



Quelques aspects biochimiques de la réaction de la roselle (*Hibiscus sabdariffa L. var. sabdariffa*) au stress salin

*Alexis Nicaise LEPENGUE¹; Isaac MOUARAGADJA¹; Séverin AKE²; Bertrand M'BATCHI¹

¹Laboratoire de phytopathologie, Unité de recherche Agrobiologie, Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM) ; BP 067 Franceville, Gabon. Tel/Fax : (00241) 67 77 36 / 07684362 / 06764738

²Laboratoire de Physiologie végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan ; 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

*Correspondant : Email: lepenque_nicaise@yahoo.fr

Originally Submitted on 25th September 2011. Published online at www.m.elewa.org on January 29, 2012.

RESUME

Objectif : Le NaCl affecte la croissance et le développement de la roselle dans les champs côtiers du Gabon, réduisant significativement les rendements de cette plante. Afin de déterminer les effets physiologiques de ce composé, 4 paramètres biochimiques (sucres réducteurs, protéines, chlorophylles et phénols) ont été étudiés sur les extraits foliaires de 3 cultivars VV1, VV2 et VV3.

Méthodologie et résultat : Pour cela, les graines de ces plantes ont été prétraitées pendant 24 h à 4 solutions salines de concentrations respectives 0 g/ml (Témoin), 0,2 g/l (T2%), 0,4 g/l (T4%), 0,6 g/l (T6%), et cultivées en serre. Les dosages biochimiques ont été réalisés au 21^e jour. Les résultats obtenus ont montré que le NaCl induisait des hausses de teneurs des composés glucidiques, protéiques et phénoliques, proportionnellement aux concentrations appliquées. Il a en revanche réduit les teneurs chlorophylliennes des 3 cultivars étudiés.

Conclusion : Les baisses de rendement de roselle occasionnées par le NaCl sont donc précédées de la perturbation de nombreux mécanismes physiologiques des métabolismes primaires et secondaires.

Mots clés : NaCl, Roselle, Prétraitement, Dosage, Métabolisme, perturbation.

Objective: In Gabon coastal areas, sodium chloride (NaCl) reduces significantly roselle growth and development. The present study was designed to investigate the physiological effects of NaCl by assessing four biochemical parameters of leaf extracts from roselle.

Methodology and results: So, 3 roselle cultivars (VV1, RV1 and RR1) seeds were treated by immersion in 4 different solutions of NaCl during 24 hr, and cultivated in a greenhouse for 21 days. The results showed that NaCl induces an increase of carbohydrate, protein and phenolic compounds levels, proportionate of NaCl concentration. But NaCl reduces chlorophyllian parameters rate in 3 roselle cultivars.

Conclusion: Hence, roselle growth perturbation is preceded by primary and secondary metabolism perturbation.

Keys words: NaCl, Roselle, Pretreatment, Dosage, metabolism, disturbance

INTRODUCTION

La roselle (*Hibiscus sabdariffa L. var. sabdariffa*) est l'une des principales plantes alimentaires du Gabon (Mouaragadja et M'batchi, 1998). C'est une

culture maraîchère de la famille des Malvaceae (Boulanger, 1985). Elle y est principalement cultivée pour des raisons alimentaires et

médicinales. Les feuilles de cette plante sont, en effet, localement consommées comme légumes de sauce, et les calices utilisés pour la fabrication du "bissap", une boisson locale acidulée et tonifiante (Lépengué et al., 2007). En pharmacopée, les infusions de la roselle sont fortement préconisées dans les traitements de toux, de scorbut, de cholestérol, d'infections cutanées, etc. Cette plante présente plusieurs autres vertus médicamenteuses, notamment digestive, laxative, diurétique et purgative (Chenu et al., 1986).

La roselle est, sur les zones côtières gabonaises, victime d'une sévère pathologie caractérisée par des pourritures de graines, des anomalies de germination et de croissance, et des étiollements des feuilles, aboutissant à la réduction des rendements agronomiques (Lépengué et al., 2009). La restriction de cette affection aux zones côtières a conduit Lépengué et al. (2009) à attribuer la maladie à l'action abiotique d'un stress salin occasionné par les eaux de mer. Cette hypothèse a par la suite été confirmée par la reproduction des symptômes similaires au laboratoire et en serre par des traitements au chlorure de sodium (NaCl) (Lépengué et al., 2011).

