par semaine au cours de la croissance des plantes.

- | | | | |
|---|---|---|---|
| ➤ | Témoins | → | eau distillée |
| ➤ | Plantes traitées par le Cuivre | → | 100 ml de CuSO ₄ (100 mg/l) |
| ➤ | Plantes traitées par le Zinc | → | 100 ml de ZnSO ₄ (100 mg/l) |
| ➤ | Plantes traitées par un mélange (Cu+Zn) | → | 50 ml de CuSO ₄ (100 mg/l) + 50 ml de ZnSO ₄ (100 mg/l) |

Pour réaliser les différents dosages, les plantes sont récoltées et les parties aériennes et racinaires sont rincées à l'eau du robinet, séchées puis pesées.

II. Observations microscopiques

1. Microscopie optique

Microscope trinoculaire optika B 350 relié à une caméra AIPTEK Z600 (résolution 1080 Megapixels). Equipé, avec deux types différents de système optique : anti champignon standards 160 mm et système corrigé à l'infini (IOS). Dans les deux cas, le diamètre du champ du système est de 20 mm, macro et micrométrique focalisation (graduée 0.002mm) avec une commande coaxiale.

2. Microscopie Electronique à Balayage Environnemental

Les observations sont réalisées au Centre Universitaire Régional d'Interface de Fès. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage Environnemental de type Quanta 200 (FEI company). Ce microscope est équipé d'un canon à électrons à filament de tungstène. Les analyses effectuées sont menées sous une pression partielle de vapeur d'eau.

Un microscope Electronique à Balayage Environnemental est constitué de :

- Une colonne maintenue sous un vide secondaire ;
- Une source d'électrons appelée canon et d'un dispositif de haute tension, accélérateur des électrons (Roussel-Dherbey 2006; Vu Thien 2004; Golsatein et al 1992);
- Un ensemble de lentilles électromagnétiques appelées condenseurs destinés à former un pinceau fin et intense ;
- Une lentille électromagnétique finale appelée «objectif» qui permet de focaliser le faisceau sur la surface à examiner ;

- Un diaphragme objectif ;
- Un dispositif de déflexion pilote par un générateur de balayage ;
- Un platine porte-objet mobile ;
- Des détecteurs permettant de capter les différents signaux émis par l'échantillon (Grillon 2006; Vicario 1978) ;
- Un système de visualisation d'image couplé de manière synchrone au même générateur de balayage ;
- Un circuit de pompage différentiel pour l'obtention d'un gradient de pression dans la colonne (de 106 à 20 Torr, de la chambre d'émission à la chambre d'analyse) ;
- des détecteurs permettant de capter les différents signaux émis par l'échantillon ;
- un écran vidéo pour l'observation des images ;
- une électronique pour gérer l'ensemble des fonctions

III. Les dosages biochimiques

1. Teneur relative en eau (TRE)

La teneur relative en eau (TRE) est mesurée sur la 7^e ou la 8^e feuille complètement développée en utilisant la formule suivante (Turner, 1986):

$$\text{TRE \%} = 100 \times [(\text{MF}-\text{MS})/(\text{MT}-\text{MS})]$$

MF : poids de matière fraîche de la feuille

MT : poids de matière fraîche de la feuille turgescente qui a été submergée dans l'eau distillée pendant 4 heures

MS : poids de matière sèche de la feuille mise à l'étuve à 70°C pendant 24 heures

2. Dosage de la chlorophylle

Des fragments de feuilles (1 g) sont broyés au mortier préalablement placé dans la glace avec une pincée de carbonate de magnésium et 5g de sulfate de sodium anhydre dans 10 ml d'acétone à 80%. Après filtration du broyat, le résidu est récupéré dans des tubes à essai. D'autres extractions sont réalisées avec de l'acétone jusqu'à obtention d'un filtrat incolore

(dépourvu de toutes traces des pigments chlorophylliens). Les différents filtrats sont rassemblés et le volume final est noté (Inskeep et Bloom, 1985).

Les DO à 645 nm et à 663 nm (respectivement max d'absorbance de la chlorophylle a et de la chlorophylle b) sont mesurées au spectrophotomètre

Les concentrations de la chlorophylle sont déterminées selon les formules d'Arnon et Mc Kinney (1941) :

Chlorophylle a = $(0,0127 D.O_{663}) - (0,00269 D.O_{645})$

Chlorophylle b = $(0,0229 D.O_{645}) - (0,00468 D.O_{663})$

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

3. Extraction et dosage des composés phénoliques

3.1 Extraction des composés phénoliques totaux

- Des fragments des parties aériennes et racinaires (0,5g) sont broyés à l'ultra-turax dans 5ml d'une solution hydro-alcoolique à 50 % d'éthanol absolu
- Les extraits sont récupérés dans des tubes munis des couvercles et bien numérotés. L'extraction est réalisée pendant une nuit dans le réfrigérateur à 4°C
- La chlorophylle des feuilles est éliminée en ajoutant 0,5 ml de chloroforme dans 3ml d'extrait, les tubes sont vortexés et centrifugés pendant 5 min à 5000 rpm
- Les dosages sont réalisés sur le surnageant débarrassé de la chlorophylle

3.2. Principe de dosage

Ce dosage repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-ciocalteau. 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'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

Dans des tubes à essai, on réalise le mélange suivant :

- 0,5 ml d'extrait
- 3 ml d'eau
- 0,5 ml de Na_2CO_3 20 %
- Après 3 min, on ajoute 0,5 ml de réactif de Folin-ciocalteau.

Le mélange est alors placé dans l'étuve à 40°C pendant 30 min. Ensuite l'absorbance est déterminée à 760nm.

La concentration des composés phénoliques d'un échantillon est déterminée à partir d'une courbe étalon réalisée à l'aide de solutions de concentrations connues d'acide gallique après dosage dans les mêmes conditions

$$Y \text{ (mg/l)} = 0.003X$$

4. Dosage des tanins condensés (TC)

Il est basé sur la propriété qu'ont les tanins de se transformer en anthocyanes par chauffage en milieu acide (Ribereau-Gayon *et al.*, 1966). Dans deux tubes à essais on verse 4 ml de la solution (éventuellement diluée au 1/50^{ème}), 2 ml H₂O et 6 ml HCl 12 N. On porte au bain marie à 100°C l'un des deux tubes pendant 30 min. Après refroidissement rapide, on ajoute 1 ml d'éthanol 95% vol pour stabiliser la réaction. La concentration en tanins de l'extrait (g/l) est donnée par la différence entre la densité optique à 550 nm sous 1 cm de parcours optique des solutions avant (DO1) et après (DO2) chauffage.

$$T \text{ (g/l)} = (DO1 - DO2) \times 19,33$$

5. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la méthode de Bates (1973). Les échantillons sont broyés dans 2 ml de méthanol 40%. Après centrifugation à 1200 trs/min pendant 15min, 1ml de surnageant est introduit dans un mélange d'acide acétique glaciale et d'acide orthophosphorique (6M) (3/2 : V/V) et 25 mg de ninhydrine. Après une heure d'incubation à 100°C, les tubes sont refroidis (la couleur vire au rouge). Par la suite, 3 ml de toluène sont ajoutés et le tout subit une homogénéisation de quelques minutes. Deux phases se séparent, la phase supérieure contenant de la proline.

L'absorbance est déterminée par spectrophotométrie à 528 nm. La concentration en proline d'un échantillon est déduite à partir d'une courbe étalon réalisée à l'aide de solutions de concentrations connues en proline.

$$Y(\mu\text{g/l})=11.41X+0.056$$

6. Extraction et analyse des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. La distillation dure trois heures après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur. L'huile essentielle est séchée avec du sulfate de sodium anhydre puis stockée à 4 °C à l'obscurité.

La teneur en huile essentielle est exprimée en ml du distillat dans 100 g de matière sèche, selon la relation suivante :

$$\text{THE (ml/100 g MS)} = (V / \text{Ms} \times 100) \pm (\Delta V / \text{Ms} \times 100)$$

Les huiles essentielles sont analysés par un chromatographe à phase gazeuse (Trace GC ULTRA) couplé à un spectromètre de masse (Polaris Q MS à trappe ionique) couplé à une base de données NIST/EPA/NIH MASS SPECTRAL LIBRARY Version 2.0 a, buildjul 1 2002.

7. Minéralisation et quantification des teneurs en métaux

7.1. Minéralisation du sol : digestion acide

1,5 ml d'acide nitrique et 4,5 ml d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutés à 0,5g de sol. Le mélange subit une préminéralisation pendant une nuit, puis chauffé à 120°C pendant 5h dans un bain de sable. Après refroidissement, les solutions sont filtrées sur un filtre de type wathman, le volume est ajusté à 20 ml avec de l'eau distillée.

7.2. Minéralisation des Feuilles et des racines

Après séchage des parties aériennes ou racinaires à l'étuve (100°C pendant 48h), 100 mg de matière sèche sont calcinés à 450°C pendant 12h dans un four à moufle. Les cendres obtenues sont dissoutes dans 3 ml d'acide nitrique (0,1N) puis filtrées à travers un papier Wathman et le volume est amené à 20 ml.

→ Le dosage des métaux a été effectué par Spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP)

IV. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme d'une moyenne d'au moins 3 répétitions pour les dosages biochimiques et 30 répétitions pour les différents paramètres de la mycorhizations, $\pm$ l'erreur standard ou l'écart type de cette moyenne. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'analyse de la variance des moyennes avec les tests ANOVA one-way et ANOVA two-ways,

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

pour évaluer la signification de l'effet au seuil $P < 0,05$ par rapport à la plus petite différence significative avec les tests Tukey (post hoc).

Toutes les analyses statistiques ainsi que l'évaluation des corrélations entre les paramètres étudiés et des tendances de leurs évolutions ont été effectuées avec le logiciel de statistique IBM.SPSS Version 19.

Chapitre 3

**Étude des variations histologiques des glandes
sécrétrices de trois plantes aromatiques et
médicinales, *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et
Pélargonium sp**

Étude des variations histologiques des glandes sécrétrices de trois plantes aromatiques et médicinales, *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pélargonium sp*

I. Introduction

L'accumulation de terpénoïdes dans les plantes est généralement limitée à des structures sécrétrices spécialisées dont il existe plusieurs types différents à savoir des trichomes glandulaires qui sont des glandes épidermiques multicellulaires, trouvées chez certaines familles comme les Lamiaceae, Asteraceae et Solanacées, et qui sécrètent des terpènes dans une cavité extracellulaire située à l'apex du trichome. Le Stockage de terpénoïdes dans ces structures peut également servir à limiter le risque de toxicité de la plante elle-même, car il est prouvé que de nombreux terpénoïdes sont potentiellement toxiques pour les tissus de la plante, lorsque les monoterpènes sont libérés aux cellules avoisinantes (Loveys et al, 1992). Des blessures ont également été trouvées lorsque certains sesquiterpènes sont déposés artificiellement sur des feuilles lors des essais de leur capacité à dissuader les herbivores (Polonsky et al, 1989). Par conséquent, la séquestration de terpénoïdes dans des compartiments spécifiques par des processus métaboliques sensibles peut être essentielle pour éviter des effets nocifs. La morphologie de ces structures varie selon les conditions d'irrigation et aussi selon la toxicité de contenu intracuticulaire.

Des études anciennes ont pu observer ces structures ainsi que ses différents constituants figure 1. Le trichome glandulaire est composé de plusieurs cellules assurant des fonctions différentes: les terpènes synthétisés par les cellules sécrétrices passent dans un espace subcuticulaire situé à l'apex du trichome pour s'y accumuler et les cellules basales assurent l'attachement de la structure à l'épiderme. Ces glandes varient de point de vue morphologique, biochimique et mode de sécrétion.

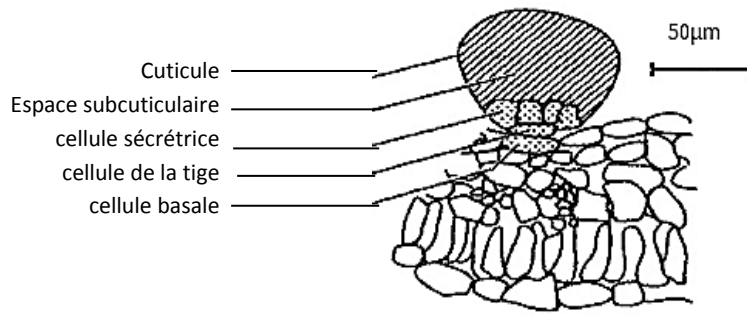


Figure 6 : Structure d'un trichome glandulaire (selon Gershenzon and Maffei.1994)

Les glandes sécrétrices des plantes aromatiques se présentent sous différentes formes et tailles, dans l'objectif d'assurer une fonction bien déterminée. Cette fonction consiste principalement en la protection des différents organes de la plante ainsi que l'attraction des pollinisateurs. Ces glandes se subdivisent en glandes pelletées et glandes capitées. Werker (1993) a classé les glandes en glandes à court terme et des glandes à long terme ; les glandes à court terme sont des glandes dont la sécrétion est rapide afin de protéger les jeunes organes. Les glandes à long terme sont des glandes dans lesquelles la substance de sécrétion s'accumule progressivement dans l'espace subcuticulaire et jouent un rôle dans la protection des organes matures comme la fleur, ainsi que dans la pollinisation. D'après cette définition, il a déduit que les glandes capitées sont des glandes à court terme alors que les glandes peltées sont des glandes à long terme. La différence entre ces 2 types de glandes consiste en plusieurs aspects à savoir, la structure, mode de sécrétion et le moment de sécrétion.

Les capitées, sont généralement constituées par une tête uni ou bicellulaire et rarement plus que deux cellules chez certaines espèces avec un contenu lipophile. Ce contenu est prêt à être libéré juste après sa production par l'intermédiaire d'une cuticule poreuse.

II. Étude histologique des structures Glandulaires de *Salvia officinalis*, *Pélargonium* *sp* et *Ocimum gratissimum*

1. Étude histologique des structures Glandulaires de *Salvia officinalis*

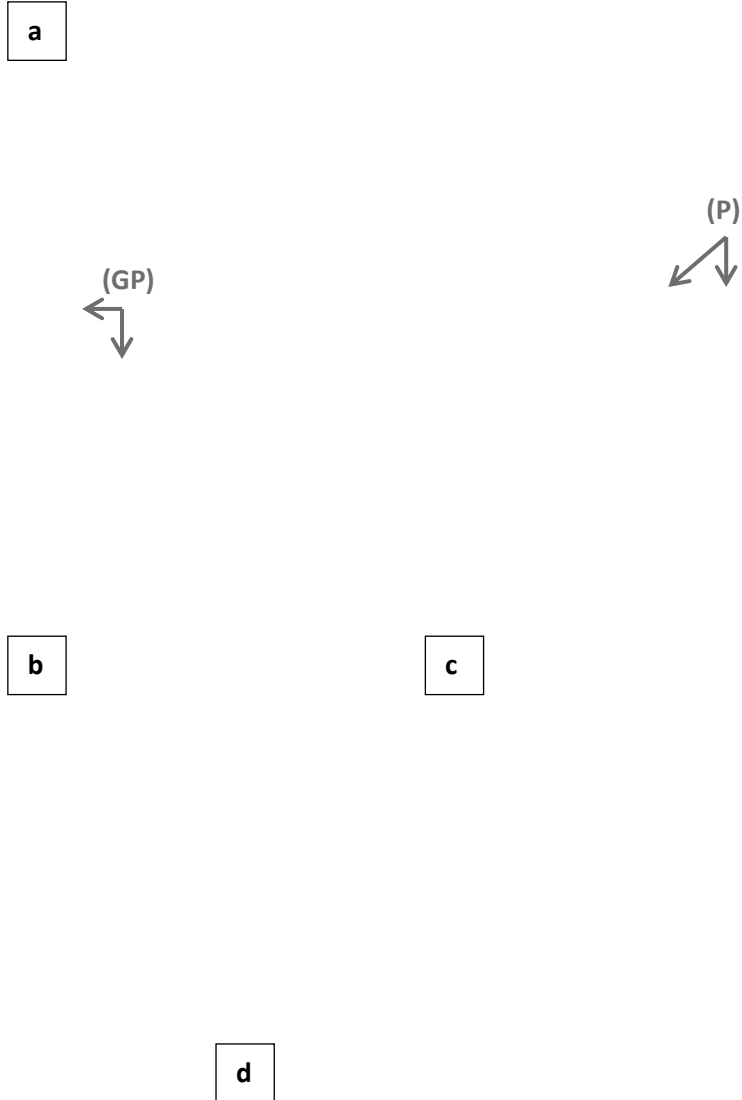


Figure 7 : Observations en microscopie électronique à balayage de la région centrale de la face dorsale d'une feuille de *Salvia officinalis* (a), montrant la présence de deux types de glandes : glandes peltées (b et c) et glandes capitées (d) avec GP : des glandes peltées et P : des poils de protection

Les observations microscopiques réalisées sur les plantes de *Salvia* (fig.7) montrent l'existence de deux types de structures (glandes de sécrétions et des poils de protections) qui jouent des rôles divers au cours de la croissance des plantes.

Des structures glandulaires constituées par une cellule de base, une tige courte unicellulaire et une tête de sécrétion généralement composée de 12 cellules (parfois 16) disposées sous forme d'un bouclier de quatre cellules centrales entourées par huit cellules périphériques. (fig 7b) et (fig.8b). Par ailleurs la figure 7c montre une glande sessile avec des multiples cellules de la tête. Ces structures sont appelées glandes peltées.

La 2e catégorie de glandes ou glandes capitées, possèdent une morphologie variable puisqu'on distingue 2 types de glandes : glandes constituées d'une tige courte à une ou deux cellules (fig.8a) (fig.9a, 9b et 9c) et une tête qui peut être unicellulaire ou bicellulaire. Chez ce type de glandes, la cuticule est mince avec la présence ou l'absence d'une petite chambre subcuticulaire. Le 2^e type est constitué par des glandes observées dans des feuilles âgées en fin de floraison (fig.10), et possédant une cuticule mince avec la présence d'une grande chambre subcuticulaire liée directement à l'épiderme. Cette structure se caractérise par la présence d'une poche d'accumulation qui sert à stocker le matériel de sécrétion laissant suggérer la présence de cellules de sécrétion en dessous de cette poche et dont les produits de synthèse arriveraient à la poche d'accumulation à travers une structure (canal ou pore) située sous cette poche. L'absence de cette structure chez les jeunes feuilles et leur apparition dans les feuilles âgées laisse supposer que ces structures possèdent une fonction précise liée à l'âge de la feuille et seraient donc spécialisées dans l'accumulation d'une substance différente.

Les glandes capitées se caractérisent généralement par une tête à une seule cellule (fig.9a et 9b). Or, les observations en microscopie photonique des feuilles de la sauge étudiée montrent la présence de glandes capitées qui peuvent présenter une tête à deux cellules (fig.9c).

Selon la classification proposée par Werker (1993), les glandes capitées sont des glandes à court terme, spécialisées dans la synthèse des substances non terpéniques fréquemment rencontrées chez les jeunes feuilles pour assurer une fonction de protections contre les prédateurs. Les glandes peltées sont appelées glandes à long terme sont présentes dans les feuilles tout au long des phases de croissance et dont le nombre augmente à la floraison et sont spécialisées dans la synthèse des substances terpéniques.

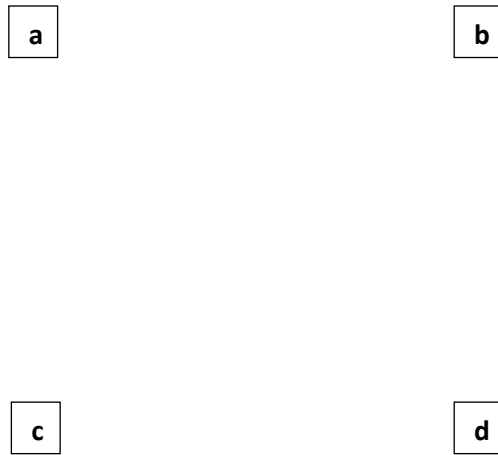


Figure 8: Observations en microscopie photonique des différentes glandes chez *Salvia officinalis*. (a) glande capitée, (b) glande peltée détachée, (c) glande peltée en phase de sécrétion, (d) glande peltée en post-sécrétion

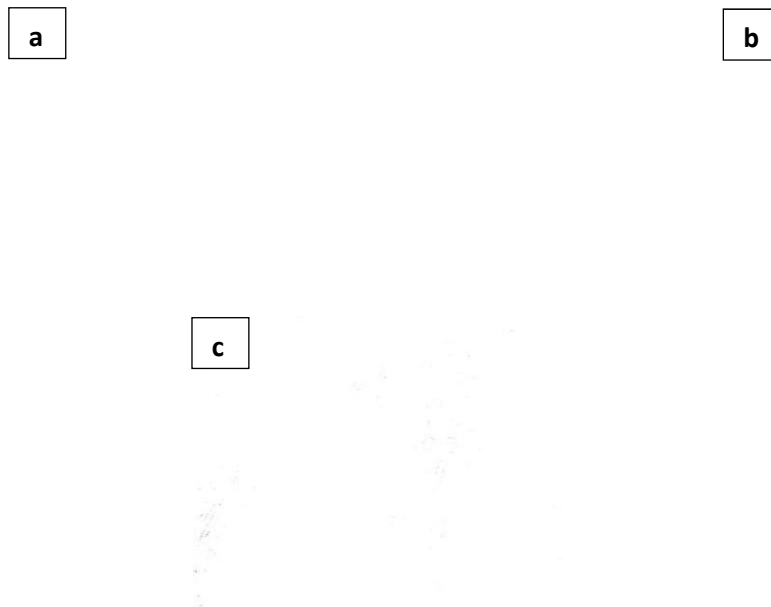


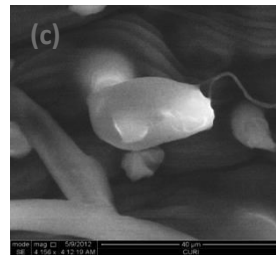
Figure 9 : Observations en microscopies photoniques et électronique à balayage de glandes capitées chez *Salvia officinalis*.

Les observations par le MP ainsi que MEB des glandes peltées (fig.8c et 8d) ne révèlent pas la présence de pores à travers desquels la matière sécrétoire peut exsuder, Ce qui fait la

matière n'a pas été libéré jusqu'à ce que la cuticule cassée, que ce soit en raison d'évènements mécaniques ou à la fin de la durée de vie de la glande.

(a)

(b)



(d)

(e)

GX400

GX400

Figure 10 : Observations en microscopies photoniques et électronique à balayage de glandes capitées chez *Salvia officinalis*.

2. Étude histologique des structures glandulaires de *Pélargonium sp*

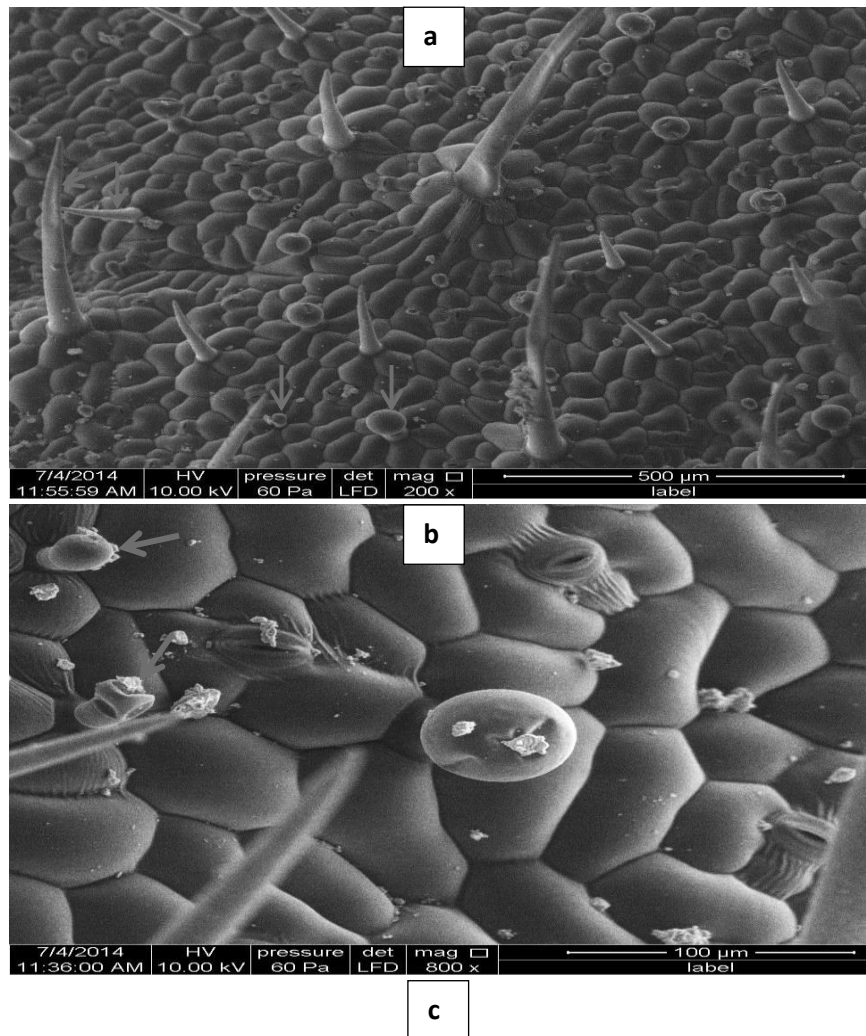


Figure 11 : Observations en microscope électronique à balayage de la partie ventro-centrale d'une feuille de *Pélargonium sp*, montrant la présence de deux types de glandes de sécrétions, peltée (c) et capitée

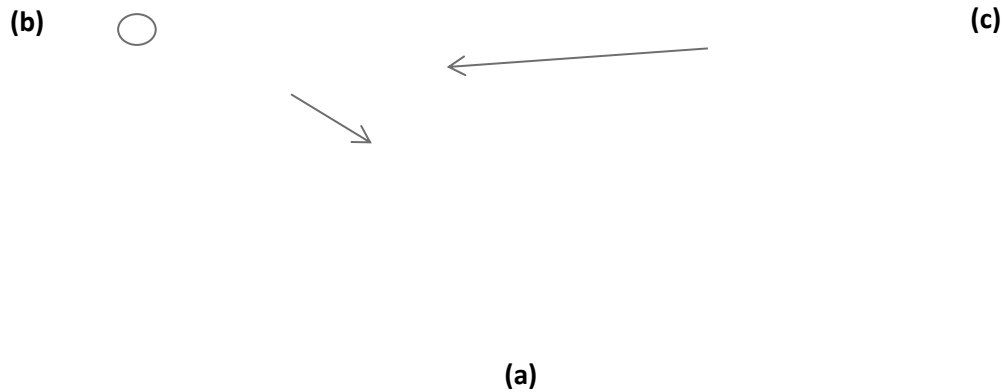


Figure 12: Observations réalisées en microscopie photonique sur une feuille de *Pélargonium sp* montrant les deux types de glandes capitées

Comme dans le cas de la sauge, les observations en microscopie optique réalisées sur les feuilles de *Pélargonium sp.* montrent que cette plante se caractérise par la présence de deux types de glandes de sécrétions : les glandes peltées ou glandes à long terme et les glandes capitées ou glandes à court terme. Ainsi que des poils de protection ou bien (des glandes non sécrétrices).

Les glandes capitées (glandes à court terme) se subdivisent en deux catégories selon leurs formes ; glandes capitées avec une tige constituée par 4 cellules (fig.12b) et des glandes capitées avec une tête et une tige unicellulaire (fig.12c). Au niveau de ces glandes, le matériel de sécrétion synthétisé est prêt à être libéré juste après sa production par l'intermédiaire d'une cuticule poreuse (fig.12b).

Par ailleurs, nous n'avons pu rencontrer qu'un seul type de glandes peltées (à long terme), avec une tige pluricellulaire et une grosse tête dans laquelle on trouve les cellules de synthèse ainsi qu'une chambre de stockage des huiles essentielles. L'aspect de ces glandes varie avec leur état de maturité. La figure (13a) montre une glande qui possède un aspect vide de tout contenu et confirmant l'état juvénile de la glande. Ces glandes se remplissent petit à petit par l'HE au fur et à mesure de leur maturation (fig.13b et 13c), et leur cuticule finit par se rompre pour libérer leur contenu à la fin de leur maturation (fig.13c).

Ces glandes peltées ont une cuticule épaisse et rigide, mais le long des stades de maturité de ces glandes l'épaisseur de cette cuticule diminue pour faciliter l'éclatement et la libération de contenu vers la fin de la maturité de la glande ou bien par contact avec certains insectes.

(a)

(b)

(c)

HE ↘

↙ C

(d)

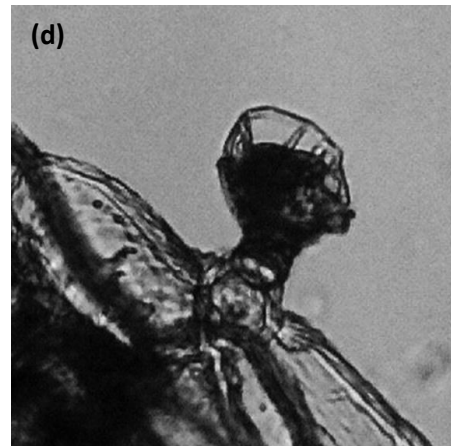


Figure 13 : Observations en microscopie photonique de glandes peltées sécrétrices d'huiles essentielles à différents stades de maturité chez *Pélargonium sp.* a) début de maturation, b et c) remplissage par l'HE, d) éclatement de la glande. C : cuticule ; HE : huile essentielle. Gx 400

3. Étude histologique des structures glandulaires d'*Ocimum gratissimum*

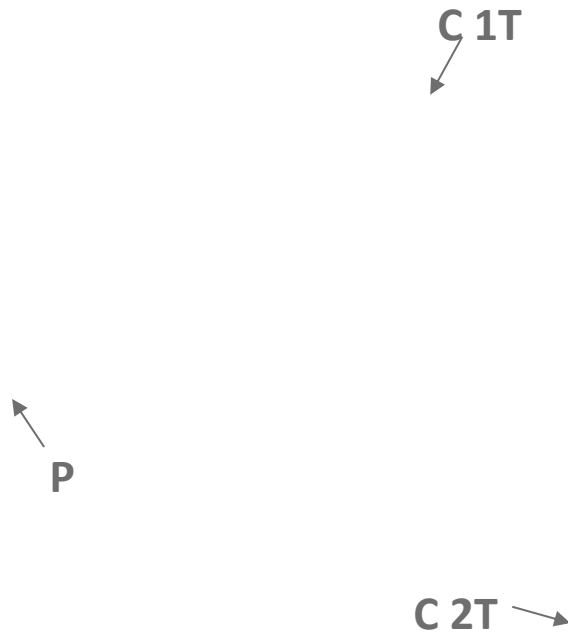


Figure 14 : Observation en microscopie électronique à balayage environnemental de la surface d'une feuille de basilic montrant l'existence de glandes peltées (P), et de glandes capitées (à une tête unie CT, et à une tête bilobée C2T)

Les observations en microscopie électronique à balayage environnemental de feuilles de basilic montrent la présence de deux types de glandes (fig.14), glandes peltées et glandes capitées. Les glandes peltées possèdent une forme arrondie et ayant un diamètre assez élevé qui peut dépasser 70 µm. Les glandes capitées sont de petite taille ne dépassant pas 40 µm et se présentent sous deux formes, de glandes capitées à une tête unie CT, et à 2 têtes bilobées C2T).

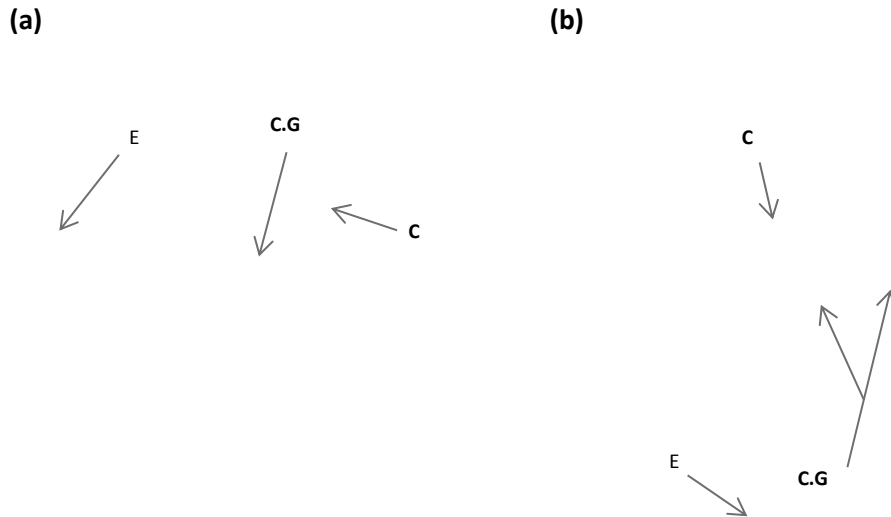


Figure 15 : Observations en microscopie photonique des glandes capitées à une seule tête avec une seule cellule (a) et avec deux cellules (b), C : cuticule ; E : épiderme ; CG : cellule glandulaire (GX400)



Figure 16: Observations d'une glande capitée à deux têtes en microscopie photonique(a) et en microscopie électronique à balayage (b) chez les plantes de basilic

Les observations réalisées par le microscope photonique des glandes capitées confirment celles réalisées en microscopie électronique à balayage c.-à-d. présence des glandes capitées à une seule tête (fig.15a) et de glandes capitées à deux têtes (fig.16b). Par ailleurs, les glandes capitées à 1seule tête peuvent être unicellulaires (fig.15a) ou bicellulaires (fig.15b)

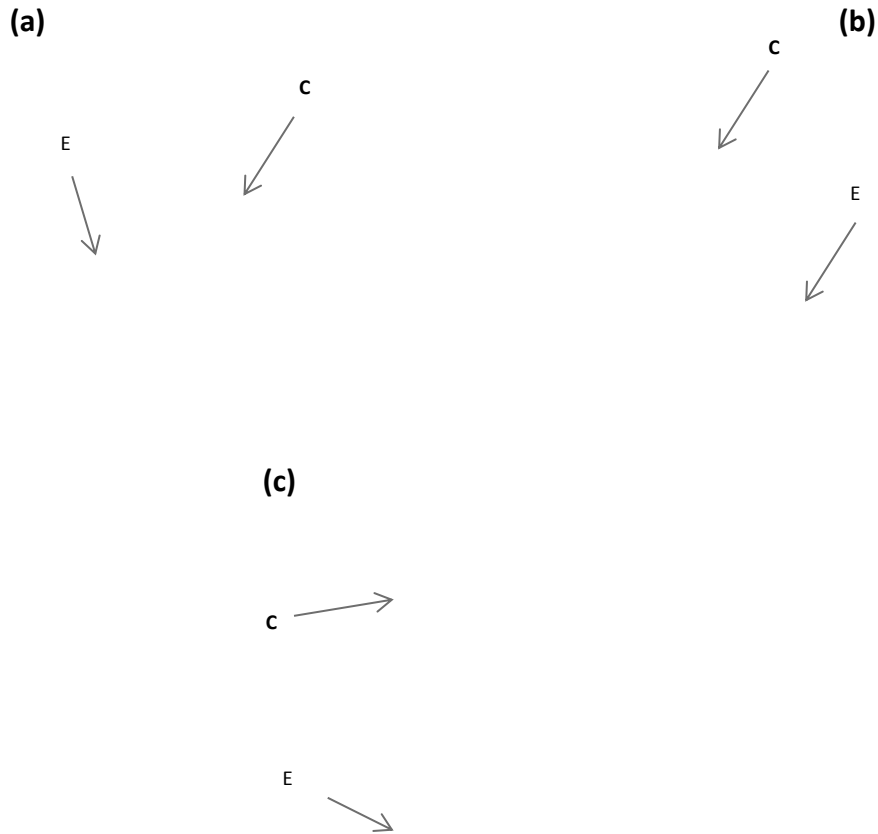


Figure 17 : Observations en microscopie photonique d'une coupe transversale de la partie centrale d'une feuille de basilic (*O. gratissimum*) montrant 2 types des glandes à peltées : glandes avec 4 cellules sécrétrices (a) et glandes avec 8 cellules sécrétrices (b et c)

Chez les plantes de basilic, les glandes peltées montrent une variabilité au niveau du nombre des cellules de sécrétion. On constate la présence de glandes de grande taille et possédant 4 cellules (fig.17a). En outre, nous avons pu mettre en évidence la présence de glandes qui possèdent 8 cellules de sécrétions (fig.17b et 17c). Une cuticule épaisse couvre les deux types de glandes. Avec le remplissage de la structure en huiles essentielles, cette cuticule devient de plus en plus mince pour faciliter la libération du contenu.

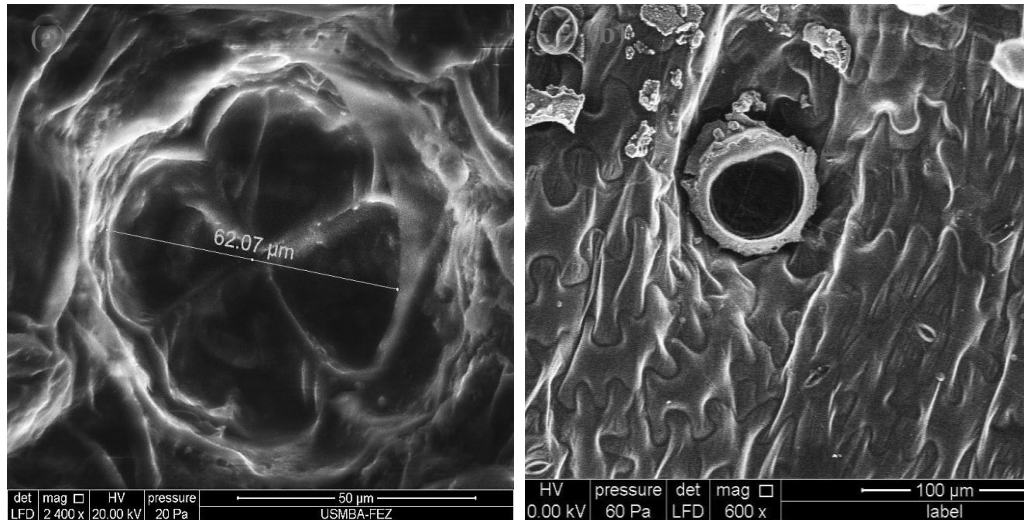


Figure 18 : Observation en microscopie électronique à balayage environnemental d'une glande peltée de basilic après éclatement naturel (a), et mécanique (b)

La figure 18 montre des glandes peltées de basilic après éclatement et libération de leurs contenus terpéniques, d'après cette figure on remarque l'existence de l'emplacement des 4 cellules de sécrétions (figure 18a) avec un diamètre interne (sans la cuticule qui englobe la glande) qui touche 62µm. Par ailleurs la figure 18b montre une glande non mature, mais éclatée sous pression (exercée par MEB), et qui montre une cuticule épaisse ce qui confirme l'état de non-maturité qu'on a déjà signalé.

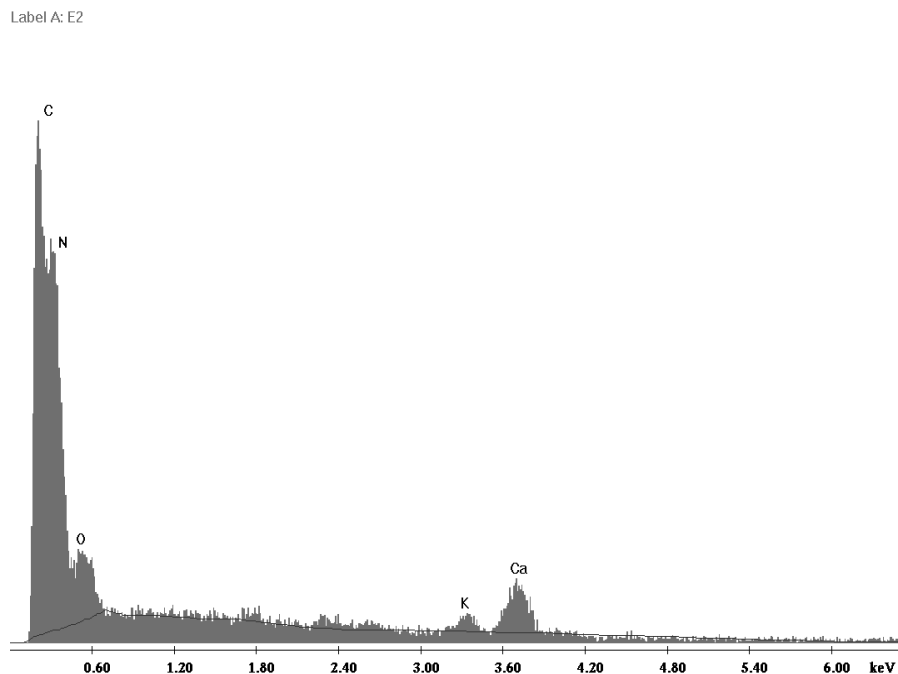


Figure 19 : Microanalyse de la composition des glandes de basilic (*Ocimum gratissimum*) après un éclatement de ces dernières

La composition des glandes de basilic après éclatement de ces dernières montre la présence des grandes teneurs en azote, oxygène et calcium, avec la présence d'autres atomes ayant des teneurs plus faibles comme le Potassium (figure 19). Cette composition hétérogène confirme qu'à ce niveau-là la synthèse des huiles essentielles se réalise, et ces atomes sont utilisés comme produit de départ de ces réactions biosynthétiques.

III. Discussion

Les observations microscopiques réalisées dans ce travail montrent la présence de deux groupes majeurs de glandes de sécrétion chez les trois plantes (sauge, pélargonium et basilic). Le 1^{er} groupe concerne des glandes peltées ou bien glande à long terme, et le 2^e groupe sont des glandes capitées ou bien glandes à court terme. Au sein d'un même groupe, on peut assister à une variation morphologique d'une plante à une autre, en fonction du contenu, du rôle et du stade phénologique de la plante, ce qui rend la classification un peu difficile. Mais pour assurer une classification crédible, les différents auteurs se basent principalement sur le critère morphologique, le contenu ainsi que sur le mode de sécrétion (Werker 1993 et Werker *et al.*, 2000).

Dans cette optique, les scientifiques ont donné une définition à ces deux appellations, puisqu'ils ont décrit une glande à court terme toute glande dont la sécrétion est rapide afin de protéger les jeunes organes, et une glande à long terme toute glande dans laquelle la substance de sécrétion s'accumule progressivement dans l'espace subcuticulaire et sert à la protection des organes matures dans la fleur, ainsi qu'à la pollinisation. La différence entre les 2 types consiste en plusieurs aspects à savoir, la structure, le mode de sécrétion et le moment de sécrétion.

Les observations microscopiques réalisées sur nos plantes vont dans le sens de cette classification et montrent les deux groupes de glandes, peltées et capitées. Par ailleurs, deux types majeurs des glandes peltées ont pu être déterminés dans cette étude, glandes peltées avec tige constituée par une seule cellule et glande peltées collée directement à l'épiderme. Dans ce dernier groupe, on distingue une différence majeure au niveau du nombre des cellules de chaque glande, puisqu'on dénombre 4 et 8 cellules chez *O. gratissimum* et jusqu'à 12 chez *Salvia*. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Tissier (2012), Werker *et al.*, (2000), et Gang *et al.*, (2001). Selon ces auteurs, les glandes peltées peuvent avoir un nombre important de cellules qui peut atteindre 16 cellules.

Ces glandes peltées se caractérisent généralement par un grand espace subcuticulaire et une cuticule rigide qui s'amincit au cours de la maturation de la glande ce qui facilite l'éclatement à maturité ou après un contact mécanique avec des prédateurs.

Les glandes capitées quant à elles se subdivisent en plusieurs catégories d'après leurs formes :

- Glandes capitées possédant une cellule basale, une tige unie ou multicellulaire (1 à 3 cellules) et une tête
- Glandes capitées possédant une cellule de tige et tête unie ou bicellulaire
- Glandes capitées possédant une cellule basale et une tête avec une ou 2 cellules
- Glandes capitées sous forme d'une poche collée directement à l'épiderme.

Ces glandes capitées se caractérisent par une cuticule mince le matériel de sécrétion synthétisé est prêt à être libéré juste après sa production par l'intermédiaire d'une cuticule poreuse, et généralement sont constituées par une tête unie ou bicellulaires avec un contenu lipophile.