MATERIEL ET METHODES

Matériel : Le matériel végétal employé dans cette étude est la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*), une plante maraîchère de la famille des Malvaceae. 3 cultivars VV1 VV2 et VV3, différents les uns des autres par la coloration et la forme ont été utilisés (Lépengué et al., 2009).

Méthodes

Mise en place de l'essai : Trente deux (32) graines de roselle, provenant des greniers du Département de Biologie de l'Université des Sciences et techniques de Masuku (USTM), de bonnes qualités morphologique et germinative, ont été désinfectées par trempage pendant 5 min. dans 0,5 L d'une solution d'hypochlorite de sodium de concentration 1%. Elles ont ensuite été rincées dans 5 L d'eau distillée, puis desséchées entre 2 épaisseurs de papier buvard. Les graines ont ensuite été reparties en 3 lots de 8 unités et incubées dans 3 éprouvettes graduées contenant 0,5 L de solutions salines de concentrations respectives 2 g/l (T2%), 4 g/l (T4%) et 6 g/l (T6%) (Lépengué et al., 2010). Un lot témoin a également été préparé par traitement des

Les auteurs ont en effet montré que les concentrations de NaCl égales ou supérieures à 10⁻² M inhibaient la germination des graines de roselle, et réduisaient les croissances longitudinales et diamétrales des tiges, ainsi que celles des surfaces foliaires des plantes. Si les effets du NaCl sur les aspects morphologiques de la roselle ont globalement été étudiés, l'impact de ce composé sur les mécanismes physiologiques des plantes reste inconnu. En effet, les réactions biochimiques de la roselle aux agressions salines ne sont toujours pas déterminées à ce jour. Les troubles de métabolisme, la nature des affections, l'étendu du phénomène ainsi que les organites cibles ne sont notamment pas connus à ce jour. C'est pour répondre à ces diverses préoccupations, que le présent travail a été conçu. Il vise donc à étudier l'évolution de quelques paramètres physiologiques du métabolisme de la roselle soumise au stress salin. Les différents paramètres étudiés sont : les sucres réducteurs et les protéines (métabolisme primaire), les chlorophylles et les polyphénols (métabolisme secondaire).

organes à 0,5 L d'eau distillée. Après 24 h d'incubation à l'obscurité et à la température de 25 °C, les graines ont été ensemencées par lots de 4 unités dans 8 pots (soit 2 pots par traitement) de culture contenant chacun 1 kg de sol fertile de texture argilo limoneuse et préalablement stérilisé par autoclave pendant 30 min. à la température de 120 °C. Les pots ont ensuite été transférés dans une serre à armature métallique de dimensions 10 x 5 x 2 m³, recouverte d'un film plastique en polyéthylène transparent, d'épaisseur 180 µm, et arrosés quotidiennement avec 0,5 L des solutions correspondantes (Lépengué et al., 2007). Les plantes ont ainsi été entretenues avant d'être récoltées au 21^e jour et soumises à diverses analyses biochimiques. Tous les dosages biochimiques ont été réalisés au spectrophotomètre (Unico Spectrophotometer 1100 ; UK) sur du matériel foliaire âgé de 2 semaines, et les résultats exprimés en mg/g de matière fraîche (MF).

Dosage des sucres réducteurs: Pour extraire les sucres réducteurs, 1 g de tissu foliaire a été broyé dans 5 ml d'éthanol 80% et centrifugé pendant 15 min. à

15000 rpm (Lépengué, 2008). Le culot a été repris dans 5 ml d'éthanol 40% et centrifugé à nouveau, pour extraire les sucres parétaux. Les 2 surnageants ont été additionnés et purifiés avec 2 ml d'acétate de plomb 10%. L'extrait glucidique a ensuite été évaporé sur un bain de sable chauffant et complété à 5 ml avec de l'eau distillée stérile. Les sucres réducteurs ont ensuite été dosés par les méthodes colorimétriques à base d'acide dinitrosalicylique de sodium (DNS) à 540 nm (Lépengué, 2008).