Des observations similaires ont été rencontrées chez *Salvia* par Corsi and Bottega (1999) ; puisque selon ces auteurs, les glandes capitées sont morphologiquement très variables et quatre types peuvent être distingués. Type I avec une tige uni ou bicellulaire court et une tête unie ou bicellulaires. La cuticule est mince et il n'y a pas de chambre subcuticulaire. Le matériel de sécrétion se dégage lentement à travers la cuticule, et peut être libéré soudainement si la cuticule est rompue. Type II très petit, possédant avec une tige unicellulaire et une petite chambre subcuticulaire. Le matériel de sécrétion est probablement sécrété par un pore. Type III, glande de grande taille avec une longue tige composée de plusieurs cellules (environ trois ou plus), une cellule de cou et une tête unicellulaire, qui dégage probablement le matériel de sécrétion recueilli souvent comme une goutte sur la tête. Le type IV est une glande de grande taille avec une longue tige mince, composée de quatre cellules.

Selon ces auteurs, chaque type de glandes est responsable de la synthèse d'une substance distincte. Venkatachalam *et al.*, (1984) ont constaté corrélation entre l'augmentation du nombre des glandes peltées et l'augmentation de la synthèse de camphor et de thujane.

Ces observations sont en accord avec celles de *Pedro et al.*, (1990) qui ont déduit la présence de 3 types de glandes, un type pelté et 2 types capités. Selon ces auteurs, les glandes avec une tige unicellulaire représentent une glande capitée distincte avec un contenu spécifique

différent de celui de la structure peltée. Selon le même travail, ces trois types de glandes assurent la synthèse de 3 types de substances différentes, terpénoides, phénols et flavonoïdes.

Dans d'autres travaux de Kyoung et al. ; 2007. Les glandes peltées et capitées de *Pélargonium* possèdent toutes une seule cellule basale. Ces deux types de glandes diffèrent par le nombre de cellules de la tige et par le diamètre de la tête selon la phase de maturité. Selon ces auteurs, les glandes définies dans notre étude comme étant des glandes capitées à une tête et une tige unicellulaire ne représenteraient qu'une étape de la formation des glandes peltées. Or, des observations réalisées chez les feuilles de *Salvia* montrent des structures identiques à cette structure, c.-à-d. possédant une tête unicellulaire de petite taille, et une tige à une cellule. Cette structure a été classée comme étant une glande capitée.

Ce genre de glandes peltées et capitées sont rencontrées chez plusieurs espèces (*Mentha piperita*, *Origanum dictamnus*, *Monarda fistulosa*, *Pogostemon cablin*...) ont été décrites dans des travaux anciens (Venkatachalam *et al.*, 1984). Chez la menthe, les glandes peltées possèdent 8 cellules de tête et les glandes capitées possèdent une seule cellule de la tige et une cellule de tête. Chez *Origanum dictamnus*, la tête des glandes peltées possède 12 cellules alors que chez *Pogostemon cablin*, elle n'en possède que 4.

Selon Werker (2000), les jeunes feuilles de basilic (*O.basilicum*) qui sont très vulnérables aux prédateurs sont fortement recouvertes par des glandes capitées qui se caractérisent par une sécrétion rapide pour repousser les herbivores. Lorsque les plantes deviennent âgées, le taux des glandes peltées augmente, ces glandes riches en terpénoides serviront pour la défense contre les agents pathogènes en cas de blessures et à l'attraction des pollinisateurs.

Conclusion

Les observations microscopiques réalisées sur les trois plantes (basilic, pélargonium et sauge) montrent la présence de deux types majeurs de glandes de sécrétion. Le 1^{er} type concerne des glandes peltées ou glandes à long terme, et le 2^{ème} type sont des glandes capitées ou glandes à court terme. Au sein d'un même type de glandes, on peut assister à une variation morphologique d'une plante à une autre, en fonction du contenu, du rôle et du stade phénologique de la plante.

Chez le basilic, nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence des glandes à 8 cellules de sécrétions chez les glandes peltées.

Chez salvia, nous avons noté la présence des deux types de glandes, capitées et peltées, ces dernières étant constituées par 12 à 16 cellules disposées sous forme d'un bouclier. On note également la présence, en fin floraison, de poches de sécrétions chez les feuilles âgées. Chez cette plante, nous avons surtout mis en évidence la présence de glandes sessiles et cette observation n'a jamais été confirmée dans la littérature.

Chapitre 4

**Etude des variations de la composition chimique et
biochimique de deux plantes aromatiques et
médicinales, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp* au
cours des stades phénologiques**

Étude des variations de la composition chimique et biochimique de deux plantes aromatiques et médicinales, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp* au cours des stades phénologiques

I. Introduction

Le monde des plantes reflète une synchronisation harmonieuse entre les différents paramètres de l'environnement (climat, altitudes, humidité, longueur du jour, sol ...) et les végétaux. Cette synchronisation se traduit par des variations morphologiques ainsi qu'un grand changement au niveau de métabolisme secondaire des plantes. Ces changements réalisés sous le contrôle des phytohormones endogènes sont appelés brièvement la phénologie.

La phénologie par définition est l'étude de l'apparition d'événements périodiques (annuels le plus souvent) dans le monde vivant, déterminée par les variations saisonnières du climat. En botanique, la phénologie des végétaux comporte plusieurs événements majeurs : la dormance, début de floraison, floraison, la feuillaison, la chute des feuilles De nos jours, les études des plantes aromatiques portent principalement sur les phases majeures, Dormance, croissance, début de floraison, pleine floraison et fin floraison, c'est-à-dire les moments de reprise ou d'arrêt de la photosynthèse ce qui est accompagné par des changements métaboliques. Cependant, certains végétaux ne présentent pas de phénologie très marquée, c'est le cas notamment des plantes sempervirentes ou des plantes présentes dans les zones chaudes et humides. La variation de la température ainsi que d'autres paramètres caractérisent le passage de la plante d'une phase à une autre.

La variation des teneurs en eau au niveau des feuilles des plantes de *Pélargonium* et de *Salvia* est directement liée aux conditions climatiques (précipitations et Températures). Au Maroc. Ces deux facteurs subissent des fluctuations importantes le long des phases de croissances de nos plantes. Entre le mois de janvier et mars. Les précipitations sont importantes et les températures très faibles. Ce qui explique l'augmentation des teneurs en eau dans la plante. Par ailleurs. Les mois de mai et juin se caractérisent par des températures élevées et des précipitations faibles ce qui entraîne une déshydratation des plantes.

Ces premières observations soulèvent déjà une série de questions : comment les différentes espèces réagiront-elles au changement climatique parcouru le long de la phénologie ? Est-ce que toutes les phases de développement des plantes seront affectées de la même manière ? De quelle manière la plante sujet d'étude réagit vis-à-vis ces changements ?

II. Résultats

1.1 Évolution des teneurs en eau et en chlorophylles au cours des stades phénologiques de *Salvia officinalis* et de *Pélargonium sp*

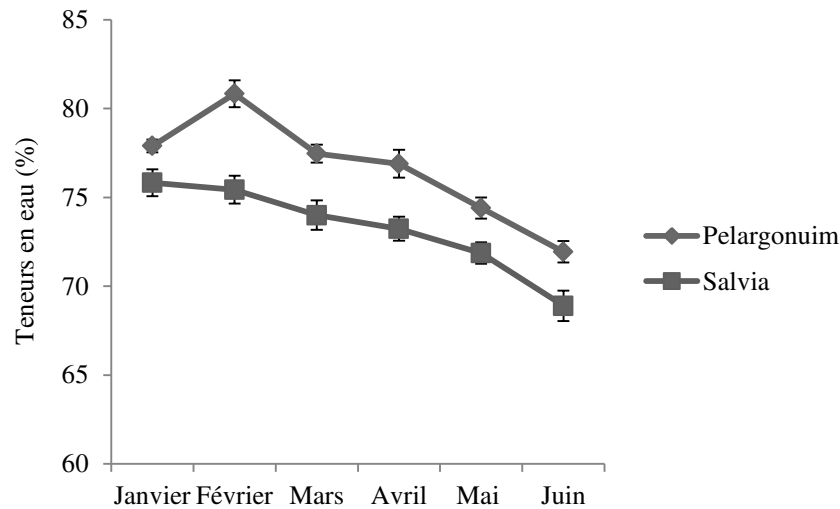


Figure 20 : Évolution des teneurs en eau au cours de la croissance de *Salvia officinalis* et de *pelargonium sp*

Les teneurs en eau chez *Salvia* et *Pélargonium* évoluent d'une manière presque similaire le long des phases végétatives, puisqu'on assiste à une diminution progressive depuis la fin de la phase de croissance jusqu'à la fin de floraison (figure 20), cette variation peut être liée aux conditions climatiques (précipitation et chaleur) ainsi aux facteurs édaphiques (ressource en eau et le taux de rétention d'eau) ce qui influence sur le phénomène d'évapotranspiration.

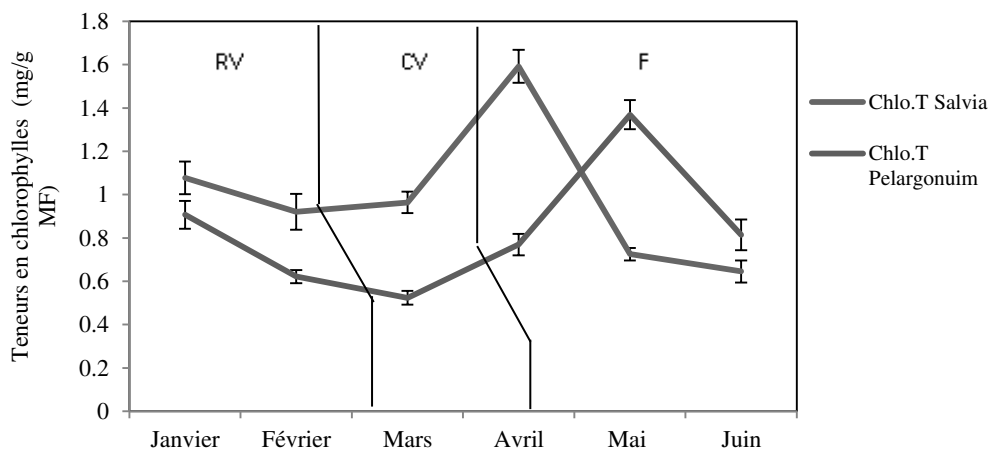


Figure 21 : Évolution des teneurs en chlorophylles au cours de la croissance de *Salvia officinalis* et de *pélargonium sp* (RV : repos végétatif ; CV : croissance végétative ; F : floraison)

La figure 21 montre la variation des teneurs en chlorophylles totales au cours des différentes phases végétatives chez *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*. On remarque que les teneurs en chlorophylles chez les plantes de *Salvia* dépassent celles de *pélargonium*, et sont très influencées par la variation des phases de croissance. Chez *Salvia*, la teneur en chlorophylle totale diminue faiblement pendant la phase de repos végétatif (depuis janvier jusqu'à fin de février), puis augmente progressivement le long de la phase de croissance (Mars jusqu'à mi-avril) avec une valeur maximale (1.6 mg/g MF) enregistrée vers la fin de cette phase et le début de la floraison (mi-avril jusqu'à mi-mai). Ces teneurs chutent de 50% en pleine floraison et de 60% en fin floraison.

Chez *pélargonium*, on remarque des résultats presque similaires à ceux rencontrés chez *Salvia* avec cependant une diminution très importante des teneurs en chlorophylles au cours du repos végétatif qui se prolonge jusqu'à mi-mars. Ensuite on enregistre une augmentation progressive de ces teneurs jusqu'à un maximum (1.4mg/g MF) à la pleine floraison, puis une diminution plus au moins similaire à celle du repos végétatif.

1.2 Évolution des teneurs en composés phénoliques totaux et en tanins condensés au cours des stades phénologiques de la sauge (*Salvia officinalis*)

1.2.1 Évolution des teneurs en composés phénoliques totaux

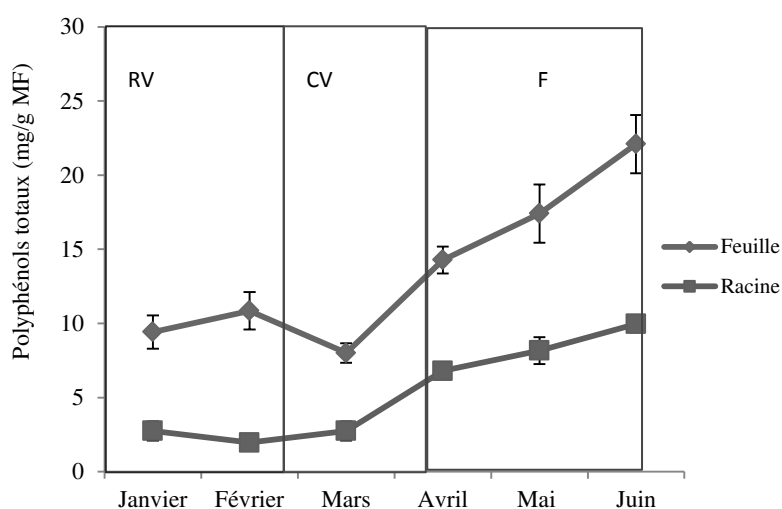


Figure 23 : Évolution des teneurs en composés phénoliques totaux au cours des stades phénologiques de la sauge (*Salvia officinalis*) (RV : repos végétatif ; CV : croissance végétative ; F : floraison)

La figure 23 montre la variation des teneurs en composés phénoliques totaux en fonction des phases phénologiques de *Salvia officinalis*. On constate que ces composés se concentrent au niveau des parties aériennes d'une façon beaucoup plus importante que dans les racines. Pendant le repos végétatif de la plante, les teneurs en CP sont faibles et évoluent très faiblement aussi bien dans les parties aériennes que racinaires. À partir de la phase de croissance, on assiste à une légère diminution des CPT dans les feuilles. Par contre, à partir de la fin de cette période, on constate une augmentation régulière dans l'ensemble de la plante pour atteindre des valeurs importantes en fin floraison. Cette augmentation peut atteindre des valeurs 115% supérieures à celles obtenues pendant la période de repos végétatif.

1.2.2 Évolution des teneurs en tanins condensés

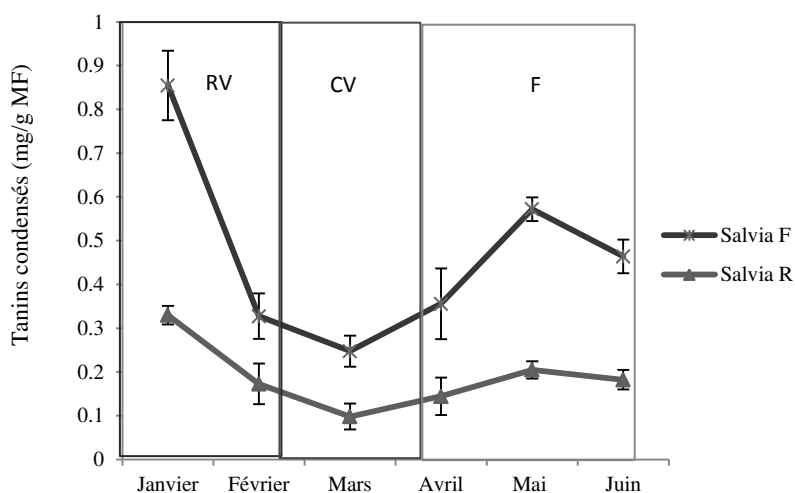


Figure 24 : Évolution des teneurs en TC au cours des stades phénologiques de la sauge (*Salvia officinalis*) (RV : repos végétatif ; CV : croissance végétative ; F : floraison)

D'après ces résultats on remarque que les TC sont concentrés principalement au niveau des parties aériennes. En phase de repos végétatif, les teneurs en TC des parties aériennes chutent d'une manière très importante pour atteindre des valeurs faibles à la fin de cette période puis augmentent au cours de la phase de croissance. Vers la fin floraison, on constate une légère diminution de ces TC dans les feuilles (figure 24).

Les teneurs en TC des parties racinaires subissent pratiquement la même évolution que celles des parties aériennes avec cependant une très légère augmentation depuis la fin de la période de repos végétatif.

1.3 Évolution des teneurs en composés phénoliques totaux et en tanins condensés au cours des stades phénologiques de *pélargonium sp*

1.3.1 Évolution des teneurs en composés phénoliques totaux

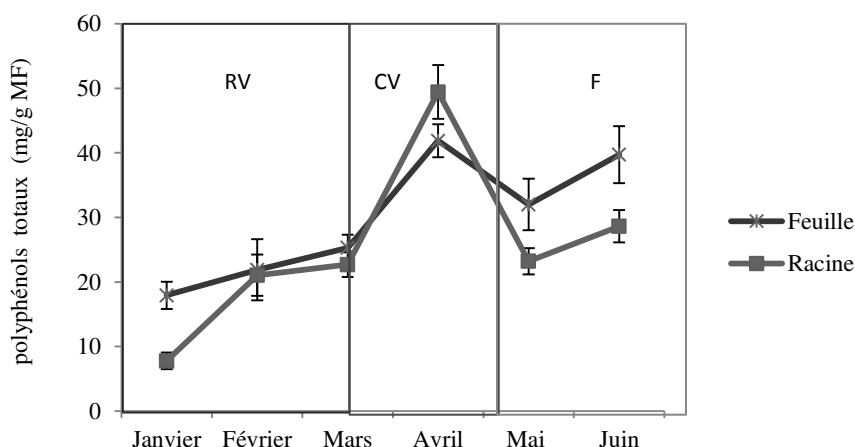


Figure 25 : Evolution des teneurs en composés phénoliques totaux au cours des stades phénologiques du *pélargonium sp* (RV : repos végétatif ; CV : croissance végétative ; F : floraison)

Contrairement à *Salvia officinalis*, les composés phénoliques évoluent d'une manière identique au niveau des parties aériennes et racinaires (fig.25). Leurs teneurs sont légèrement supérieures dans les feuilles principalement pendant les phases de repos végétatifs et de floraison. Par ailleurs, ces teneurs augmentent régulièrement depuis le début de la période hivernale jusqu'à la fin de cette période. Au début de la période de croissance (mi-mars), on constate une accumulation très importante de ces molécules qui atteignent des valeurs maximales formant un pic d'accumulation pendant cette phase. À partir du début de la floraison, on remarque une diminution de ces teneurs suivie par une légère augmentation au cours de la phase de floraison.

1.3.2 Évolution des teneurs en tanins condensés

Les TC évoluent également de la même dans les parties aériennes et racinaires (figure 26). Ces composés présentent des teneurs très importantes par rapport à la totalité des composés phénoliques puisqu'ils peuvent représenter parfois environ 40% de la totalité des composés phénoliques totaux. Par ailleurs, les parties souterraines sont plus riches en TC que les parties aériennes principalement à partir de la phase de croissance.

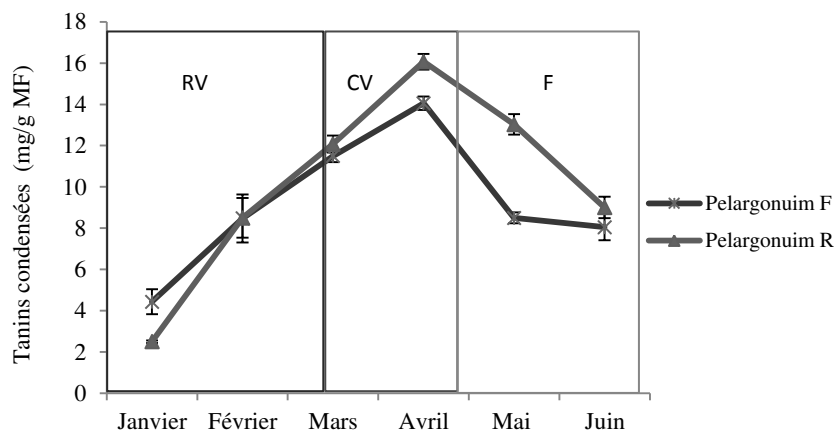


Figure 26 : Evolution des teneurs en TC au cours des stades phénologiques de *pelargoniumm sp* (RV : repos végétatif ; CV : croissance végétative ; F : floraison)

2. Influence des différentes phases phénologiques sur les teneurs en huiles essentielles de *Salvia officinalis* et de *pélargonium sp*

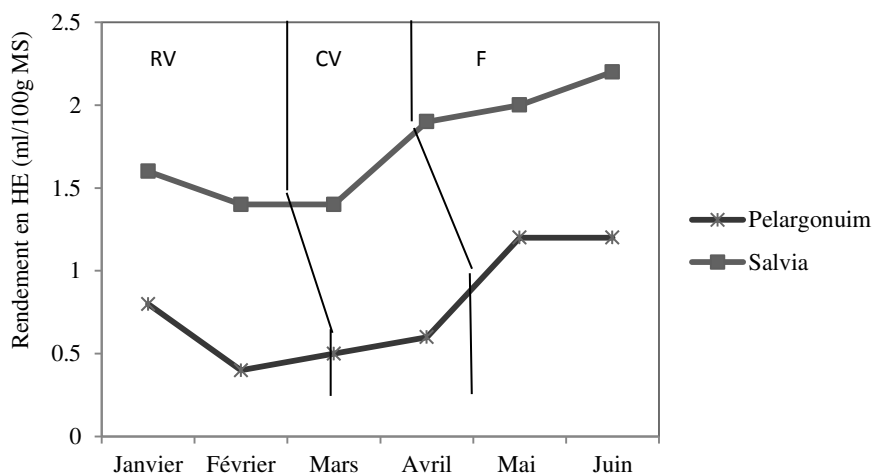


Figure 27 : Évolution des teneurs en huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques de *Salvia officinalis* et de *pélargonium* (RV : repos végétatif ; CV : croissance végétative ; F : floraison)

La figure 27 montre que les rendements en HE de *Salvia officinalis* et de *pélargonium* sont influencés par les phases phénologiques. On constate que pour les 2 espèces, ces rendements évoluent exactement de la même manière ; ils sont faibles et diminuent au cours de la période de repos végétatif, puis commencent à augmenter à partir de la croissance. Ces teneurs atteignent leur maximum pendant la pleine floraison.

3. Evolution des teneurs et de la composition des huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques de *Salvia officinalis*

3.1 Evolution des teneurs en huiles essentielles et en eau au cours des différentes phases phénologiques de *Salvia officinalis*

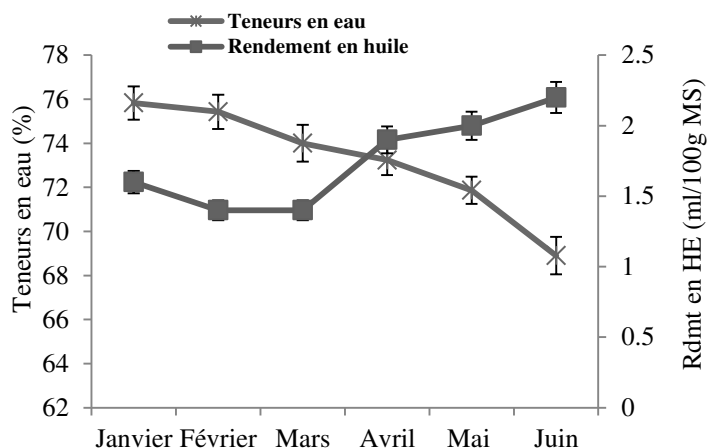


Figure 28 : Corrélation entre les teneurs en huile et les teneurs en eau chez les plantes de *Salvia officinalis*

Il existe une corrélation entre la teneur en eau au niveau des feuilles et le rendement en HE (figure.28 et tableau 4) : l'augmentation des teneurs en eau entraîne une diminution des teneurs en HE et inversement. Les teneurs en eau sont très importantes pendant la phase de repos végétatif puis diminuent régulièrement jusqu'à la fin de floraison. Inversement, les teneurs en HE sont basses pendant la phase de repos végétatif et ne dépassent pas 1.4 à 1.6%. À partir du début de croissance végétative, ces teneurs augmentent régulièrement pour atteindre en fin floraison une valeur maximale de 2.2%.

Tableau 4 : Test de corrélation du rendement en huile essentielle en fonction des teneurs en eau chez la sauge (*Salvia officinalis*)

	TE	TH
TE		
Corrélation de Pearson	1	-,840**
Sig. (bilatérale)		,000
N	18	18
TH		
Corrélation de Pearson	-,840**	1
Sig. (bilatérale)	,000	
N	18	18

**. La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral)

3.2 Évolution de la composition des huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques de *Salvia officinalis*

Tableau 5: Détermination des teneurs en différentes fractions de terpènes constituant les huiles essentielles de *Salvia officinalis* au cours des phases phénologiques (RV : repos végétatif ; DF : début de floraison ; PF : pleine floraison ; FF : fin floraison)

Les huiles essentielles de *Salvia* se caractérisent par une forte hétérogénéité de point de vue qualitatif (nombre et nature des molécules constituant les différentes familles de ces huiles essentielles), et quantitatif (teneurs des molécules qui représentent chaque famille). Le tableau 5 montre que les HE de *Salvia* sont constituées principalement par des monoterpènes et des sesquiterpènes avec comme molécules majoritaires naphthalenone, camphre, 1,8-cinéol et eremophilène (tableau 5).

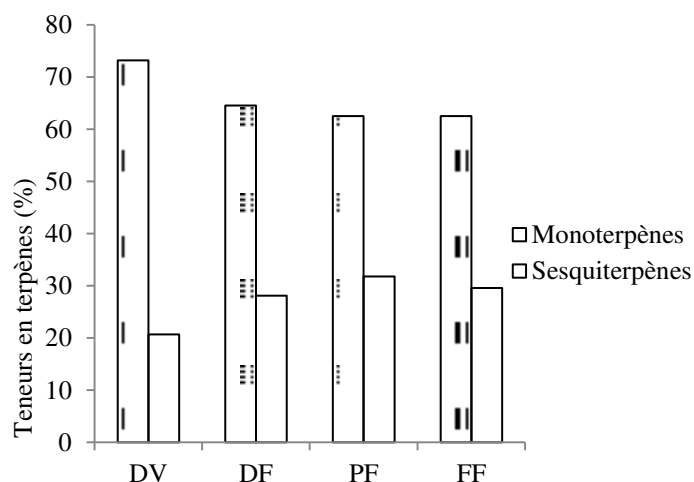


Figure 29 : Evolution des teneurs en monoterpènes et sesquiterpènes des huiles essentielles de *Salvia officinalis* au cours des différentes phases phénologiques

Les monoterpènes représentent le groupe de molécules dominant de l'huile essentielle chez *Salvia* avec des teneurs qui peuvent varier de 62 à 74% de la totalité des molécules (fig.29), alors que les sesquiterpènes ne représentent que 21 à 32%. On constate également que les teneurs de ces 2 groupes de molécules varient en sens inverse selon les stades phénologiques de la plante, l'augmentation d'un groupe fait baisser l'autre ; c'est ainsi que pendant la phase de repos végétatif, on enregistre le taux le plus élevé des monoterpènes et le taux le plus bas des sesquiterpènes alors que pendant la floraison, la diminution des teneurs en monoterpènes fait augmenter celles des sesquiterpènes.

Si on considère la diversité moléculaire des terpènes, on constate que les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent qualitativement la famille principale avec 15 molécules dont les 3 plus importantes sont la trans-caryophyllène, l' α -humulène et l'ermophilène. Les teneurs de toutes ces molécules varient selon la phase phénologique de la plante et cette variation est accompagnée par une modification de la composition chimique de certaines molécules puisqu'on remarque l'apparition de junipène pendant la phase de PF et la disparition de cis-calamène pendant la phase PF et le cadinène pendant les phases DF et FF.

Les molécules de la 2^e famille la plus représentée dans cette huile sont des monoterpènes hydrocarbonés avec 14 molécules en totalité mais avec une balance d'apparition et/ou disparition selon la phase phénologique à savoir : l' α -terpinène et le β -pinène sont absentes pendant le repos végétatif, mais apparaissent pendant les autres phases. Cependant l'azulène est présent pendant le repos végétatif puis disparaît au cours des autres phases. On note également la disparition de L'phellandrene de la phase de D.F.

Les monoterpènes oxygénés représentent la 3^e plus grande famille, 10 molécules représentent cette famille dont 4 majoritaires (1,8-cineol, α -thujone, naphthalène et camphre) et dans les teneurs varient selon la phase de croissance des plantes : c'est ainsi que le carvéol apparaît avec la floraison de la plante. Par contre la menthone disparaît au début de la floraison, le Z-citral à la pleine PF et le D-verbenone à la fin de floraison.

Les molécules qui n'appartiennent à aucune des familles précédentes et dont la synthèse est basée sur l'unité Isoprène représentent un 4^e groupe avec 5 molécules. Là aussi, on remarque que l'acétate de linalyle et l'acétate sabinyle disparaissent au cours de la floraison alors que l'acétate de myrtenyle apparaît pendant cette période.

Les Sesquiterpènes Oxygénés ne sont représentés que par 3 molécules présentes dans la plante pendant toutes les phases à l'exception de l'oxyde d'aromadendrene- qui disparaît à la fin de floraison.

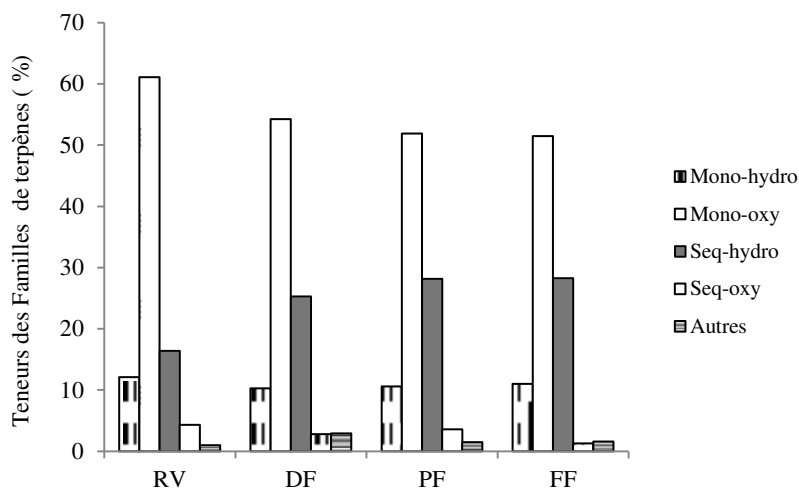


Figure 30: Evolution des teneurs en principales familles des huiles essentielles chez la sauge (*Salvia officinalis*) au cours des phases de croissances

Par ailleurs, la figure 30 montre que sur le plan quantitatif, la famille des monoterpènes oxygénés domine par des teneurs qui dépassent 50% de la totalité des molécules pendant la période de repos végétatif de la plante. Ces teneurs diminuent au cours de la floraison et cette diminution est due d'une part à la diminution des teneurs des différentes molécules principalement celles des 4 molécules majoritaires de cette famille, le 1,8-Cinéole, l' α -thujone, le naphthalénone et le camphre, d'autre part, à la disparition de molécules qui étaient présentes pendant la période de repos végétatif comme le Z-citral, la p-menthone et la D-verbénone.

Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la 2^e famille sur le plan quantitatif après les monoterpènes oxygénés (fig. 30), avec des teneurs qui augmentent de 16% pendant la période de repos végétatif à 28% à la fin floraison. Cette augmentation est principalement due à l'augmentation des teneurs en molécules majoritaires de cette famille à savoir trans-caryophyllène qui passe de 3.66 en RV à 9.61% en fin de floraison (FF), α -humulène qui varie de 3.36 en RV à 8.34 % à en FF, et eremophilène qui passe de 7.25 en RV à 10% en PF.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent la 3^e famille avec des teneurs comprises entre 10 et 12% montrant que cette famille évolue très peu au cours des différentes phases de croissance.

Enfin, les sesquiterpènes oxygénés et les autres molécules qui n'appartiennent ni aux mono ni aux sesquiterpènes représentent des familles minoritaires avec des teneurs ne dépassant pas 3 à 4 %.

4. Evolution des teneurs et de la composition des huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques de *pélargonium sp*

4.1 Evolution des teneurs en eau et en huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques de *pélargonium sp*

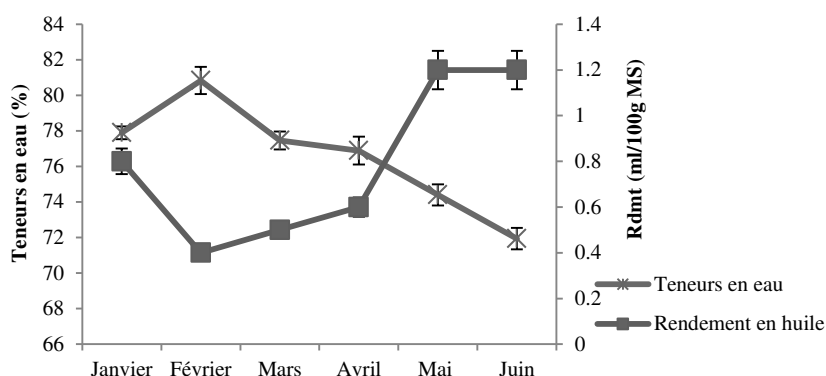


Figure 31: corrélation entre les teneurs en eau et les teneurs en huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques de *Pelargonium sp*

Le rendement en huiles essentielles chez *pélargonium* évolue d'une façon importante au cours des différentes phases phénologiques de la plante : ces teneurs diminuent d'une façon très importante pendant la période de repos végétatif et passent de 0.8 à 0.4% puis commencent à augmenter d'abord légèrement au cours de la phase de croissance végétative, puis d'une façon très importante pendant la floraison pour enfin se stabiliser vers 1.2% à la fin de floraison.

Par ailleurs, on constate que les teneurs en eau suit une évolution inverse de celle des HE avec augmentation pendant le repos végétatif, diminution au cours de la croissance jusqu'à la fin de floraison.

Le tableau 6 montre l'existence d'une corrélation entre les teneurs en eau au niveau des feuilles et le rendement des HE : la diminution des teneurs en eau entraînent une augmentation du rendement des HE et inversement (figure 31).

Tableau 6: test de corrélation du rendement en huile essentielle en fonction des teneurs en eau chez *Pelargonium sp*

		TE	TH
TE	Corrélation de Pearson	1	- ,840**
	Sig. (bilatérale)		,000
	N	18	18
TH	Corrélation de Pearson	- ,840**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	
	N	18	18

**, La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

4.2 Evolution de la composition chimique des huiles essentielles au cours des différentes phases phénologiques du *pélargonium sp*

Tableau 7: Détermination des teneurs de différentes fractions de terpènes constituant les huiles essentielles de *pélargonium sp* au cours des phases phénologiques (RV : repos végétatif ; DF : début de floraison ; PF : pleine floraison ; FF : fin floraison)

Les huiles essentielles de pélargonium se caractérisent par une forte hétérogénéité dans la composition avec 56 molécules dont 4 majoritaires, menthol, isogeraniol, menthène et eremophilène (tableau 7). Cette composition change fortement au cours des différentes phases phénologiques, aussi bien qualitativement que quantitativement. Qualitativement : la composition de cette HE varie d'un stade à l'autre. Elle est constituée de 52 à 53 molécules depuis le repos végétatif jusqu'à la pleine floraison, puis de 55 molécules au stade fin floraison. On remarque également des changements dans la qualité de cette HE avec apparition et disparition de certaines molécules selon les stades ; certaines molécules

n'apparaissent qu'avec le début de la floraison : c'est le cas d'isomenthol, β -bourbonene et trans-longipinocarveol, d'autres molécules ne sont présentes que pendant la phase de repos végétatif et qui disparaissent avec le début de floraison : c'est le cas de trans-ocimène, limonène et cryptène.

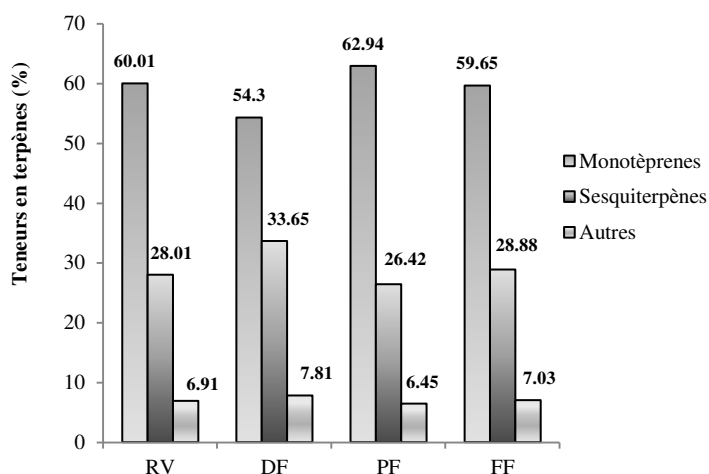


Figure 32: Evolution des teneurs en monoterpènes et en sesquiterpènes des huiles essentielles de *Salvia officinalis* au cours des différentes phases phénologiques

Les monoterpènes représentent le groupe de molécules dominant des huiles essentielles de pélargonium (fig.32) avec des teneurs qui peuvent varier de 54 à 63% de la totalité des molécules, alors que les sesquiterpènes ne représentent que 27 à 34%. On constate également que les teneurs de ces 2 groupes de molécules varient selon les phases phénologiques de la plante, l'augmentation d'un groupe fait baisser l'autre ; La phase de début de floraison représente la phase où on a le taux le plus faible des monoterpènes et le taux le plus élevé des sesquiterpènes, alors qu'en PF on a un maximum de monoterpènes (63%) et un minimum de sesquiterpènes (27%).

Par ailleurs, la figure 33 montre que sur le plan quantitatif, la famille des monoterpènes oxygénés domine par des teneurs qui peuvent varier de 35 à plus de 40% de la totalité des molécules. Ces teneurs diminuent au cours de la période végétative de la plante et cette diminution est due principalement à la diminution des teneurs des 3 molécules principales de cette famille, isogeraniol, menthol et isoborneol. L'augmentation des teneurs des molécules principales à partir du début de la floraison font augmenter les teneurs en monoterpènes oxygénés pendant la floraison.

Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la 2^e famille sur le plan quantitatif après les monoterpènes oxygénés (fig.33), avec des teneurs qui augmentent de 25.5% pendant la période de repos végétatif à 30% au début de floraison. Ces teneurs diminuent ensuite au cours de la période de floraison suite à la diminution des teneurs de la plupart des molécules constitutives de ce groupe.

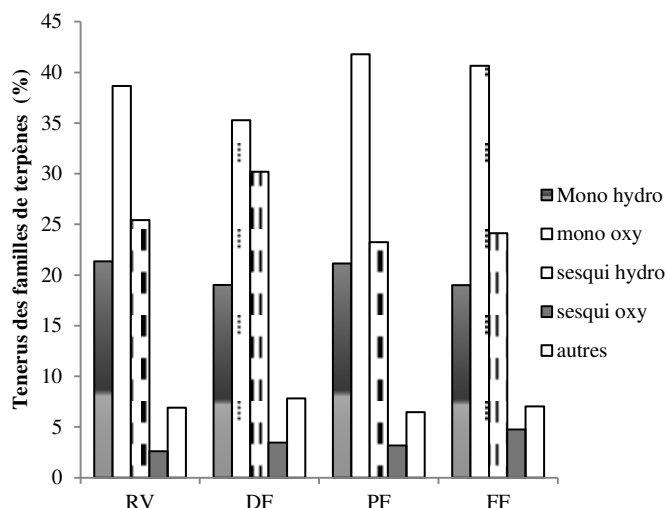


Figure 33 : Évolution des teneurs en principales familles des huiles essentielles de *Pelargonium* sp au cours des différentes phases phénologiques

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent la 3^e famille avec des teneurs situées aux alentours de 20%. Ce groupe de molécules ne montre pas de fluctuations importantes durant les différentes phases phénologiques de la plante.

Enfin, les sesquiterpènes oxygénés et les autres molécules qui n'appartiennent ni aux mono ni aux sesquiterpènes représentent des familles minoritaires avec des teneurs qui ne dépassent pas 8 %.

Quantitativement. Les composés majoritaires et secondaires subissent des variations en teneurs reflétant un changement biosynthétique très important au sein de la plante. Les teneurs en menthol qui est le composé majoritaire ne changent pratiquement pas au cours des phases de repos végétatif. (Croissance et début de floraison). Par contre à partir de la pleine floraison, on constate une augmentation importante qui peut atteindre environ 24% et 20.5% respectivement pendant les stades pleine floraison et fin floraison. L'augmentation des teneurs en cette molécule est inversement proportionnelle à la diminution des teneurs en isogéraniol (figure 34), puisqu'on remarque que les teneurs de cette dernière restent stables au

cours des premiers stades allant du RV à D.F et diminuent pour atteindre environ 7 et 9% respectivement pendant les stades P.F et F.F.

Par ailleurs. Les teneurs en menthène augmentent légèrement à partir de la pleine floraison et restent stables jusqu'à la fin de floraison, alors que les teneurs en eremophilène ne présentent aucun changement. Les composés secondaires ont également subi plusieurs variations, puisqu'on remarque que le β -bourbonène et le déhydro-aromadendrène qui sont présents à des quantités importantes à la phase de repos végétatif, diminuent à partir du début de la floraison alors que le 3-carène diminue régulièrement depuis le début de floraison jusqu'à la fin floraison.

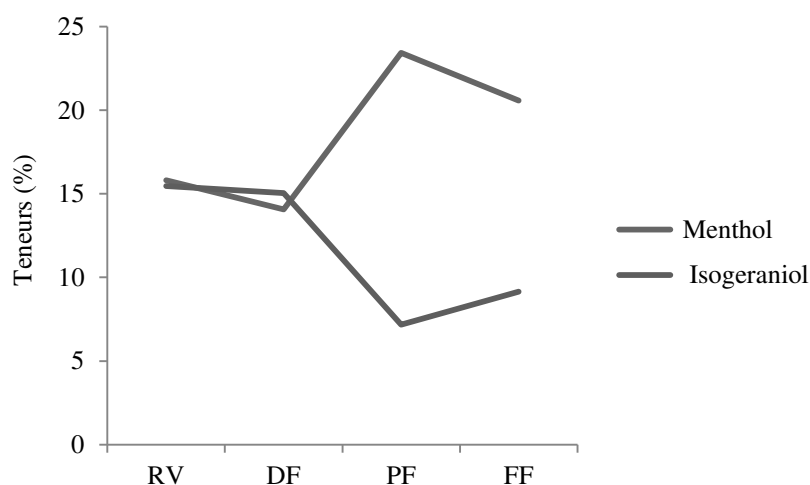


Figure 34: Variation des teneurs en menthol et isogéranol chez *Pelargonium sp* au cours des différentes phases phénologiques

III. Discussion :

Les teneurs en chlorophylle chez *Salvia officinalis* et *pelargonuims sp* sont fortement influencées par les différentes phases phénologiques des 2 plantes. Pendant le repos végétatif, la teneur en chlorophylle totale diminue faiblement, puis augmente progressivement au cours de la phase de croissance. Ces résultats ont été confirmés par Valéry et al (1999) qui ont montré que la photosynthèse reste faible quand les conditions sont défavorables (froid, stress hydrique...) qui coïncident le plus souvent avec la phase de repos végétatif. L'augmentation des teneurs en chlorophylle pendant la phase de croissance est due à l'augmentation de la surface foliaire et de la biomasse (Fattahi *et al* (2010)). Tapani *et al.*, (2004) ont lié l'activité photosynthétique au rapport entre la surface foliaire et la biomasse sèche, l'augmentation de la biomasse suppose la multiplication et l'élongation des cellules.

Les teneurs en eau augmentent lorsqu'on passe de la phase de repos végétatif à la phase de croissance. Ces résultats sont en accord avec ceux Pétri José *et al.*, (2012) qui ont montré la présence d'une corrélation entre les teneurs en eau et les teneurs en chlorophylles. Ceci explique l'augmentation des teneurs en chlorophylles chez nos plantes et l'apparition de nouvelles feuilles. Vers la fin floraison, on assiste à une diminution des teneurs en chlorophylle liée directement à l'augmentation de la température. Ces résultats sont confirmés par (Yazdanpanah *et al.*, 2010), qui ont déterminé un concept contrôlant le passage des pommiers d'une phase à une autre par la variation de la température (indice de chaleur) (Brown, 1970 ; Yazdanpanah *et al.*, 2010). Pétri José *et al.*, (2012) ont confirmé que les teneurs en chlorophylles diminuent fortement chez les plantes soumises à des conditions de chaleurs et de stress hydrique.

Composés phénoliques et tanins condensés

Les teneurs en composés phénoliques et en tanins condensés sont largement influencées par les variations saisonnières, elles même en relation avec les conditions climatiques et l'espèce végétale. Les teneurs en CP chez la sauge augmentent d'une manière exponentielle depuis le repos végétatif jusqu'à la fin de floraison. Ce résultat est confirmé par Generalié *et al.*, (2012) selon lesquels la sauge est riche en composés phénoliques totaux dont les teneurs changent en fonctions des phénophases de la plante ; ces teneurs sont faibles à la phase de repos végétatif et augmentent pendant la phase de croissance. Les mêmes résultats ont été enregistrés par Fletcher *et al* (2010) et Luis *et al* (2005), qui montrent que cette variation touche aussi bien les composés phénoliques totaux que les flavonoïdes, flavanols et les composés non flavonoïdes.

Selon Galen et Stanton (1995) les teneurs les plus élevées sont enregistrées en mai. Ces teneurs sont deux fois plus élevées qu'en février et novembre, et quatre fois plus qu'en aout.

Cerasela *et al* (2014) ont montré que les teneurs en composés phénoliques de la sauge varient selon les conditions climatiques (température et humidité), les teneurs maximales étant enregistrées d'une manière croissante depuis mai jusqu'à juillet. Cette variation des CPT affecte les Tanins condensés, les flavonoïdes ainsi que quelques composés majoritaires comme l'acide rosmarinique et l'acide phénolcarbonilique.

Par ailleurs, dans notre étude, les teneurs les plus faibles en CPT sont enregistrées pendant la phase de repos végétatif de la plante. Ces résultats suggèrent que la photosynthèse et le métabolisme secondaire de la plante sont réduits pendant le repos végétatif. La reprise de la

croissance oriente la plante vers le métabolisme primaire (augmentation de la biomasse) plutôt qu'à un métabolisme secondaire (défense). C'est la raison pour laquelle on assiste à une légère diminution des teneurs en CPT au début de la phase de croissance, résultats confirmés par ceux de Hamrouni *et al.*, (2009) sur *Origanum majorana*. Au cours de la croissance, on assiste à une accumulation des teneurs en composés phénoliques dans la plante due en grande partie à l'augmentation des teneurs en TC pendant cette période mais également à la lignification de la plante, entraînant une diminution de processus de la croissance.

En outre, les teneurs les plus élevées en CPT sont enregistrées pendant le mois de Juin qui se caractérise par une température élevée et une précipitation faible. Ces mêmes résultats sont confirmés par Bettaieb *et al.*, (2011) qui ont enregistré une accumulation des CPT chez *Salvia officinalis* sous stress hydrique et en conditions de températures élevées. Rodriguez *et al.*, (2011) ont confirmé ces résultats sur l'oignon et ont montré que ces composés jouent un rôle contre les conditions climatiques défavorables (stress environnementaux, températures élevées et déficit hydrique) pendant cette période.

Les plantes de pélargonium se caractérisent par des teneurs élevées en composés phénoliques ainsi qu'en tanins condensés. L'évolution des teneurs en CPT présente la même allure que celle de *Salvia*, avec cependant un maximum situé vers la fin de la phase de croissance. Cette variation confirme les observations de Latte et Kolodziej (2004) qui ont montré que les teneurs en composés phénoliques totaux ainsi que des tanins condensés et les flavonoïdes chez *Pelargonium reniforme* subissent de multiples variations au cours des phases de croissance en fonctions des conditions climatiques et édaphiques d'une même région.

D'un autre côté, on remarque que pélargonium est une plante très riche en CPT. Au cours de la phase de croissance végétative, ces teneurs peuvent atteindre jusqu'à 40 mg/g MF dans les feuilles et 50 mg/g MF dans les racines. En outre, les tanins condensés représentent une grande partie des polyphénols, leurs teneurs peuvent atteindre 35 à 40% des CPT. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Charpentier (1987) qui a montré que *Pelargonium hortorum* est riche en tanins hydrolysables, et ceux de Vivier 2006 qui a montré que *Pelargonium sidoides* est riche en CPT et possède une quantité importante de tanins condensés. La richesse de pélargonium en CPT laisse supposer une orientation particulière du métabolisme phénolique.

Le rendement des huiles essentielles des plantes médicinales et aromatiques est fortement influencé par des multiples facteurs à savoir : les conditions climatiques et écologiques, la

géographie et la localisation, la saison et le moment de récolte, les phases de croissance, les méthodes d'extraction, ainsi que les facteurs liés à la génétique (chénotype) et le nombre des glandes sécrétrices de chaque espèce Prakasa et al (1995) et Croteau (1987). Par ailleurs, on constate qu'il existe une corrélation entre les teneurs en eau au niveau des feuilles et le rendement des HE : la diminution des teneurs en eau entraînent une augmentation du rendement des HE et inversement.

Selon Grulova D et al (2014), le changement du rendement en huiles essentielles au cours des phases de croissance est accompagné par des changements qualitatifs et quantitatifs, spécifiquement au niveau des composés majoritaires. Des molécules augmentent en phase de floraison par exemple et diminuent progressivement aux autres phases, cette augmentation est accompagnée par la diminution des teneurs d'autres molécules.

Chez *Salvia officinalis* et *pélargonium sp*, les rendements en HE évoluent exactement de la même manière ; ils sont faibles et diminuent au cours de la période de repos végétatif, puis commencent à augmenter à partir de la croissance. Ces teneurs atteignent leur maximum pendant la pleine floraison. Des résultats similaires ont été mentionnés dans les travaux de Sefidkon et al. (2007) sur *Satureja rechingeri*, de Ozlem et al. (2009) sur l'*Origanum onites* et de Verdian-Rizi (2008a) sur *Laurus nobilis*. Naghdi Badi et al. (2004) et Oliveira et al. (2005) ont remarqué que le rendement augmente progressivement jusqu'à la floraison de *Thymu vulgaris* et *Hyptis suaveolens*. Selon Verdian-Rizi (2008b) le rendement en huiles essentielles chez *Artemisia annua* varie de la manière suivante : début de floraison < fin floraison < pleine floraison. La faible synthèse des huiles pendant les 1^{res} phases de croissance est expliquée par l'absence ou l'inactivation de certaines enzymes.

Ces résultats confirment ceux de Rajeswara et al (1996) qui ont montré que les rendements en HE de plusieurs espèces de genre géranium augmentent au cours des différents stades phénologiques. En général, dans les cultures aromatiques, la biosynthèse de l'huile essentielle en tant que métabolite secondaire à partir des produits de la photosynthèse est liée à l'activité photosynthétique (Croteau. 1987) ; pendant le repos végétatif, la faible activité photosynthétique affecte négativement la synthèse des huiles essentielles et leurs accumulations. Les faibles teneurs en huile essentielle pendant ce premier stade sont donc dues à : (a) disponibilité restreinte de la photosynthèse puisque cette période correspond à une faible luminosité et températures faibles (Salisbury et Ross. 1974); (b) catabolisme de l'huile essentielle (Croteau, 1987) en réponse à la contrainte saisonnière (baisse de température).

Le passage d'une plante d'une phase de croissance à une autre est réalisé suite à un changement physiologique déclenché par l'augmentation de l'intensité lumineuse Voirin et al (1990): lorsque les conditions deviennent favorables à la croissance, stades de croissance végétative et de floraison, les plantes se retrouvent dans des conditions d'éclairement prolongé et de températures élevées. Ceci entraîne l'augmentation des rendements en huile essentielle principalement pendant la floraison, période pendant laquelle en plus des conditions favorables, on assiste à une augmentation du nombre des glandes dans les feuilles de basilic, phénomène que nous avons montré dans le précédent chapitre. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Demarne (1989) et qui montrent que les plantes sont amenées pousser à synthétiser des quantités plus importantes d'arômes qui vont servir aux réponses physiologiques aux conditions climatiques (Voirin *et al.*, 1990) et à l'attraction des insectes pour la pollinisation.

La composition chimique des terpénoïdes des deux plantes est dominée par les monoterpènes. Cette composition est fortement influencée par les changements climatiques et les phases de croissances. Les teneurs en monoterpènes varient en sens inverse par rapport à celles des sesquiterpènes.

Cette variation est déterminée par les teneurs des HE en monoterpènes oxygénées et sesquiterpènes hydrocarbonées qui représentent les 2 groupes les plus importants du point de vu quantitatif. Ces deux groupes évoluent en sens inverses au cours des différentes phases phénologiques des deux plantes. Des résultats analogues de changement de teneurs des différents groupes des HE ont été signalés par d'autres auteurs ; Verma et al (2010) ont montré une variation quantitative et qualitative des huiles essentielles extraites à partir *Majoran hortensis* au cours des phases de croissances. Les huiles essentielles de cette plante sont dominées par les monoterpènes oxygénés en phase de croissance et en début de floraison. Lorsque la plante avance en phase de croissance, les teneurs des monoterpènes oxygénés diminuent et celles des monoterpènes hydrocarbonées augmentent. Ces auteurs ont rapporté cette différence qualitative et quantitative à l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de ces huiles, elles-mêmes est influencées par les conditions environnementales.

Salvia et *Pélargonium* sont caractérisés par une hétérogénéité importante dans la composition chimique de leurs huiles essentielles avec respectivement 47 et 55 molécules. Cette composition chimique déterminée par les teneurs en différentes molécules constitutives est largement influencée par la succession des phases phénologiques des 2 plantes.

Salvia officinalis est caractérisée par 5 molécules majoritaires, 1,8-cineol, naphthalenone, Camphore trans-caryophyllene et eremophilene. L'évolution des teneurs en ces composés majoritaires détermine la qualité de l'HE au cours des phases phénologiques. 1,8-Cineol, naphthalenone, camphore diminuent depuis le repos végétatif jusqu'à la fin floraison alors que trans-caryophyllene et eremophilene baissent.

Des études réalisées par Mirjalili et al 2006 en Iran vont dans le même sens : ces auteurs ont indiqué une diversité très importante des huiles essentielles de *Salvia officinalis* avec 41 composés et 4 molécules majoritaires (1,8 cineol, caryophyllene, comphor et humulene). Les monoterpènes oxygénés présentent la famille majoritaire avec des teneurs qui varient entre 45% et 57%, suivi par les monoterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes hydrocarbonés, avec des teneurs qui varient entre 8 et 28% durant la phénologie de la plante.

Ces résultats diffèrent des nôtres puisque selon ces auteurs, le passage de la phase de croissance à la floraison est accompagné par une augmentation des teneurs en monoterpènes hydrocarbonés et une diminution des teneurs en sesquiterpènes oxygénés, alors que les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes hydrocarbonés varient légèrement. Par ailleurs, ils montrent également que les molécules majoritaires varient en fonction de la phénologie de la plantes ; puisque 1,8 cineol augmente depuis la phase de croissance à de la floraison, le comphor et le trans-caryophyllene diminuent. L'humulene et le thujone varient légèrement au cours de la phénologie.

Les huiles essentielles de pélargonium se caractérisent par une forte hétérogénéité dans la composition avec 56 molécules dont 4 majoritaires menthol, isogéraniol, menthene et eremophilene. Comme pour *Salvia*, l'évolution des teneurs en ces composés majoritaires détermine la qualité de l'HE au cours des phases phénologiques ; le menthol et le menthène augmentent alors que l'isogéraniol diminue. L'eremophylene montre une faible variation. Des études réalisées par Eranki et al 1995 ont montré que les huiles essentielles de pélargonium d'inde possèdent comme molécules majoritaires l'isomenthole, le géraniol, le citronellol et le citronellyl. Au cours des différentes phases phénologiques, ces molécules subissent de multitudes variations dues aux facteurs environnementaux pouvant engendrer un nouveau chémotype. Rao et al 1996 ont enregistré une faible variation d'isomenthole alors que le géraniol augmente de pratiquement le double lorsqu'on passe de janvier à juin.

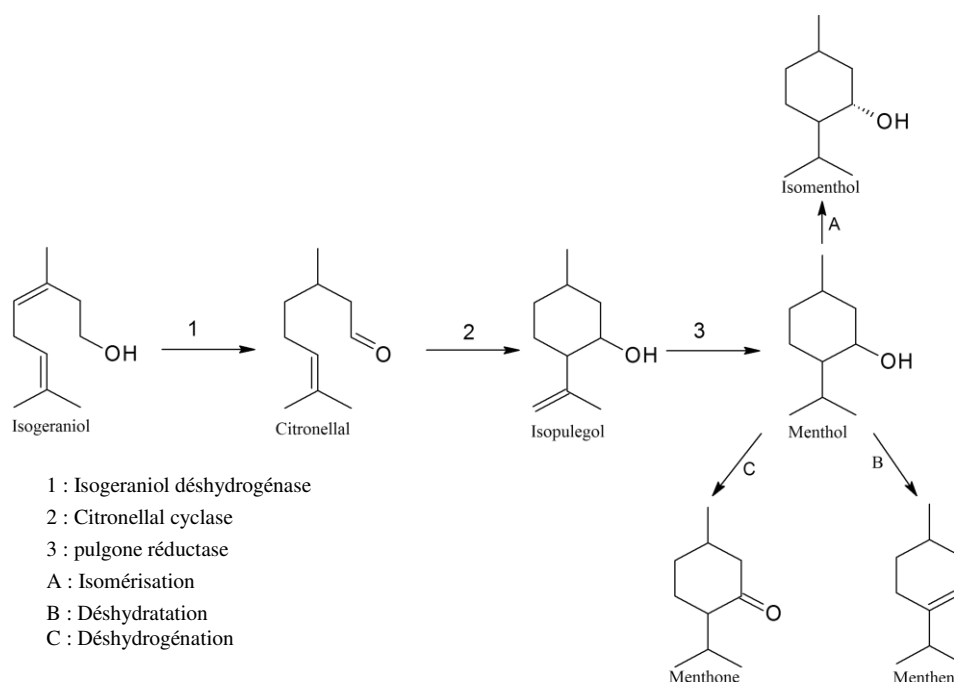


Figure 35: Conversion d'Isogéraniol en Menthol chez (*Pelargonium sp*) au cours de la phénologie

Par ailleurs, les composés majoritaires et secondaires subissent de multitudes variations de teneurs reflétant un changement biosynthétique très important au sein de la plante. Les teneurs en menthol et en isogéraniol, qui sont les composés majoritaires, évoluent en sens inverse au cours des différentes phases phénologiques de la plante ; l'augmentation des teneurs en menthol pendant la floraison est consécutive à la diminution des teneurs en isogéraniol et inversement (figure 35). Ces résultats confirment ceux de Demarne (1989) qui a montré que l'humidité et l'augmentation des températures couplées avec de fortes intensités lumineuses pendant l'été conduiraient chez *Pelargonium sp*, à la conversion d'une partie de l'isogéraniol au menthol. L'hiver favorise l'accumulation de grandes quantités de géraniol et de ses esters, alors que la saison d'été favorise l'accumulation du Menthol et de ses esters.

Les huiles essentielles :

Les teneurs en huiles essentielles varient fortement au cours des différentes phases phénologiques des plantes. Cette variation dépend des facteurs externes et des facteurs liés à la génétique de chaque espèce. Selon Grulova *et al* (2014) les conditions climatiques affectent

le rendement ainsi que la composition des huiles essentielles chez la Menthe. Ce changement affecte fortement les teneurs en composés majoritaires, spécifiquement le menthol et le menthone. Par ailleurs, selon les mêmes auteurs, ces conditions climatiques affectent le passage des plantes d'une phase végétative à une autre, ce qui induit des changements du profil enzymatique et des voies métaboliques de plusieurs molécules.

Des études anciennes ont émis une corrélation entre les variations climatiques et la variation quantitative en Menthol, il y avait une réduction de menthone en menthole et une acétylation de Menthol (pour produire, acétyle de menthyle) accompagné par la disparition du limonène. Dai *et al.*, (2010) ont montré que les changements dans la température et l'humidité changent la qualité des HE

Selon (Rohloff *et al.*, 2005), Verma *et al.*, (2010), les teneurs en menthol augmentent depuis la phase de croissance jusqu'à la floraison. Par ailleurs, le menthone présente une variation contradictoire, cette variation est accompagnée par la diminution des teneurs en limonene, puisque c'est une molécule clé dans la synthèse du menthol.

Hamrouni *et al.*, (2010) ont étudié l'effet des phases de croissance sur le rendement et la composition des huiles essentielles chez l'*Origan majoran*. Les résultats ont montré que le maximum de rendement a été enregistré en pleine floraison. Ces résultats sont en accords avec ceux d'Ozguven and Tansi (1998) sur *Thymus vulgaris* (maximum en début et plein floraison). Même résultats ont été confirmés par Mallavarapu *et al.*, (1999) sur *Artemisia pallens*.

L'accumulation des monoterpènes chez *Mentha* ont été remarqués chez les feuilles qui ne dépassent pas les trois semaines de croissance avec perte catabolique inférieure à 1% du total (Rohloff. J *et al.*, 2005), selon les mêmes auteurs le rendement en huiles essentielles chez *Mentha* est déterminé par l'âge des feuilles et le nombre des glandes par feuilles. Par ailleurs, au niveau quantitatif, la teneur élevée en Menthol est déterminée par le ratio feuilles jeunes/feuilles âgées, ou bien par la phase de croissance de la plante (moment de récolte).

Plusieurs études ont approuvé une relation contradictoire entre les teneurs en huile essentielles et en composés phénoliques. Selon ces études, la plantes lorsque il synthèse les huiles essentielles d'une manière importante (phase de pleine floraison) pour l'aidé dans la pollinisation ainsi pour la défense contre les champignons (activité antifongique) Langenheim, 1994, par contre lorsque la plante dépasse cette phase elle renforce ses défenses

par les composés phénoliques (flavonoïdes) Dixon and Paiva, 1995. Ces résultats ne présentent pas le cas général puisque certains auteurs ont remarqué que les teneurs les plus élevées ont été enregistrées en phase de début de floraison, Males *et al.*, (2003) sur *Crithmum maritimum*. Verma et Kesara (2007) ont confirmé ces résultats sur *Boerhavia diffusa* et *Sida cordifolia*.

Ce changement dans la composition chimique dû aux conditions climatiques a également été rapporté par Putievsky et al. (1990) et par (Rajeswara Rao *et al.* 1990a) qui ont montré que des plantes *Pelargonium graveolens* soumises au stress hydrique peuvent conduire à une huile essentielle riche en citronellol. Par ailleurs, La diminution des teneurs en composés secondaires peut s'expliquer soit par un catabolisme qui se produit après les multitudes changements subis par la plante à la suite de la période de croissance. Soit des fois suite à des conditions défavorables qui peuvent survenir au cours de la croissance (Croteau. 1987).

Conclusion

Les phases phénologiques influencent fortement la composition chimique des plantes : les teneurs en chlorophylle et le rendement en huiles essentielles atteignent leurs valeurs maximales en fin floraison chez *Salvia* et en pleine floraison chez *pélargonium*. Dans cette dernière, la variation des huiles essentielles est accompagnée par une conversion du menthol en isogéraniol à partir du début de floraison

Les composés phénoliques varient également en fonctions des phases phénologiques avec des teneurs maximales enregistrées en fin floraison chez *salvia* et pendant la croissance végétative chez *pélargonium*. Cette variation est directement liée à l'orientation particulière du métabolisme secondaire de la plante, et cela en fonction des enzymes impliquées dans la biosynthèse, et sous l'influence des conditions environnementales.

Chapitre 5

Effet des phytohormones (Acide gibbérellique, Acide indole acétique, Acide abscissique et la benzylaminopurine) sur le comportement physiologique et métabolique chez *Ocimum gratissimum* L, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*

Effet des phytohormones (Acide gibbérellique, Acide indole acétique, Acide abscissique et la benzylaminopurine) sur le comportement physiologique et métabolique chez *Ocimum gratissimum* L, *Salvia officinalis* et *Pelargonium* sp

I. Introduction

Chez les plantes, la croissance, le développement, la résistance contre les conditions climatiques, la lutte contre les agents pathogènes sont sous le contrôle de certaines substances synthétisées au cours de la croissance et du développement des plantes et appelées phytohormones. Ces substances, qu'elles soient endogènes ou exogènes, peuvent, même avec des faibles concentrations, influencer fortement de multiples aspects morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques. Ceci se traduit par un changement dans le métabolisme secondaire, qui renforce les défenses des plantes contre certaines conditions défavorables, mais aussi pour stimuler certaines fonctions physiologiques (le passage d'une phase de croissance à une autre, pollinisation....).

L'effet des phytohormones sur la synthèse des huiles essentielles change avec la nature de l'hormone végétale, la dose, la nature de l'espèce végétale, la phase à partir de laquelle on applique les traitements (Prins *et al* 2010).

Selon les chercheurs, l'application exogène des phytohormones affecte aussi bien le côté qualitatif que quantitatif des HE. Certaines phytohormones agissent sur le rendement en huiles essentielles par une augmentation des teneurs en HE soit à travers l'augmentation du nombre des glandes par feuilles, ou bien en agissant sur la phase de maturation de ces glandes (sécrétions, poste sécrétion) Fraternal *et al* (2003).

Qualitativement, ces changements se traduisent par l'apparition et/ou la disparition de certaines molécules (Kim *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2007), ainsi que par de multiples réactions d'isomérisation qui peuvent être rencontrées après une application d'une hormone végétale bien déterminée (Erbilgin *et al.*, 2006).

II. Résultats

1. Influence de quelques phytohormones (AIA, AG₃, ABA et BAP) sur quelques paramètres morphologiques et physiologiques chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*

1.1 Influence des phytohormones sur la croissance et les teneurs en chlorophylles chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*

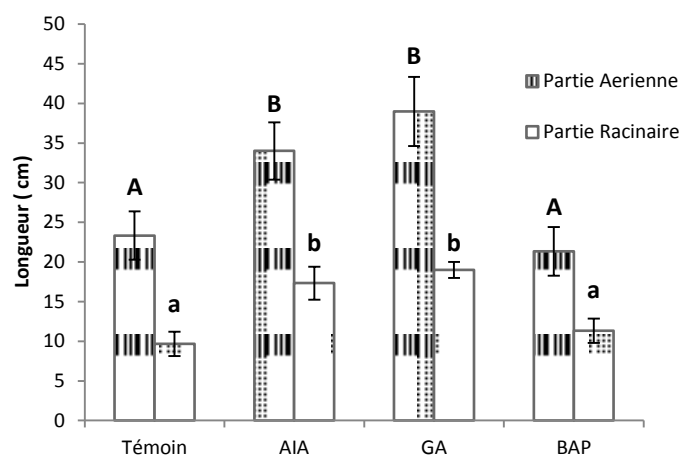


Figure 36: Longueurs des parties aériennes et racinaires des plantes d'*O.gratissimum* après traitements par AIA, AG₃ et BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

La croissance du basilic est affectée directement par les traitements hormonaux (Figure 36). On constate que l'AG₃ et l'AIA entraînent une augmentation significative de la longueur des parties aériennes et souterraines des plantes alors que la BAP ne montre aucune influence sur la longueur des plantes.

Par ailleurs, les figures (37, 38 et 39) montrent que quelle que soit la plante, l'AG₃ entraîne une diminution significative des teneurs en pigments chlorophylliens alors que la BAP n'a aucune influence sur les teneurs en chlorophylles. Par contre, l'AIA agit différemment selon la plante, il entraîne une diminution des teneurs en chlorophylles chez *Salvia*, mais ne joue aucun rôle chez les autres plantes. Il faut noter également que l'ABA entraîne une légère baisse des teneurs en chlorophylles chez *Pelargonium*.

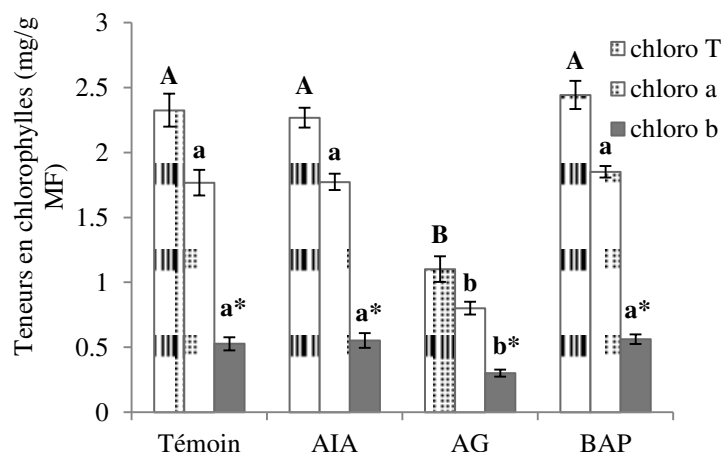


Figure 37 : Teneurs en pigments chlorophylliens d'*O. gratissimum* après traitements par l'AIA, l'AG₃ et la BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

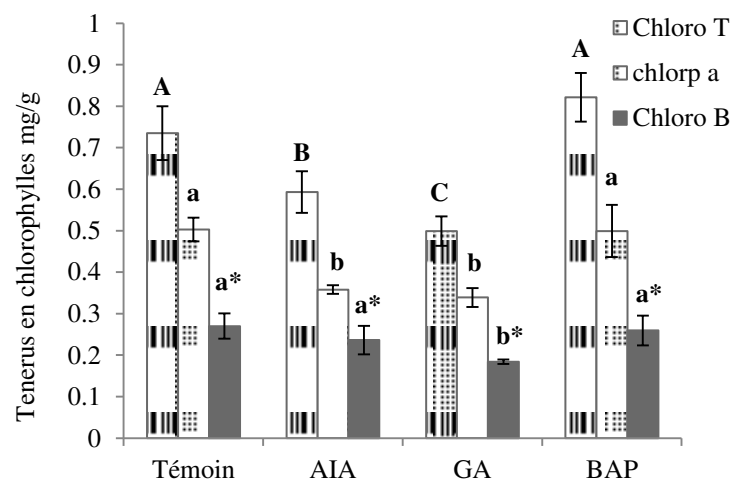


Figure 38 : Teneurs en pigments chlorophylliens chez les plantes de *Salvia officinalis* après traitements par l'AIA, l'AG₃ et la BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

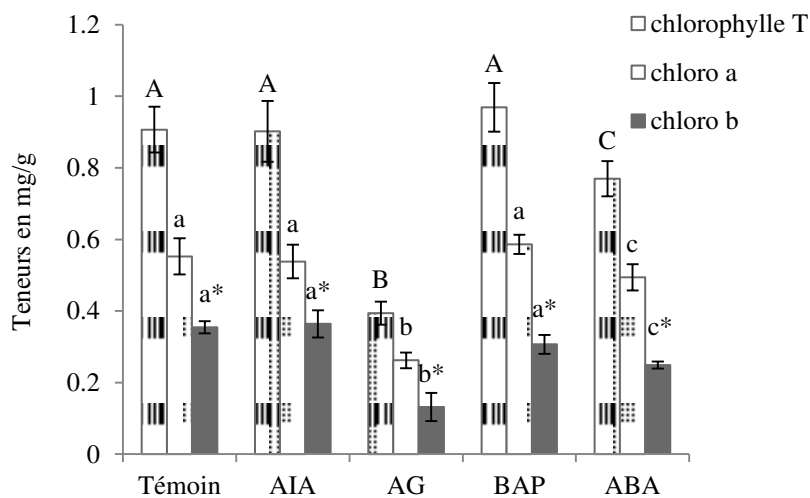


Figure 39: Teneurs en pigments chlorophylliens chez les plantes de *Pelargonium sp* après traitements par l'AIA, l'AG₃, la BAP et l'ABA. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

1. 2. Influence des phytohormones sur les teneurs en proline chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*

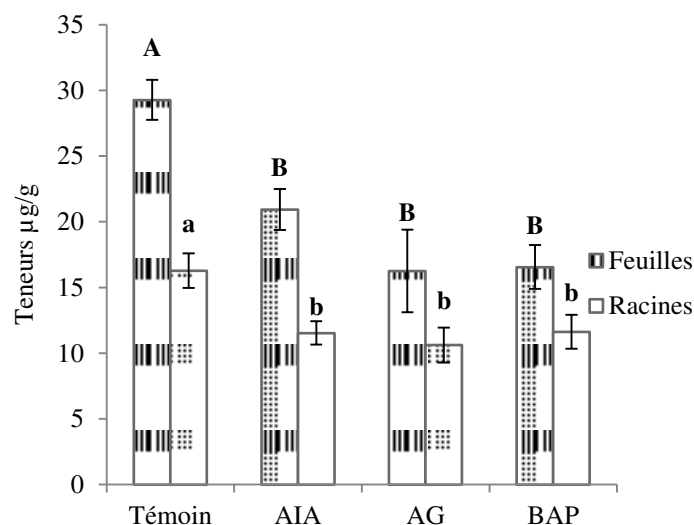


Figure 40 : Teneurs en proline chez *O.gratissimum* après traitements par l'AIA, l'AG₃ et la BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

En absence de tout traitement, on constate que la proline est principalement synthétisée dans les parties aériennes des 3 plantes. Chez *O. gratissimum*, (fig.40) les teneurs sont faibles dans les feuilles et les racines (respectivement à peine 29 µg/g et 16 µg/g). Chez *Salvia officinalis*, (fig.41) ces teneurs sont plus élevées (91 µg/g et 32 µg/g respectivement dans les feuilles et les racines), alors que dans *Pelargonium sp.* (fig.42), on constate que les parties aériennes et racinaires accumulent des quantités très élevées en prolines (respectivement 420 µg/g et 195 µg/g).

Par ailleurs, quelle que soit la plante, on constate que l'application des phytohormones entraîne toute une diminution des teneurs en proline par rapport aux témoins et intéresse principalement les feuilles. Dans les racines, la diminution est souvent négligeable, voire même absente. Cette diminution est plus ou moins importante en fonction de la phytohormone utilisée, de la plante et même de l'organe :

Chez *O. gratissimum* (fig.40), on ne constate aucune différence significative entre les phytohormones utilisées, alors que chez *Salvia officinalis* (fig.41), on constate une diminution importante des teneurs en prolines dans les feuilles principalement lorsqu'il s'agit de l'AG₃ et de la BAP ; cette diminution peut atteindre 67%. Chez *Pelargonium sp.* (fig.42), on observe également une diminution très importante d'environ 75% des teneurs en prolines dans les

feuilles dans le cas de l'utilisation de la BAP et de l'AG₃, mais également dans le cas de l'AIA. Dans ce cas, les teneurs en prolines des feuilles passent en dessous de celles des racines. Dans cette dernière plante, l'application de l'ABA permet néanmoins de rétablir les niveaux de prolines proches à celles du témoin.

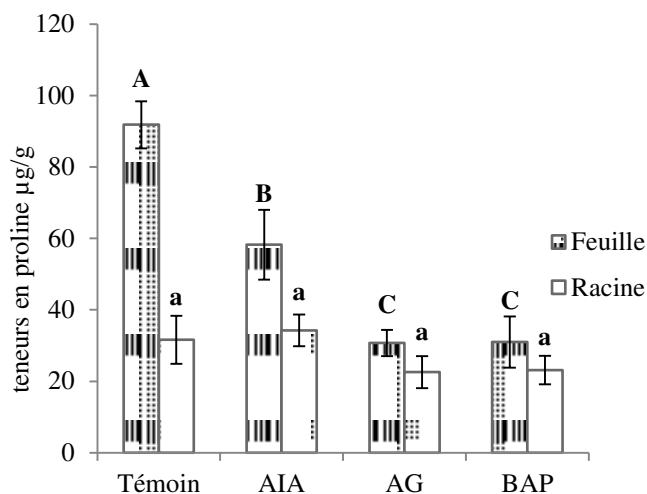


Figure 41 : Teneurs en proline chez *Salvia officinalis* après traitements par l'AIA, l'AG₃ et la BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

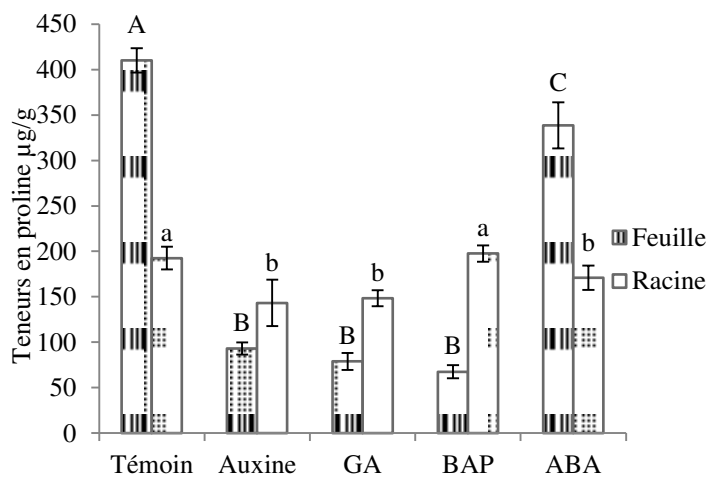


Figure 42 : Teneurs en proline chez *Pelargonium sp.* après traitements par l'AIA, l'AG₃, la BAP et l'ABA. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

1. 3. Influence des phytohormones sur les teneurs en composés phénoliques chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp.*

Ocimum gratissimum, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp.* possèdent des teneurs plus ou moins élevées en composés phénoliques. Ces teneurs sont faibles chez *O. gratissimum* de l'ordre de 2 à 2.5 mg/g MF (fig.43), alors *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp.* (fig.44 et 45),

possèdent des teneurs assez élevées qui peuvent atteindre 20 à 25 mg/g MF. Ces composés phénoliques sont principalement localisés dans les parties aériennes en particulier chez *O. gratissimum* et *Salvia officinalis*. Chez *Pelargonium sp.* On ne rencontre pas de différences significatives dans les teneurs en polyphénols entre les feuilles et les racines. Par ailleurs, les teneurs en tanins condensés représentent une part non négligeable des polyphénols totaux puisque leurs teneurs peuvent aller d'environ 10% dans le cas d'*Ocimum gratissimum* et de *Salvia officinalis* jusqu'à 50% dans le cas de *Pelargonium sp.*

Les teneurs en composés phénoliques des plantes sont fortement influencées par les phytohormones. Des variations dans ces teneurs sont enregistrées aussi bien au niveau de la partie aérienne que dans la partie racinaire et diffèrent en fonction de la plante et de la nature des phytohormones utilisées :

Chez le basilic (figure 43) nous avons remarqué une diminution significative des teneurs en composés phénoliques totaux dans le cas de l'utilisation de l'AIA et de l'AG₃. Cette baisse n'est observée que dans les parties aériennes. La BAP par contre, ne montre aucune différence avec le témoin. Les mêmes constatations peuvent être faites sur les teneurs en tanins condensés dont les teneurs baissent d'une façon proportionnelle à la diminution des teneurs en polyphénols totaux.

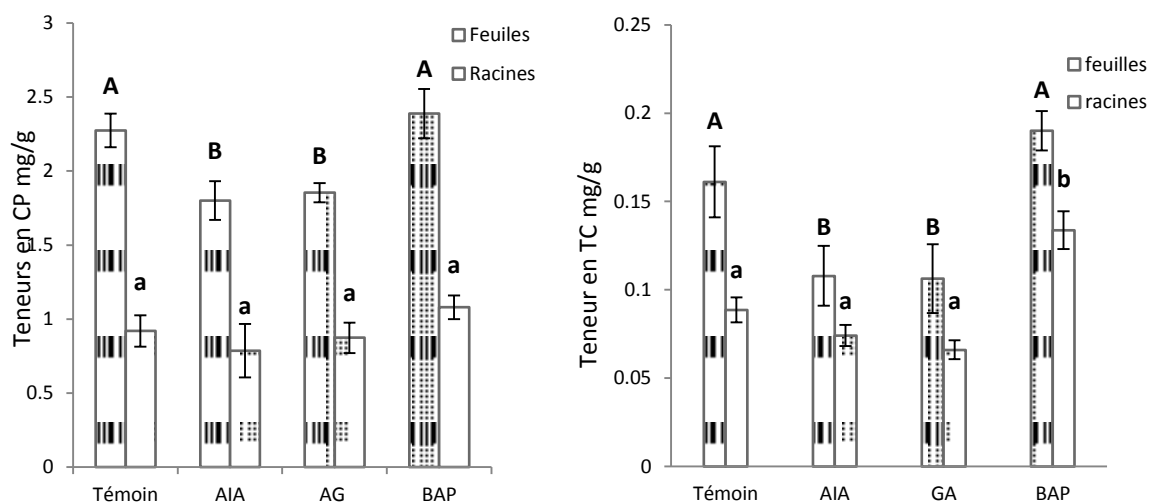


Figure 43: Teneurs en composés phénoliques totaux et en tanins condensés chez *O. gratissimum* après traitements par l'AIA, l'AG₃ et la BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

Dans le même sens, les résultats des dosages des tanins condensés montrent que les teneurs de ces derniers sont très faibles par rapport au CPT. Pourtant, nous avons remarqué que les deux

phytohormones qui stimulent la croissance en longueur (AIA et AG₃) enregistrent les teneurs les plus faibles en TC. On constate néanmoins une augmentation de la synthèse des TC dans les racines après utilisation de la BAP

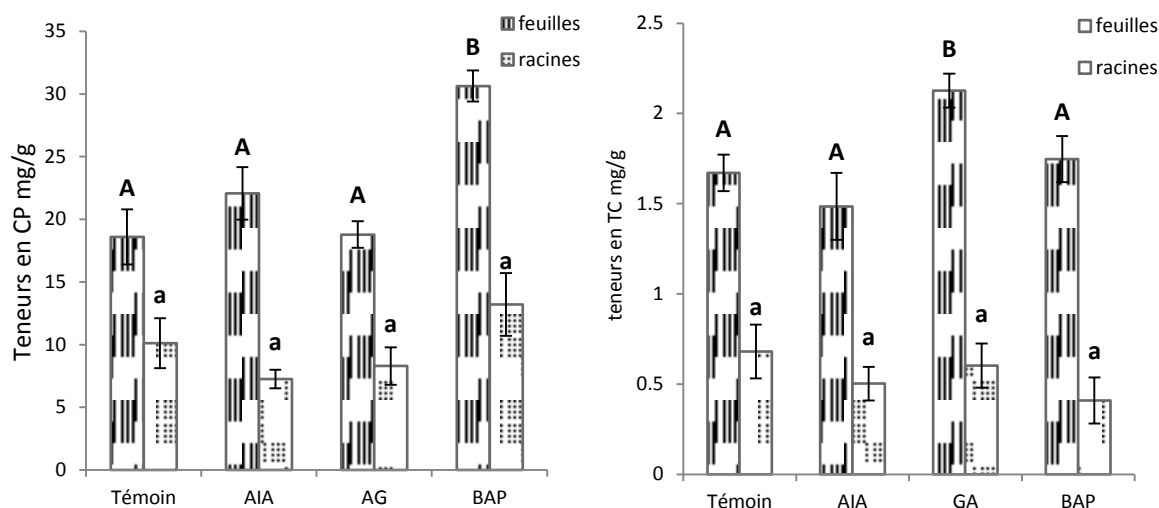


Figure 44 : Teneurs en composés phénoliques totaux et en tanins condensés chez *Salvia officinalis* après traitements par AIA, AG₃ et BAP. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

Dans le cas de *Salvia officinalis*, (figure 44) les teneurs en composés phénoliques totaux ne montrent aucune différence lorsqu'on applique l'AIA et l'AG₃ aussi bien dans les feuilles que dans les racines. L'utilisation de la BAP fait néanmoins augmenter ces teneurs d'une manière significative au niveau de la partie aérienne.

Les teneurs en tanins condensés subissent également les mêmes évolutions que les CPT avec cependant une légère augmentation des teneurs en tanins condensés au niveau des feuilles après application de l'AG₃.

Chez *Pelargonium* (Figure.45), les teneurs en composés phénoliques totaux montrent une augmentation significative lorsqu'on applique l'AIA, et la BAP, aussi bien au niveau des parties aériennes que racinaires. L'AG₃ montre également une augmentation significative des teneurs en CPT dans les différentes parties de la plante, mais avec des valeurs inférieures que celles d'AIA et la BAP. Cependant, l'application de l'ABA ne semble avoir un effet que dans la partie aérienne de la plante puisqu'on observe une augmentation des teneurs en CPT à ce niveau et non pas au niveau des racines.

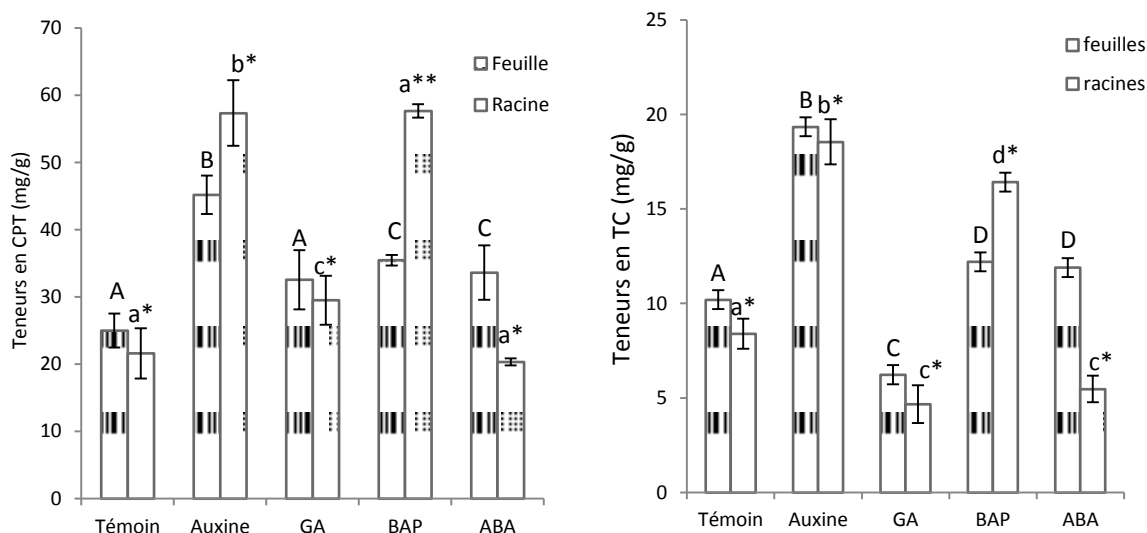


Figure 45 : Teneurs en composés phénoliques totaux et en tanins condensés chez *Pelargonium sp* après traitements par AIA, AG₃, BAP et ABA. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

Les TC constituent la plus grande contribution au sein des polyphénols chez *pelargonium* puisqu'ils peuvent représenter environ 45% de la totalité des CPT. Les teneurs en cette famille de molécules varient en fonction des phytohormones ; leurs teneurs subissent presque les mêmes évolutions que celles des CPT :

AIA et la BAP entraînent une augmentation significative des teneurs en TC, avec un maximum enregistré chez les plantes traitées par AIA. Cette augmentation concerne les deux parties de la plante. Par ailleurs, ces teneurs diminuent d'une manière significative après l'application de l'AG₃. L'application d'ABA montre par contre une augmentation des TC dans les feuilles et une diminution dans les racines.

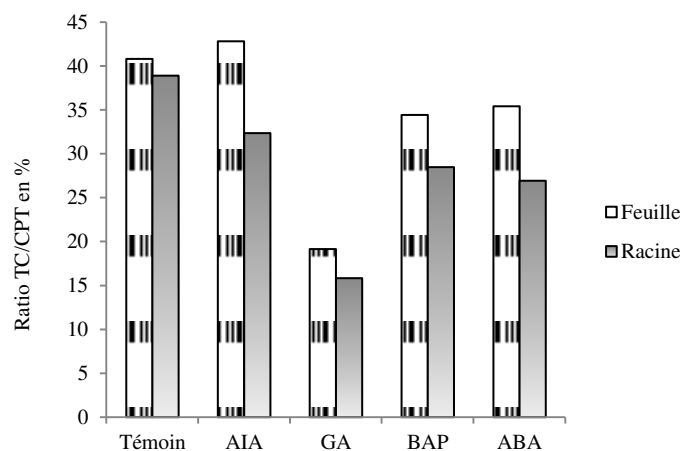


Figure 46: Ratio des teneurs en TC par rapport au CPT chez *Pelargonium sp* traitées par AIA, AG₃, BAP et ABA

D'après la figure 46 on remarque que le ratio TC/CPT varie en fonction des traitements. AIA augmente légèrement le ratio au niveau des parties aériennes, et provoque une diminution au niveau racinaire. Par ailleurs AG₃ engendre une diminution de presque la moitié au niveau des deux parties aérienne et racinaire. BAP et ABA diminuent ce paramètre, mais d'une manière faible par rapport à l'AG₃.

2. Influence de l'AIA, l'AG₃, l'ABA et la BAP les teneurs et la composition des huiles essentielles chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*

2. 1 Influence de l'AIA, l'AG₃ et la BAP sur *Ocimum gratissimum*

2. 1. 1 Influence de l'AIA, l'AG₃ et la BAP sur les teneurs et la composition des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum*

Le tableau 8 montre les rendements en huiles essentielles des plantes *O. gratissimum* et leurs compositions chimiques. On constate que les plantes témoins montrent un rendement de 0,22% et sont caractérisées par une diversité importante de molécules avec la dominance de la famille des monoterpènes oxygénés qui représentent 92% de la totalité des molécules. Le méthyle chavicol est le composé majoritaire dont les teneurs atteignent 85.26% et son isomère trans-anéthol avec 4.25%. Par ailleurs, les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent le 2^e groupe de cette huile essentielle avec à peine 4 % de la totalité. Les monoterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés ne sont représentés que par quelques molécules dont les teneurs sont négligeables.