Dosage des composés protéiques : Pour l'extraction des protéines, 1 g de tissu foliaire a été broyé dans 10 ml de tampon phosphate 0,1M, pH 6,5 en présence de 0,5 g de PVP, et centrifugé pendant 15 min. à 15 000 rpm. Le surnageant issu de cette opération a été récupéré dans un bêcher, précipité avec 5 ml de sulfate d'ammonium 80%, et à nouveau centrifugé comme précédemment. Le culot protéique obtenu a été repris dans 5 ml de tampon d'extraction, homogénéisé et dosé au spectrophotomètre par réaction au bleu de Coomassie, à la longueur d'onde de 595 nm (Bradford, 1976).

Dosage des pigments chlorophylliens : Pour chaque

traitement, 1 g de tissu foliaire prélevé comme précédemment, a été broyé dans 15 ml d'acétone glacée 80% et filtré sur Büchner selon la méthode de Savouré (1980). Les teneurs chlorophylliennes ont ensuite été déterminées au spectrophotomètre par la méthode de Mac Kinney, aux longueurs d'onde de 645 nm et 663 nm (Savouré, 1980).

Dosage des composés phénoliques : La teneur en composés phénoliques des feuilles de roselle a été déterminée à partir de 1 g de tissus végétaux. Pour chaque traitement, le matériel végétal a été broyé au mortier, incubé pendant 24 h à 4 °C et centrifugé durant 15 min. à 15 000 rpm. Les extraits phénoliques ont ensuite été dosés par les méthodes colorimétriques de Folin et Ciocalteu (1927), à la longueur d'onde de 725 nm.

Analyse statistique : Toutes les expériences ont été répétées 3 fois et soumises à une analyse de variance (ANOVA) au logiciel Statistica 6.0. En cas de différences significatives, les tests de comparaisons multiples de Newman-Keuls ont été utilisés au seuil de 5%.

RESULTATS

Effets de la salinité sur la formation des sucres réducteurs : L'influence du prétraitement des graines de 3 cultivars de roselle (VV1, VV2 et VV3) par 3 solutions salines (T2%, T4% et T6%) a donné les résultats résumés à la figure 1. Leur analyse a révélé que les traitements salins induisaient des augmentations significatives des teneurs des sucres réducteurs des feuilles de roselle, au seuil de 5%. Ces

hausses se sont révélées proportionnelles aux concentrations de salinité appliquées. Pour chaque cultivar, les plus fortes augmentations de teneurs en sucres réducteurs ont alors été notées avec le traitement T6%. Les différentes teneurs obtenues, 3,5 mg/g de MF (VV1), 3,4 mg/g de MF (VV2) et 3,6 mg/g de MF (VV3), ont correspondu à des taux d'augmentations respectifs de 45,83%, 47,82% et 50%.

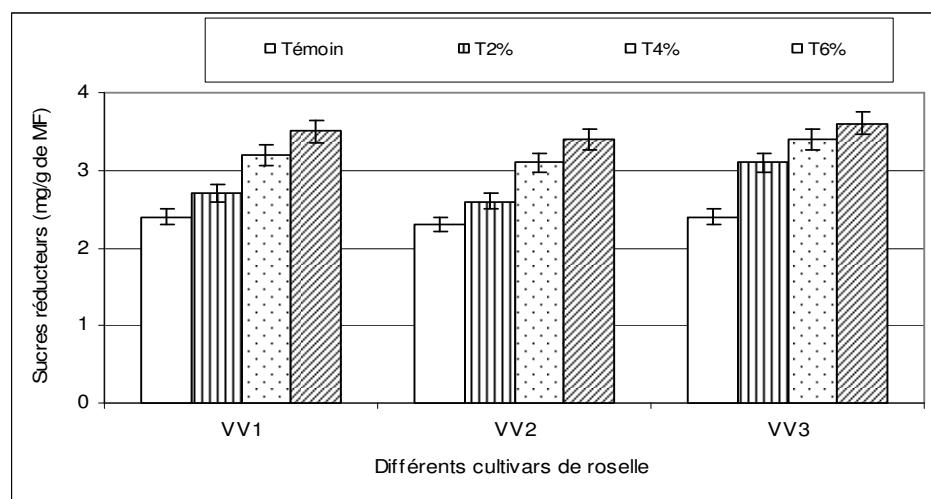


Figure 1 : Effet du prétraitement au NaCl des graines de 3 cultivars de roselle sur la synthèse des sucres réducteurs des plantes après 21 jours de culture en serre.