Le rendement en HE et les teneurs en différentes catégories de molécules varient en fonction du type de phytohormone utilisée. C'est ainsi que l'AIA et la BAP entraînent une augmentation des rendements en HE pouvant atteindre 0,3%, alors que l'AG₃ n'a pas une grande influence sur le rendement (0,2 %).

En outre, on remarque que le méthyle chavicol et son isomère trans-anéthol restent majoritaires, quel que soit le traitement utilisé ; leurs teneurs représentent la majeure partie des différentes HE et représentent environ 89 % de la totalité de l'huile dans le cas de l'AIA et de la BAP et environ 70% dans le cas de l'AG₃.

L'utilisation des phytohormones montre que les composés majoritaires (méthyle chavicol et trans anéthol) et les composés secondaires (Eucalyptol, azulene ...) subissent quelques modifications avec une balance de diminution et d'augmentation selon la nature du traitement (Tableau 8, figure 47).

Chapitre 5 : Effet des phytohormones sur le comportement physiologique et métabolique chez les trois espèces

Tableau 8 : Influence des phytohormones (AIA, AG₃ et BAP) sur les teneurs et la composition des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L

L'AG₃ entraîne une diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés à 75% due principalement à une diminution très importante du méthyle chavicol qui passe de 85,26 pour le témoin à 58,3%, alors que le trans-anéthole n'augmente que de 4,25 à 12,30%. Par ailleurs, les teneurs en sesquiterpènes totaux augmentent à 15%. Nous constatons également une augmentation des teneurs en composés secondaires (21,37%) avec l'apparition de 4 composés

(Germacrène-D, Naphthalène, camphre, Ledène,) et disparition de deux molécules (β Cedrène et Azulène). On remarque d'un autre côté un changement très important dans les teneurs des molécules préexistantes, la teneur en Cadinène augmente d'un facteur de quatre (de 0,78 à 3,83%), la teneur en Cubénol augmente 11 fois (de 0,19 à 2,23%) et la teneur en aromadendrène augmente d'un facteur de 6 (de 0,21 à 1,37%). Par contre la teneur en eucalyptol subit une diminution d'un facteur de 4 (de 2,02 à 0,52%).

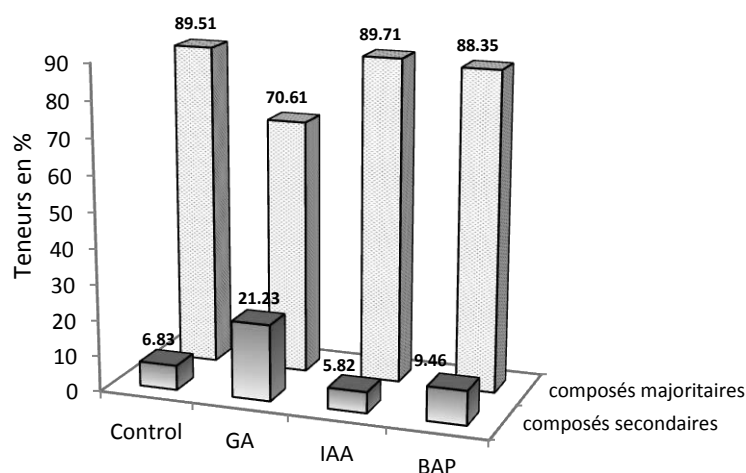


Figure 47 : Teneurs globales en composés majoritaires (Méthyle chavicol et trans-anéthole) et en composés secondaires d'*Ocimum gratissimum* L. après un traitement par AG₃, AIA et BAP

En ce qui concerne l'AIA, La figure 47 montre que les HE des plantes traitées par cette phytohormone ne présentent pas un changement notable en composés majoritaires puisque la somme de ces molécules est pratiquement la même que pour le témoin, avec une légère augmentation en méthyle chavicol et légère diminution en trans anéthol (tableau 8). La somme des composés secondaires est également identique (6,13%), mais nous notons l'apparition de Germacrene-D et la disparition de l'Aristolene.

Le 3eme traitement qui concerne l'utilisation de la BAP montre les mêmes constatations réalisées par l'AIA avec la seule différence représentée par la disparition aromadendrene (tableau 8).

2. 1. 2 Influence de l'AIA, l'AG₃ et la BAP sur les glandes sécrétrices des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum*

Les glandes sécrétrices des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* sont largement influencées par les traitements par les phytohormones. Cette influence réside dans le nombre, la nature (peltée ou capitée) ainsi que dans leur taille.

Les glandes des plantes témoins (fig.48) sont peu nombreuses et possèdent un diamètre qui ne dépasse pas 72 µm pour la plupart. Le traitement des plantes par la BAP ou par l'IAA (fig.48 b et d) entraîne une augmentation de la densité des glandes sécrétrices dans les feuilles par rapport au témoin. Cette augmentation du nombre de glandes est accompagnée par une augmentation de leur diamètre qui peut atteindre pour la majorité d'entre elles 80 à 88 µm. Pour ces deux traitements, les glandes se présentent toujours sous forme gonflée. Par contre, l'application de l'AG₃ ne montre aucune différence dans la densité des glandes et leur diamètre ne subit par un changement notable. Notons également que les glandes des plantes traitées par l'AG₃ présentent un aspect dégonflé montrant la structure quadratique déjà signalée dans le chapitre I.

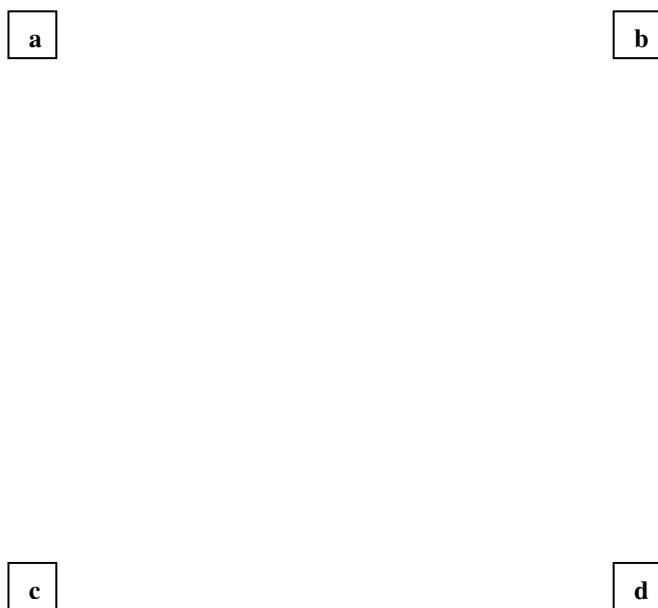


Figure 48: Observations en microscopie électronique à balayage environnemental des glandes sécrétrices des huiles essentielles situées au niveau de la face ventrale des feuilles d'*Ocimum gratissimum* L. Témoins (a) et après un traitement par l'AIA (b), l'AG₃ (c) et la BAP (d)

2. 2. Influence de l'AIA, l'AG₃ et la BAP sur les teneurs et la composition des huiles essentielles de *Salvia officinalis*

Le tableau 9 montre les rendements en huiles essentielles des plantes *Salvia officinalis* et leurs compositions chimiques. On constate que le rendement en HE de *Salvia officinalis* est assez élevé et peut représenter 1.6%. Cette valeur est susceptible de varier en fonction des traitements subis par la plante : les plantes traitées par AG₃ montrent le plus faible rendement avec une diminution de 31% par rapport au témoin alors que l'AIA entraîne une légère diminution du rendement. La BAP par contre entraîne une légère augmentation.

Chapitre 5 : Effet des phytohormones sur le comportement physiologique et métabolique chez les trois espèces

Tableau 9: Effet des phytohormones (AIA, AG₃ et BAP) sur le rendement et la composition des huiles essentielles de *Salvia officinalis*

Les huiles essentielles de Salvia (Tableau 9) se caractérisent par une forte hétérogénéité avec plus de 50 molécules distribuées sur 4 familles de molécules, dont les monoterpènes oxygénés présentent la famille majoritaire avec une teneur qui dépasse les 63%. Les molécules majoritaires de cette huile essentielle sont, naphthalène, camphorquinone et 1,8-Cinéole. Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la 2^e plus grande famille de point de vue quantitatif avec des teneurs qui varient entre 16% et 28%. 14 molécules constituent cette famille, dont 3 principales, trans-caryophyllène, α -humulène et eremophilène.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent la 3^e plus grande famille sur le plan quantitatif au sein des huiles essentielles de cette plante (vers les 12%). Enfin, les sesquiterpènes

oxygénés représentent une famille minoritaire aussi bien qualitativement que quantitativement.

Le traitement des plantes par les phytohormones entraîne des changements qualitatifs et quantitatifs des huiles essentielles. Le rendement en HE et les teneurs en différentes catégories de molécules varient en fonction du type de phytohormone utilisée. C'est ainsi que la BAP entraîne une légère augmentation des rendements en HE, l'AIA une légère diminution alors que l'AG₃ entraîne une diminution importante du rendement.

On assiste également à une balance de disparition et d'apparition de molécules ainsi un changement des teneurs en molécules préexistantes :

Le traitement par AIA engendre la diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés (53,66%). Cette diminution est accompagnée par la diminution des teneurs en composés majoritaires, spécifiquement le camphorquinone de près de 24%, la disparition de trois molécules (p-menthone, Z-citral et germacrene-D) et l'apparition d'une seule (camphre). Ce traitement par l'AIA entraîne néanmoins l'augmentation des teneurs des Sesquiterpènes hydrocarbonés et engendre l'apparition d'une molécule (Junipene) et la disparition de β humulene, α bourbonene et de cis-calamenene. Par ailleurs, on assiste à la diminution des teneurs en Sesquiterpènes oxygénés et monoterpènes hydrocarbonés avec l'apparition de 3 molécules (α -terpinène, β -pinène, et cis-sabinène) et la disparition de 2 molécules (azulène et sabinène)

L'AG₃ entraîne également une diminution des teneurs de cette famille (monoterpènes oxygénés) (56%), une valeur supérieure à celle enregistrée chez les plantes traitées par AIA, mais toujours inférieures par rapport au témoin. Cette diminution est accompagnée par la diminution des teneurs en composés majoritaires spécifiquement le 1,8 cineole, la disparition d'une molécule (p-menthone) et l'apparition d'une autre (camphre). Ce même traitement entraîne l'augmentation des teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés avec l'augmentation des teneurs en α -humulène et en trans-caryophyllène et la disparition de cadinene et β humulène. Les sesquiterpènes oxygénés et les monoterpènes hydrocarbonés subissent également une baisse de leur teneur. Chez ce dernier groupe, l'AG₃ provoque l'apparition d' α -terpinène, et la disparition de trois molécules (l-phellandrène, Azulène et sabinène).

Enfin, le traitement par la BAP entraîne une diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés (53%) suite à la diminution des teneurs des 4 molécules majoritaires et à la disparition de trois autres, p-menthone, D-verbonène et Z-citral. Les sesquiterpènes hydrocarbonés subissent en outre une augmentation après traitement par la BAP suite à l'augmentation des teneurs en trans-caryophyllène, humulène et eremophilène. Notons dans ce cas la disparition de cadinène, β humulène et α bourbonène. Les deux autres groupes, monoterpènes hydrocarbonés et sesquiterpènes oxygénés diminuent suite à l'application de la BAP: on assiste à l'apparition de 3 molécules (α –Terpinène, β –Pinène, cis-sabinène) et la disparition d'une seule (Azulène) dans les monoterpènes hydrocarbonés.

Le changement qualitatif est accompagné par un changement quantitatif, puisqu'on remarque que les trois hormones végétales provoquent une augmentation en teneurs de cette famille de molécules, dont le maximum enregistré chez les plantes traitées par AIA (**28%** des teneurs totales en huile) ce qui signifié une augmentation de presque **12%** plus que le témoin. Une augmentation similaire a été enregistrée chez les plantes traitées par BAP, cependant AG₃ engendre une augmentation de **9%** de plus que le témoin. Ce changement en teneurs totales des molécules est dû principalement à l'augmentation des teneurs en molécules majoritaire au sein des huiles.

Le trans-caryophyllène augmente de presque 150% chez les plantes traitées par AIA et BAP et de 143% chez AG₃. Cependant l' α -humulène augmente de 110% chez les plantes traitées par AIA et AG et de 148%. Les teneurs en eremophilène ont peu influencé par les traitements hormonaux.

La teneur totale de cette famille de molécules est légèrement influencée par les traitements hormonaux, avec un maximum de (11%) chez les plantes témoins et de 9 à 10% chez les plantes traitées par les hormones.

Les teneurs en molécules non terpéniques passent d'état de trace chez les témoins (0,68%) à (3%) par AG₃. Par ailleurs, l'AIA et la BAP entraînent une faible augmentation de ces teneurs, avec une balance d'apparition et disparition de quelques molécules (acétate de linalyle et acétate de sabinyle).

Les traitements hormonaux influencent fortement sur les teneurs et la composition des huiles essentielles de Salvia, avec une balance de variation qui touche les familles de molécules ainsi que les molécules au sein de même famille.

Le traitement par (AIA, AG₃ et BAP) provoque une diminution de presque les 10% en teneur totale des huiles au niveau de la famille des monoterpènes oxygénés, par contre on constate une augmentation de 10% (des teneurs totales en huile) chez la famille des sesquiterpènes hydrocarbonés, c'est comme une activation d'une voie biosynthétique d'une famille et l'inhibition de l'autre famille, et que la même portion qui diminue chez la 1^{ère} famille se compense chez la 2^e.

2. 3. Influence de l'AIA, l'AG₃, la BAP et l'ABA sur les teneurs et la composition des huiles essentielles de *Pelargonium sp*

Tableau 10: Effet des phytohormones (AIA, AG₃ et BAP) sur le rendement et la composition des huiles essentielles de *Pelargonium sp*

Le tableau 10 et la figure 49 montrent le rendement en huiles essentielles de Pelargonium et leurs compositions chimiques. En dehors de tout traitement, cette plante possède un rendement assez faible ne dépassant pas 0.7% avec comme molécules majoritaires le menthol, l'isogéranol, l'eremophilene, le menthène et l'isoborneol.

Les monoterpènes présentent le groupe qui domine les teneurs de ces huiles essentielles avec une contribution qui dépasse 55%, suivis par les sesquiterpènes avec des teneurs qui avoisinent les 30% et enfin les autres molécules. Cette huile essentielle se caractérise par une forte hétérogénéité avec 65 molécules réparties sur 6 familles : les monoterpènes oxygénés représentent la famille majoritaire avec des teneurs d'environ 38% et possédant trois molécules majoritaires, menthol, isogéranol et isobornéol.

Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la 2^e plus grande famille de point de vue quantitatif avec des teneurs qui peuvent atteindre 26%. Une vingtaine de molécules constituent cette famille dont l'eremophilene est la molécule principale.

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent la 3^e plus grande famille sur le plan quantitatif au sein des huiles essentielles de cette plante avec des proportions qui peuvent atteindre 20% de la totalité de l'HE. Le menthène est la molécule principale de cette famille. Enfin, les sesquiterpènes oxygénés représentent une famille minoritaire aussi bien qualitativement que quantitativement. D'autres molécules peuvent être présentes parmi lesquelles on trouve des esters de terpènes et des traces de diterpènes.

Le traitement des plantes par les phytohormones entraîne des changements quantitatifs et qualitatifs des huiles essentielles. Le rendement en HE et les teneurs en différentes catégories de molécules varient en fonction du type de phytohormone utilisée : La BAP entraîne une augmentation importante des teneurs en huiles essentielles de presque 71%, suivie par l'ABA de 43%. Par contre, l'AIA a légèrement augmenté ces teneurs et l'AG₃ n'a pas eu une influence notable sur les teneurs en huiles essentielles.

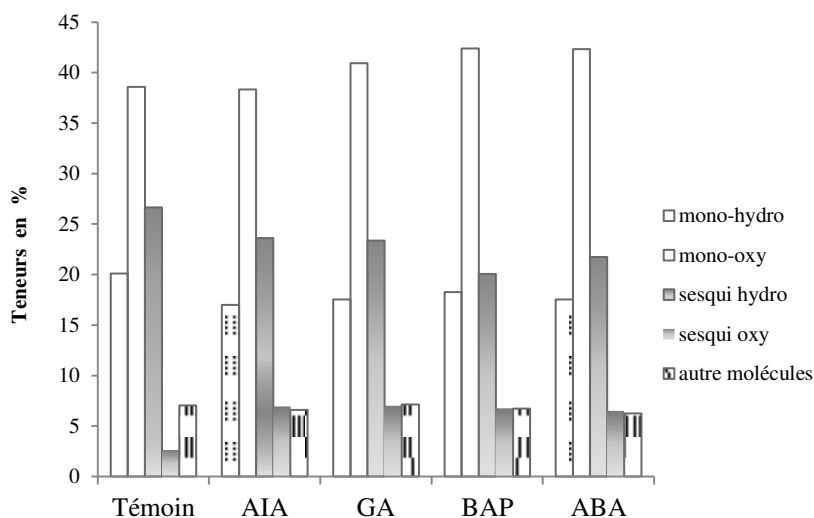


Figure 49 : Variation des teneurs des familles constitutives des huiles essentielles de *pelargonium sp.* Après traitements hormonaux (AIA, AG₃, BAP et AIA)

On assiste également à une balance de disparition et d'apparition de molécules ainsi à un changement des teneurs en molécules préexistantes :

Le traitement par l'AIA (Tableau 10, fig.49) n'a pas une grande influence sur les teneurs en monoterpènes oxygénés totaux. Ceci est dû principalement à l'augmentation importante des teneurs en menthol et en isoborneol d'une part, d'autre part à la diminution importante des teneurs en isogéraniol qui a tendance à disparaître en passant de 15% dans le témoin à 0.12%. Par ailleurs, on assiste à une diminution des teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés et en monoterpènes hydrocarbonées. Ces derniers diminuent suite à la disparition d'un certain nombre de molécules et à la diminution des teneurs en 3-Carene et pinène malgré l'augmentation des quantités de menthène. On assiste néanmoins à une légère augmentation des teneurs en sesquiterpènes oxygénés suite à l'augmentation des teneurs de la plupart des molécules constitutives de cette famille.

Des observations identiques peuvent être faites après traitement avec l'AG₃ avec cependant une augmentation des teneurs en monoterpènes oxygénés consécutive à la diminution des teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés, augmentation des teneurs en sesquiterpènes oxygénés et diminution des teneurs en monoterpènes hydrocarbonés. Là aussi, on assiste à l'augmentation importante des teneurs en menthol et en Isoborneol et à la diminution des teneurs en isogéraniol qui atteignent 2.6% au lieu de 15%.

L'application de la BAP représente le traitement qui a l'incidence la plus importante puisqu'elle permet d'obtenir les taux les plus élevés en monoterpènes oxygénés (42.37%) et les taux les plus faibles en sesquiterpènes hydrocarbonés (20.06%). On assiste dans ce cas à la quasi-disparition de l'isogéraniol (0.15%) et une augmentation importante de l'isobornéol (11%). Les monoterpènes hydrocarbonés diminuent également légèrement suite à la diminution des teneurs en 3-Carene et α -pinène malgré l'augmentation des quantités de menthène. L'application de la BAP fait également augmenter les teneurs en sesquiterpènes oxygénés.

Le traitement des plantes de *Pelargonium* par l'acide abscissique conduit aux mêmes observations que celles obtenues avec la BAP avec pratiquement les mêmes proportions pour les différentes familles. Néanmoins, cette phytohormone conduit aux rendements les plus faibles en huile essentielles.

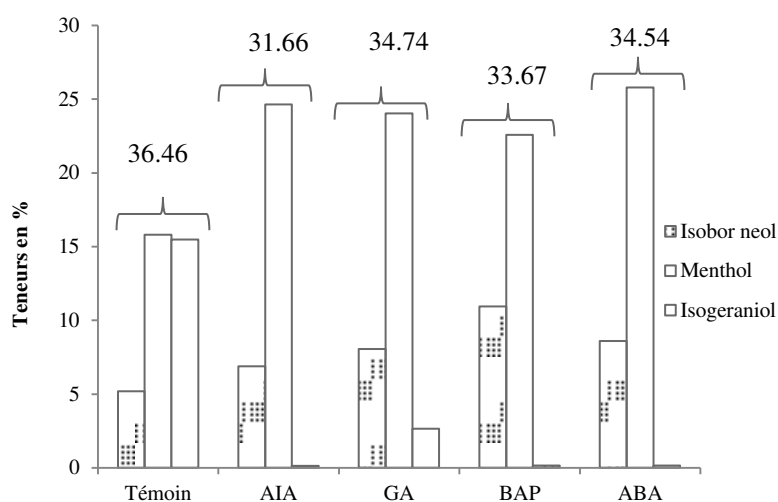


Figure 50: Variation des teneurs en isoborneol, menthol et isogeraniol après traitements par des phytohormones

Les phytohormones peuvent exercer une variation qualitative très importante sans influencés sur les teneurs totales (figure 50), à titre d'exemple on assiste à une variation des teneurs des trois molécules (isobornéol, menthol et isogéraniol) dans les environs de 32% à 36%, pourtant on remarque AIA, BAP et ABA ont engendré une presque disparition d'isogéraniol.

Qualitativement : la famille des sesquiterpènes hydrocarbonés domine avec une forte hétérogénéité (26 molécules) avec une balance d'apparition et/ou disparition de certaines molécules selon le traitement hormonal utilisé. Chez les plantes témoins, nous avons identifié 22 molécules. Par ailleurs chez AIA et BAP 24 molécules ont été identifiées et 23 chez la

BAP et ABA. On remarque l'apparition d' α -copoene chez les plantes traitées par AG₃ et BAP, β -cubebene chez tous les traitements et l' α -calacorene chez AG₃, BAP et ABA. On assiste en outre à la disparition d'autres molécules, germacrene dans tous les traitements, calarene chez les plantes traitées par BAP, deshydro-aromadendene et junipen chez les plantes traitées par AG₃.

Les monoterpènes oxygénés présentent la 2^e famille sur le plan qualitatif, avec 14 molécules dont certaines disparaissent et/ou apparaissent selon le traitement appliqué. L'apparition de Cineole chez les plantes traitées par AIA, AG₃ et BAP ; l'isomenthol chez les traitements par AG₃, BAP et ABA ; citronellal chez tous les traitements et le cis-limonene oxide chez AIA, BAP et ABA. En outre, on remarque la disparition de α -thujone chez les plantes traitées par AIA et la disparition du trans-anéthole chez tous les traitements hormonaux.

Les monoterpènes hydrocarbonés occupent la 3^e plus importante famille, avec 13 molécules fortement influencées par les traitements. On assiste à l'apparition de cis-sabinène et cis-ocimène chez les plantes traitées par AG₃, BAP et ABA. Par ailleurs, on remarque la disparition de Trans-ocimène et limonène quelque soit le traitement utilisé ; Cis-sabinène chez les plantes traitées par AG₃ ; Carène chez les plantes traitées par AIA ; naphtalène chez les plantes traitées par ABA et azulène chez les plantes traitées par BAP. Chez les sesquiterpènes oxygénés, on remarque l'apparition de trans-logipinocarveol après les traitements par les phytohormones, ainsi que la disparition d'oxyde ledène chez les plantes traitées par AIA, BAP et ABA.

III. Discussion

L'influence des phytohormones sur la croissance végétative des plantes n'est plus à démontrer puisqu'il est devenu évident que l'AG₃ et l'AIA stimulent la croissance alors que la BAP ne montre aucune influence sur la longueur des plantes. L'ABA par contre entraine l'inhibition de la croissance. Ces effets sont retrouvés sur nos plantes de basilic puisqu'on constate une augmentation significative de la longueur des parties aériennes et souterraines des plantes après application de l'AIA et de l'AG₃. La BAP par contre ne montre pas de différence de croissance par rapport au témoin. Néanmoins, les différents travaux ne sont pas tous d'accord quant à l'influence des phytohormones sur les teneurs en chlorophylles ; dans nos travaux nous avons constaté que l'AG₃ entraine une diminution significative des teneurs en pigments chlorophylliens alors que la BAP n'a aucune influence sur les teneurs en chlorophylles. Par contre, l'AIA agit différemment selon la plante, il entraine une diminution des teneurs en

chlorophylles chez *Salvia*, mais ne joue aucun rôle chez les autres plantes. Il faut noter également que l'ABA entraîne une légère baisse des teneurs en chlorophylles chez *Pelargonium*. Ces résultats sont confirmés par ceux de Cherepneva *et al.*, 1998, An Misra et Uc Biswal 1980 qui ont montré que l'AIA et la kinétine inhibent la dégradation de la chlorophylle alors l'AG₃ stimule la dégradation des pigments pendant la croissance des plantes de blé à la différence de son action d'inhibitrice de la sénescence des chloroplastes isolés. Par contre, Giannakoula *et al.*, (2012) ont montré une influence très significative de phytohormones (AG₃, AIA et BAP) sur la croissance des plantes de lentille (*Lens culinaris*) ainsi que sur leurs teneurs en composés phénoliques : l'AG₃ engendre une augmentation de croissance d'environ 43% alors que la BAP entraîne une diminution de la croissance de 26%. Selon les mêmes auteurs, les traitements par AIA, AG₃ et BAP n'ont pas une influence significative sur les teneurs en chlorophylles.

La proline est un indicateur très important sur l'état physiologique de la plante. Chez nos plantes, on constate que la proline est principalement synthétisée dans les parties aériennes. Ces teneurs sont faibles dans les feuilles et les racines chez *O. gratissimum*, plus élevées chez *Salvia officinalis*, alors que chez *Pelargonium sp.*, on constate que les parties aériennes et racinaires accumulent des quantités très élevées en proline.

Par ailleurs, quelle que soit la plante, on constate que toutes les phytohormones entraînent une diminution des teneurs en proline par rapport aux témoins et cette diminution intéresse principalement les feuilles. Dans les racines, la diminution est souvent négligeable, voire même absente. Cette diminution est plus ou moins importante en fonction de la phytohormone utilisée, de sa concentration, de l'espèce végétale et même de l'organe.

La diminution des teneurs en proline rencontrée dans nos travaux sont en accord avec ceux de Kaya *et al.*, (2006) et de Alia and Gahiza *et al.*, (2007) qui ont enregistré une diminution des teneurs en proline après traitements par AG₃ chez des plantes de *Zea mays* et *Anabaena*. Par contre, ces résultats ne confirment pas ceux de Faizan *et al.*, (2012), qui ont enregistré une augmentation des teneurs en proline après une application de certaines phytohormones comme l'acide salicylique et putrescine, cette application est corrélée avec des conditions de sécheresse chez des plantes de *Brassica napus*. Les travaux de Tuna *et al.*, (2008) sur le maïs et ceux de Khan *et al.*, (2010b) sur le lin ont également montré une augmentation des teneurs en proline foliaire après application de l'AG₃ sous des conditions de stress salin. Selon ces

auteurs, l'augmentation des teneurs en azotes agissent d'une manière positive sur la synthèse des prolines ce qui influence sur l'ajustement osmotique chez ces plantes.

Par ailleurs, Rashmi *et al.*, (2011) ont enregistré des résultats similaires chez les plantes de *Bambusa arundinaceae*, puisqu'une application d'AIA à 10µM engendre une diminution des teneurs en proline, et cette diminution augmente avec l'application d'une concentration de 100µM. Par contre, l'application de la BAP à 10µM n'a aucune influence sur les teneurs en proline. Dans ce cas, c'est une concentration de 100µM qui engendre une diminution très importante en proline chez la même espèce et selon les mêmes auteurs.

Dans le cas de *Pelargonium*, nous avons constaté que contrairement aux autres phytohormones qui font baisser d'une manière importante les teneurs en prolines, l'ABA fait baisser également les teneurs en proline, mais d'une façon moins spectaculaire, c-à-d qu'il permet de rétablir des niveaux proches de ceux du témoin. McDonnell *et al.*, (1983) ont montré que l'application exogène d'ABA n'influence pas sur les teneurs en proline chez *Spinacia* et *Pennisetum*. Trotel (1999) a montré que l'ajout d'ABA exogène au milieu hypo-osmotique d'incubation des explants foliaires provoque l'inhibition de la mobilisation «apparente» de la proline, à condition que le «traitement hormonal» soit réalisé à la lumière. Aux conditions expérimentales retenues, la chute de la teneur en proline en situation hypo-osmotique, résulte à la fois de la stimulation du catabolisme et de la relaxation de la biosynthèse de cet acide aminé.

ABA influence sur les teneurs en proline d'une manière directe puisque la voie de signalisation dépend de niveau d'ABA, l'application exogène de ce dernier à une concentration qui varie entre 33 à 100µM stimule la synthèse de proline agissant sur le gène P5CS1 chez *Arabidopsis* Abrahám *et al.*, (2003).

Les auteurs qui ont indiqué que l'application exogène d'ABA augmente les teneurs en proline, ont reporté cette augmentation à l'assimilation d'azote et l'augmentation des teneurs de ces derniers, comme déjà discuté.

Les teneurs en composés phénoliques et en tanins condensés changent en fonction de la nature de la phytohormone ainsi que de l'espèce végétale. L'effet de l'AIA sur la synthèse des composés phénoliques diffère selon l'espèce : l'AIA n'a pas un effet notable sur les teneurs en composés phénoliques chez *salvia*, alors qu'il entraîne une diminution chez *O. gratissimum* et une augmentation chez *Pelargonium*. L'AG₃ entraîne par contre une diminution des teneurs en

CPT chez *O. gratissimum* et chez *Pelargonium* et n'a pas d'effet sur *Salvia*. La BAP entraîne une augmentation des teneurs en CPT chez *Salvia* et chez *Pelargonium* et n'a pas d'effet sur *O. gratissimum*. Les TC suivent en gros les mêmes évolutions que les CPT

On constate selon ces résultats que l'influence des phytohormones sur la synthèse des CPT et des TC varie en fonction de la plante. De nombreux auteurs ont montré qu'il existe une relation entre les phytohormones et les composés phénoliques Marigo et Boudet, (1975). D'autres Marigo et Boudet (1978) ont montré que les teneurs en composés phénoliques sont directement liées aux teneurs en phytohormones par des phénomènes d'antagonismes. En outre, certains travaux ont montré que les composés phénoliques sont impliqués dans les phénomènes liés à la croissance des plantes et peuvent agir sur l'élongation des cellules manifestant dans les phénomènes de synergie (Aberg, 1969) ou d'antagonisme (Nitsch et Nitsch 1962, Aberg et Johansson 1969).

Giannakoula *et al.*, (2012) dans des travaux réalisés sur les lentilles (*Lens culinaris*) ont démontré une influence très significative de phytohormones (AG₃, AIA et BAP) sur la croissance ainsi sur les teneurs en composés phénoliques. Selon ces travaux, l'AG₃ engendre une augmentation de croissance d'environ 43% alors que la BAP fait diminuer la croissance en longueur de 26%. Selon ces travaux, la BAP augmente la rutine, l'acide gallique et les épicatechines (de 93%, 79% et 49%, respectivement), l'AG₃ fait augmenter ces teneurs légèrement et l'AIA entraîne une diminution des teneurs en composés phénoliques totaux. Par ailleurs, ces trois phytohormones agissent positivement sur les teneurs en acide gallique.

Différents mécanismes biochimiques peuvent être proposés pour expliquer les effets des phytohormones sur les composés phénoliques. Ces mécanismes sont basés sur la nature de la phytohormone (inhibitrice ou stimulatrice) et sa concentration (Demoss *et al.*, 1975).

Influence des phytohormones sur les teneurs et la composition des huiles essentielles

Chez le basilic (*Ocimum gratissimum* L), le rendement en huiles essentielles se situe aux alentours de 0,22%, une valeur similaire à celle trouvée chez *Ocimum basilicum* L de l'Égypte (0,213%) (Salah et Mahmoud, 1996), mais qui est plus faible que celle retrouvée chez *O.basilicum* L de Turquie (Telci *et al.*,2006) et d'Iran (Ebrahim S, 2006) qui ont enregistré une valeur proche de 0,5%.

Par ailleurs, *O.gratissimum* L se caractérise par le méthyle chavicol comme composé majoritaire avec une teneur de 85.26%, une valeur supérieure à celle *Ocimum basilicum* L de

l’Egypte (Salah et Mahmoud, 1996) et celle d’Iran (Ebrahim S, 2006) et du Moyen-Orient (Werker *et al.*, 1992) qui varient de 48% à 75%. Par contre, cette valeur est presque similaire à celle des îles Comores dont les teneurs varient entre 74% et 84% (Randriamiharisoa *et al.*, 1986).

Les plantes de *Salvia officinalis* se caractérisent par un rendement en huile essentielle largement supérieure à celui du basilic. Ce rendement peut atteindre 1.6%, avec comme composés majoritaires le naphthalenone, camphorquinone et 1,8-Cineole. Ce rendement est supérieur à celui enregistré chez la sauge algérienne qui atteint 1.2%. Cette différence concerne les teneurs, mais également la composition puisque cette dernière est riche en 1.8 cinéol et en carvacrol (Kheyyar.N *et al.*, 2014). Chez *Salvia officinalis* variété Regula cultivée à Arbaz et à Butzberg en Suisse, ces teneurs se situent entre les 1.7% et 2.39%, ces rendements dépendent de la nature d’organe (feuille ou tige) ainsi que de l’âge des plantes (Carlen *et al.*, 2006).

Chez *Pelargonium sp.*, le rendement en huile essentielle atteint 0.7% et possède comme molécules majoritaires le menthol, l’isogéraniol, l’eremophilene, le menthène et l’isoborneol. Ce rendement est supérieur à celui de la variété algérienne (0.3%) et celui d’Egypte U.A. Dasuki (2002). Ces variétés possèdent comme composés majoritaires le citronellol et géraniol avec des teneurs qui varient entre 29% et 9% chez la variété Egyptienne et de 33% et 5% chez la variété algérienne respectivement. Le rendement en huile essentielle des *pelargonium* change en fonction des conditions climatiques, de l’âge des plantes ainsi que la variété, et il peut atteindre 1.4% (Dasuki, 2002, Angadi *et al.*, 1995).

Les traitements des plantes avec les phytohormones influencent fortement les rendements et les compositions chimiques des huiles essentielles. Ces effets varient en fonction de la plante et de la nature des substances hormonales utilisées ainsi que de leurs concentrations. Cependant, on constate que l’AG₃ entraîne généralement une diminution des rendements alors que la BAP entraîne une augmentation. L’AIA réagit différemment selon les plantes ; il entraîne une augmentation chez le basilic et chez *Pelargonium* et une diminution chez *Salvia*.

L’AG₃ entraîne une diminution du rendement des huiles essentielles *O.gratissimum* L. et une variation dans la composition de ces huiles. Ces résultats sont confirmés par ceux du Salah et Mahmoud (1996) qui ont montré que l’application d’AG₃ sur les plantes de basilic *O.basilicum* entraîne une diminution du rendement en huiles essentielles. Cette variation est

accompagnée par une diminution de la teneur en méthyle chavicol et une augmentation de l'Eucalyptol.

Chez *Salvia officinalis* L., l'AG₃ agit de la même manière, puisqu'on remarque une diminution des teneurs en huiles essentielles. Ces résultats sont en désaccord avec les travaux de Poyh et Ono (2006) qui ont noté une augmentation du rendement en HE après une pulvérisation d'AG₃ (100mg/L), cette augmentation est accompagnée par une diminution de composé majoritaire α -thujon. Dans la même voie, on remarque que chez les plantes de *pelargonium*, l'AG₃ engendre une très faible diminution du rendement en huiles essentielles. Ces résultats ont été confirmés chez d'autres espèces comme *Thymus vulgaris* L. (Reda *et al.*, 2005) qui ont enregistré une augmentation du rendement en huiles essentielles après application d'AG₃.

L'AIA entraîne une augmentation du rendement en huiles essentielles d'*O.gratissimum* L qui passe de 0,22% à 0,3%, sans changement notable ni dans la teneur en composés majoritaires ni dans la composition chimique des huiles essentielles. Chez les plantes de *Salvia officinalis* l'AIA entraîne une diminution des teneurs en huiles essentielles qui passe de 1.6% à 1.4%. Par ailleurs chez *Pelargonium sp*, l'AIA engendre une augmentation du rendement en huile essentielle qui passe de 0.7% à 0.9%, résultat similaire à celui de basilic.

Ces résultats sont confirmés par ceux trouvés dans la littérature : Salah et Mahmoud (1996) ont montré que l'application de l'AIA fait augmenter légèrement le rendement en huiles *O.basilicum* L, cette variation est accompagnée par une faible variation en méthyle chavicol. La même constatation a été réalisée sur *Melissa officinalis* L (Shukla et Farooqi1990), et sur *thymus vulgaris* L. (Affonso *et al.*, 2009). Ces derniers ont par contre observé une très importante augmentation du composé majoritaire (Thymol 315%) sans variation qualitative de l'Huile essentielle.

En ce qui concerne la BAP, on constate que cette phytohormone engendre une augmentation du rendement en huile essentielle chez les trois espèces végétales. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs auteurs chez d'autres espèces. El-Keltawi et Croteau (1987) ont enregistré une augmentation du rendement en huile essentielle chez *Salvia officinalis* après traitement par la BAP. De même chez d'autres espèces comme *Lavandula dentata* L (Oudin *et al.*, 2007), *Thymus mastichina* L, (Fraternale *et al.*,2003), *Mentha piperita*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *Lavandula vera* (El-Keltawiet Croteau, 1987), *Cymbopogon citratus* L. (Craveiro *et al.*, 1989)

Ce changement du rendement des HE chez les plantes *O.gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp* après traitement par les phytohormones peut être expliqué par une modification de la surface foliaire et par la densité des glandes sécrétrices par feuilles. Ceci suggère une éventuelle influence des phytohormones sur la formation et le développement des glandes de sécrétions des huiles essentielles : Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Scravoni *et al.*, (2006) qui ont constaté une augmentation de la masse sèche chez des plantes de *Mentha piperita* L. traitées par la BAP à 50mg/L, et de ceux de Fraternali *et al.*, (2003) qui ont enregistré une augmentation du rendement en huile essentielle chez *Thymus mastichina* après traitement par benzyladénine à une concentration de 0,1 mg L⁻¹. Selon ce dernier auteur, l'effet de l'application de la benzyladénine entraîne une augmentation de la densité de ces glandes au niveau des feuilles, et cette augmentation consiste principalement en des glandes en stade de sécrétion plutôt que des glandes en postes sécrétion. Selon Poyh et Ono (2006) l'augmentation du rendement en huile essentielle chez *Salvia officinalis* est due à l'augmentation du nombre de feuilles et à l'activation de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse des terpénoides. El-Keltawi et Croteau (1987) ont suggéré que les cytokinines stimulent le métabolisme et l'accumulation des huiles essentielles et spécifiquement les monoterpènes chez *Mentha piperita* L, *M. spicata* L et *Salvia officinalis* L.

Par ailleurs, on constate que les phytohormones influencent également fortement la composition des huiles essentielles. Des changements dans les teneurs en certaines molécules ont été enregistrés suite à l'utilisation des phytohormones entraînant par la même occasion des changements dans les teneurs en différentes familles. Des résultats analogues ont été signalés par d'autres auteurs : Craveiro *et al.* (1989) et Prins *et al.*, (2010) ont indiqué que le traitement de *Cymbopogon citratus* par BAP engendre une augmentation des teneurs en monoterpènes de 9 à 93%. Arikat *et al.*, (2004) ont rapporté l'augmentation des teneurs en certaines molécules comme (α -pinene, 1,8-cineole, camphor and borneol) chez *Salvia fruticosa* Mill, à l'augmentation des teneurs en BAP endogènes. Chez *Salvia officinalis*, le traitement par AG3 (100mg/l) engendre une diminution significative de β -tujone et α -humulene par rapport aux plantes non traitées.

Influence des phytohormones sur les deux isomères méthyl chavicol et trans-anéthole

Les huiles essentielles d'*O.gratissimum* sont caractérisées par le méthyl chavicol comme chémotype, avec la présence de son isomère (t-anéthole). Nous avons remarqué que

l'augmentation des teneurs en ces composés majoritaires (méthyl chavicol et trans-anéthole) s'accompagne d'une diminution des composés secondaires et inversement, particulièrement chez les plantes traitées par l'AG₃ qui montrent une baisse importante des composés majoritaires et l'augmentation des composés secondaires. Ceci peut être expliqué par les voies métaboliques des plantes qui changent avec l'application du traitement engendrant ainsi l'apparition de nouvelles molécules et/ou la disparition de molécules préexistantes. Ces constatations confirment les travaux de *Kim et al.*, (2006), *Li et al.*, (2007) et *Erbilgin et al.*, (2006) qui ont remarqué que les monoterpènes de *Ocimum basilicum* et *Lavendula dentata* sont très influencés par les traitements hormonaux suite à la régulation des gènes qui entraînent une augmentation du nombre des enzymes liées aux voies métaboliques de ces composés.

Par ailleurs, ces deux isomères ne diffèrent que par la double liaison de la chaîne propénylique, et nous pouvons trouver cet isomère naturel dans l'HE de nombreuses plantes, estragon (*Artemisia dracunculus* L), basilic (*Ocimum basilicum* L) et (*Foeniculum vulgare*) (Gross *et al.*, 2002), mais avec des teneurs différentes. Cette différence est due principalement au complexe enzymatique (O-méthyle transférase), qui utilise comme substrat le chavicol et trans-anol pour produire respectivement le méthyl chavicol et trans-anéthole (fig.5) (Lewinshon *et al.*, 2000, Gross *et al.*, 2002).

Nos résultats montrent que ces deux isomères évoluent de manière opposée : l'augmentation d'une molécule fait baisser son isomère et inversement (Tableau 8). Cette évolution de la teneur des deux isomères et l'absence de trans-anol laissent supposer que chez *O.gratissimum* L, la voie de la synthèse de trans-anéthole passe par l'isomérisation directe du méthyl chavicol (fig.51) probablement par un complexe enzymatique et non pas par la transformation de trans-anol comme déjà suggéré par M.Gross *et al* (2002). In vitro la catalyse de cette réaction est possible et très utilisée dans l'industrie alimentaire (Kishore, Kannan 2006, Sharma *et al.* 2005).

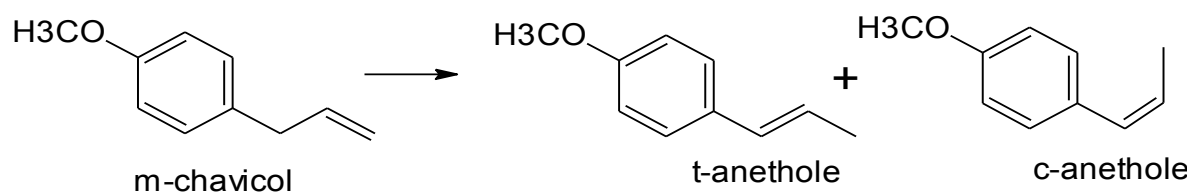


Figure 51 : Isomérisation de chavicol en anéthole selon D. Kishore, S. Kannan (2006)

(a)

(b)

(c)

(d)

Figure 52 : Chromatogrammes des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* L extraites de plantes témoins (a) et après application de l'AG₃ (b) de l'AIA (c) et de la BAP (d)

Les faibles teneurs en cis anéthol rencontrées dans nos extraits peuvent être attribuées à l'instabilité de cette configuration (cis). Chez les plantes traitées par l'AG₃ (figure 52 et tableau 8 p105), l'augmentation importante des teneurs en t-anéthole laisse par ailleurs supposer que cette phytohormone agit sur le complexe enzymatique responsable de l'isomérisation de m-chavicol en t-anéthole.

Conclusion

L'application exogène des phytohormones engendre des variations significatives des paramètres morphologiques et biochimiques, et ceci en fonction l'espèce végétale mais également en fonction de la nature de la phytohormone et sa concentration.

Chez les trois espèces étudiées, l'AG₃ entraîne une diminution des teneurs en chlorophylles. Par ailleurs, on assiste à une diminution des teneurs en prolines après applications d'AIA, d'AG₃ et de BAP.

Le dosage de composés phénoliques montre que la BAP engendre une augmentation de ces molécules chez le basilic et chez Salvia alors que chez pélargonium, c'est l'AIA qui donne les résultats les plus prononcés.

Les observations microscopiques montrent que la BAP entraîne une augmentation de la densité des glandes de sécrétion des huiles essentielles ce qui influence sur le rendement en huiles chez les trois plantes.

La composition des huiles essentielles montre des variations qualitatives et quantitatives après traitements par les différentes phytohormones avec un phénomène d'isomérisation du m-chavicol en t-anéthole chez le basilic après traitement avec l'AG₃. Ce dernier ayant une influence importante sur le complexe enzymatique responsable de cette réaction.

Chapitre 6

**Effet des champignons mycorhiziens arbusculaires et
du stress hydrique sur les trichomes glandulaires et
sur la synthèse des huiles essentielles chez *Ocimum
gratissimum* L**

Effet des champignons mycorhiziens arbusculaires et du stress hydrique sur les trichomes glandulaires et sur la synthèse des huiles essentielles chez *Ocimum gratissimum* L

I. Introduction :

La plupart des organismes contiennent plus que 60% d'eau et les réactions chimiques qui permettent la vie se font dans des solutions aqueuses. Le problème de dessiccation a été l'un des principaux obstacles que les plantes ont rencontré sur terre depuis l'éternité. Il affecte la morphologie ainsi que la physiologie et la biochimie des plantes. L'incapacité des végétaux à se déplacer ouvre la voie sur d'autres modes d'adaptation pour remédier à ces aléas climatiques, la mycorhization représente une stratégie d'adaptation développée par les plantes pour les aider à supporter ces conditions défavorables. Ces associations ont permis la constitution d'un sol plus résistant aux intempéries ; ayant la capacité de mieux stocker l'eau, tout en améliorant la résistance des plantes au stress (hydrique, froid, manque d'azote ...).

Le sol en général se caractérise par une forte hétérogénéité de microflore ce qui influence sur la relation entre les champignons mycorhiziens et les Rhizobiums, d'une part selon la nature des espèces de champignons considérées et d'autre part en fonction de la variété de la plante hôte. Selon cette dernière, les champignons peuvent présenter un mode de vie symbiotique, parasitaire ou indifférent. De même, selon la nature des microorganismes impliqués dans l'association (bactéries et champignons), ils peuvent avoir un effet bénéfique sur la croissance de la plante hôte. Il est signalé à cet effet une amélioration de la disponibilité et l'assimilation du phosphore, la protection contre certains pathogènes et la tolérance des plantes hôtes à la sécheresse et à la salinité.

Par ailleurs, il a été aussi signalé une synergie, un antagonisme ou une absence d'interaction entre les souches de la population indigène et les espèces de champignons mycorhiziens.

Dans cet objectif, nous avons étudié l'influence des champignons mycorhiziens (*Glomus intraradices*) et du stress hydrique sur la croissance, le rendement en huiles essentielles ainsi que sur la structure et la morphologie des glandes sécrétrices chez une plante médicinale et aromatique connue au Maroc par sa saveur, le basilic (*Ocimum gratissimum* L).

II. Résultats

1. Effet de la colonisation mycorhizienne sur la morphologie et la physiologie d'*Ocimum gratissimum*

1.1. Colonisation mycorhizienne

Tableau 11: Effet du stress hydrique sur la colonisation mycorhizienne du basilic

Colonisation mycorhizienne	NS	S
Fréquence mycorhizienne (F%)	78,5	77,3
Intensité mycorhizienne (M%)	35	32
richesse en arbuscules (A%)	20	17

Le tableau 11 montre la colonisation mycorhizienne des plantes de basilic soumises à une irrigation continue (NS) et à un stress hydrique (S) après révélation par le bleu de trypan. Cette colonisation, estimée par la fréquence mycorhizienne (F%), l'intensité mycorhizienne (M%) et la richesse en arbuscules (A%) ne montre pas de différences significatives entre les plantes stressées et les plantes non stressées. Par contre, les plantes témoins qui ont été cultivées dans un sol stérilisé ne montrent aucune colonisation mycorhizienne.

1.2. Effet de la mycorhization et du stress hydrique sur la croissance et sur les teneurs en eau d'*O. gratissimum* L

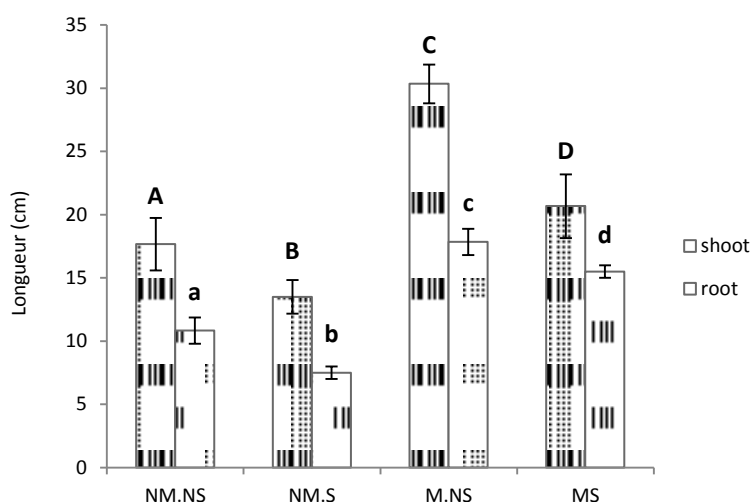


Figure 53 : Longueur des plantes de basilic (*O. gratissimum* L) inoculées par *Glomus intraradices* (M) ou non (NM) sous des conditions de stress hydrique (S) ou non (NS). Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

L'élongation des parties aériennes et racinaires des plantes de basilic est influencée d'une manière significative par la mycorhization et le stress, avec un maximum de croissance

enregistré chez les plantes MNS. Par contre, nous constatons que le stress hydrique inhibe la croissance de ces deux parties principalement chez les plantes NM (fig.53). Chez les plantes mycorhizées stressées, le déficit de l'alimentation hydrique est compensé par la mycorhization puisqu'on observe une augmentation de la longueur des parties aériennes et racinaires de la plante.

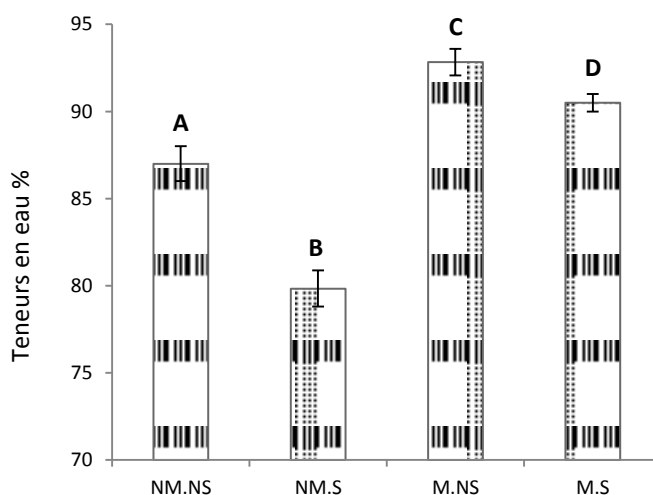


Figure 54: Teneurs en eau des plantes de basilic (*O. gratissimum* L) inoculées par *Glomus intraradices* (M) ou non (NM) sous des conditions de stress hydrique (S) ou non (NS). Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

Les mesures des teneurs en eau au niveau des feuilles des plantes de basilic montrent des variations significatives (figure 54) : chez les plantes MNS, la mycorhization augmente les teneurs en eau à une valeur qui peut atteindre 93%. Les plantes non mycorhizées ont enregistré les teneurs les plus basses avec une diminution très importante enregistrée chez les plantes NMS (81%). Chez les plantes MS, on constate des teneurs en eau assez élevées (91%) qui reflètent le rôle des champignons mycorhizien à supporter le déficit hydrique chez les plantes stressées.

1.3 Effet de la mycorhization et du stress hydrique sur les teneurs en pigments chlorophylliens

La photosynthèse estimée par les teneurs des plantes en pigments chlorophylliens montre des variations significatives, puisqu'en absence du stress hydrique, la teneur en chlorophylle (Cha+Chb) est plus élevée de presque 10% chez les plantes mycorhizées (2,59 mg/g MF) que chez les plantes témoins (NM) (2,36mg/g MF). Cette teneur est réduite par le stress hydrique,

spécifiquement chez les plantes NM puisqu'on a enregistré une diminution de 53% de chlorophylles, mais reste plus élevée chez les plantes M. Par ailleurs, lorsque on compare les teneurs de ces pigments entre les plantes NM.S et MS on constate que les plantes mycorhizées accumulent 73% de chlorophylles de plus (figure 55).

Les mêmes constatations peuvent être faites quant au rapport Chla / Chlb. En absence de stress hydrique, ce rapport est plus élevé dans les plantes mycorhizées que dans les plantes NM et diminue en cas de stress.

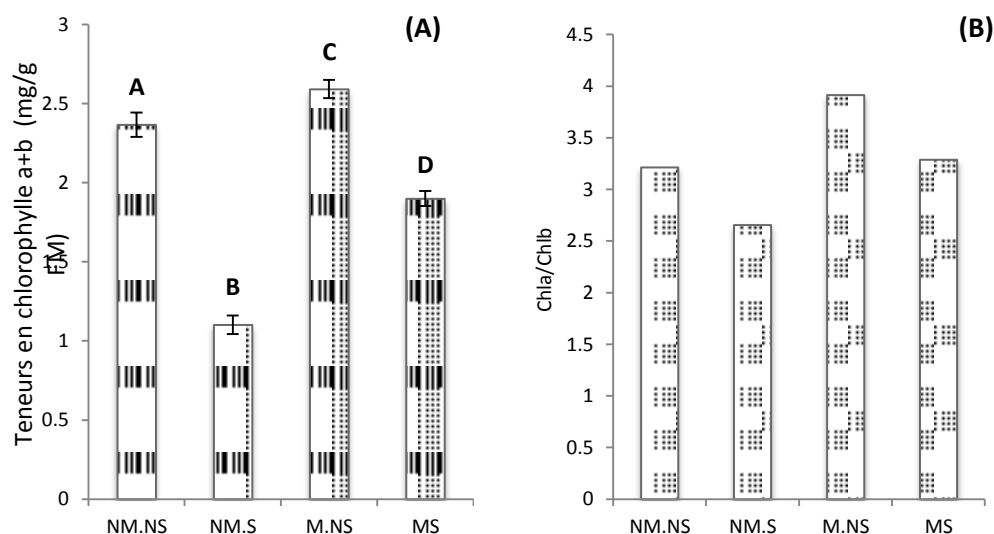


Figure 55: Teneurs en chlorophylles, Ca + Cb en (mg / g MF) (A) et Ca / Cb (B) chez les plantes de basilic (*O. gratissimum* L) inoculées par *Glomus intraradices*(M) ou non (NM) sous des conditions de stress hydrique (S) ou non (NS). Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

1.4 Effet de la mycorhization et du stress hydrique sur les teneurs en proline

Les teneurs en proline varient d'une manière significative au cours de la croissance, soit en conditions de mycorhization ou bien de stress. (Figure 56). Avec le stress hydrique, les teneurs en proline augmentent significativement et cette augmentation est plus prononcée chez les plantes NM que chez les plantes M (55µg/g et 41µg/g respectivement).

Au niveau des parties radiculaires, la proline montre la même tendance d'accumulation que pour les parties aériennes. Ainsi, les teneurs en proline sont comparables chez les plantes non stressées qu'elles soient inoculées ou non, alors que le manque d'eau entraîne une augmentation de la synthèse de la proline principalement chez les plantes non mycorhizées 31µg/g MF (Figure 56).

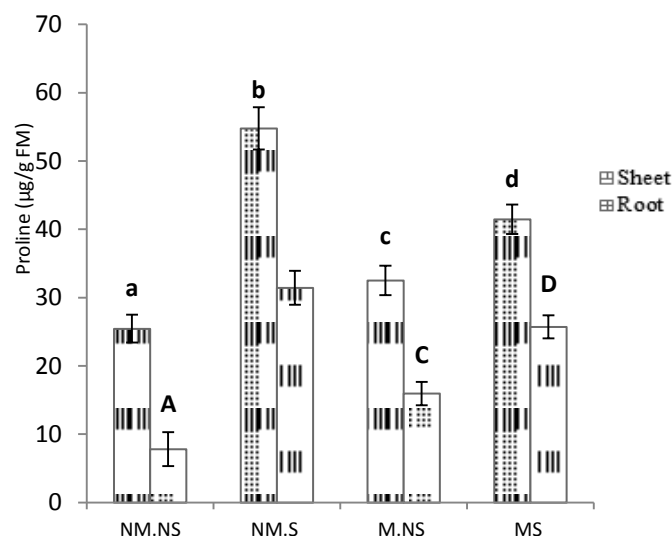


Figure 56 : Teneurs en proline des plantes de basilic (*O. gratissimum* L.) inoculées par *Glomus intraradices* (M) ou non (NM) sous des conditions de stress hydrique (S) ou non (NS). Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

1.5 Effet de la mycorhization et du stress hydrique sur les teneurs en composés phénoliques

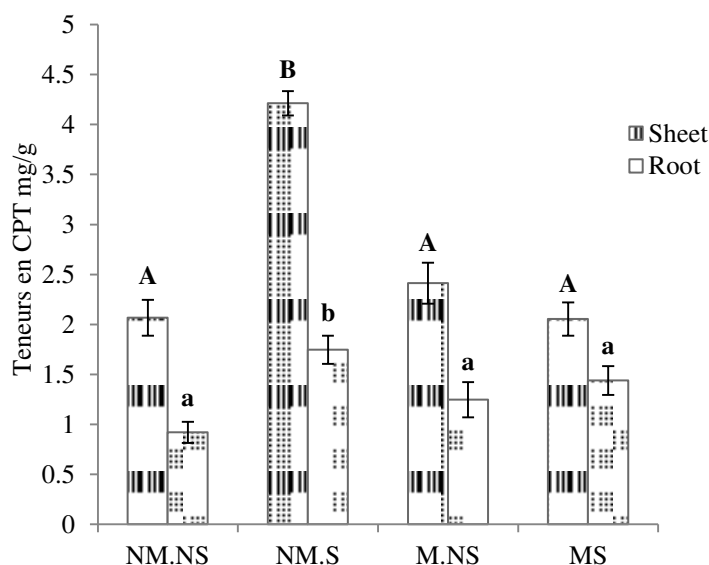


Figure 57 : Teneurs en composés phénoliques totaux chez (*O. gratissimum* L.) inoculées par *Glomus intraradices* (M) ou non (NM) sous des conditions de stress hydrique (S) ou non (NS). Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

En condition de non-stress, le contenu en phénols totaux des parties aériennes des plantes de basilic est presque identique chez les plantes M (2.5 mg/g MF) et NM (2.1 mg/g MF) (Fig. 5). En cas de stress hydrique, on constate que la synthèse des CP augmente significativement, chez les plantes non mycorhizées (4.3 mg/g MF) alors que chez les plantes mycorhizées, ces

teneurs ne changent pratiquement pas, et restent similaire à celles de NS (2.3 mg/g MF) (Fig. 57). Dans les racines, on remarque la même tendance, puisque les plantes NMS accumulent plus de composés phénoliques. Cette augmentation est significative et diffère des autres traitements. Par ailleurs, les plantes MS enregistrent des teneurs normales ce qui reflète l'importance des AMF dans la compensation du déficit hydrique.

2. Influence de la mycorhization sur la structure des trichomes glandulaires chez *Ocimum gratissimum*

Figure 58: observation en microscopie photonique de glandes sécrétrices de la face ventrale des feuilles d'*Ocimum gratissimum* NM.NS (a), NM.S (b), MNS(c) et MS(d) G ×400

Les observations en microscopie photonique de la face ventrale de feuilles d'*Ocimum gratissimum* ayant subi un stress hydrique et inoculé par *Glomus intraradices* montrent des structures glandulaires présentant des différences importantes quant à la taille, la structure et la couleur : Les plantes non stressées, mycorhizées ou non, présentent des glandes de grande taille ayant une forme gonflée et de couleur verdâtre (fig.58a et 58c). Par contre, les plantes

stressées présentent des glandes ayant une coloration rougeâtre (fig.58b et 58d) avec une structure de petite taille et un aspect dégonflé pour les plantes NM (fig.58b).

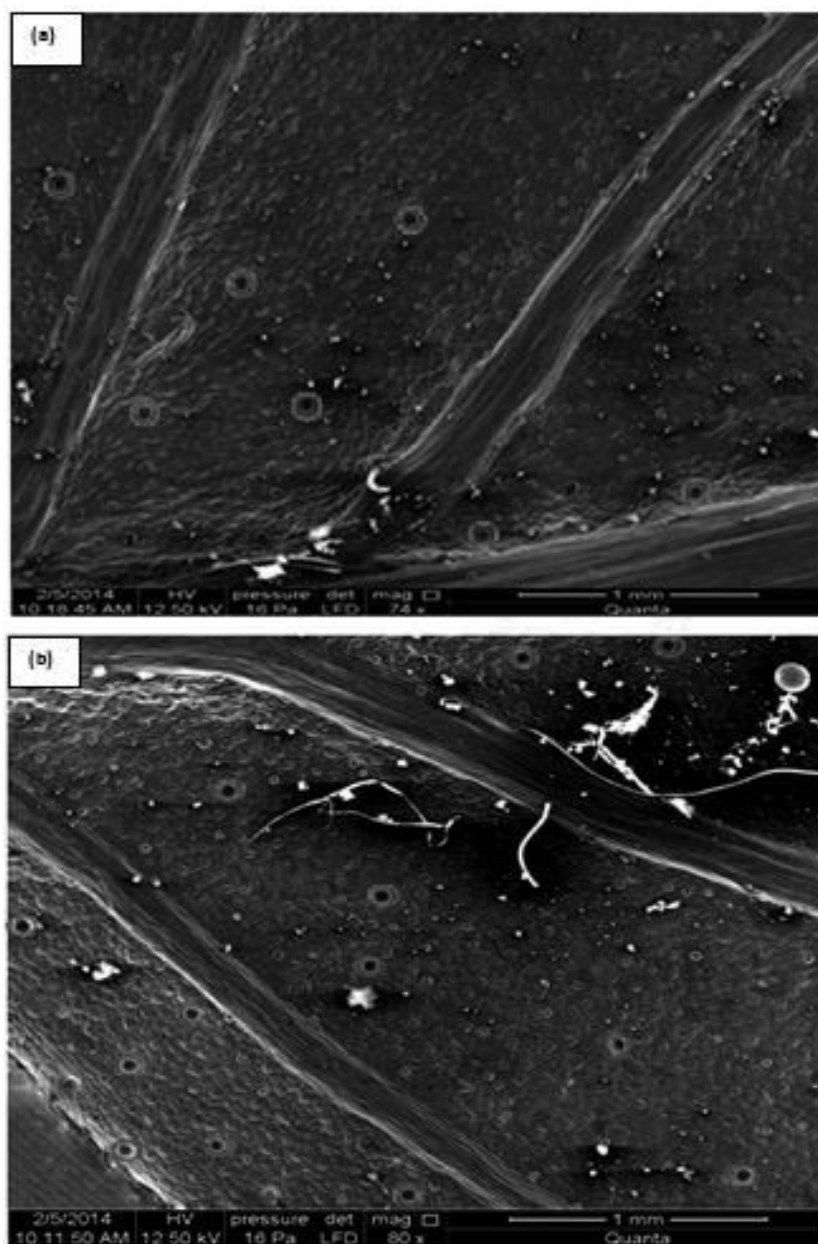


Figure 59 : Observations en microscopie électronique à balayage environnementale montrant l'abondance des glandes sécrétrices des huiles essentielles au niveau de la partie basale d'une plante d'*Ocimum gratissimum* non stressée : (a) non mycorhizée, (b) mycorhizée

Les observations en microscopie électronique à balayage environnemental de la partie basale des feuilles de *plantes non stressées* (fig.59) montrent une augmentation du nombre de ces glandes chez les plantes M (fig.59b) par rapport aux plantes NM (fig.59a). Cette augmentation influence directement sur la synthèse et la quantité des terpénoides stockés.

Figure 60: observation en microscope électronique à balayage environnemental de la partie centrale de feuilles d'*Ocimum gratissimum* NM.NS (a), NM.S(b), M.NS (c) et MS (d)

Les résultats obtenus en microscopie photonique sont confirmés par les observations en microscopie électronique à balayage environnemental (fig.60). La Mycorhization entraine une augmentation importante de la taille de ces glandes (fig 60c et 60d), alors que les plantes non mycorhizées ont des glandes de petite taille et ceci quel que soit le niveau d'hydratation de la plante (fig.60a et 60b). Le stress hydrique entraine en outre un dégonflement de ces glandes avec un aspect plus ou moins plissé principalement chez les plantes mycorhizées. Ce dégonflement laisse apparaitre à la surface de l'épiderme une excavation glandulaire dont le diamètre atteint le diamètre d'une cavité glandulaire gonflée d'une feuille non stressée (entre 75µm et 78µm) (fig.61).

D'après cette définition, on peut déduire que c'est la taille de la cavité extracellulaire qui a été affectée par le stress chez les plantes NM (Figure 61, région α) et non plus la taille de la

glande entière (figure, région β), puisque le diamètre du cercle qui entoure la cavité ne varie pas entre les plantes non stressées et stressées (fig.61 région β) (entre 75 μ m et 78 μ m).

Figure 61: comparaison du diamètre de l'excavation glandulaire chez une plante NM.S et son diamètre potentiel en cas de gonflement de la cavité

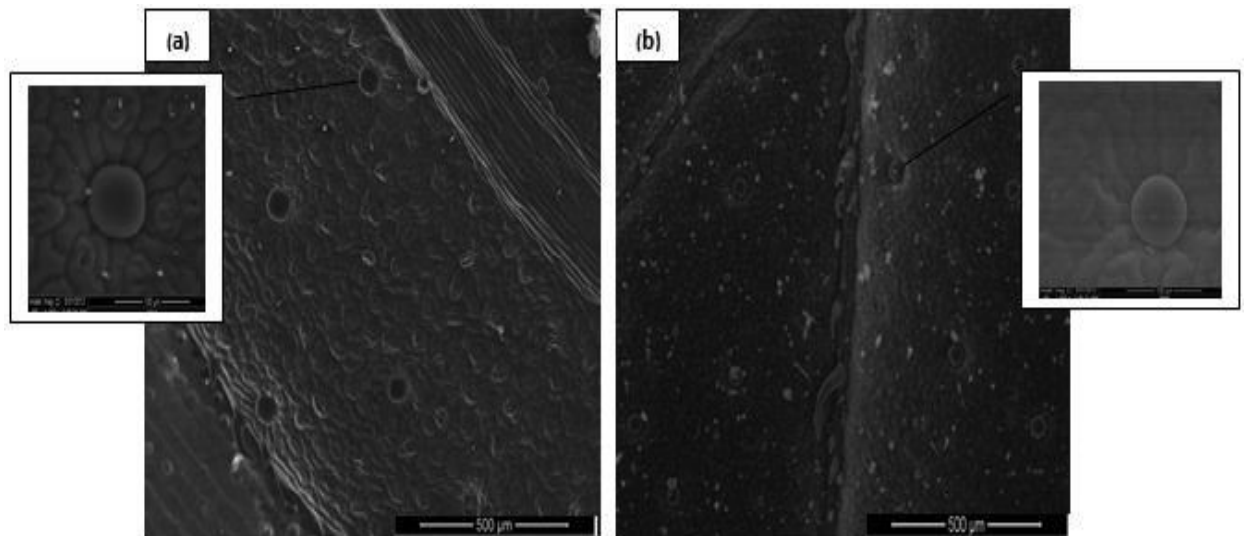


Figure 62 : Structure des glandes des parties basale (a) et apicale (b) d'une plante d'*Ocimum gratissimum* mycorhizée non stressée (MNS)

Figure 63 : variation structurale des glandes entre la partie basale (a) et la partie apicale(b) d'une plante d'*Ocimum gratissimum* non mycorhizée stressée (NMS)

En outre, la figure 62 montre la localisation des glandes au niveau de la région basale (a) et de la région apicale (b) d'une feuille de basilic cultivée dans des conditions optimales c'est-à-dire plante mycorhizée non stressée. On constate qu'il n'y a aucune différence en ce qui concerne la morphologie de ces glandes. Quelle que soit la zone, les glandes se présentent toujours sous forme gonflée. Par contre, lorsque la plante se retrouve dans des conditions de stress (plante non mycorhizée et stressée), on constate une différence structurale entre les glandes selon leur localisation dans la feuille : les glandes situées dans la partie basale présentent un aspect gonflé (fig.63a) alors que celles situées dans la partie apicale présentent un aspect dégonflé avec un diamètre de 58µm et laissant une excavation d'un diamètre très important (fig.61) qui peut atteindre 80 µm ou plus. Cette différence entre les deux parties de la feuille peut s'expliquer par le fait que la région basale, étant plus proche de la tige, reçoit en premier l'eau et les éléments nutritifs contribuant à une alimentation adéquate des cellules de cette région et donc un équilibre hydrique plus ou moins normal des cellules, contrairement à l'autre partie de la feuille (apicale) qui ne reçoit que peu de ces éléments rendant ces parties très peu alimentées en eau ce qui entraîne une diminution du volume et un dégonflement des glandes. Notons qu'on ne constate pas de différence quant à la taille de ces glandes en fonction de leur localisation.

3. Variations des teneurs et de la composition des huiles essentielles chez le basilic (*O. gratissimum*) sous des conditions de mycorhization et de stress hydrique

Table 12: Teneurs en huile essentielle chez les plantes de basilic (*O. gratissimum* L) inoculées par (*Glomus intraradices*) (M) ou non (NM) et soumises au stress hydrique (S) ou non (NS). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque traitement.

Le rendement en huiles essentielles est fortement influencé par la mycorhization puisqu'on constate une synthèse plus importante aussi bien en cas de stress qu'en cas d'irrigation. Cette augmentation atteint des valeurs pouvant aller jusqu'à 37,5 % de plus que celles retrouvées chez les plantes non mycorhizées (tableau 12). Par ailleurs, le stress hydrique ne montre pas une influence significative sur la synthèse des HE puisqu'on ne remarque qu'une légère augmentation des teneurs en ces huiles. En outre, le traitement combiné (stress et mycorhysation) peut augmenter le rendement d'environ 50% de plus par rapport aux plantes

NM.NS. Ces résultats peuvent être confirmés par l'augmentation du nombre et de la taille des glandes sécrétrices. Du point de vue composition, les huiles essentielles du basilic sont constituées par 3 catégories de molécules, Monoterpènes Hydrocarbonés, les monoterpènes oxygénés et les Sesquiterpènes.

Les monoterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés sont représentés chacun par une seule molécule Azulene et cubenol respectivement.

Les monoterpènes oxygénés présentent la famille majoritaire des huiles essentielles de basilic avec 5 molécules dont les teneurs varient entre 87 % chez les plantes NMS et un maximum de 97% chez les plantes M.NS. Le méthyle chavicol, molécule majoritaire de cette huile essentielle de basilic, représente des teneurs qui touchent un maximum de 93% chez les plantes MS et un minimum de 84% chez les plantes NM.S. Cependant, les teneurs de son isomère (t-anéthole) varie différemment selon les conditions de stress et de mycorhization ; le stress hydrique entraîne une diminution des teneurs de cette molécule (2%) chez les plantes stressées alors que la mycorhization entraîne une augmentation des teneurs de cette molécule avec un maximum enregistré chez les plantes M.NS (8%).

Les Sesquiterpènes présentent la plus grande diversité qualitative avec 9 molécules chez les plantes NM.S et 8 molécules chez les autres traitements.

On remarque que la teneur la plus élevée de cette famille a été enregistrée chez les plantes NM.S (8.61%) avec l'apparition d'une molécule (Germacrene-D) dont les teneurs sont de 1,76% et 0,20% respectivement, et la quasi-disparition de l'Aristolene (0,05%). Cependant, cette famille de molécules est très peu abondante chez les plantes M.NS, avec des teneurs qui représentent moins de 2% de la totalité des molécules.

4. Influence de la mycorhization sur les teneurs des deux isomères: méthyl chavicol et trans-anéthole

Les huiles essentielles d'*O.gratissimum* sont caractérisées par la présence du méthyl chavicol comme chémotype, et de son isomère t-anéthole. Le tableau 12 et la figure 64 montrent que chez les plantes mycorhizées et en conditions de stress, les teneurs de ces deux isomères évoluent d'une manière opposée : l'augmentation des teneurs d'une molécule fait baisser son isomère et inversement.

Cette évolution de la teneur des deux isomères laisse supposer que chez *O.gratissimum* L, la voie de la synthèse de trans-anéthole passe par l'isomérisation directe du méthyle chavicol en t-anéthole sous l'influence des conditions de la mycorhizations et du stress (fig.64).

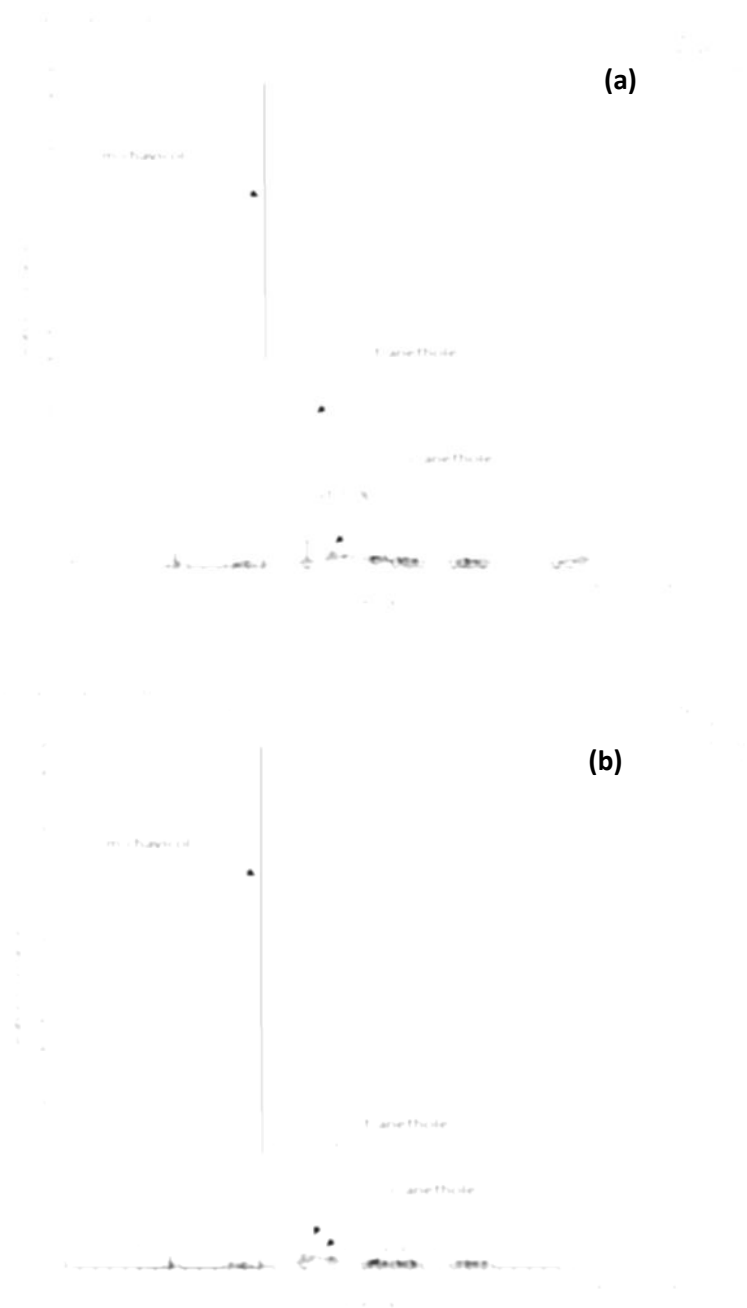


Figure 64: les chromatogrammes (GC/MS) des huiles essentielles extraites des plantes d'*O. gratissimum* L: (a) MNS, (b) MS

5. Discussion

L'effet des mycorhizes sur la tolérance des plantes de basilic au stress hydrique est étudié en utilisant le champignon *G. intraradices* comme inoculum mycorhizien. Les plantes inoculées par *Glomus intraradices*, montrent une meilleure croissance que les plantes non inoculées, aussi bien en conditions d'irrigation, qu'en conditions de stress hydrique. En conditions d'irrigation, l'inoculation entraîne une augmentation de la longueur de la partie aérienne et de la partie racinaire, respectivement de 71 et de 75%. En conditions de stress hydrique, la croissance des plantes non mycorhizées est limitée puisque le stress altère la croissance des parties racinaires ce qui influence sur l'état hydrique et nutritionnel des plantes. Dans ces conditions, la mycorhization entraîne une augmentation de la croissance des parties aériennes de 51% et des parties racinaires de près de 130%. Des résultats analogues sont observés par de nombreux auteurs, bien que l'ampleur des effets négatifs causés par le stress hydrique et des effets positifs de la mycorhization soient très variables : Ferahani, (2008) a montré que la coriandre mycorhizée stressée présente une croissance normale. An-Dong (2013), Baslam *et al* (2011), Rasouli-Sadaghianil (2010), Toussaint (2007), Zolfaghari (2013) ont montré que les champignons mycorhiziens *Glomus fasciculatum*, *Glomus etuonicatum* et *Glomus intraradices* stimulent la croissance et l'état nutritionnel de plusieurs plantes comme *Lactuca sativa* L., *Loniceracon fusa*, *Ocimum basilicum* L et *Vicia faba* L. Le stress hydrique induit une réduction significative des teneurs en eau (TE) des plantes non mycorhizées. Chez les plantes mycorhizées, on assiste également à une réduction des teneurs en eau, mais cette réduction est très faible. En conditions de déficit hydrique, le maintien des teneurs en eau à des niveaux élevés, grâce à l'association mycorhizienne, est dû en grande partie à une meilleure exploitation de l'eau disponible dans le sol par les hyphes fongiques (Davies *et al.*, 1993).

Les teneurs en chlorophylles des plantes en cas d'irrigation ne semblent pas affectées par la mycorhization puisque les plantes non mycorhizées possèdent des teneurs comparables à celles des plantes mycorhizées. Cependant, chez les plantes soumises au stress hydrique, la colonisation mycorhizienne par *G. intraradices* diminue l'ampleur de la réduction de la chlorophylle et maintient sa teneur à des taux beaucoup plus élevés que par rapport aux plantes non mycorhizées, puisque l'amélioration peut atteindre 72%. Ces résultats confirment ceux trouvés par Kucey et Paul (1982), et Snellgrove *et al.*, (1986), qui ont montré que l'association mycorhizienne stimule la photosynthèse de nombreuses plantes aromatiques et

médicinales. Ces auteurs ont rapporté cette stimulation de la photosynthèse à l'amélioration de la nutrition en P nécessaire aux réactions d'assimilation de CO₂ chez les plantes. Cette stimulation peut également être liée à une augmentation de la surface foliaire (Fredeen and Terry, 1988), ou bien associée à une hydratation accrue des feuilles (Snellgrove, 1982).

Nos résultats montrent, également, qu'avec le stress hydrique, les teneurs en proline augmentent significativement par rapport aux plantes non stressées, et ceci aussi bien dans les parties aériennes que dans les parties racinaires. Cette augmentation est plus importante chez les plantes non mycorhizées que chez les plantes mycorhizées. Ces dernières accumulent moins de proline que les plantes non inoculées ; la mycorhization permet donc d'atténuer l'augmentation de la teneur en proline en conditions de stress hydrique. Des résultats comparables sont montrés par de nombreux auteurs (Ruizlozano *et al.*, 1995, Rosa *et al.*, 2004) qui ont montré que le stress hydrique induit une accumulation de la proline dans les feuilles de nombreuses plantes. La proline est un composé qui est considéré comme un régulateur osmotique (Kubikova *et al.*, 2001) permettant de promouvoir la tolérance au stress hydrique chez la plante stressée en maintenant la turgescence à travers l'ajustement osmotique.

Notons par ailleurs qu'en cas de non-stress, les teneurs en prolines augmentent légèrement dans les parties aériennes et dans les parties racinaires lorsque les plantes sont mycorhizées. Cette légère augmentation serait due au mécanisme de défense mis en place par la plante suite à l'infection mycorhizienne. Selon Giovannetti *et al.*, (2002), la colonisation mycorhizienne serait initialement perçue par la plante comme un stress ou une attaque, lors de l'implantation même de la colonisation par le champignon endomycorhizien, d'où la synthèse de composés secondaires au tout début de la colonisation.

Nous avons par ailleurs montré que les teneurs en phénols totaux des plantes augmentent principalement dans les feuilles en réponse au stress hydrique et sont plus élevées chez les plantes non mycorhizées que chez les plantes mycorhizées. Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux d'Iker *et al.*, (2004) qui ont montré que les teneurs en flavanols, qui sont les monomères des tanins condensés (flavanols épicatechine (EC), épicatechine gallate (ECG) et épigallocatechine gallate (EGCG), augmentent dans les feuilles de *Cistus clusii*, en réponse au déficit hydrique. La plupart des phénols des plantes sont d'ailleurs considérés comme des métabolites de stress (Waterman et Mole, 1989 ; Gershenzon, 1984) et leur accumulation dans les plantes est affectée par plusieurs facteurs.

Nos résultats indiquent que la morphologie des glandes de sécrétions des huiles essentielles varie selon les conditions d'irrigation. Les observations réalisées dans cette étude ont permis de montrer l'existence de deux types de glandes selon leur forme : glandes gonflées et glandes dégonflées. La mycorhization assure pour les plantes une nutrition optimale aussi bien hydrique que minérale permettant aux feuilles de recevoir l'eau et les éléments nutritifs en quantités plus ou moins suffisantes. Cette entrée d'eau permet d'assurer un état de turgescence pour les cellules épidermiques et les cellules sécrétrices de la glande entraînant un gonflement des cavités et leur grossissement. Chez les plantes NM, la diminution de l'apport d'eau au niveau des feuilles entraîne une plasmolyse des cellules suite à la baisse des teneurs en eau au niveau des glandes ce qui conduit à une baisse de leur volume et un dégonflement. Cette baisse de volume est d'autant plus prononcée que la plante est stressée. Ces résultats ne confirment pas ceux obtenus par Copetta *et al.*, (2006) qui n'ont pas observé de différences significatives de structures entre les glandes des feuilles NM et celles des feuilles M. cette variation est due à l'influence des mycorhizes qui assurent une nutrition optimale pour les plantes.

D'après cette définition on peut déduire que c'est la taille de la cavité extracellulaire qui a été affectée par le stress chez les plantes NM.S (Figure 61, région α) et non plus la taille de la glande entière (Figure 61, région β), puisque le diamètre depuis le cercle qui entoure la cavité ne varie pas entre les plantes non stressées et stressées région (β) (entre 75 μ m et 78 μ m).

Nos résultats indiquent aussi que la densité des glandes augmente chez les plantes mycorhizées. Ces résultats vont dans le même sens que ceux Khaosaad *et al.*, (2006) et (Gang *et al.*, 2001) qui ont montré que *G. mosseae* et *G. rosea* augmentent la teneur des huiles essentielles de deux espèces de basilic (*O. vulgare* et *O. basilicum*) et que cette augmentation est rapportée au nombre des glandes par feuilles. Selon ces scientifiques la colonisation par des champignons MA stimule la production de ces glandes et cette production peut être liée à l'altération du profil hormonal surtout d'AIA, cytokinines et AG chez les plantes mycorhizées, (augmentation des teneurs de ces phytohormones endogènes) ce qui est confirmé par (Torelli *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les observations en microscopie photonique ont montré que ces glandes peuvent présenter une coloration rougeâtre chez les plantes qui possèdent l'aspect plissé et dégonflé, ce

qui permet de conclure à la présence d'un contenu en terpénoïde. Ces résultats sont en accord avec ceux de Worker *et al.*, 1993 qui ont montré que les glandes de basilic (*Ocimum basilicum*) peuvent posséder 4 cellules de sécrétion ou plus et que la maturation des glandes est déterminée par le plissement de la cuticule qui s'opère lorsque les cellules de sécrétion cessent de sécréter les terpénoïdes. Ils ont remarqué également que les feuilles les plus âgées possèdent des glandes présentant un aspect dégonflé et creux. Par contre, Gang *et al.*, (2001) n'ont pas observé la présence de glandes avec 8 cellules sécrétrices et que les glandes plissées ne présentent pas un contenu terpénoïde. Selon les mêmes auteurs, le plissement qui donne la subdivision quadratique de la cuticule en raison de la présence de 4 cellules sécrétrices est un indice de non-maturation des glandes puisqu'au moment du remplissage de cette cavité cuticulaire par les huiles, cette division quadratique a tendance à disparaître et ces glandes deviennent moins abondantes.

En outre, le degré de maturation des glandes est lié à la synthèse des huiles essentielles et au remplissage des cavités cuticulaires par ces huiles entraînant l'augmentation du diamètre de la glande d'une façon importante indépendamment du degré de plissement puisque selon nos observations, cet aspect est lié à l'état hydrique et nutritionnel. Cette constatation est confirmée par la position de la glande dans la feuille ; les glandes de la partie basale présentent un aspect gonflé et celles de la partie apicale un aspect dégonflé lorsque la plante se trouve en état de stress hydrique. Par ailleurs, la mesure du diamètre de l'excavation dans laquelle se situe la glande permet de confirmer cette hypothèse. Le diamètre de cette dernière peut atteindre les environs de 90 μm , taille que la glande peut avoir lorsqu'elle est en état de gonflement.

Le rendement en huiles essentielles est fortement influencé par la mycorhization puisqu'on constate une synthèse plus importante, quel que soit le niveau d'hydratation de la plante (stress ou irrigation). Le stress hydrique montre également une légère augmentation des teneurs en huiles essentielles. Par ailleurs, le traitement combiné (stress et mycorhization) peut augmenter le rendement d'environ 50% de plus par rapport aux plantes NM.NS. Ces résultats confirment ceux de Copetta *et al.*, (2006) qui a montré que cette augmentation chez les plantes mycorhizées peut être due à une réponse défensive à la colonisation fongique puisque plusieurs molécules de ces huiles possèdent des propriétés fongicides. Cette augmentation peut également être attribuée à un changement du métabolisme secondaire des plantes et au nombre des glandes par feuilles confirmant les résultats de Zolfaghari (2013) et de Freitas *et al.*, (2004) qui ont enregistré une augmentation des rendements des huiles

essentielles chez les plantes *Mentha arvensis* et *Mentha piperita* L. inoculées par des champignons mycorhiziens. En outre, Strack (2003) a montré que de nombreux métabolites secondaires ayant des fonctions différentes sont produits au cours de la croissance et du développement des plantes.

Si on considère les groupes de terpènes, on constate que la mycorhization engendre une augmentation des teneurs en monoterpènes oxygénés aussi bien en cas de stress que de non-stress. Par contre, les sesquiterpènes hydrocarbonés diminuent d'une manière très importante. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Copetta *et al.*, (2006) qui ont montré une variation quantitative et non pas qualitative au niveau des constituants des huiles essentielles chez des plantes de basilic (*O.basilicum* L) inoculées par *Gigaspora Rosea* et *Gigaspora Margarita*, c.-à-d. augmentation des monoterpènes oxygénés et diminution des sesquiterpènes hydrocarbonés.

L'influence de la mycorhization sur les variations dans les groupes de terpènes est principalement due aux variations dans les teneurs des différentes molécules. On constate en effet une augmentation dans les teneurs des différentes molécules constitutives de l'extrait terpénique d'*O. gratissimum* suite à l'inoculation par *G. intraradices*. Cette augmentation fait suite à l'augmentation des teneurs en molécules majoritaires de l'HE (m-chavicol, cis et trans anéthole) qui peut être expliquée comme une réponse à un agent pathogène.

Copeta (2006) a également montré une augmentation significative des teneurs en eucalyptol et linalool chez *O.basilicum* inoculé par *Gigaspora Margarita*. Dans des études menées sur *Mentha arvensis*, Khaliq et Janardhanan (1997), Gupta *et al.* , (2002) et Freitas *et al.*, (2004) ont montré une relation entre la présence des champignons MA et le changement des teneurs en huiles essentielles. Des résultats similaires ont été confirmés par Kapoor *et al.*, (2004) sur *Coriandrum sativum* et par Nemec and Lund (1990) sur *Citrus Jambhiri* inoculé par *Glomus intraradices*.

Selon Vidhi Chaudhary *et al.*, (2008) et Kapoor *et al.*, (2007), il existe une corrélation positive entre la nutrition en P, l'augmentation du rendement en huiles essentielles et l'augmentation des teneurs en composé majoritaire (artémisinine) dans l'huile essentielle d'*Artemisia annua* L. après infection par *Glomus macrocarpum* et *Glomus fasciculatum*.