Effets de la salinité sur la formation des protéines :

Les résultats de l'effet de différentes solutions salines sur la synthèse des protéines des cultivars de roselle ont été présentés à la figure 2. De leur examen, il est nettement ressorti que les différents traitements augmentaient significativement la teneur des composés protéiques des feuilles de roselle. Ces augmentations

ont toutes été proportionnelles aux concentrations de NaCl appliquées. Les plus faibles élévations ont alors été notées aux traitements T2%, alors que les plus forts effets s'observaient avec les traitements T6%. Dans ce dernier cas, ces augmentations protéiques ont correspondu à des taux de 69,23% (VV1), 61,53% (VV2) et 64,28% (VV3).

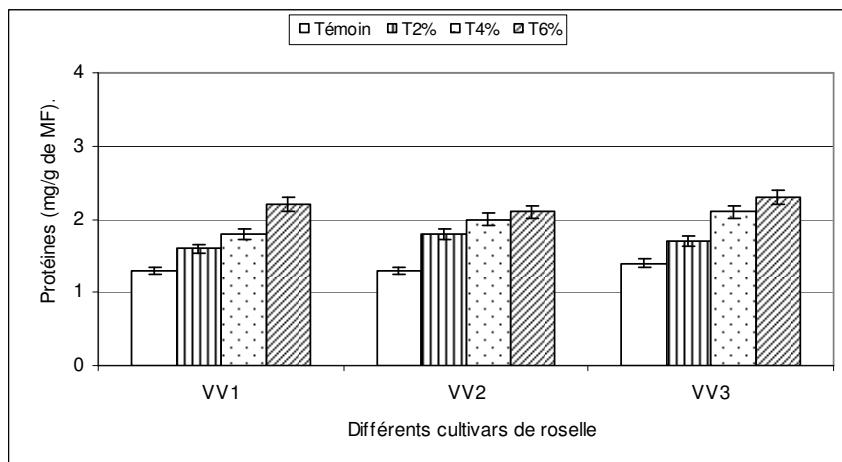


Figure 2 : Effet du prétraitement au NaCl des graines de 3 cultivars de roselle sur la synthèse des protéines des plantes après 21 jours de culture en serre.

Effets de la salinité sur la synthèse des pigments chlorophylliens : La figure 3 présente les résultats de l'effet de la salinité sur la formation des pigments chlorophylliens des feuilles de roselle. Leur analyse a révélé que les 3 traitements salins inhibaient significativement la formation de ces pigments. Ces inhibitions ont été proportionnelles aux doses de salinité appliquées. Pour chaque cultivar, les plus forts effets ont alors été obtenus avec les traitements T6%,

et les plus faibles impacts enregistrés avec les traitements T2%. Pour le cultivar VV1 par exemple, les teneurs chlorophylliennes induites par ces 2 traitements (T2% et T6%) ont respectivement été de 2,2 mg/g de MF et de 0,5 mg/g de MF. Ce qui correspond à des baisses chlorophylliennes respectives de 26,67% et 83,33%, par rapport aux témoins.

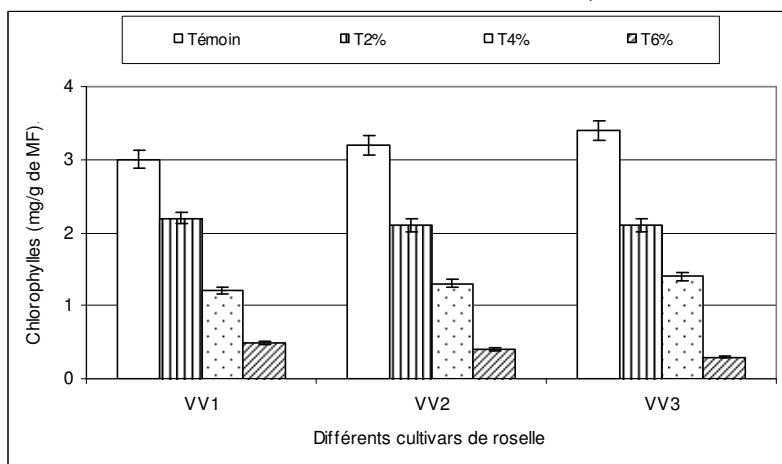


Figure 3 : Effet du prétraitement au NaCl des graines de 3 cultivars de roselle sur la synthèse des pigments chlorophylliens des plantes après 21 jours de culture en serre.