Nos résultats montrent également que le stress hydrique entraîne une légère augmentation des teneurs en huiles essentielles. Cette augmentation peut être un résultat de l'activation de

certaines enzymes impliquées dans la synthèse de certains métabolites secondaires de défense. Ceci est en accord avec les travaux de Khalid (2006) et Sangwan (1994) qui ont enregistré une augmentation du rendement en huiles essentielles après l'application d'un stress hydrique sur les plantes d'*Ocimum basilicum* L, *Ocimum americanum* L, *Cymbopogon nardus* L et *Cymbopogon pendulum* L.

En outre, on constate que le stress hydrique provoque une diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés et une augmentation très importante des sesquiterpènes hydrocarbonés. Ces résultats s'accordent avec les travaux de Simon *et al.*, (1992) qui ont remarqué l'augmentation des teneurs en linalool et méthyl chavicol après l'application d'un stress hydrique sur des plantes de basilic (*O.basilicum*). Par ailleurs, Khalid (2006) a enregistré des teneurs élevées en méthyl chavicol après l'application d'un stress hydrique sur des plantes *O.basilicum*, alors que chez *O. americanum* L, il a enregistré une diminution des teneurs de cette molécule. L'eucalyptol diminue faiblement après un stress hydrique chez *O.basilicum*, et *O. americanum*, alors que les teneurs en cadinene augmentent ce qui est en accord avec nos résultats.

Le m-chavicol et son isomère t-anéthol caractérisent les huiles essentielles de nos plantes. Ces deux isomères ne diffèrent que dans la double liaison de la chaîne propénylique et cet isomère naturel se retrouve dans l'HE de nombreuses plantes, comme l'estragon (*Artemisiadracunculus* L), le basilic (*Ocimum basilicum* L) et le fenouil (*Foeniculum vulgare*) (Gross *et al.*, 2002), mais avec des teneurs différentes. Cette différence est due principalement au complexe enzymatique (O-méthyle transférase) qui utilise comme substrat le chavicol et le trans-anol pour produire respectivement le méthyle chavicol et trans-anéthol (fig.5 (Lewinshon *et al.*, 2000, Gross *et al.*, 2002).

Chez les plantes mycorhizées, l'application du stress hydrique influence sur l'augmentation de ces 2 molécules : on remarque que l'augmentation du t-anethole est accompagnée par une diminution du m-chavicol et inversement. Cette variation serait liée à la variation de la synthèse des phytohormones endogènes, plus particulièrement l'AG qui stimule l'isomérisation de m-chavicol en t-anéthole. Dans le chapitre IV, nous avons confirmé que les plantes traitées par l'AG peuvent engendrer une isomérisation directe (figure 52) de ces deux composés par l'intermédiaire du complexe enzymatique O.methyl-isomerase, responsable de

l'isomérisation de m-chavicol en t-anéthole. Ce phénomène n'est pas observé chez les plantes NM puisque les teneurs en m-chavicol restent inchangées. Les faibles teneurs en cis anéthole rencontrées dans nos extraits peuvent être attribuées à l'instabilité de cette configuration cis par rapport à la forme trans.

Conclusion

En absence de mycorhization, le stress hydrique limite la croissance, le pouvoir photosynthétique et engendre une diminution des teneurs en eau chez la plante. Cette diminution des paramètres morphologiques est accompagnée par une synthèse de la proline et des composés phénoliques, connus pour leur rôle dans la tolérance des plantes aux conditions défavorables. Par ailleurs, la mycorhization stimule la croissance et la photosynthèse, et entraîne un état hydrique optimal pour la plante, ce qui engendre une diminution des teneurs en proline et en composés phénoliques, confirmant ainsi le rôle joué par la symbiose mycorhizienne dans la défense des plantes vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques.

L'étude histologique des glandes sécrétrices des huiles essentielles du basilic (*O. gratissimum*) montre des différences structurales très claires. Le stress hydrique conduit à un dégonflement des cavités extracellulaires et à une diminution de leur taille ce qui entraîne la concentration des HE, mais cet effet est atténué en cas de mycorhization.

Ces deux facteurs influencent également la synthèse des huiles essentielles : la mycorhization entraîne une augmentation du rendement en huile essentielle quel que soit l'état hydrique de la plante. Par ailleurs, la synthèse du composé majoritaire, méthyl-chavicol, augmente chez les plantes mycorhizées stressées (93%) et diminue chez les plantes non mycorhizées stressées (84%) alors que la concentration de son isomère, le trans-anéthole, augmente chez les plantes non mycorhizées non stressées (8 %) et diminue chez les plantes non mycorhizées stressées (2%)

Chapitre 7

**Influence du Cuivre et du Zinc sur quelques
paramètres de croissance, sur la synthèse des huiles
essentielles chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia
officinalis* et *Pelargonium sp***

Influence du Cuivre et du Zinc sur quelques paramètres de croissance, sur la synthèse des huiles essentielles chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*

I- Introduction

Les éléments métalliques tels que le Cu et le Zn sont essentiels pour la croissance et le développement des plantes, car ils entrent dans la constitution d'un grand nombre d'enzymes et de protéines. Cependant, des concentrations élevées de ces deux métaux dans le sol peuvent entraîner une toxicité et une inhibition de la croissance de la plupart des plantes. La différence entre l'effet bénéfique des plantes à ces métaux et leur toxicité varie selon la nature et la concentration du métal, ainsi que de l'espèce végétale. Par ailleurs, certains facteurs liés au sol comme la texture, le pH, la microflore (spécifiquement les champignons mycorhiziens) peuvent augmenter la tolérance des plantes dans le cas des concentrations élevées.

Les symptômes de toxicité observés en présence de quantités excessives de métaux lourds peuvent être dus à une gamme d'interactions au niveau moléculaire. La toxicité peut résulter de la liaison de métaux aux protéines, conduisant à l'inhibition de certaines activités ou de perturbations de la structure ou du déplacement d'un élément essentiel. En outre, un excès de métal peut stimuler la formation de radicaux libres et des espèces réactives d'oxygène. Dans ce volet, de multitudes recherches ont été focalisées sur l'effet des métaux sur l'agriculture, les aspects morphologiques et des fois biochimiques des plantes ainsi que les méthodes adéquates pour dépolluer un sol toxique (phytoremédiation). Michalak (2006) a indiqué que les métaux affectent directement la biochimie de la plante, spécifiquement les composés phénoliques. Ces derniers augmentent dans le cas d'un stress métallique puisqu'ils peuvent agir comme des chélateurs de métaux et certains phénols peuvent directement piéger les radicaux libres et l'oxygène réactif.

Macfarlane et Burchett (2002) ont démontré une corrélation entre les teneurs en éléments métalliques et les paramètres morphologiques et photosynthétiques. Selon ces auteurs, le

traitement des plantes d'*Avicennia marina* par des concentrations croissantes de zinc montrent qu'à 125 µg/g du sol, le zinc joue un rôle stimulateur de ces paramètres. À partir de 500µg/g, le zinc devient toxique pour la plante et inhibe presque la totalité des activités physiologiques et biochimiques.

Gupta et Winter (1975), Mackinol et Beckett (1985) ont montré que le zinc exerce des effets néfastes sur certaines plantes aromatiques (*Genera aremisia, Draccocephalum, inula, ruta et symphytum*) lorsque le sol contient des concentrations comprises entre 200 mg/kg et 400 mg/kg. Chez d'autres espèces, même à une concentration légèrement supérieure à 100 mg/kg, les symptômes de toxicité apparaissent.

Chez les plantes traitées par le cuivre, Macfarlane et Burchett (2002) ont enregistré une stimulation des paramètres physiologiques et biochimiques à des concentrations inférieures à 100 µg/g. À partir de cette concentration, les activités physiologiques de la plante commencent à diminuer.

Selon Kbatia-Pendias et Pendias (1992), la concentration critique du cuivre dans le sol est de 120 mg/kg. Cette concentration dépend du taux d'accumulation de l'espèce végétale : à 20 mg/kg du poids sec de la plante, le cuivre engendre des effets néfastes (Gupta et Winter 1975, Mackinol et Beckett 1985).

Cependant, peu d'études ont été réalisées sur la synthèse des huiles essentielles et les glandes sécrétrices de ces huiles essentielles. Nous nous sommes donc proposé d'axer nos travaux sur les effets que peuvent avoir le Zn et le Cu sur la synthèse des huiles essentielles et sur la composition chimique de ces huiles ainsi que sur la morphologie des glandes sécrétrices chez *Ocimum gratissimum*, *Salvia officinalis* et *pelargonium sp.*

II- Résultats

1- Détermination des teneurs en éléments métalliques dans les plantes après traitements

Le tableau 13 montre la variation des teneurs en éléments métalliques dans les sols avant traitements par les solutions de métaux et après avoir récolté les plantes pour dosage. Les analyses ICP montrent que les sols avant traitements sont très riches en zinc et atteignent des valeurs qui peuvent être toxiques pour la croissance de certaines plantes, alors que ces sols sont assez pauvres en cuivre. Après récolte, on constate une accumulation très importante de ces deux métaux dans le sol rendant ce dernier à une quasi-saturation en cuivre et en zinc.

Chapitre 7 : influence du Cu et Zn sur la croissance et les huiles essentielles chez les trois espèces

Tableau 13: Teneurs en éléments métalliques du sol avant traitement et après récolte

Le tableau 14 montre les variations des teneurs en cuivre et en zinc chez les plantes de basilic, pélagonium et *Salvia* après application des différents traitements et récolte. On constate que les plantes témoins possèdent des teneurs très faibles en zinc principalement localisées dans les racines alors que le cuivre se trouve à l'état de traces aussi bien dans les racines que dans les feuilles. Après traitement, lorsque ces deux éléments sont appliqués séparément, ils s'accumulent pour toutes les plantes dans les racines d'une façon beaucoup plus importante que dans les feuilles. On constate également que les taux d'accumulation dans les racines sont plus élevés pour le cuivre que pour le zinc. Ces taux sont 10 à 15 fois plus élevés par rapport aux témoins correspondants, alors que les taux d'accumulation du zinc ne dépassent pas 6 à 7 fois ceux des témoins. Par contre, lorsque ces deux métaux sont additionnés en combinaison, leurs taux d'accumulation baissent aussi bien dans les racines que dans les feuilles.

Tableau 14 : Teneurs en éléments métalliques ($\mu\text{g/g}$) chez les plantes de Basilic, Salvia et Pélargonium, après traitements par le Cuivre, Zinc et Cuivre+Zinc

[illegible]

Lorsqu'on analyse les résultats des deux tableaux, on remarque que le taux de passage des métaux depuis le sol vers les plantes se situe dans les environs de 5 à 7.5% pour le cuivre et 10 à 14% pour le Zinc selon les plantes, et le passage des racines vers les feuilles dépend de l'espèce végétale et des teneurs préexistantes du métal dans le sol, et varie de 1/4 à 1/10. Cette notion de passage des métaux depuis le sol vers les racines et de la racine vers les feuilles,

détermine le comportement de la plante vis-à-vis de chaque traitement, ainsi sur le rôle de ce métal dans la plante, bénéfique (oligoélément) ou bien toxique (stress métallique).

2- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en chlorophylle chez les 3 plantes

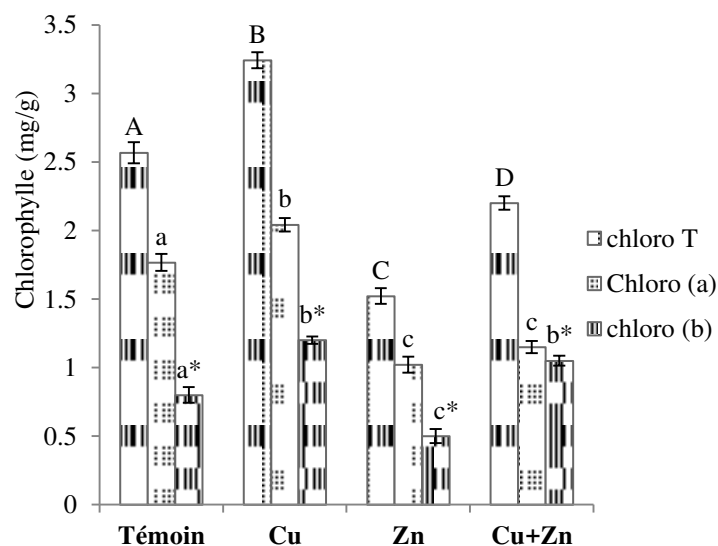


Figure 65 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en chlorophylle chez *O. gratissimum* L. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

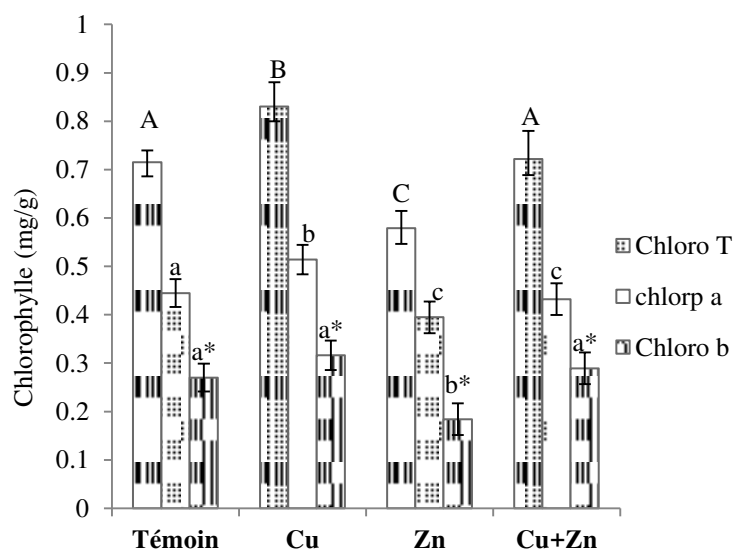


Figure 66 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en chlorophylle chez *Salvia officinalis*. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

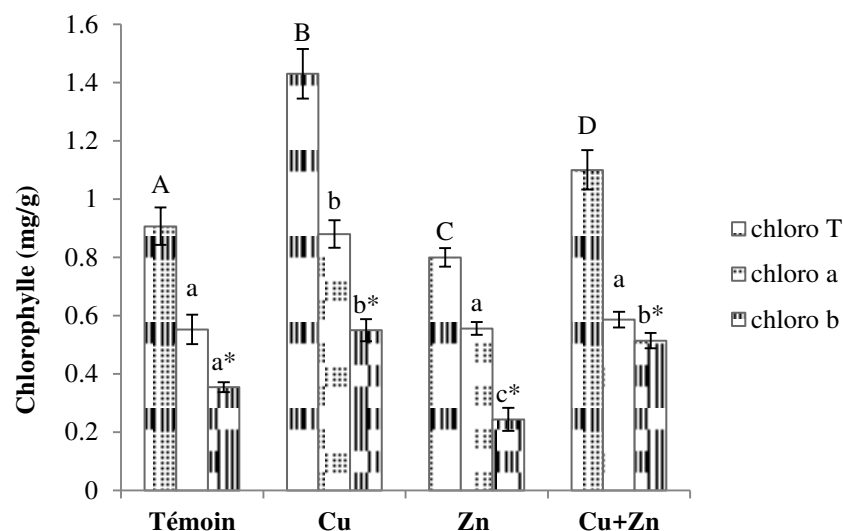


Figure 67 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en chlorophylle chez *Pelargonium sp.* Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

La photosynthèse estimée par les teneurs des plantes en pigments chlorophylliens montre des variations significatives en fonctions des traitements métalliques. Chez les trois plantes (basilic, salvia et pélargonium) (figures 65, 66 et 67), le cuivre entraîne une augmentation importante des teneurs en chlorophylles a et b et par conséquent en chlorophylle totale. Par contre, le zinc entraîne une diminution significative des teneurs en ces pigments chez les trois plantes. Cette diminution intéresse principalement la chlorophylle b, ce qui se répercute sur les teneurs en chlorophylle totale. L'action du traitement combiné du Cu et du Zn diffère d'une plante à une autre ; il engendre une augmentation significative des teneurs en chlorophylle totale chez pélargonium due principalement à l'augmentation des teneurs en chlorophylle b. Chez le basilic, on assiste à une diminution des teneurs en chlorophylle totale suite à la baisse importante des teneurs en chlorophylle a et à la légère augmentation des teneurs en chlorophylle b (figure 65). Chez Salvia, on ne remarque aucune différence par rapport au témoin.

3- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en proline chez les 3 plantes

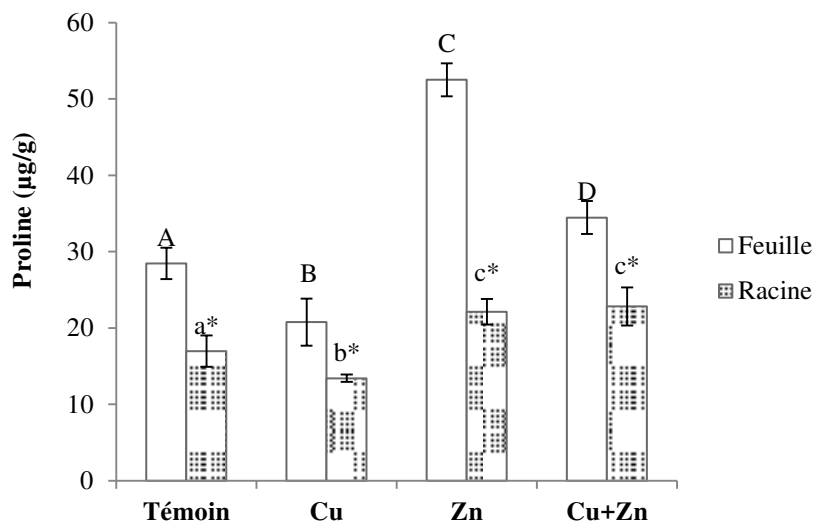


Figure 68 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en proline chez *O. gratissimum* L. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

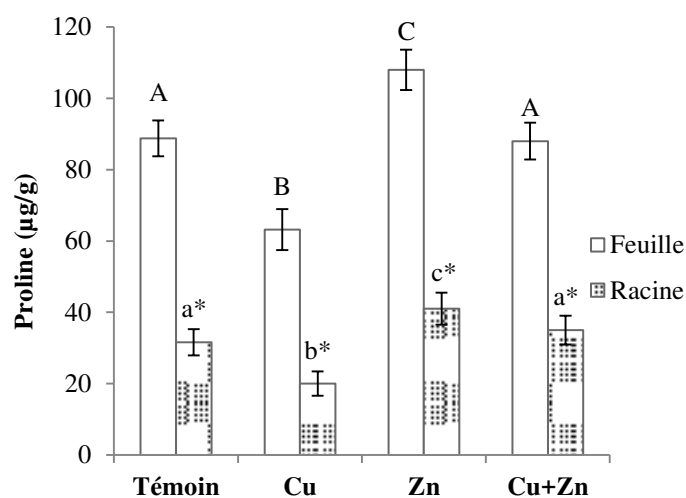


Figure 69 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en proline chez *Salvia officinalis*. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

Dans les parties aériennes (figures 68, 69 et 70), le cuivre entraîne une diminution significative des teneurs en proline chez les 3 plantes. Par contre, l'utilisation du zinc entraîne une augmentation des teneurs en proline. L'action du traitement combiné du cuivre et du zinc est différente selon les plantes ; on constate une augmentation significative des teneurs en proline dans les feuilles chez le basilic, une diminution chez *Pelargonium*, avec des valeurs

presque similaires à celles enregistrées dans le cas du traitement par le cuivre (figure 70). Chez *salvia*, on ne constate aucune différence par rapport au témoin.

Au niveau des parties racinaires, les teneurs en proline montrent les mêmes tendances d'accumulation que dans les parties aériennes, avec des résultats plus prononcés chez les *Pelargonium* puisqu'on remarque une augmentation significative de ces teneurs après traitement par le Zinc et par l'action combinée des deux métaux (figure 70).

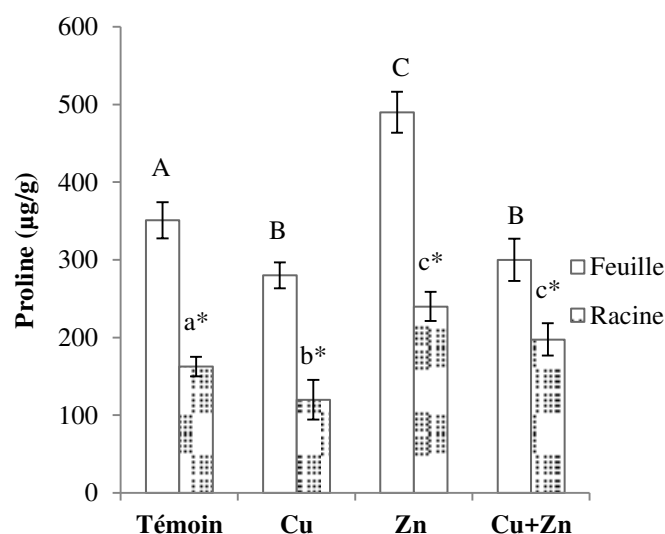


Figure 70: Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en proline chez *pelargonium* sp. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

4- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en composés phénoliques chez les 3 plantes

4-1- Effet sur les CP d'*O. gratissimum* L

Les teneurs en composés phénoliques totaux chez le basilic varient selon la nature de traitement métallique (figure 71). Cette variation touche les deux parties de la plante aériennes et racinaires. On constate que le cuivre n'a aucune influence sur les teneurs en CPT ni dans les feuilles ni dans les racines. Par contre, le zinc entraîne une augmentation importante de ces composés et ceci dans les deux parties de la plante. Dans le cas de l'action combinée, l'addition du cuivre semble atténuer cette augmentation dans les feuilles, mais les teneurs en CPT restent néanmoins très élevées par rapport à celles du témoin.

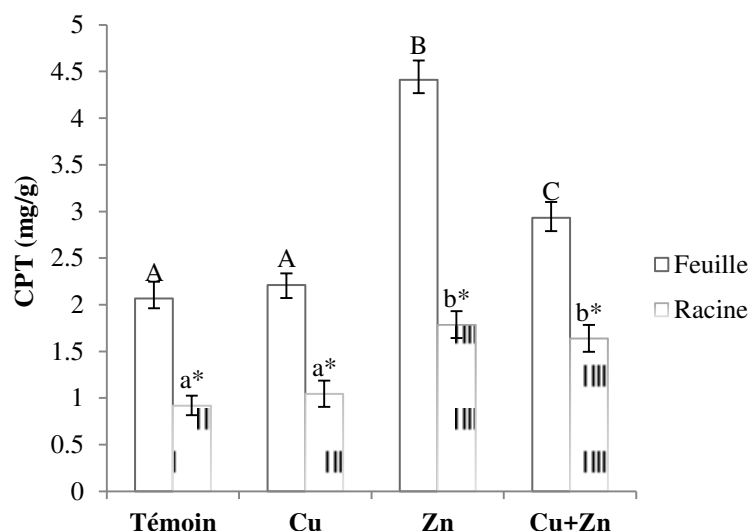


Figure 71 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en composés phénoliques totaux chez *O. gratissimum* L. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

4-2- Effet sur les CP de *Salvia officinalis*

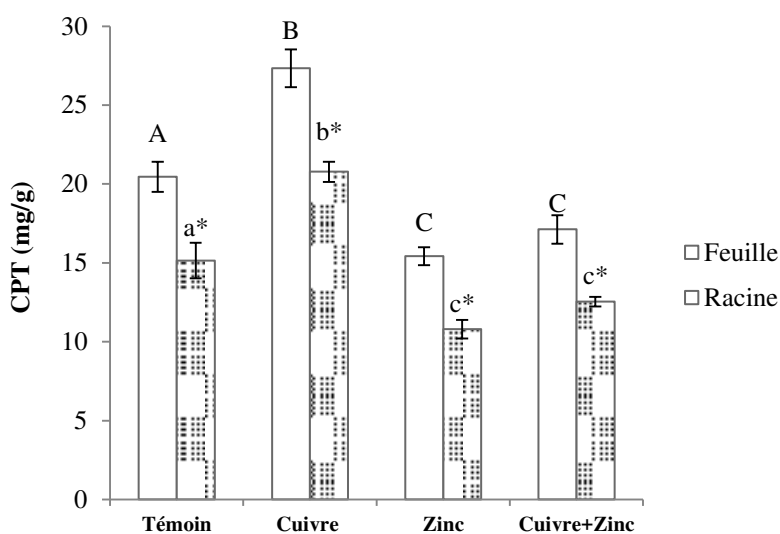


Figure 72 : Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en composés phénoliques totaux chez *Salvia officinalis*. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes ($P = 0.05$)

Chez *Salvia* (figure 72), le cuivre entraîne une augmentation significative des teneurs en CPT aussi bien dans la partie aérienne que racinaire. Par contre, et contrairement au basilic, le zinc engendre une diminution significative des teneurs en CPT au niveau des deux parties de la plante, et cette diminution est retrouvée également dans le cas du traitement combiné (Cu+Zn).

Comme signalé dans le chapitre 2, les tanins condensés représentent une partie assez faible des CPT chez *Salvia officinalis*. Néanmoins, on constate que ces molécules suivent la même évolution que les CPT (figure 73), c.-à-d. augmentation dans les feuilles dans le cas du traitement par le cuivre et diminution dans les deux parties de la plante dans le cas du traitement par le zinc. Ces tanins condensés diminuent également dans les feuilles et les racines des plantes traitées par la combinaison du cuivre et du zinc.

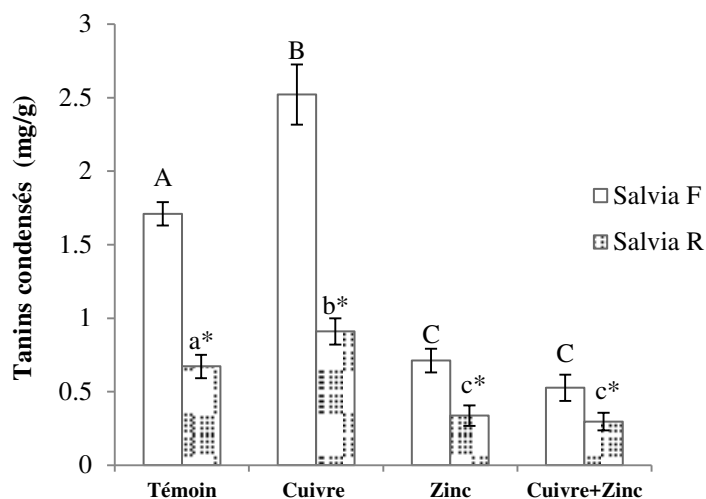


Figure 73: Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en tanins condensés chez *Salvia officinalis*. Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

4-3- Effet sur les CP de *Pelargonium*

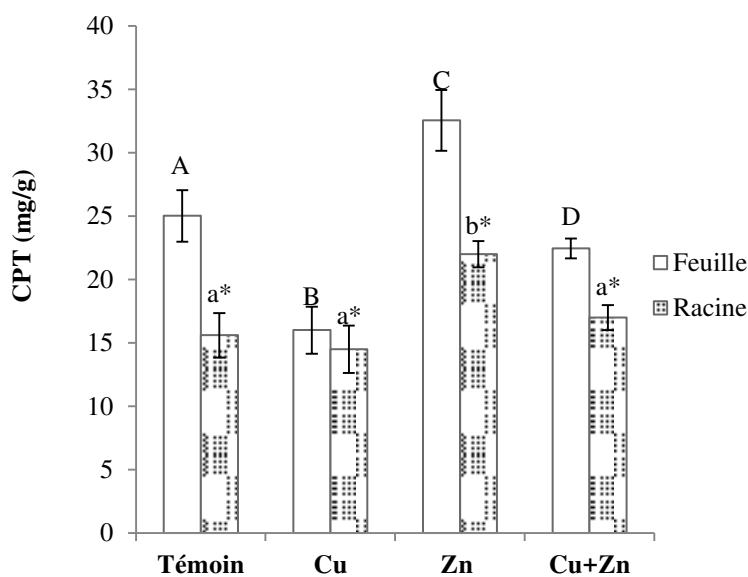


Figure 74: Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en composés phénoliques totaux chez *pelargonium sp.* Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

Contrairement à *Salvia officinalis*, le cuivre et le zinc agissent différemment sur les teneurs en CPT chez *Pelargonium* (figure 74). On constate que le cuivre entraîne une diminution des teneurs en ces composés dans les feuilles alors que le zinc entraîne une augmentation des teneurs en CPT aussi bien dans les feuilles que dans les racines. L'action combinée ne montre par contre aucun effet notable par rapport au témoin ; elle permet néanmoins de remédier à l'effet inhibiteur du cuivre d'une part et à l'effet stimulateur du zinc d'autre part sur la synthèse des CPT.

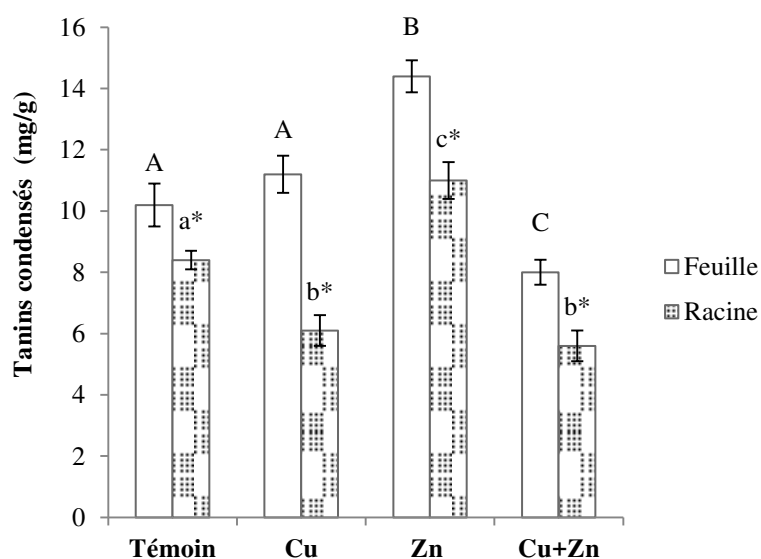


Figure 75: Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en tanins condensés chez *pelargonium sp.* Les valeurs indiquées par des lettres différentes sont significativement différentes (P = 0.05)

Chez *Pélargonium*, les TC représentent un taux important de la totalité des polyphénols (figure 75) puisqu'ils peuvent atteindre des valeurs qui avoisinent 50% des CPT. Dans ce cas, le cuivre ne semble pas avoir une influence importante si ce n'est une légère diminution dans les racines. Par contre, comme pour les CPT, le zinc permet une augmentation importante aussi bien dans les feuilles que dans les racines. Néanmoins, et contrairement au CPT, la combinaison Cu+Zn entraîne une diminution des tanins condensés et ceci dans les deux parties de la plante.

5- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur la structure morphologique des glandes sécrétrices de *Salvia officinalis*

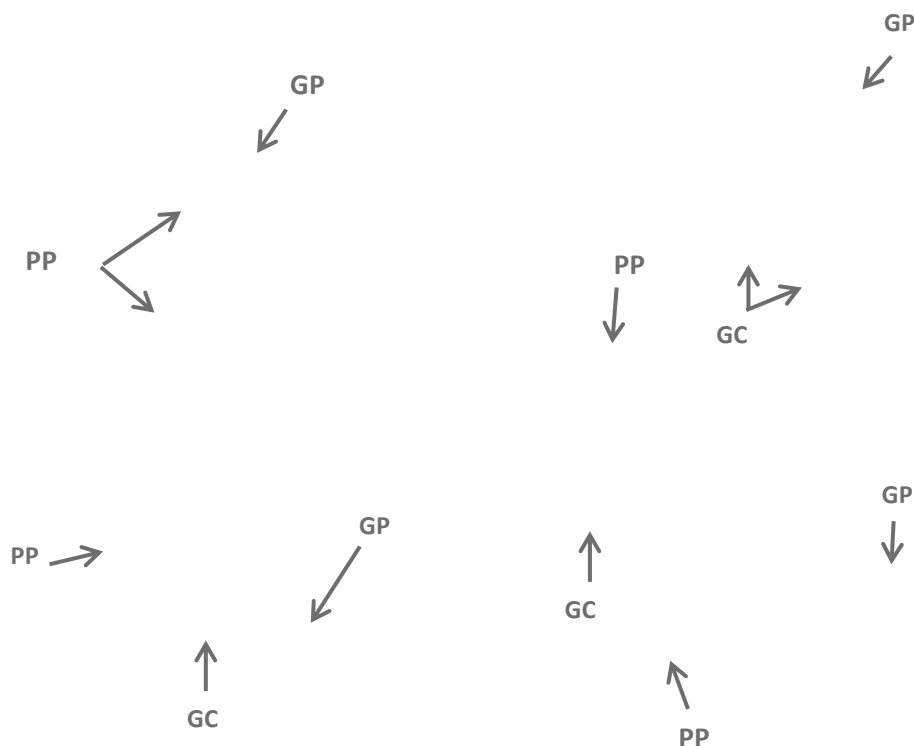


Figure 76: Observations en microscopie électronique à balayage environnemental de la face ventrale d'une feuille de *salvia officinalis* montrant les différentes structures glandulaires : Témoins (a) et après traitement par le Cuivre (b), le Zinc (c) et Cuivre + Zinc (d). PP : poils de protection, GC : glande capitée, GP : glande peltée

conformément aux observations réalisées dans le chapitre I, la figure 76 montre la présence de plusieurs structures glandulaires sur la face ventrale d'une feuille de salvia, notamment des poils de protection (PP) qui sont des glandes non sécrétrices, des glandes peltées (GP) et des glandes capitées (GC). Au niveau de cette face ventrale, on ne remarque pas de différences quant au type des glandes après application des différents traitements.

Par contre, des observations réalisées sur la face dorsale d'une feuille de *salvia officinalis* après traitements par le zinc (figure 78a) montrent la présence de structures glandulaires dont la taille est plus grande que celle des glandes capitées et plus petite que celle des glandes peltées. Ces structures possèdent une morphologie typique présentant des déformations à leur surface. Ces déformations en forme de petites poches présentent un aspect irrégulier et peuvent être en nombre de 1 à plusieurs sur une même glande. De telles structures, absentes

dans les feuilles de Salvia témoin et dans les feuilles de salvia traitées par le cuivre, pourtant ayant le même âge, sont également présentes sur la face dorsale des feuilles de salvia traitée par la combinaison Cu+Zn (figure 78a).

Figure 78: Observations en microscopie électronique à balayage environnemental de la face dorsale d'une feuille de *Salvia officinalis* montrant des déformations des structures glandulaires après traitement par le Zinc (a) et par la combinaison Cu+Zn (b)

6- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en huiles essentielles et leurs compositions chimiques chez les 3 plantes

6- 1- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en huiles essentielles et leurs compositions chimiques chez *O. gratissimum* L

Le tableau 15 montre la variation du rendement en huiles essentielles des plantes *O. gratissimum* et leurs compositions chimiques en fonction des traitements métalliques. On constate que l'utilisation du cuivre, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec le zinc, entraîne une augmentation du rendement en HE. Les plantes traitées par l'association Zn+Cu présentent le rendement le plus élevé avec une augmentation de 43% rapport au témoin. Les plantes traitées seulement par le cuivre présentent une augmentation d'environ 14%. Par contre, l'utilisation du zinc n'a pas entraîné de changement du rendement.

Chapitre 7 : influence du Cu et Zn sur la croissance et les huiles essentielles chez les trois espèces

Tableau 15: Teneurs en huiles essentielles chez *O. gratissimum* L. après traitements par le Cuivre, le Zinc et Cuivre + Zinc. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque traitement. (Seuil de détection des molécules à 0.5%)

Les monoterpènes oxygénés présentent la famille majoritaire des huiles essentielles de basilic avec 5 molécules dont les teneurs varient de 87 à 90 % selon le traitement. Les sesquiterpènes hydrocarbonés présentent la 2^e famille de cette huile essentielle avec 8 molécules dont les teneurs varient entre 3 et 10% (fig. 79).

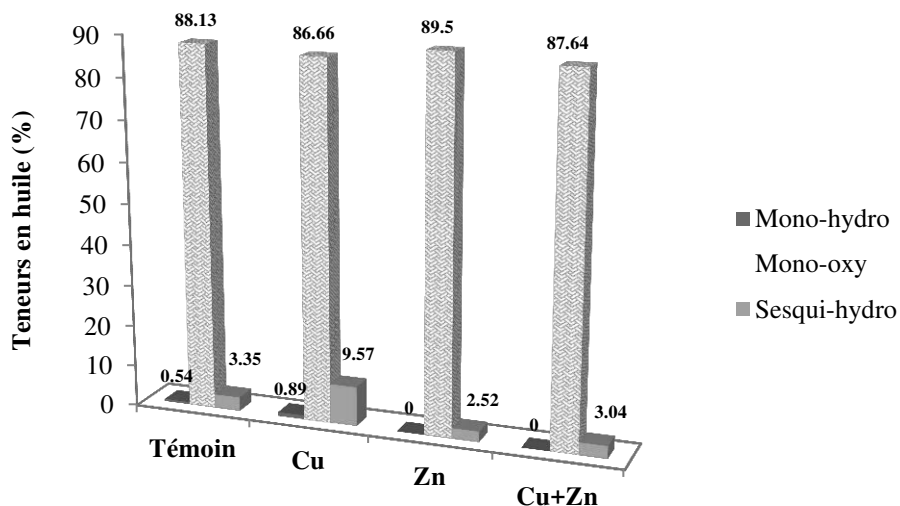


Figure 79: Teneurs en familles majoritaires des huiles essentielles chez les plantes d'*O. gratissimum*, après traitement par le Cu, Zn et Cu+Zn

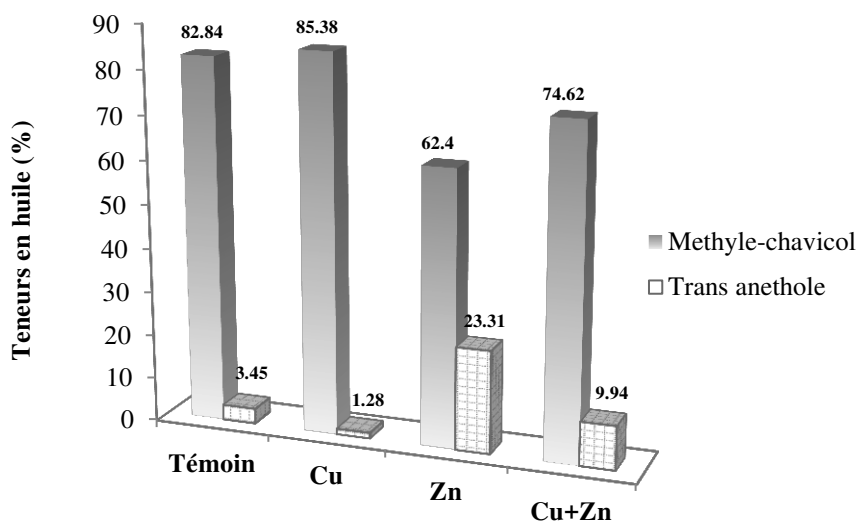


Figure 80: Variation des teneurs en composé majoritaire le méthyle chavicol et son isomère le trans-anéthole chez les plantes d'*O. gratissimum*, après traitement par le Cu, Zn et Cu+Zn

Les teneurs de ces derniers restent à peu près stables en fonction des traitements métalliques. Le composé majoritaire, m-chavicol et ses isomères varient fortement en fonction des traitements : Le cuivre entraîne une légère augmentation des teneurs en m-chavicol, alors que son isomère, t-anéthol diminue de moitié environ (fig. 80). On assiste également à la disparition de l'eucalyptol. Chez les plantes traitées par le zinc, on constate un changement

très important dans les teneurs de ces molécules, le m-chavicol diminue fortement de presque 25% et son isomère t-anéthole augmente d'un facteur d'environ 6.75 puisqu'il passe de 3.45 à 23.31. On assiste en outre à l'apparition du cis-anéthole, qui est un autre isomère du m-chavicol.

Chez les plantes traitées par (Cu+Zn) on remarque une diminution de m-chavicol d'environ 10%. Cette diminution est accompagnée par l'augmentation d'environ 188% des teneurs de son isomère t-anéthole, et par l'apparition de son isomère cis-anéthole.

Les sesquiterpènes hydrocarbonés varient aussi bien qualitativement que quantitativement vis-à-vis des traitements métalliques. Le cuivre engendre une augmentation de leurs teneurs d'un facteur de 3 grâce à l'augmentation considérable de l' α -longipinène et du cadinène, et à l'apparition de certaines molécules comme le germacrène-D, le β -cedrène, et l'aromadendrène. Les traitements par le zinc et par (Cu+Zn) entraînent de très légères modifications dans les teneurs de cette famille.

Les monoterpènes hydrocarbonés sont représentés par une seule molécule, l'azulène qui disparaît lorsqu'on applique le traitement au zinc et (Cu+Zn).

6- 2- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en Huiles essentielles et leurs compositions chimiques chez *Salvia officinalis*

Tableau 16: Teneurs en huiles essentielles chez *Salvia officinalis* après traitements par le Cuivre, le Zinc et Cuivre + Zinc. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque traitement. (Seuil de détection des molécules à 0.5%)

Les monoterpènes hydrocarbonés, constitués par 9 molécules, et représentent la 3^e plus grande famille sur le plan quantitatif au sein des huiles essentielles de cette plante puisque les teneurs varient de 12.5% de la totalité des huiles pour les plantes traitées par le (Cu) à 21% chez les plantes traitées par le (Zn). Les traitements par les éléments métalliques entraînent des variations de leurs teneurs ainsi que de leurs compositions : α -terpinène et cis-sabinène apparaissent chez les plantes traitées par les éléments métalliques, alors que Carvéol est présent seulement chez les plantes traitées par le Zn et Cu+Zn.

Enfin, les sesquiterpènes oxygénés représentent une famille minoritaire aussi bien qualitativement que quantitativement.

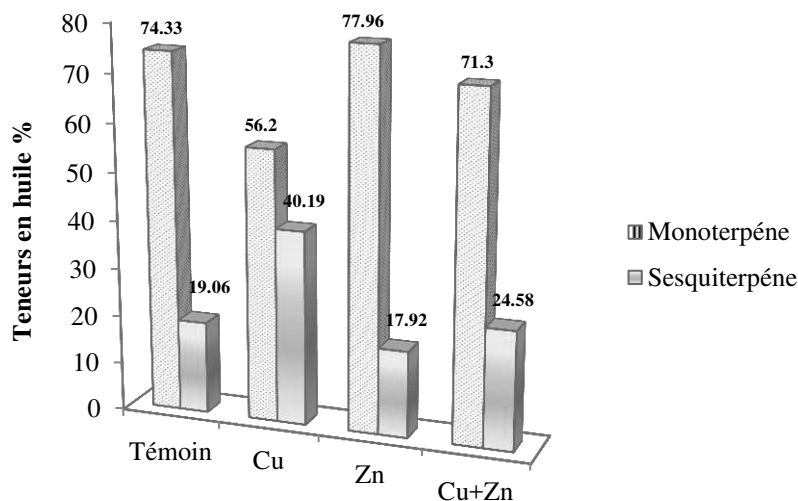


Figure 81: Teneurs en groupes majeurs des huiles essentielles chez les plantes de *Salvia officinalis*, après traitements par le Cu, Zn et Cu+Zn

On constate également que quelque soit le traitement, les monoterpènes représentent toujours le groupe de molécules dominant cette huile. Les teneurs en sesquiterpènes évoluent en fonction de l'évolution des monoterpènes, l'augmentation des teneurs d'un groupe fait baisser celles de l'autre (fig. 81).

On assiste également à une balance de disparition et d'apparition de molécules ainsi qu'au changement des teneurs en molécules préexistantes : le traitement par le Cu entraîne une diminution très importante des teneurs en monoterpènes oxygénés (presque 30% de la totalité des teneurs de la famille). Cette diminution est principalement due à la diminution des teneurs en composés majoritaires, spécifiquement le naphthalène qui passe de 23 à 19%, et le camphorquinone qui diminue de presque 50%. L' α -thujone et l'isobornéol diminuent également respectivement de 68 et de 74%. Cette variation des teneurs est accompagnée par la disparition de β -thujone et oxyde de cis limonène (figure 82).

Par ailleurs, on remarque que cet élément métallique influence positivement sur les teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés, puisque les teneurs de cette dernière augmentent de 161%. Cette augmentation est due au changement positif des composés majoritaires de cette famille, puisqu'on remarque que le trans-Caryophyllène augmente de 190%, l'ermophilène augmente de 150% et l' α -humulène de 137%. On remarque également l'apparition d' α -bourbonène et Junipène.

Le traitement par le Cu n'a pas énormément influencé sur les teneurs en monoterpènes hydrocarbonés qui diminuent très faiblement ni en sesquiterpènes oxygénés qui passent de 5% à presque 2%.

Le Zn entraîne également une diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés (57%) d'une manière moins importante que chez les plantes traitées par le cuivre, mais toujours inférieures par rapport au témoin. Cette diminution est accompagnée par la diminution des teneurs en naphthalenone, α - thujone, isoborneol et une faible diminution de camphorquinone. On assiste en outre à une augmentation des teneurs en 1,8 cinéole (68%). Ce même traitement entraîne l'augmentation des teneurs en monoterpènes hydrocarbonés (augmentation de presque 66%). Cette augmentation se traduit par l'augmentation des teneurs de certaines molécules qui se trouvent à l'état de traces (Phellandène, β -Carène) ainsi que par l'apparition de certaines molécules (carvéol et α -terpinène). Les Sesquiterpènes hydrocarbonés restent presque stables. Par ailleurs, les sesquiterpènes oxygénés diminuent de moitié à cause de la disparition de l'oxyde d'isoaromadendrène. On remarque aussi l'apparition d'une autre molécule (acétate d'exobornyle).

Enfin, le traitement combiné (Cu+Zn) entraîne une diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés (17%) suite à la diminution des teneurs des 4 molécules majoritaires (α thujone, naphthalenone, camphorquinone et isoborneol) et à la disparition de β -thujone. Ce traitement entraîne l'augmentation des teneurs en monoterpènes hydrocarbonés (67%), suite à l'augmentation des teneurs de certaines molécules qui se trouvent à l'état de traces (phellandrene, β -carene) ainsi que par l'apparition de certaines molécules (carveol, α -terpinene et cis-Sabinene).

Les sesquiterpènes hydrocarbonés augmentent (53%) suite à l'augmentation de la majorité des molécules constitutives de cette famille. Par ailleurs, les sesquiterpènes oxygénés diminuent (70%) à cause de la disparition d'oxyde de caryophyllène et la diminution de l'oxyde d'isoaromadendrène.

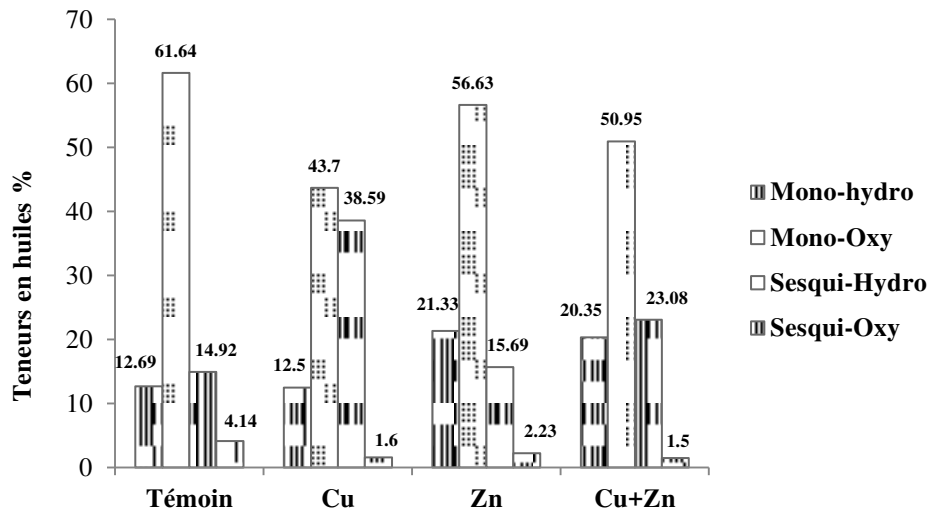


Figure 82: Teneurs en différentes familles des huiles essentielles chez *Salvia officinalis*, après traitement par le Cu, Zn et Cu+Zn

6- 3- Influence du Cu, du Zn et de leur combinaison (Cu+Zn) sur les teneurs en Huiles essentielles et leurs compositions chimiques chez *Pelargonium sp*

Tableau 17: Teneurs en huiles essentielles chez *Pelargonium sp* après traitements par le Cuivre, le Zinc et Cuivre+Zinc. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque traitement (seuil de détection des molécules à 0.5%)

Le rendement en huiles essentielles de *Pelargonium* ainsi que leurs compositions chimiques en fonction des traitements métalliques sont représentés dans le tableau 17.

Le traitement par le cuivre entraîne une augmentation du rendement en huile de 33%. Par ailleurs, le traitement combiné (Cu+Zn) présente l'augmentation la plus importante (50%). Le zinc n'a aucune influence sur le rendement en huile.

En outre, quel que soit le traitement appliqué, on constate que les monoterpènes présentent le groupe dominant suivi par les sesquiterpènes (Figure 83). Les monoterpènes oxygénés constituent le maximum de contribution en huile essentielle avec des teneurs qui varient entre 35 et 48%. Les monoterpènes hydrocarbonés occupent la 3^e place sur le plan quantitatif après les sesquiterpènes hydrocarbonés. Ces derniers représentent une contribution qui varie de 24 à 30%. Les sesquiterpènes oxygénés restent minoritaires avec d'autres molécules puisqu'ils possèdent des teneurs faibles ne dépassant pas les 7% (figure 84).

Chez les plantes traitées par le cuivre on remarque de multitudes variations aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif. Les teneurs en monoterpènes oxygénés augmentent (34%) à cause de l'augmentation du composé majoritaire, le menthol (78%) et de l'apparition d'autres molécules (citronellal, isomenthol, trans-anethole et oxyde de limonène). Les sesquiterpènes hydrocarbonés subissent une variation plus qualitative que quantitative ; dans cette famille de 18 molécules, le traitement par le cuivre engendre la disparition de 3 molécules (trans-caryophyllène, germacrène-D, et l'himachalène), ce qui provoque une faible diminution en teneurs de cette famille malgré l'augmentation de son composé principal (eremophilène).

Les monoterpènes hydrocarbonés subissent une diminution de 30% à cause de la diminution du menthène et du limonène et la disparition de l'azulène, malgré l'apparition du delta carène et du cis-ocimène. Par ailleurs, les teneurs en sesquiterpènes oxygénés diminuent légèrement.

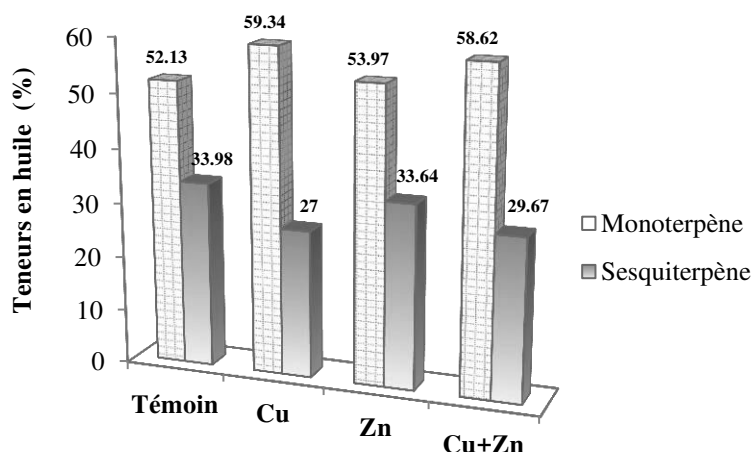


Figure 83: Teneurs en groupes majeurs des huiles essentielles chez *Pelargonium sp.*, après traitement par le Cu, Zn et Cu+Zn

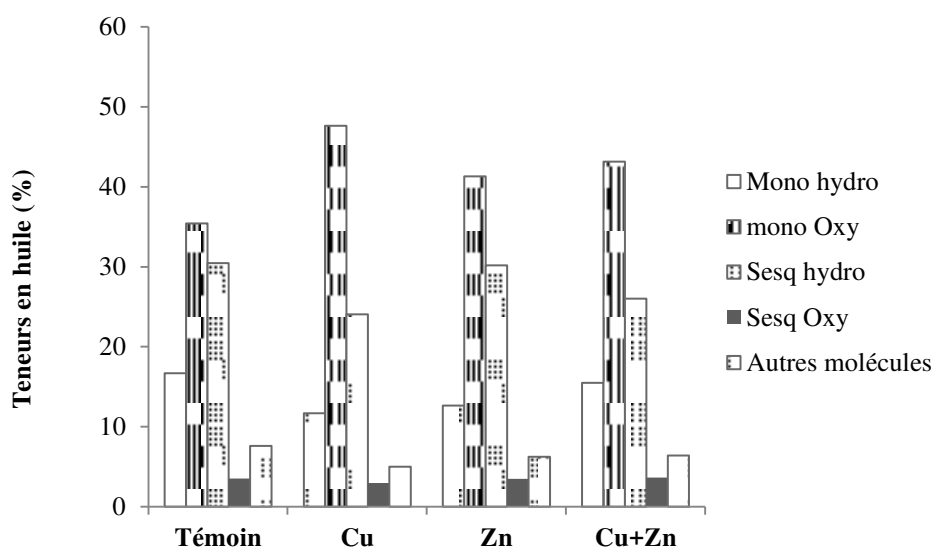


Figure 84: Teneurs en familles majoritaires des huiles essentielles chez *Pelargonium sp.*, après traitement par le Cu, Zn et Cu+Zn

En ce qui concerne le traitement par le zinc, les teneurs en monoterpènes oxygénés augmentent d'environ 16% à cause de l'augmentation du composé majoritaire le menthol (45%) et l'apparition de 3 molécules (isomenthol, trans-anéthole et oxyde de limonène) et malgré la diminution du 2^e composé majoritaire l'isogéraniol. Les sesquiterpènes hydrocarbonés subissent une variation plutôt qualitative, puisqu'on assiste à la disparition de 3 molécules, aromadendrène, α -Calarène et himachalène. Le composé majoritaire (eremophilène) augmente sans influencer les teneurs de cette famille.

Les monoterpènes hydrocarbonés subissent une diminution (24%) à cause de la diminution de l' α -pinène et du limonène et de la disparition du carène, malgré l'apparition de cis-ocimène et

l'augmentation du composé majoritaire (menthène). Par ailleurs, les teneurs en sesquiterpènes oxygénés restent presque stables.

Le traitement combiné du Cu et du Zn entraîne une augmentation (22%) des teneurs en monoterpènes oxygénés suite à l'augmentation de 50% du composé majoritaire, le menthol, et l'apparition du trans-anéthole et de l'oxyde de limonène.

Par contre, les sesquiterpènes hydrocarbonés subissent une faible diminution quantitative ainsi qu'une variation qualitative ; on assiste à la disparition de 2 molécules, α -Cubebène et himachalène, alors que l'eremophilène, composé majoritaire, augmente légèrement.

Les monoterpènes hydrocarbonés subissent une faible diminution. Cette variation est accompagnée par la disparition du Carène et de l'azulène, et l'apparition de cis-ocimène et du delta carène. Malgré l'augmentation du composé majoritaire (menthène), les teneurs de cette famille restent faibles par rapport au témoin. Par ailleurs, les teneurs en sesquiterpènes oxygénés restent presque stables.

III- Discussion

La photosynthèse estimée par les teneurs en pigments chlorophylliens montre des variations significatives en fonction des traitements métalliques et selon l'espèce végétale. Chez les trois plantes (basilic, Salvia et pélargonium), le cuivre engendre une augmentation importante des teneurs en chlorophylle a et b. Le zinc entraîne une diminution significative en teneurs de ces pigments chez les trois espèces. Le traitement combiné engendre une augmentation significative des teneurs en chlorophylle b et chlorophylle totale chez pélargonium. Cependant chez le basilic, il engendre une diminution significative de la chlorophylle a et chlorophylle totale, la chlorophylle (b) augmente significativement. Dans nos plantes, les teneurs élevées en zinc dans les plantes dépassent les valeurs tolérables, ce qui engendre un stress métallique. Ces résultats sont confirmés par ceux de Michalak (2006) qui a remarqué que les éléments métalliques tels que cuivre et le zinc peuvent exercer des effets négatifs sur la photosynthèse ainsi que sur l'élongation et l'allongement cellulaire au-delà de certaines concentrations et selon la nature de l'espèce végétale. Les concentrations élevées des métaux peuvent entraîner un stress oxydatif à cause des formes d'oxygènes réactives qui entrent en réaction avec presque toute forme de constituants cellulaires, provoquant des perturbations aux différentes chlorophylles (Mitova *et al.*, 2000, Díaz *et al.*, 2001). Macfarlane et Burchett (2002) ont démontré une corrélation entre les teneurs en éléments métalliques en fonction de

la croissance et les paramètres morphologiques et la capacité photosynthétique. Selon ces auteurs, le traitement des plantes d'*Avicennia marina* par des concentrations croissantes en zinc montre qu'à 125 µg/g, le zinc joue un rôle stimulateur de ces paramètres. À partir de 500µg/g, le zinc devient toxique pour la plante et inhibe presque la totalité des activités physiologiques et biochimiques.

Par contre, les teneurs en cuivre dans les plantes restent plus au moins dans la gamme de tolérance. Selon Fernandes et Henriques (1991), le cuivre est un élément métallique très important pour de multitudes réactions physiologiques et biochimiques de la plante ; il engendre une augmentation des teneurs en pigments chlorophylliens lorsqu'il est présent à de faibles concentrations. Par contre, à des concentrations élevées, Chen *et al.*, (2001) ont remarqué qu'un excès de cuivre intracellulaire peut engendrer chez *Oryza sativa* une légère diminution des teneurs en chlorophylle a. Macfarlane et Burchett (2002) ont enregistré une stimulation des paramètres morphologiques d'*Avicennia marina* à des concentrations dans les sols inférieures à 100µg/g. De 100µg/g à 400µg/g, les activités physiologiques de la plante commencent à diminuer, à savoir la croissance et la photosynthèse. Cette tolérance des plantes est due aux faibles quantités qui peuvent atteindre les parties aériennes.

On constate également que les teneurs en proline varient d'une manière significative en fonction des traitements métalliques. Au niveau de la partie aérienne, le cuivre engendre une diminution significative des teneurs en proline chez les trois plantes, alors que le zinc entraîne une augmentation. Le traitement combiné entraîne une augmentation significative des teneurs en proline chez le basilic, une diminution chez pélargonium, mais n'a aucun effet sur Salvia.

Au niveau des parties racinaires, la proline montre la même tendance d'accumulation que pour les parties aériennes, avec des résultats plus prononcés chez *Pelargonium* puisqu'on remarque une augmentation significative de ces teneurs après traitement par Zinc et le traitement combiné. Ces résultats confirment ceux de Tripathi et Gaur (2004) qui ont enregistré une augmentation des teneurs en proline chez une algue, *Scenedesmus* sp., lorsque la concentration du zinc ou du cuivre augmentent. Selon ces auteurs, ces métaux engendrent un stress oxydatif, suivi d'une peroxydation lipidique. Dans ce cas, la proline peut diminuer les concentrations intracellulaires du cuivre de presque 54%, et du zinc de presque 49% (Tripathi and Gaur 2004). La proline protège les cellules contre le stress oxydatif induit par le métal en piégeant les espèces réactives d'oxygène plutôt que par chélation des ions métalliques.

Par ailleurs, Sharma *et al.*, (1998) et Farago et Mullen (1979) ont expliqué l'augmentation des teneurs en proline en conditions du stress métallique comme mécanisme de protection du glucose-6-phosphate déshydrogénase et du nitrate réductase contre la toxicité causée par ces métaux. En outre, selon Chen *et al.*, (2001), un excès de cuivre intracellulaire peut causer la perturbation de la balance hydrique avec augmentation des teneurs en proline chez *Oryza sativa*. Cette augmentation est due d'une part à la diminution de la dégradation de la proline déjà synthétisée par la plante, et d'autre part à l'augmentation de sa biosynthèse.

Selon les mêmes auteurs, le traitement par CuSO₄ entraîne une augmentation des teneurs en arginine et glutamine qui sont des intermédiaires de la synthèse de la proline via Δ^1 -prolin5 - carboxylate (P5C) pour la glutamine, grâce à deux enzymes P5C synthétase et P5C réductase et via l'ornithine pour l'arginine, résultat d'activité catalytique d'arginase.

Les teneurs en composés phénoliques totaux varient en fonction des traitements métalliques, ainsi que selon l'espèce végétale. Chez le basilic, on remarque que les variations des teneurs en composés phénoliques totaux intéressent les deux parties, aériennes et racinaires. Le cuivre n'a pas une grande influence sur les teneurs de ces molécules. Par contre, le zinc, utilisé seul ou en combinaison avec le cuivre, influence fortement sur les composés phénoliques des 2 parties, avec un maximum enregistré chez les plantes traitées par le zinc seul. Chez *Salvia*, le cuivre entraîne une augmentation significative des teneurs en ces molécules dans les deux parties de la plante, alors que le zinc et le traitement combiné (Cu+Zn) entraînent une diminution significative de ces teneurs.

Chez *Pelargonium*, les résultats diffèrent par rapport au basilic et au *Salvia* : le cuivre entraîne une diminution des teneurs en ces molécules au niveau de la partie aérienne, et le zinc une augmentation aussi bien au niveau de la partie aérienne que racinaire. Le traitement combiné (Cu+Zn) n'a pas d'influence sur les teneurs de ces molécules.

Les teneurs en tanins condensés chez *Salvia* suivent la même évolution que celle des CPT ; ces teneurs augmentent dans la partie aérienne dans le cas de l'utilisation du cuivre, sans grand changement dans la partie racinaire. Le traitement par le zinc et le traitement combiné engendrent une diminution très significative dans les deux parties de la plante.

Chez *Pelargonium*, le cuivre n'engendre pas de variation des teneurs en tanins condensés dans la partie aérienne, mais entraîne une diminution au niveau racinaire. Le zinc provoque une augmentation au niveau des parties aériennes et racinaires. Cependant, le traitement combiné engendre une diminution significative au niveau des deux parties.

Ces résultats confirment ceux de Díaz *et al.*, (2001) qui ont montré la synthèse de quantités importantes de CP après traitement *Phyllanthus tenellus* par le cuivre. On suggère que les métaux influencent fortement sur le taux de ces molécules, selon la concentration présente dans le sol, et celle qui atteint les racines et les feuilles. Aux faibles concentrations, ces métaux ont peu d'influence sur la synthèse de ces molécules et la plante considère ces éléments métalliques comme des oligoéléments qui ont des effets bénéfiques (Jung *et al.*, 2003). A des concentrations élevées, on assiste à une stimulation de la synthèse de ces molécules pour lutter contre les effets néfastes des métaux suite à l'augmentation d'activités de certaines enzymes impliquées dans la synthèse de ces molécules. Ceci est confirmé par les travaux de Pary *et al.*, (1994) sur *Medicago sativa*.

Le mode d'action des composés phénoliques vis-à-vis des stress métalliques réside dans le fait que leurs groupements hydroxyle et carboxyle possèdent une grande affinité à chélater ces métaux (Morgan *et al.*, 1997). Par ailleurs, Michalak (2006) a indiqué que les tanins condensés jouent un rôle important dans la lutte contre les stress métalliques grâce à leur activité antioxydante contre les stress, en particulier oxydatifs. Des résultats analogues ont été confirmés par Lavid *et al.*, (2001).

Les observations en microscopie réalisées sur des plantes de *Salvia officinalis* ont montré la présence de structures glandulaires peltées et capitées, et des structures non glandulaires (poils de protections). Le traitement par le zinc et par la combinaison cuivre et zinc montre la présence sur la face dorsale des feuilles, de structures glandulaires dont la taille est plus grande que celle des glandes capitées et plus petite que celle des glandes peltées et présentant une morphologie atypique avec des déformations en forme de petites poches à leur surface. De telles structures, absentes dans les feuilles de *Salvia* témoin et dans les feuilles de *salvia* traitée par le cuivre, pourtant ayant le même âge, sont également présentes sur la face dorsale des feuilles de *salvia* traitée par la combinaison Cu+Zn. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce phénomène :

- Ces structures seraient des gouttelettes d'huile essentielle excrétées à partir de glandes déjà arrivées en phase de sécrétion. Cette hypothèse confirme les observations de Bhatt *et al.*, (2010) qui ont attribué des structures similaires à des gouttes d'huile essentielle excrétées à la surface des glandes peltées chez *Orthosiphon labiatus*.

- Ces structures peuvent résulter d'une anomalie subie par les glandes et causée par les concentrations élevées du zinc.

Cette dernière hypothèse semble la plus plausible pour plusieurs raisons :

- de telles déformations ne se rencontrent que dans les plantes qui ont reçu des quantités élevées de zinc (Zn seul ou Cu+Zn). En effet, nous n'avons jamais pu rencontrer de telles structures dans les plantes traitées par le cuivre seul ni dans les plantes témoins.

- la taille de ces glandes est comprise entre la taille des glandes peltées et celle des glandes capitées, ce qui rend difficile la classification de ces glandes

- Les différents prélèvements ont été réalisés au même stade phénologique. Les glandes se trouvent donc au même degré de maturation.

- l'aspect de ces structures possédant parfois plusieurs petites poches à leur surface. Dans ce cas, l'hypothèse d'une excrétion d'huile est à exclure : il ne pourrait pas s'agir de glandes peltées puisque ces glandes libèrent leur contenu par éclatement de la cuticule. Il ne pourrait pas s'agir non plus de glandes capitées, puisque ces dernières libèrent leur contenu à travers un seul pore. Or dans notre cas, plusieurs poches sont observées. Des glandes possédant plusieurs pores n'ont à ce jour jamais été rencontrées.

Les rendements en huiles essentielles des plantes de basilic, *Salvia* et *Pelargonium* varient en fonction des traitements métalliques. On constate que le zinc ne permet pas une variation remarquable de rendement, puisque dans le cas général on constate une stabilité de ce dernier. Par contre, les plantes traitées par (Zn+Cu) enregistrent les rendements les plus élevés chez les trois plantes, avec une augmentation maximale de 50% chez *Pélargonium* et minimale de 33% chez *Salvia officinalis*. Chez *O.gratissimum*, on remarque une augmentation de 43%.

Le cuivre entraîne également une augmentation du rendement en huile chez les trois espèces, le taux d'augmentation du rendement dépend de l'espèce végétale, puisqu'on remarque que chez *Salvia* et *pélargonium* le rendement augmente de 33% et 27% respectivement. Chez le basilic, une légère augmentation de 14% est observée.

Ces variations de teneurs sont accompagnées par des changements au niveau de la composition, aussi bien qualitativement que quantitativement. Ces changements se traduisent par l'apparition de certaines molécules et la disparition d'autres, ainsi que par des modifications des teneurs de molécules préexistantes.

Melsted *et al.*, (1969) ont indiqué que les effets d'un métal dépendent principalement de l'espèce végétale et de la concentration critique foliaire. Nos résultats montrent une stabilité

du rendement des huiles essentielles des 3 plantes après traitement des plantes par le zinc avec à chaque fois une diminution de la teneur en molécule majoritaire. Ces résultats concernant les rendements sont en désaccord avec ceux de Abu-Darwish (2009) qui a indiqué une augmentation des teneurs en huiles essentielles chez *Thymus vulgaris* L, *Thymus serpyllum* L, et *Salvia officinallis* L cultivés dans des sols qui contiennent des teneurs élevées en zinc. Misra et Sharma (1991) ont également montré des variations de rendement à des concentrations différentes de la concentration critique du zinc dans les feuilles qui est de 28µg/g chez *Mentha arvensis*; A des concentrations inférieures, le zinc augmente le rendement de l'huile essentielle et à des concentrations supérieures le zinc abaisse le rendement. Dans des études réalisées sur géranium, Misra *et al.*, (2005) ont indiqué qu'au-delà des concentrations critiques, le zinc met la plante sous un stress métallique et entraîne une perturbation de l'équilibre nutritionnel de la plante, spécifiquement l'assimilation du carbone, l'accumulation de saccharide, l'élimination des radicaux libres ainsi que dans les activités antioxydantes, provoquant ainsi une perturbation de la synthèse des huiles essentielles et la diminution du rendement. Par contre, concernant la modification de la composition chimique et principalement les quantités de la molécule majoritaire, nos résultats confirment ceux de Misra et Sharma (1991) et de Misra *et al.*, (2005) qui ont noté une diminution des teneurs de la molécule majoritaire lorsque la concentration du zinc augmente dans les feuilles.

Par contre, les résultats concernant l'influence du cuivre sont en accord avec les travaux de Zheljazkov *et al.*, (2006) sur le basilic, l'anis et la menthe traités par le cuivre à 100 mg/l et par des traitements combinés entre le cuivre et le plomb. Selon ces résultats, le cuivre entraîne une augmentation du rendement en huile essentielle chez le basilic. Chez l'anis et la menthe, il engendre une diminution du rendement.

Les analyses des huiles essentielles ont indiqué une certaine variation dans la composition chimique des trois espèces. D'autres auteurs ont également rapporté des variations au niveau de la composition des huiles essentielles de ces trois espèces après traitement par les métaux. (Zhelyazkov et Warman, 2004a,b). A l'inverse, Scora et Chang (1997) n'ont pas trouvé une variation de constituants d'huile de la menthe après traitements par des concentrations élevées de ces métaux.

L'effet important du cuivre qui se traduit dans l'augmentation du rendement en huiles essentielles chez nos plantes a été confirmé par El said deef (2007) qui a remarqué une augmentation des teneurs en huiles chez le romarin en fonction de l'augmentation de la

concentration de cuivre, de 50 à 3200 ppm. Cette augmentation est accompagnée par une variation dans la composition chimique des huiles essentielles.

Chez le basilic, Zheljazkov et Warman (2003) a également constaté que le traitement par des concentrations croissantes de cuivre engendre un changement quantitatif, puisque les teneurs en α -terpinéol, linalool et d'acétate de bornéol augmentent en fonction de l'augmentation des concentrations en cuivre, alors que le β -caryophyllène diminue. Les mêmes résultats ont été rapportés par Abu-Darwish (2009) sur *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum* et *Salvia officinalis* dont les rendements en huiles essentielles augmentent et leurs compositions chimiques changent quand les concentrations du cuivre varient entre 7,66 et 13,23 ppm.

Conclusion

Les traitements des plantes par le Cu et le Zn jouent un rôle très important sur les paramètres morphologiques et biochimiques, et cela en fonction de la concentration du métal dans le sol, ainsi que de la quantité absorbée par les racines. Le Zn entraîne une diminution des teneurs en chlorophylles alors que le Cu entraîne une augmentation.

Contrairement au Cu, le Zn engendre une augmentation des teneurs en proline chez les trois plantes. Chez le basilic et pélargonium, le Zn entraîne une augmentation des teneurs en composés phénoliques alors que chez salvia, la synthèse de ces molécules est stimulée par le cuivre.

Le traitement combiné de ces deux éléments (Cu+Zn) entraîne une augmentation des rendements en huiles essentielles chez les trois plantes, et cela est accompagné par un changement qualitatif et quantitatif.

Du point de vue morphologique, nous avons pu mettre en évidence la présence de glandes anormalement constituées dans les feuilles de Salvia à chaque fois que la plante est traitée par le Zn. Ces glandes possèdent une morphologie typique présentant des déformations en forme de petites poches à leur surface et présentant un aspect irrégulier. Ces déformations peuvent être en nombre de 1 à plusieurs sur une même glande.

Conclusion générale

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'influence de quelques paramètres de croissance à savoir stades phénologiques, applications de phytohormones, mycorhization, stress hydrique et influence des métaux, sur un certain nombre de métabolites secondaires de trois plantes aromatiques et médicinales, *O. gratissimum*, *Salvia* et *Pélargonium*. Les différents métabolites secondaires étudiés étant les pigments chlorophylliens, la proline, les composés phénoliques, les huiles essentielles. Ces dernières ainsi que les glandes responsables de leur synthèse et de leur sécrétion ont particulièrement été étudiées du point de vue rendement, mais également composition chimique.

- Dans cette vision, et concernant la synthèse des **pigments chlorophylliens**, nous avons remarqué que tous les facteurs étudiés affectent directement les activités photosynthétiques de la plante. Ces dernières représentent le processus bioénergétique qui permet aux plantes d'assurer la synthèse du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire. Les teneurs en ces pigments augmentent depuis la phase de croissance jusqu'au début de floraison chez *Salvia* et *pélargonium*. Chez *O. gratissimum*, le stress hydrique perturbe cette activité photosynthétique et entraîne une diminution des teneurs en pigments chlorophylliens.

Les phytohormones agissent différemment sur ces pigments ; la teneur de ces dernières varie selon la nature de l'hormone, de sa concentration ainsi que de l'espèce végétale : La BAP n'a pas une influence significative chez *Pélargonium*, mais entraîne une augmentation de ces pigments chez *O. gratissimum* et *Salvia*. L'AG entraîne par contre une diminution des teneurs de ces pigments, quelle que soit la plante. L'AIA exerce un effet positif sur la synthèse de ces pigments chez *O. gratissimum* et *pélargonium* et un effet inhibiteur chez *Salvia*.

Le traitement des plantes par les métaux (Cu et Zn) entraîne également des changements dans la synthèse des pigments photosynthétiques. Le cuivre permet une augmentation importante des teneurs en chlorophylle alors que le zinc entraîne une diminution et ceci est valable chez les trois plantes. La combinaison entre ces deux métaux engendre une augmentation significative des pigments chlorophylliens chez *pélargonium*, une diminution chez le basilic, mais n'a aucun effet chez *Salvia*.

- Un autre paramètre étudié concerne les variations importantes des teneurs **en proline** en fonction des facteurs étudiés puisqu'il s'agit d'un indicateur important de l'état physiologique

Conclusion générale

de la plante. On constate que, quelle que soit la plante, elle est principalement synthétisée dans les parties aériennes. En outre, les différentes plantes réagissent différemment vis-à-vis de l'accumulation de la proline, les teneurs sont faibles dans *O. gratissimum*, plus élevée chez *Salvia officinalis*, alors que chez *Pelargonium sp.*, on constate que les parties aériennes et racinaires accumulent des quantités très élevées en proline.

Par ailleurs, quelle que soit la plante, on constate que l'application des phytohormones entraîne une diminution des teneurs en proline par rapport aux témoins et cette diminution intéresse principalement les feuilles. Cette diminution est plus ou moins importante en fonction de la phytohormone utilisée, de sa concentration, de l'espèce végétale et même de l'organe.

Nos résultats montrent, également, qu'avec le stress hydrique, les teneurs en proline augmentent significativement par rapport aux plantes non stressées chez le Basilic et ceci aussi bien dans les parties aériennes que dans les parties racinaires. Cette augmentation est plus importante chez les plantes non mycorhizées que chez les plantes mycorhizées.

On constate également que les teneurs en proline varient d'une manière significative en fonction des traitements métalliques. Au niveau de la partie aérienne, le cuivre engendre une diminution significative des teneurs en proline chez les trois plantes, alors que le zinc entraîne une augmentation. Le traitement combiné entraîne une augmentation significative des teneurs en proline chez le basilic, une diminution chez pélargonium, mais n'a aucun effet sur *Salvia*.

Au niveau des parties racinaires, la proline montre les mêmes tendances d'accumulations que pour les parties aériennes, avec des résultats plus prononcés chez *Pelargonium*.

- L'étude des **composés phénoliques** des trois espèces montre que *Pelargonium* possède les teneurs les plus élevées par rapport au Basilic et à *Salvia*. En outre, les tanins condensés représentent une grande partie des polyphénols chez cette espèce, leurs teneurs peuvent atteindre 35 à 40% des CPT. Par ailleurs, Les CPT varient selon le stade phénologique de la plante, et on note dans ce cas que le maximum des teneurs de ces molécules a été enregistré vers la fin de la phase de croissance végétative. Les facteurs environnementaux influencent énormément sur les teneurs en CPT ; chez *O. gratissimum*, le stress hydrique entraîne chez les plantes mycorhizées ou non mycorhizées, une augmentation des teneurs en composés phénoliques. Néanmoins, la mycorhization permet d'atténuer cette augmentation dans la synthèse des CPT.

Conclusion générale

Les traitements métalliques particulièrement par le zinc seul ou en combinaison avec le cuivre, augmentent les teneurs en composés phénoliques chez le Basilic et Pélargonium, avec un maximum enregistré chez les plantes traitées par le zinc seul. Chez ces deux plantes, le cuivre a un effet inverse. Par contre, chez *Salvia*, on assiste à des effets inverses, c.-à-d.. que le cuivre entraîne une augmentation des teneurs en ces molécules, alors que le zinc et le traitement combiné (Cu+Zn) entraînent une diminution. Les tanins condensés suivent presque les mêmes évolutions que celles des CPT. On suggère que les métaux influencent fortement sur le taux de ces molécules, selon la concentration présente dans le sol et celle qui atteint les racines et les feuilles.

- **Les huiles essentielles et les structures responsables de la synthèse et de la sécrétion** de ces groupes et familles de molécules subissent de multitudes variations en fonctions des facteurs étudiés dans ce travail. Les observations microscopiques réalisées dans ce travail montrent la présence de deux groupes majeurs de glandes de sécrétion chez les trois plantes. Le 1^{er} groupe concerne des glandes peltées ou glandes à long terme et le 2^e groupe sont des glandes capitées ou glandes à court terme. Au sein d'un même groupe, on peut assister à une variation morphologique d'une plante à une autre, en fonction du contenu, du rôle et du stade phénologique de la plante, ce qui rend la classification un peu difficile. Mais pour assurer une classification crédible, les différents auteurs se basent principalement sur le critère morphologique, le contenu ainsi que sur le mode de sécrétion.

Les glandes à court terme sont les glandes dont la sécrétion est rapide afin de protéger les jeunes organes. Les glandes à long terme sont toutes les glandes dans laquelle la substance de sécrétion s'accumule progressivement dans l'espace subcuticulaire et sert à la protection des organes matures (dans la fleur), ainsi qu'à la pollinisation. La différence entre les 2 types consiste en plusieurs aspects à savoir, la structure, le mode de sécrétion et le moment de sécrétion.

Les observations microscopiques réalisées sur nos plantes montrent la présence des glandes peltées dont le nombre de cellules de sécrétion varie de 4 et 8 cellules chez *O. gratissimum* et jusqu'à 12 chez *Salvia*.

Les glandes capitées quant à elles, se subdivisent en plusieurs catégories d'après leurs formes :

- Glandes capitées possédant une cellule basale, une tige uni ou multicellulaire (1 à 3 cellules) et une tête

Conclusion générale

- Glandes capitées possédant une cellule de tige et tête uni ou bicellulaire
- Glandes capitées possédant une cellule basale et une tête avec une ou 2 cellules
- Glandes capitées sous forme d'une poche collée directement à l'épiderme.

Ces glandes sont fortement influencées par les facteurs étudiés dans ce travail puisqu'on remarque que la mycorhization et le stress hydrique agissent sur la morphologie et la taille des glandes du basilic. Le stress hydrique entraîne un dégonflement de ces glandes alors que la mycorhization engendre un gonflement de ces structures. Par ailleurs, le degré de maturation des glandes est lié à la synthèse des huiles essentielles et au remplissage des cavités cuticulaires par ces huiles entraînant l'augmentation du diamètre de la glande d'une façon importante indépendamment du degré de plissement ; nous avons montré que cet aspect est lié à l'état hydrique et nutritionnel.

Le traitement des plantes par le zinc influence d'une manière remarquable sur les plantes de *Salvia*. Les observations en microscopie électronique à balayage environnemental montrent que ce traitement, utilisé seul ou en combinaison avec le cuivre, a fait apparaître des structures glandulaires dont la taille est plus grande que celle des glandes capitées et plus petite que celle des glandes peltées et présentant une morphologie atypique avec des déformations en forme de petites poches à leur surface. Ces structures peuvent résulter d'une anomalie subie par les glandes et causée par les concentrations élevées du zinc. Le traitement par le cuivre seul ne montre pas de différences avec les structures habituelles.

Ces facteurs influencent également sur les produits de synthèse de ces glandes, aussi bien au niveau des teneurs que de la composition chimique des huiles essentielles de ces trois espèces végétales. On remarque que le rendement en huile dépend principalement du nombre des glandes de sécrétion, mais aussi de la phase de maturité de ces glandes (sécrétion et poste-sécrétion).

Le rendement en huile essentielle des trois plantes est fortement influencé par le stade phénologique de la plante. Chez *Salvia officinalis* et *Pelargonium sp*, le rendement en huiles essentielles augmente depuis le repos végétatif jusqu'à la fin floraison. La faible synthèse des huiles essentielles pendant les 1^{res} phases de croissance est expliquée par l'absence ou l'inactivation de certaines enzymes ainsi que l'immaturité des glandes peltées.

Le passage des plantes d'une phase à une autre dépend des facteurs environnementaux, eux même sous la dépendance de l'expression de certaines phytohormones

Conclusion générale

Dans cette optique, nous avons essayé d'étudier l'influence de ces hormones végétales sur nos plantes et à déterminer un certain nombre de paramètres morphologiques et biochimiques. Les résultats montrent que l'espèce végétale, la phytohormone utilisée et sa concentration influencent fortement sur l'activité biosynthétique des huiles essentielles et sur l'abondance de ces glandes. Le phénomène le plus important dans ce cas est l'influence de la BAP qui permet la synthèse la plus importante des huiles essentielles, et ceci, quelle que soit la plante. L'AG entraîne généralement une diminution des rendements, alors que l'AIA réagit différemment selon les plantes ; il entraîne une augmentation chez le basilic et chez Pélargonium et une diminution chez Salvia.

L'AIA entraîne une augmentation du rendement des huiles essentielles qui passe chez *O.gratissimum* L de 0,22 à 0,3% et chez *Pelargonium* sp, de 0.7 à 0.9%. Chez *Salvia officinalis*, l'AIA engendre une diminution des teneurs en huiles essentielles qui passe de 1.6 à 1.4%.

Parmi les facteurs environnementaux qui influent fortement sur la synthèse des huiles essentielles et sur leurs compositions chimiques, la mycorhization utilisée en combinaison avec le stress hydrique entraîne une augmentation du rendement d'environ 50% de plus par rapport aux plantes NM.NS. Par ailleurs, le stress hydrique montre également une légère augmentation des teneurs en huiles essentielles.

Cette augmentation des teneurs en huiles essentielles chez les plantes mycorhizées peut être la conséquence d'une réponse défensive à la colonisation fongique ainsi qu'à une augmentation du nombre des glandes par feuilles ; plusieurs molécules de ces huiles possèdent des propriétés fongicides.

En ce qui concerne l'influence des métaux (zinc et cuivre) sur la synthèse des métabolites secondaires du basilic, Salvia et pélargonium, nous avons constaté que le zinc, lorsqu'il est utilisé seul, ne présente pas une variation remarquable de rendement, puisqu'on constate dans le cas général une stabilité de ce dernier. Par contre, les plantes traitées par la combinaison Zinc et cuivre, enregistrent les rendements les plus élevés chez les trois plantes, avec une augmentation maximale de 50% chez *Pélargonium* et minimale de 33% chez *Salvia officinalis*. Chez *O. gratissimum*, on remarque une augmentation de 43%.

Conclusion générale

Le cuivre entraîne également une augmentation du rendement d'huile chez les trois espèces. L'augmentation du rendement dépend de l'espèce végétale ; chez *Salvia* et *pélargonium*, cette augmentation est importante et représente 33 et 27% respectivement alors qu'elle est faible chez le basilic et ne représente que 14%.

La composition chimique des huiles essentielles des trois plantes est dominée par le groupe des monoterpènes. Cette composition est fortement influencée par les facteurs étudiés dans ce travail. En général, les teneurs en monoterpènes varient en sens inverse par rapport à celles des sesquiterpènes. Par ailleurs, au sein d'un même groupe de molécules (mono ou sesquiterpènes), on assiste parfois à une évolution inverse dans les teneurs des différentes familles, c.-à-d. l'augmentation d'une famille est accompagnée par la diminution d'une autre : c'est ainsi que l'augmentation des teneurs en monoterpènes hydrocarbonés est accompagnée d'une diminution des teneurs en monoterpènes oxygénés et inversement, et l'augmentation des teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés est accompagnée d'une diminution des teneurs en sesquiterpènes oxygénés et inversement.

Salvia et *Pélargonium* sont caractérisés par une hétérogénéité importante dans la composition chimique de leurs huiles essentielles avec respectivement 47 et 55 molécules. Par contre, l'huile essentielle du basilic ne montre pas cette grande diversité moléculaire puisqu'elle n'est constituée que par une vingtaine de molécules. Cette composition chimique est déterminée par les teneurs en différentes molécules constitutives est largement influencée par la succession des phases phénologiques, par les conditions environnementales ainsi que par les autres facteurs étudiés dans ce travail : au sein de même famille, on assiste à des réactions d'isomérisation et de conversion d'une molécule à une autre. C'est le cas de l'isomérisation de m-chavicol en t-anéthole sous l'effet du traitement par l'AG chez *O. gratissimum*, et de la conversion de l'isogéraniol en menthol au cours de la pleine floraison chez *Pelargonium*. On assiste également à l'apparition de nouvelles molécules et/ou la disparition de molécules préexistantes.

Références bibliographiques

A

Åberg, B. & Johansson, I., 1969. Studies on plant growth regulators. XXIV. Some phenolic compounds. *Lantbr Högsk. Annlr* 35: 3–27.

Abu-Darwish mohammad Sanad, Essential Oils Yield and Heavy Metals Content of Some Aromatic Medicinal Plants Grown in Ash-Shoubak Region, South of Jordan. *Advances in Environmental Biology*, 3(3): 296-301, 2009

Abrahám, E., Rigó, G., Székely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L., 2003. Lightdependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 51, 363–372.

Abu-Darwish MS, Abu-Dieyeh ZHM (2009). Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agr. Biol.* 11: 59-63.

Affonso VR, Bizzo HR, Lage CLS, Sato A (2009) Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of in vitro Plantlets of *Thymus vulgaris* L. *J Agric Food Chem* 57:6392–6395

Ain-Lhout F, Zunzunegui1 M., Diaz M.C. Barradas, R. Tirado, A. Clavijo& F. Garcia Novo Comparison of proline accumulation in two mediterranean shrubssubjected to natural and experimental water deficitPlant and Soil 230: 175–183, 2001.

Akiyama, K., and Hayashi, H. 2002. Arbuscularmycorrhizalfunguspromoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots.*Biosci.Biotechnol.Biochem.* 66:762–769.

Alia, E.A., Gahiza, I.A., 2007. Accumulation of amino acids in *Anabaena oryzae* in response to sodium chloride salinity. *Journal of Applied Sciences Research* 3, 263–266.

An-Dong, S.H., Qian, L. Jian-Guo, H. and Ling, Y. (2013). Influence of arbuscularmycorrhizal fungi on growth,mineral nutrition and chlorogenic acid content of *loniceraconfusaseedlings* under field conditions. *Pedosphere*.23(3): 333–339.

Angadi, S.P. & Vasantha Kumar, T., 1995. Geranium. In: Chadha, K.L. & Rajendra Gupta (Editors). *Advances in Horticulture. Volume 11: Medicinal and aromatic plants.* Malhotra, New Delhi, India. 932 pp. (pp. 668–687).

Arikat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S., Shibli, R.A.: Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). - *Scientia Hort.* **100**: 193-202, 2004.

Ascensão L, Pais MS. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann Bot.* 1998;81:263–271.

Référence Bibliographiques

Azalenko K. (1995), Contribution à la détermination des chemotypes d'une plante à huile essentielle du Togo : *Lippia mutiflora*. Mémoire d'ingénieur de travaux, ESTBA, Univ. Lomé

B

Baize D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA Éditions, Paris, 410 p.

Baslam, M., Garmendia, I. and Goicoechea, N. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse grown lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5504–5515.

Bates L.S., Waldren R.P., Teare J.D. 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant and Soil.* 39: 205-207.

Bettaieb I., Hamrouni-Sellami I., Bourgon S., Liman F., Marzouk B., Drought effects on polyphenols composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol. Plant*, 2011; 33: 1103-1111.

Bhatt A, Y Naidoo and A Nicholas An investigation of the glandular and non glandular foliar trichomes of *Orthosiphon labiatus* N.E.Br. [Lamiaceae] *New Zealand Journal of Botany*, Vol. 48, Nos. 34, September December 2010, 153161

Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2001). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Edited by Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Brown, D. M. Fall Workdays in Ontario. Ontario Agricultural College Facsheet: Guelph, 1970. 6p.

Brzozowska et P. Hanower 1976 les composés phénoliques des végétaux et leurs rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers des végétaux, *Annales de l'Université d'Abidjan, série C (Sciences)*, tome XII,

C

Carlen C, C.-A. Carron, C. Previdoli et Catherine Baroffio, *Sauge officinale*: effets de la fréquence des récoltes, de la hauteur et de la date de la dernière coupe avant l'hiver sur la productivité et la qualité. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 38 (5): 315-320, 2006

Carrasco A, Boudet AM and Marigo G (1978) Enhanced resistance of tomato plants to *Fusarium* by controlled stimulation of their natural phenolic production. *Physiol Plant Pathol* 12:225-232

Ceballos Lilian · Maxime Delescluse · Marc Gibernau Martine Hossaert-Mckey 2002 Effects of sublethal attack by a sucking insect, *Hyalomenus tarsatus*, on *Sesbania drummondii* seeds: Impact on some seed traits related to fitness *Ecoscience* 9:28-36

Cerasela elena gîrd, ioana nencu, teodora costea, ligia elena duțu, maria lidia popescu, nicoleta ciupitu quantitative analysis of phenolic compounds from *salvia officinalis* l. leaves *FARMACIA*, 2014, Vol. 62, 4 p 646-657

Chalchat J.C., Garry R.F., Michet A Essential oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean littoral *J Essential Oil Res*, 10 (1998), pp. 613–617

Référence Bibliographiques

Charpentier, J. P. 1987: Les composés phénoliques du *Pelargonium hortorum*. Diss. Univ. Orlean

Chen Chien, Li-Men Chen, Chuan Chi Lin, Ching Huei Kao; Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper Plant Science 160 (2001) 283–290

Cherepneva G. N., Kukina I. M., Kuznetsov V. V., Kulaeva O. N., Mikulovich T. P. (1998) Effects of ABA on the synthesis of total and chloroplast proteins in pumpkin cotyledons and on the accumulation of chloroplast gene transcripts. Russian Journal of Plant Physiology, vol. 46, p. 47-56

Chiariello, N. R., H. A. Mooney, and K. Williams. 1989. Growth, carbon allocation and cost of plant tissues. Pages 327-365 in R. W. Pearcy, J. Ehleringer, H. A. Mooney, and P. W. Rundel, editors. Plant physiological ecology: field methods and instrumentation. Chapman and Hall, London, UK.

Copetta, A., Lingua, G. and Berta, G., (2006). Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. Var. Genovese. *Mycorrhiza* 16: 485–494.

Copetta, A., Lingua, G., Berta, G., Bardi, L., and Masoero, G. 2006. Three arbuscular mycorrhizal fungi differently affect growth, distribution of glandular trichomes and essential oil composition in *Ocimum basilicum* var. Genovese. Proceedings of the 1st International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation 723:151–156.

Cornic G., Fresneau C. (2002). Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, 89, n°sp., 887-894

Corsi G. and s. *Bottega* (1999) Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function *Annals of Botany* 84: 657-664

Craveiro A, Barreira ES, Rabi J, Dagnino D (1989) Estudo sobre o efeito de citocininas na biossíntese de monoterpenos. SBPC, Fortaleza-CE, p 531

Croteau, R. (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.* 87, 929-954. <http://dx.doi.org/10.1021/cr00081a004>

Croteau R, Felton M, Karp F, Kjonaas R. Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*) *Plant Physiol.* 1981;67:820–824.

D

Dai KM, A preliminary study on species of genus *Mentha* cultivated in China. *Yao Xue Xue Bao* 11:849–859 (2010).

Dakole C.D., Leth V., Vismer H.F., Torp J., Guemdjom E.F.N., Mbeffo M., Tamgue O., Fotio D., Zollo P.H.A., Nkengfack A.E. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi Nguefack J., Dongmo J.B.L., *International Journal of Food Microbiology* 2009 131:2-3 (151-156)

Dasuki, U.A., 2002. *Pelargonium Rosat* Group. Fiche de Protabase. Oyen, L.P.A. & Lemmens, R.H.M.J. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas.

Référence Bibliographiques

David R. Gang, Jihong Wang, Natalia Dudareva, KyoungHee Nam, James E. Simon, EfraimLewinsohn, and EranPichersky (2001), An Investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil,*Plant Physiol.* Vol. 125, p 539-555

Davies J, Potter JR, Linderman RG (1993) Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration–response in gas exchange and water relations. *Physiol Planta*

Decendit A, Petit G, Andreu F, Doireau P, Mérillon JM, Rideau M (1993) Putative sites of cytokinin action during their enhancing effect on indole alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. *Plant Cell Rep* 12: 710-712.

Delauney AJ and Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215–223

Demarne, F. E. (1989) L'amélioration variétale du 'Geranium Rosat' (*Pelargonium* sp.) contribution systématique, caryologique, et biochimique, Thesis, Université De Paris, pp. 1-250.

Demoss, e. k., m. Woolwine, r. h. Wilson, and c. mc. Millan: The effects of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. *Amer. J. Bot.* 62, 97-102 (1975).

87:45–53

Diáz j., BERNAL A., PO MAR F., MERINO F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci.* 161, 179, 2001.

Dixon RA and NL Paiva Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.* 1995 Jul; 7(7): 1085–1097. doi: 10.1105/tpc.7.7.1085

Dos, Santos-Neto, LI; De, Vilhena, Toledo, Ma; Medeiros-Souza, P; De, Souza, Ga (December 2006). "[The use of herbal medicine in Alzheimer's disease-a systematic review](#)" (Free full text). *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 3 (4): 441–5. doi:10.1093/ecam/nel071.PMC 1697739. PMID 17173107.

Dubey K, Tiwari TN, Danielle M, Hary A, Jean-Pierre C (2000) Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia* 71:567–569

E

Ebrahim Seyed Sajjadi (2006) Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.). From Iran *Daru* 14:3

EléonoreYayi, Joachin D. Gbenou , Léon AkanniAhoussi , Mansour Moudachirou, Jean Claude Chalchat *Ocimum.gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développementC. R. Chimie 7 (2004) 1013–1018

El-Keltawi NE, Croteau R (1987) Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of the lamiaceae. *Phytochemistry* 26(4): 891-895.

El-Said Deef Hanan (2007), Copper treatments and their effects on growth, carbohydrates, minerals and essential oils contents of *Rosmarinus officinalis* L, *World journal of agricultural sciences* 3(3):322-328

Eranki V. S. Prakasa Rao, Ravoor S. Ganesha Rao & Srinivasaiyer Ramesh Seasonal Variation in Oil Content and Its Composition in Two Chemotypes of Scented Geranium (*Pelargonium* sp.) *Journal of Essential Oil Research* Volume 7, Issue 2, 1995 pages 159-163

Référence Bibliographiques

Erbelgin N, Krokene P, Christiansen E, Gazmend Z, Gershenzon J (2006) Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces host colonization by the bark beetle *Ips typographus*. *Oecologia* 148:426–436

F

Fahn A. Secretory Tissues in Plants. New York: Academic Press; 1979. pp. 162–164.

Faizan ullah, Asghari bano and Asia nosheen effects of plant growth regulators on growth and oil quality of canola (*brassica napus* l.) under drought stress Pak. J. Bot., 44(6): 1873-1880, 2012.

Farago ME, Mullen WA (1979) Plants which accumulate metals. IV. A possible copper–proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Chim Acta* 32:93–94

Farooqi AHA, Khan A, Sharma S (2003) Effect of kinetin and chlormequat chloride on growth, leaf abscission and essential oil yield in *Mentha arvensis*. *Indian Perfumer* 47(4): 359-363.

Farooqi AH, Sharma S (1988) Effect of growth retardants on growth and essential oil content in Japanese mint. *Plant Growth Regul* 7: 39-45.

Farooqi AHA, Sharma S, Naqvi AA, Khan A (1993) The effect of kinetin on flower and oil production in *Rosa damascena*. *J Essent Oil Res* 5: 305-309.

Fattahi M, V Nazeri , F Sefidkon , Z Zamani (2010), Effect of phenological stages on chemical compositions of essential oils of *Dracocephalum kotschy* Boiss. growing wild in Dizin of Iran, *Planta Med* 2010; 76 - P320, DOI: 10.1055/s-0030-1264618

Ferahani, H.A., Lekaschi, M.H. and Hamidi, A. (2008). Effects of arbuscularmycorrhizal fungi, phosphorus and water stress on quantity and quality characteristics of coriander. *Adv. Nat. Appl. Sci.* 2: 55–59.

Fernandes J.C., F.S. Henriques, Biochemical, physiological and structural effect of excess copper in plants, *Bot. Rev.* 57 (1991) 246–273.

Fletcher R. S., T. Slimmon, L. S. Kott, *Open Agric. J.* 2010, 4, 10.

Franchomme P. et PENOEL D. (1990), Matière médicale aromatique fondamentale (317-406), livre quatrième, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. R.Jollois Edit., Limoge, 446p.

Francis M.J.O. 1971. In: Goodwin T.W. (ed.), *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, London, p. 29.

Fraternal D, Giamperi L, Ricci D, Rocchi MBL, Guidi L, Epifano F, Marcotullio FC (2003) The effect of triacontanol on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:87–97

Fredeen, A.L. and Terry, N. (1988). Influence of vesicular-arbuscularmycorrhizal infection and soil phosphorus level on growth and carbon metabolism of soybean. *Can. J. Bot.* 66: 2311-2316.

Freitas, M.S.M., Martins, M.A. and Curcino Vieira, I.J. (2004). Yield and quality of essential oils of *Mentha arvensis* in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 39: 887–894.

G

Galen, C., and Stanton M. L. 1995. Responses of snowbed plant species to changes in growing-season length. *Ecology* 76:1546-1557.

Gange AC, Gange EG, Sparks H, Boddy L. 2007. Rapid and recent changes in fungal fruiting patterns. *Science* 316: 71.

Gang, D.R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E. and Pichersky, E. (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* 125, 539–555

Generalie I, Skroza D, Surjak J, Mozina SS, Ljubenkovic I, Kataliniec A, Simat V, Kataliniec V. Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chem Biodivers.* 2012;9(2):441-57

Gershenzon J (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *J Chem Ecol* 20:1281–1328

Gershenzon, j., Maffei,., and Croteau, R. (1989). Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Menthaspicata*). *Plant Physiol.* 89:1351 - 1357.

Gershenzon J. 1984. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. Pages 273–320 in *Recent Advances in Phytochemistry*, Volume 18, edited by B N Timmermann et al. New York: Plenum Press.

Giannakoula, A. E., Ilias, F. I., Dragišić Maksimović, J., Maksimović, V. M., Zivanović, B. D. (2012). The effects of plant growth regulators on growth, yield, and phenolic profile of lentil plants. *J. Food Comp. Anal.*, 28, 46–53

Giovannetti M, Avio L (2002) Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizas*. In: Khachatourians GG, Arora DK (ed) *Applied Mycology and Biotechnology*, Vol. 2. Agriculture and Food Production. Elsevier, Amsterdam, pp 275–310

Corsi. G and s. bottega Glandular Hairs of *Salvia officinalis*: New Data on Morphology, Localization and Histochemistry in Relation to Function *Annals of Botany* 84: 657-664, 1999

Gupta umesh C. and Winter K. A (1975). selenium content of soils and crops and the effects of lime and sulfur on plant selenium, *canadian journal of soil science* 55: 161-166.

Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M. and Kumar, S. (2002). Effect of the vesicular–arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresour. Technol.* 81: 77–79.

Graham E.R. 1973 selective distribution and labile pools of micronutrient elements as factors affecting plant uptake. *Proc soil sci soc am J* 37:70-74

Référence Bibliographiques

Grandmaison, J., Olah, G.M., Van, Calsteren, M.R., Furlan, V. (1993). Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza*. 3:155– 164.

Gross M, Jacob F, Nativ D, Olga L, Yael C, Einat B, Uzi R, Eli P, Efraim L (2002) Biosynthesis of estragole and t-anethole in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene Omethyltransferase activities during development. *Plant Sci* 163:1047–1053

Grulova Daniela, Laura De Martino, Emilia Mancini, Ivan Salamon and Vincenzo De Feo Seasonal variability of the main components in essential oil of *Mentha × piperita* L. *J Sci Food Agric* (2014) (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.6802

H

Haque S, Farooqi AHA, Gupta MM, Sangwan RS, Khan A (2007) Effect of ethrel, chlormequat chloride and paclobutrazol on growth and pyrethrins accumulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. *Plant Growth Regul* 51: 263-269.

Hamrouni Ibtissem Sellami, Emna Maamouri, Thouraya Chahed, Wissem Aidi Wannes, Mohamed Elyes Kchouk, Brahim Marzouk Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) *Industrial Crops and Products* 30 (2010) 395–402

Handa S, Handa AK, Hasegawa PM and Bressan RA (1986) Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to salinity stress. *Plant Physiol* 80: 938–945

Held, D. W., P. Gonsiska, and D. A. Potter. 2003. Evaluating companion planting and non-host masking odors for protecting roses from the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 81-87.

Heldwein C.G., Reetz L.G.B., Hörner R., Mallmann C.A., Heinzmann B.M. [In Process] *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2010 20:5 (700-705) Chemical composition, antibacterial activity in vitro and brine-shrimp toxicity of the essential oil from inflorescences of *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae Silva L

Hendawy S.F. and Khalid Kh. A (2005), Response of Sage (*Salvia Officinalis* L.) Plants to Zinc Application Under Different Salinity Levels. *Journal of Applied Sciences Research* 1(2): 147-155

Heuer B (1994) Osmoregulatory role of proline in water and salt-stressed plants. In: Pessarakli M (ed) *Handbook of Plant and Crop Stress*, pp 363–381. New York: Marcel Dekker, Inc

I

Iker H, Leonor A, Sergi M-b (2004) Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiol* 24:1303–1311

Inskip William p. and Bloom Paul R (1985). Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone *Plant Physiol.* 77, 483-485

Iuvone, T; De, Filippis, D; Esposito, G; D'Amico, A; Izzo, Aa (June 2006). "The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity" (Free full text). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317 (3): 1143 9.doi:10.1124/jpet.105.099317. PMID 16495207.

Référence Bibliographiques

Iriti, M., G. Colnaghi, et al. (2006). "Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study." *Flavour and Fragrance Journal* 21(4): 704-712.

Iroanya O.O., Okpuzor J.E., Mbagwu H., Ojobo Analgesic properties of an indigenous polyherbal preparation P.D. *The FASEB Journal* 2009 23:S1

J

José Luiz Petri, Fernando José Hawerth, Gabriel Berenhauser Leite, Marcelo Couto and Poliana Francescatto Apple Phenology in Subtropical Climate Conditions 196-216 (2012)

Jung ch ., maeder v., funk f., frey b., stich er h., fross erd e. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 252, 301, 2003.

K

Kapoor R, Chaudhary V, Bhatnagar AK (2007) Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza* 17:581–587

Kapoor R, Giri B, Mukerji KG (2004) Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresour Technol* 93:307–311

Kaya Cengiz, A. Levent Tunaand Alfredo A. C(2006). Alves Gibberellic acid im proves wa ter def i cit tol er ance in maize plants, *acta physiologiae plantarum* Vol. 28. No. 4: 331-337

Kbata-Pendias A., and H.Pendias.1992. Trace Elements in soils and plants.2nd edit., CRC press, 365p.

Khalid Kh.A Int. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical compositionof herbs (*Ocimum* sp.)*Agrophysics*, 2006, 20, 289-296

Khaliq, A. and K.K. Janardhanan. 1997. Influence of VAM Fungi on the productivity of cultivated mints. *Lucknow. J. Medi. & Arom. Pl. Sci.*, 19: 7-10.

Khan, M.N., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Naeem, M., Khan, M.M.A., 2010b. Calcium chloride and gibberellic acid protect Linseed (*Linum sitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. *Acta Physiologia Plantarum* 32, 121–132.

Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M, Zitterl-Eglseer K, Novak J (2006) Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum sp.*, Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16:443–446

Kheyar Nawel, Dahia Meridja , Kamel Belhamel, Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, *Algerian Journal of Natural Products* 2:1(2014)18-26

Kim H-J, Chen F, Chen F, Rajapakse NC (2006) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 54:2327–2332

Kim J.Y., Mahe A., Brangeon J., Prioul, J.L. (2000). A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology*, 124, 71-84

Kishore D Srinivasan Kannan (2006). *Journal of Molecular Catalysis A* 244:83–92

Kubikova E, Moore JL, Ownlew BH, Mullen MD, Augé RM.2001. Mycorrhizal impact on osmotic adjustment in *Ocimum basilicum* during a lethal drying episode.*Journal of Plant Physiology* 158, 1227–1230.

Référence Bibliographiques

Kucey RMN, Paul EA (1982) Carbon flow, photosynthesis and N₂ fixation in mycorrhizal and nodulated fababeans (*Vicia faba* L). *Soil Bioi Biochem* 14:407–412

Kyoung Nam Ko, KyoungWhan Lee, Sang Eun Lee, and EunSoo Kim Development and Ultrastructure of Glandular Trichomes in *Pelargonium x fragrans* 'Mabel Grey' (Geraniaceae) *Journal of Plant Biology*, June 2007, 50(3) : 362-368

L

Langenheim Jean H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles *Journal of Chemical Ecology* June 1994, Volume 20, Issue 6, pp 1223-1280

Latte Klaus peter and **Kolodziej** herbert Antioxidant Properties of Phenolic Compounds from *Pelargonium reniforme* (2004)

Lavid n., schwartz a., yar den o., tel-or e. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy metal accumulation by epidermal glands of waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* 212, 323, 2001.

Lemberkovics E., Petri G., Nguyen H. and Mathe I. 1995. Relationships between essential oil and flavonoid biosynthesis in sweet basil. *Acta. Horticulturae*. 426: 647–655.

Levin, D.A. 1973. The role of trichomes in plant defence. *Quart. Rev. Biol.* 48: 3-15.

Levy, Y. and Krikun, J. (1980).Effect of vesicular-arbuscularmycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relations.*New Phytol.* 85: 25-31.

Lewinsohn E, Ziv-Raz I, Dudai N, Tadmor Y, Lastochkin E, Olga Larkov A, David C, Uzi R, Eli P, Eran P, Yuval S (2000) Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L), Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Sci* 160:27–35

Li Z, Wang X, Chen F, Kim H-J (2007) Chemical changes and over expressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. *J Agri. Food Chem* 55:706–713

Loveys, B.R.; Robinson, S.P; Brophy, J.J. & Chacko, E.K. Mango sapbum: Components of fruit sap and their role in causing skin damage. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19:449-457, 1992.

Luis J. C., C. B. Johnson, *Span. J. Agric. Res.* 2005, 3, 106.

M

MacFarlane G.R. and M.D. Burchett Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh *Marine Environmental Research* 54 (2002) 65–84

Mackinol, RD and P.H.T Beckett.1985. Critical tissue concentration of potentially toxic elements. *Plant soil*.85:107

Madeira S.V.F., M.Rabelo, P.M.G. Soares, E.P. Souzaa, A.V.P. Meireles, .C Montenegro , R.F. Limaa, A.M.S. Assreuya, D.N. Criddle, Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (*Labiatae*) on guinea-pig ileum *Phytomedicine* 12 (2005) 506–509

Référence Bibliographiques

Maffei M, Chialva F, Sacco T. Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves: I. Variation of peltate trichome number and terpene distribution within leaves. *New Phytol.* 1989;111:707–716.

Maffei M, Gallino M, Sacco T. Glandular trichomes and essential oils of developing leaves in *Mentha viridis lavanduliodora*. *Planta Med.* 1986;52:187–193.

Males E, Žuntar I, Nigović B, Plazibat M, Bilušić Vundać V (2003). Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire—*Crithmum maritimum* L. *Acta Pharmaceutica.* ;53:139–144.

Mallavarapu Gopal R. , Raghavendra N. Kulkarni , Kuppusamy Baskaran , Laxmi Rao , and Srinivasaiyer Ramesh Influence of Plant Growth Stage on the Essential Oil Content and Composition in *Davana* (*Artemisia pallens* Wall.) *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47 (1), pp 254–258 DOI: 10.1021/jf980624c

Marigo Gérard, Boudet Alain m. (1975), Relations polyphénols croissance: Mise en évidence d'un effet inhibiteur des composés phénoliques sur le transport polarisé de l'auxine, *Physiologia Plantarum* Volume 41, Issue 3 November 1977 Pages 197–202

Marigo Gerard, Alain M. Boudet (1979) Effects of an Increase in Levels of Phenolic Compounds on the Auxin Content and Growth of *Lycopersicum esculentum* *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* Volume 92, Issue 1, , Pages 33-38 :doi:10.1016/S0044-328X(79)80150-6

Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. *Academic Press, London.*

Matta A, Gentile I and Gai I (1969) Accumulation of phenols in tomato plants infected by different forms of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 59:512-513

McDonnell, E.M., Coughlan, S.J., Wyn-Jones, R.G., 1983. Differential effects of abscisic acid on glycinebetaine and proline accumulation in three plant species. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 109, 207–213.

McGimpsey, J. A., Douglas, M. H., van Klink, J. W., Beauregard, D. A. and Perry, N. B. (1994) Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flav. Frag. J.* 9, 347-352.

McLean JG, LeTourneau DJ and Guthrie JW (1961) Relation of histochemical tests for phenols to Verticillium wilt resistance in potatoes. *Phytopathology* 51:84-89

Melsted SW, Motto HL and Peck TR (1969) Critical plant nutrient composition values useful in interpreting plant analysis data. *Agron J* 61:17-20

Michalak A (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress *Polish. Journal. Environmental. Studies* Vol. 15, No. 4 523-530.

Milic b.l., Djilas s.m., Canadanovic-brunet j.m. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chem.* 61, 443, 1998.

Misra a., a.k. srivastava, n.k. srivastava, and a. khan Zn-acquisition and its role in growth, photosynthesis, photosynthetic pigments, and biochemical changes in essential monoterpene oil(s) of *Pelargonium graveolens* *photosynthetica* 43 (1): 153-155, 2005 153

Misra. A and Sharma. S Critical Zn concentration for essential oil yield and menthol concentration of Japanese mint *Fertilizer Research* 29: 261-265, 1991. 1991 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 261

Misra An et Biswal Uc (1980) effect of phytohormones on chlorophyll degradation during aging of chloroplasts in vivo and in vitro, *protoplasma* 105, 1-8

Référence Bibliographiques

Mirjalili Mohammad Hossein, Peyman Salehi, Ali Sonboli, Masood Mohammadi Vala Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle Chemistry of Natural Compounds January 2006, Volume 42, Issue 1, pp 19-23

Mitova v., Volokita m., Guy m., Tal m. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 110, 45, 2000.

Morgan j.f., klucas r.v., gray er r.j., abian j., becana m. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 861, 1997.

Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berteà, C. and Maffei, M. (2003). In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytol.* 158: 579–591.

N

Naghdi Badi Hassanali, Darab Yazdani, Sajed Mohammad Ali, Fatemeh Nazari Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. Volume 19, Issue 3, May 2004, Pages 231–236

Neelamsingh-Sangwan, A. H. Abad Farooqif and rajender Singh sangwan Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses *New phytol*(1994), 128, 173-179

Nemec, S., Lund, E. (1990). Leaf volatiles of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Citrus jambhiri* Lush. *J Essent Oil Res.* 2:287-297.

Ngassoum MB, Essia-Ngang JJ, Tatsadjieu LN, Jirovetz L, Buchbauer G, Adjoudji O (2003) Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia* 74(2003):284–287

Nitsch, J. P. & Nitsch, C., 1962. Composés phénoliques et croissance végétale. *Annls Physiol. vég.* 4: 211–225.

Nolan, K. shetty. acta hort. H26, ISHS Scravoni J, Vasconcellos MC, Valmorbida J, Ferri AF, Marques MOM, Ono EO,

O

Obob F.O.J., Madsodje H.I., Enabulele S.A Nutritional and antimicrobial properties of *Ocimum gratissimum* leaves. *Journal of Biological Sciences* 2009 9:4 (377-380)

Ohki K (1976) Effect of zinc nutrition on photosynthesis and carbonic anhydrase activity in cotton. *Physiol Plant* 38:300-304

Okasha KA, Ryugo K and Bringhurst RS (1968) Inhibition of growth of *Verticillium albo-atrum* sporelings by tannins and polyphenols from infected crowns of *Verticillium*-resistance and -susceptible strawberry cultivars. *Phytopathology* 58:1118-1122

Oliveira V.C.S., Moura D.M.S., Lopes J.A.D., De Andrade P.P., Da Silva N.H., Figueiredo R.C.B.Q Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitology Research* 2009 104:5 (1053-1059)

Référence Bibliographiques

Oliveira Marcio J., Irani F.P. Campos Carolina B.A. Oliveira, Marisa R. Santos Paulo S. Souza Suzana C. Santosa Jose´ C. Seraphin Pedro H. Ferri, Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens* Biochemical Systematics and Ecology 33 (2005) 275–285

Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodríguez- Concepción M, St-Pierre B, Burlat V (2007) Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. PlantMol Biol 65:13–30

Ozlem toncer , Sengul karaman , Suleyman kizil , Emel DIRAZ2)Changes in Essential Oil Composition of Oregano (*Origanum onites* L.) due to Diurnal Variations at Different Development Stages Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 37 (2) 2009, 177-181

Ozguven Menşure, Sezen TANSI Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. as in Influenced by Ecological and Ontogenetical Variation Tr. J. of Agriculture and Forestry 22 (1998) 537-542

P

PARY A.D., TIL ER S.A., EDWAR DS R. The Effects of Heavy Metals and Root Immersion on Isoflavonoid Metabolism in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Plant Physiol. 106, 195,1994.

Usherwood, P. N. R. 1994. Insect glutamate receptors. Advances in Insect Biochemistry and Physiology. 24: 309-341.

Patil SS, Powelson RL and Young RA (1964) Relation of chlorogenic acid and free phenols in potato roots in infection by *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology 54:531-535

Patricia Trotel Aziz 1999; Contribution a l'étude du syndrome prolinique chez le colza (*brassica napus* L.) : implication de l'acide abscissique. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1, Rennes, France

Pedro LG, Barroso JG, Marques NT, Ascensa L, Pais MS, Scheffer JJ. 1991. Composition of the essential oil from sepals of *Leonotis leonurus* R. Br. Journal of Essential Oil Research 3: 451-453.

Pedro L., P. Campos and M. S. Pais Morphology, ontogeny and histochemistry of secretory trichomes of *Geranium robertianum* (Geraniaceae) Nord. J. Bot. - Section of structural botany 10(5) (1990) page 501-509 *Reniforme*

Penning de Vries FWT, Brunsting AHM, Van Laar HM. 1974. Products, requirements and efficiency of biosynthesis: A quantitative approach. Journal of Theoretical Biology 45: 358-377

Pessoa LM, Morais SM, Bevilacqua CML, Luciano JHS (2002) Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 109:59–63

Peter Rogers Mosley, Michael. "[Unexpected ways to wake up your brain](#)". Retrieved 30 October 2014.

Petropoulos SA, Dimitra D, Polissiou MG, Passam HC (2008). The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. Sci Hort 115: 393–397.

Philips et Hayman (1970), improved procedures for clearing and staining parasite and vesiculaire-arbuscularmycorrhizal fungi for rapid assessment of infection trans. Brit. Mycol.soc 55.158-161.

Polonsky J. Bhatnager S.C. Griffiths D.C, Pickett J.A, and Woodcock C.M (1989) Activity of quassinoids as antifeedants against aphids Journal of Chemical ecology 15, 993-998

Référence Bibliographiques

Potter, D. A. and Held, D. W. 1999. Absence of food-aversion learning by a polyphagous scarab, *Popillia japonica*, following intoxication by geranium, *Pelargonium x hortorum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 91: 83-88.

Povh JA, Ono EO (2006) Rendimento do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. *Acta Sci Biol Sci* 28(3): 189-193.

Poyh JÁ, Ono EO (2007) Efeito do ácido giberélico na composição do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. *Publ UEPG Biol Health Sci* 13(1/2):7–10

Pozo et Azcón-Aguilar (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance, *Current Opinion in Plant Biology* Volume 10, Issue 4, Pages 393–398 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>

Putievsky, E. Ravid, U. Diwan-Rinzler, N. and Zohary D. Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill. and their hybrids *Flavour and Fragrance Journal* Volume 5, Issue 2 Pages 121–123

Putievsky, E., Ravid, U. and Dudai, N. (1990) The effect of water stress on yield components and essential oil of *Pelargonium graveolens* L. *J. Essent. Oil Res.* 2, 11 1-14

Prakasa Rao, E.V.S., Ganesha Rao, R.S. & Ramesh, S., 1995. Seasonal variation in oil content and its composition in two chemotypes of scented geranium (*Pelargonium* sp.). *Journal of Essential Oil Research* 7: 159–163 <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1995.9698491>

Prins CL, Vieira IJC, Freitas Braz SP (2010) Growth regulators and essential oil production. *J Plant Physiol* 22:91–102

U

Unzelmanj, . M., and P. L. Healey. 1974. Development, structure, and occurrence of secretory trichomes of *Pharbitis*. *Protoplasma* 80: 285-303.

Uphof JCT. 1962. Plant hairs. *Encyclopedia of Plant Anatomy* IV, 5: 1-206.

R

Randriamiharisoa R, Gaydou EM, Banchini JP, Ravelojaona G, Vernin G (1986) Etude de la variation, de la composition chimique et classification des huiles essentielles de basilic de MADAGASCAR. *Science et Aliments* 6:221–231

Ranger, C.M.; Winter, R. E.; Singh, A. P.; Reding, M. E.; Frantz, J. M.; Locke, J. C.; Krause, C. R. (2011). "Rare excitatory amino acid from flowers of zonal geranium responsible for paralyzing the Japanese beetle". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (4): 1217–1221. doi:10.1073/pnas.1013497108.

Rashmi Vamil, Aniat-ul-haq, R K Agnihotri and Rajendra Sharma; Effect of certain plant growth regulators on the seedling survival, biomass production and proline content of *Bambusa arundinacea*; *Science Research Reporter* 1(2):44 - 48, Sept. 2011

Rajeswara Rao, B. R., Sastry, K. P., Prakasa Rao, E. V. S. and Ramesh, S. (1990a) Variation in yield and quality of geranium (*Pelargonium graveolens* L' Her. ex Aiton.) under varied climatic and fertilin/ conditions. *J. Essent. Oil Res.* 2, 73-79.

Référence Bibliographiques

Rajeswara Rao, B. R., Bhattacharya, A. K., Kaul, P. N., Chand, S. and Ramesh, S. (1993) Changes in profiles of essential oils of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) during leaf ontogeny. *J. Essent. Oil Res.* 5,301-304. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1993.9698224>

Rajeswara rao B. R., p n. kaul, g. r. mallavarapu and s. rameshs (1996)Effect of Seasonal Climatic Changes on BiomassYield and Terpenoid Composition of Rose-scented Geranium (*Pelargonium species*), *Biochemical Svstemat and Ecology*. Vol. 24, No.?/9. pp. 627-635.

Rajeswara Rao Bhaskaruni R., Kakaraparthi P. Sastryb, Eranki V.S. Prakasa Rao & Srinivas I. Ramesh Variation in Yields and Quality of Geranium (*Pelargonium graveolens* L' Hér. ex Aiton) under Varied Climatic and Fertility Conditions *Journal of Essential Oil Research* Volume 2, Issue 2, 1990

Rao B.R. Rajeswara, , P.N. Kaul, G.R. Mallavarapu, S. Ramesh Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rose-scented geranium (*Pelargonium species*) *Biochemical Systematics and Ecology* Volume 24, Issues 7–8, October–December 1996, Pages 627–635

Rapior S · Ceballos L · Mousain D · Andry C· Bessiere J.M 1998 Bioproduction des substances volatiles aromatisantes par les Suillus. *Annales de la Société d'Horticulture et d'Histoire Naturelle de l'Hérault*, 138 (2), 42-46

Rapparini, F., LLUSIA, J., and PENUÉLAS, J. 2008. Effect of arbuscularmycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biol.* 10:108–122

Rasouli-Sadaghianil, M.H., Hassani, A., Barin, M., Danesh, Y.R. and Sefidkon, F. (2010).Effects of arbuscularmycorrhizal (AM) fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. *J Med Plants Res.*4(21):2222 – 2228.

Reda F, Abdel Rahim EA, El Baroty GSA, Ayad HS (2005) Response of essential oils, phenolic components and polyphenol oxidase activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) to some bioregulators and vitamins. *J Agr Biol* 7:735–739

RetigNand Chet I (1974) Catechol-induced resistance of tomato plants to *Fusarium* wilt. *Physiol Plant Pathol* 4:469-475

Ribereau-Gayon, P., Stonestreet, E., les composés phénoliques des végétaux 1966

Rodriguez A.S., Pérez-Gregorio M.R., García-Falcón M.S., Gándara S.J., Almeida D.F., Effect of meteorological conditions on antioxidant flavonoids in Portuguese cultivars of white and red onions. *Food Chemistry*, 2011; 124: 303-308.

Rodrigues JD (2006) Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. *Rev Bras Pl Med* 8(4):40–43

Rodriguez-Saona C, Crafts-Brandner SJ, Paré PW, Henneberry TJ (2001) Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *J Chem Ecol* 27(4):679–695

Rohloff J, Dragland S, Mordal R and Iversen T-H, Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield, and quality of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *J Agric Food Chem* 53:4143–4148 (2005).

Rojas-Andrade, R., Cerda-Garcia-Rojas, C.M., Frias-Hernandez, J.T., Dendooven, L., Olalde-Portugal, V. and Ramos- Valdivia, A.C. (2003). Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscularmycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. *Mycorrhiza*. 13: 49–52.

Référence Bibliographiques

Rosa LP, dos Santos MA, Matvienko B, dos Santos EO, Sikar E (2004) Greenhouse gases emissions by hydroelectric reservoirs in tropical regions. *Climatic Change* 66(1–2):9–21

Rosa M. Rivero, Juan M. Ruiz, Pablo C. Garcí'a, Luis R. Lo'pez-Lefebre, Esteban Sa'nchez, Luis Romero Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants *Plant Science* 160 (2001) 315–321

Ruiz-Lozano JM, Azcn R (1995) Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol Plant* 95:472–478

S

Sakai, W. S., and W. G. Sanford. 1980. Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Annals of Botany* 46:7-11.

Salah el deen Et Mahmoud (1996) Response of Growth and essential oil content of sweet Basil (*Ocimum basilicum* L) To some naturel hormones, proceeding int .symp. In: Medicinal and aromatics plants. Eds. L.E Craker, L.

Salisbury F B and Ross C 1974 Plant physiology (New Delhi: Prentice Hall of India Pvt. Ltd.)

Sangwan N.S., A.H.A. Farooqi, F. Shabih and R.S. Sangwan. Regulation of essential oil production in plants *Plant Growth Regulation* 34: 3–21, 2001.

Scora, R.W., Chang, A.C., 1997. Essential oil quality and heavy metal concentrations of peppermint grown on a municipal sludge-amended soils. *J. Environ. Qual.* 26, 975–979. Gupta, U 1975 In Copper in the environment, JO Nriagu ed. 255. John Wiley and Sons Inc., New York.

Scravoni J, Vasconcellos MC, Valmorbida J, Ferri AF, Marques MOM, Ono EO, Rodrigues JD (2006) Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. *Rev Bras Pl Med* 8(4):40–43

Shao Hong-Bo, Li-Ye Chu , Cheruth Abdul Jaleel , Chang-Xing Zhao, Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants *C. R. Biologies* 331 (2008) 215–225

Sharma SK, Srivastava VK, Pandya PH, Raksh V (2005) Jasra Solvent-free isomerization of methyl chavicol to trans-anethole using transition metal complexes as atalysts. *Catalysis Communications* 6:205–209

Sharma SS, Schat H, Vooijs R (1998) In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. *Phytochemistry* 49:1531–1535

Sheppard JW and Peterson JF (1976) Chlorogenic acid and Verticillium wilt of tobacco. *Can J Plant Sci* 56:157-160

Shukla A, Farooqi AHA (1990) Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. *Curr Res Med Arom Plants* 12:152–157

Sohrabi, Y., Heidari, G., Weisany, W., GhasemiGolezani, K. and Mohammadi, K. (2012b). Changes of antioxidative enzymes, lipi d peroxidation and chlorophyll content in chickpea types colonized by different *Glomus* species under drought stress. *Symbiosis*. 56:5-18.

Solinas, V., Deiana, S., 1996. Effect of water and nutritional conditions on the *Rosmarinus officinalis* L., phenolic fraction and essential oil yields. *Riv. Ital. EPPOS* 19, 189–198.

Référence Bibliographiques

Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C. and Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67-69.

Sivak, M.N. and Walker, D.A. (1986). Photosynthesis in vivo can be limited by phosphate supply. *New Phytologist*. 102: 499-512.

Smith, S. E., and READ, D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.

Kucey, R.M.N. and Paul, E.A. (1982). Carbon flow, photosynthesis and N₂ fixation in mycorrhizal and nodulated fababeans (*Vicia faba* L.). *Soil Bioi. Biochem.* 14: 407-12.

Snellgrove, R.C., Stribley, D.P., Tinker, P.B. and Lawlor, D.W. (1986). The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on photosynthesis and carbon distribution in leek plants. *See Ref.* 13: 421-24.

Snellgrove, R.C., Splittstoesser, W.E., Stribley, D.R. and Tinker, R.B. (1982). The distribution of carbon and the demand of the fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*. 92: 75-S7.

Spurgeon SL, Porter JW. 1981. Biosynthesis of carotenoids. In: Porter JW, Spurgeon SL, eds. Biosynthesis of isoprenoid compounds, vol 2. New York: John Wiley & Sons, pp 1-122.

Sudriá C, Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM, Vila R, Morales C, Bonfill M, Cañigual S (1999) Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 58: 177-184

Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. and Walter, M.H. (2003). Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *J Chem Ecol.* 29:1955–1979.

T

Tapani Repo , Ilkka Leinonen, Aija Ryyppo and Leena Fine'r The effect of soil temperature on the bud phenology, chlorophyll fluorescence, carbohydrate content and cold hardiness of Norway spruce seedlings, *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 121: 93–100. 2004

Tausz M., WONISCH A., GRIL D., MORAL ES D., JIMENEZ M.S. Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluationm. *J. Exp. Bot.* 54, 1505, 2003.

Teisseire Paul José Chimie des substances odorantes, Edition Lavoisier Tec & Doc, 1991

Telci I, Emine B, Gungor Y, Betul A (2006) Variability in essential oil composition of Turkish basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biochem Syst Ecol* 34:489-497

Thompson JD. 1991. The biology of an invasive plant: What makes *Spartina anglica* so successful. *BioScience* 41: 393– 401.

Tissier Alain Glandular trichomes: what comes after expressed sequencetags *The Plant Journal* (2012) 70, 51– 68

Tripathi B. N. and Gaur J. P. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* (2004) 219: 397–404

Torelli, A., Trotta, A., Acerbi, L., Arcidiacono, G., Berta, G., and Branca, C. 2000. IAA and ZR content in leek (*Allium porrum* L.) as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. *Plant Soil*, **225**: 29–35.

Référence Bibliographiques

Toussaint, J.P., Smith, F.A. and Smith, S.E. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of photochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza* 17: 291–297.

Toussaint, J.P., Smith, F.A. and Smith, S.E. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of photochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza* 17: 291–297.

Tuna, A.L., Kaya, C., Dikilitas, M., Higgs, D.E.B., 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany* 62, 1–9.

Turner CE, ElSohly MA, Boeren EG. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. a review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.* 1980;43:169–234.

Trouvelot, A, Kough, J. L. Gianinazzi-Pearson, V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche des méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle In *Physiological aspect of mycorrhiza* (Edbay Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi) pp 217-221. INRA, Paris

Trotel Patricia Aziz 1999; Contribution à l'étude du syndrome prolinique chez le colza (*brassica napus* L.) : implication de l'acide abscissique. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1, Rennes, France

V

Valéry gond, david g. g. de pury, frank veroustraete and reinhart ceulemans Seasonal variations in leaf area index, leaf chlorophyll, and water content; scaling-up to estimate fAPAR and carbon balance in a multilayer, multispecies temperate forest, *Tree Physiology* 19, 673—679 (1999)

Venkatachalam k. v., Robert Kionaas, and Rodney Croteau (1984), Development and Essential Oil Content of Secretory Glands of Sage (*Salvia officinalis*)' *Plant Physiol.* 76, 148-150

Verdian-rizi Mohammadreza and Abbas Hadjiakhoondi Essential Oil Composition of *Laurus nobilis* L. of Different Growth Stages Growing in Iran *Z. Naturforsch.* 63 c, 785-788 (2008)

venkatachalam k. v., robert kionaas, and rodney croteau Development and Essential Oil Content of Secretory Glands of Sage (*Salvia officinalis*)' *Plant Physiol.* (1984) 76, 148-150

Verma Rams., rajesh k. verma, amit chauhan and ajai k. yadav Changes in the essential oil composition of *Majorana hortensis* Moench. cultivated in India during plant ontogeny *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (4) 441–447 (2010) UDC 665.52/.54:635.71(540) JSCS–3977

Vierheilig, H., GAGNON, H., STRACK, D., and MAIER, W. 2000. Accumulation of cyclohexenone derivatives in barley, wheat and maize roots in response to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9:291–293.

Vidhi Chaudhary, Rupam Kapoor, , A.K. Bhatnagar Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology* Volume 40, Issue 1, September 2008, Pages 174–181

Vivier, Véronique (2006) ; Utilisation de la racine de *Pelargonium sidoides* DC. ou Géranium du Cap (Geraniaceae) en phytothérapie (Thèse de doctorat)

Vogl S, Picker P, Mihaly-Bison J, Fakhrudin N, Atanasov AG, Heiss EH, Wawrosch C, Reznicek G, Dirsch VM, Saukel J, Kopp B (Oct 2013). "Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine - An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs". *J Ethnopharmacol* 149 (3): 750771. doi:10.1016/j.jep.2013.06.007. PMC 3791396. PMID 23770053.

Voirin, Brun, N. and Bayet, C. (1990) Effects of day length on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. *Phytochemistry* 29,74S-755.

W

Wahid A (2007) Physiological implications of metabolites biosynthesis in net assimilation and heat stress tolerance of sugarcane sprouts. *J Plant Res* 120:219–228

Wahid A, Ghazanfar A (2006) Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J Plant Physiol* 163:723–730

Wang, B., and QIU, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299–363.ribution and. (s.d.).

Waterman P G, Mole S. 1989. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. Pages 107–134 in *Insect-Plant Interactions, Volume 1*, edited by E A Bernays. Boca Raton (FL): CRC Press

Weiss E.A. 1997. In: *Essential Oil Crops*. CAB International, pp. 24–58.

Weisshaar, B. & Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 251-257.

Werker E (2000), Trichome Diversity and Development, *Advances in Botanical Research* Vol. 31, p 1-35

Werker E, Putievsky E, Ravid U, Dudai N, Katzir I (1993) Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *ocimum basilicum* L (Lamiaceae). *Ann Bot* 71:43–50

Werker E, Ravid U, Putievsky E. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Isr J Bot.* 1985;34:31–45.

Y

Yazdanpanah, H., Ohadi, D., Tabar, M.S. (2010) Forecasting Different Phenological Phases of Apple Using Artificial Neural Network. *Journal of Research in Agricultural Science* Vol. 6, No. 2, pp. 97 – 106.

Yinrong Lu, L. Yeap Foo Polyphenolics of *Salvia*—a review

Z

Zehtab-salmasi, S., Javanshir, A., Omidbaigi, R., Alyjari, H. & Ghassemi-golezani, K. 2001. Effects of water supply and sowing date on performance and essential oil production of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Acta Agronomica Hungarica* 49, 75–81.

Référence Bibliographiques

Zhang YS, Ye HC, Liu BY, Wang H, Li GF (2005) Exogenous GA₃ an flowering induce the conversion of artemisinic acid to artemisinin in *Artemisia annua* plants. Russian J Plant Physiol 52(1): 68-73.

Zheljaskov V.D., P.R. Warman Application of high Cu compost to Swiss chard and basil; The Science of the Total Environment 302 (2003) 13–26

Zheljaskov Valtcho D, Lyle E. Craker , Baoshan Xing b Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in *dill, peppermint, and basil* Environmental and Experimental Botany 58 (2006) 9–16

Zheljaskov, V.D., Warman, P.R., 2004a. Application of high Cu compost to dill and peppermint. J. Agric. Food Chem. 52, 2615–2622.

Zheljaskov, V.D., Warman, P.R., 2004b. Source separated municipal solid waste compost application to Swiss Chard and basil. J. Environ. Qual. 33, 542–552.

Zinselmeier C., Jeong B.R., Boyer J.S. (1999). Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. Plant Physiology, 121, 25-36

Zolfaghari, M., Nazeri, V. Sefidkon, F. and Rejali, F. (2013). 'Effects Effect of arbuscularmycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of *Ocimum basilicum*L.'. *Iran J Plant Physiol* 3 (2), 643-650.

Zubek, S., Mielcarek, S. and Turnau, K. (2012). Hypericin and pseudo hypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 22:149–156.