Effets de la salinité sur la synthèse des composés phénoliques : Le prétraitement des graines de roselle au NaCl a provoqué une augmentation significative des teneurs de composés phénoliques dans les feuilles des plantes de roselle étudiées (figure 4). Ces hausses ont toutes été proportionnelles aux doses de salinité appliquées. Les élévations les plus fortes ont alors été

notées chez les plantes soumises au traitement T6%, et les plus petites chez celles exposées au traitement T2%. Pour l'ensemble des 3 cultivars, ces augmentations ont varié entre 50% (cultivar VV1, traitement T2%), et 300% (cultivar VV1, traitement T6%).

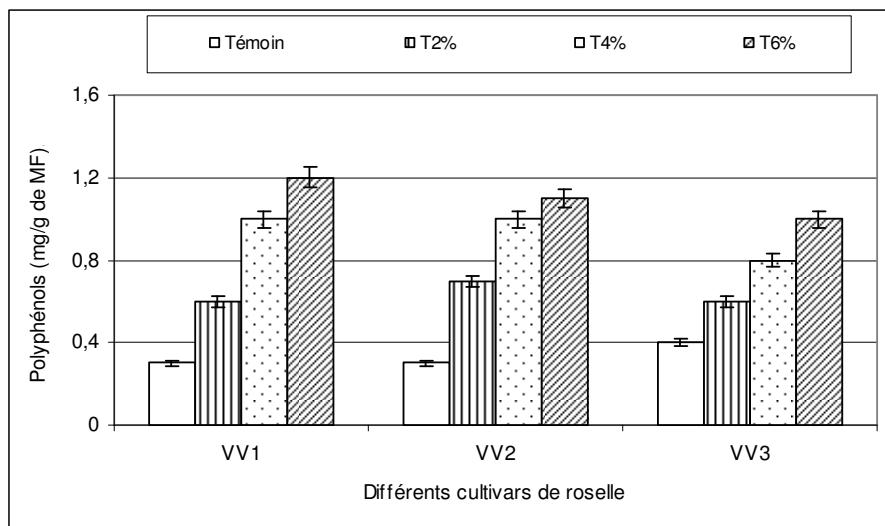


Figure 4 : Effet du prétraitement au NaCl des graines de 3 cultivars de roselle sur la synthèse des composés phénoliques des plantes après 21 jours de culture en serre.

DISCUSSION

Les résultats de cette étude ont montré que les traitements de NaCl induisaient des augmentations des teneurs de composés glucidiques, protéiques et phénoliques des 3 cultivars de roselle étudiés. Ces traitements ont en revanche abaissé les teneurs des pigments des 3 plantes. Toutes ces variations de réponses positives et négatives ont été proportionnelles aux concentrations de NaCl appliquées. Les études analogues réalisées par Lépengué et al. (2010) ont montré que le NaCl inhibait aussi bien la germination des graines de roselle, que les taux de croissances longitudinale et diamétrale de leurs tiges, proportionnellement aux doses utilisées. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces perturbations découlent d'un stress salin lié à la toxicité chimique de NaCl. Ces conclusions confirmaient celles de Nabors et al. (1980) sur le tabac, Piri (1991) sur le blé et celles de Askri et al. (2007) sur les pastèques. Les variations biochimiques observées dans notre étude pourraient provenir des mêmes phénomènes.

Selon diverses études, le stress végétal découle de trois actions indépendantes : la cimentation du sol, la perturbation de la nutrition minérale, et la toxicité

chimique foliaire (Soltani, 1980 ; Roudani, 1988). La cimentation du sol serait un phénomène de compaction tellurique dû à la formation d'agrégats au niveau du sol. Sa mise en place rend difficile l'absorption hydrique racinaire, engendrant ainsi les stress hydriques végétaux (El Jaafari, 1993). Ce phénomène a notamment été rapporté chez le blé cultivé sur des milieux salins (Roudani, 1988). La perturbation de la nutrition minérale provient de la compétition nutritionnelle engendrée par les ions Na⁺ et Cl⁻ constitutifs du NaCl vis-à-vis des cations (Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺) et des anions (NO₃⁻, PO₄³⁻, ...) telluriques, aboutissant à un déficit minéral de la plante (Levignon et al., 1995). Des illustrations de ce phénomène sont notamment observées chez l'orge (Soltani, 1980). La toxicité foliaire résulte de l'accumulation du NaCl dans les feuilles de nombreuses plantes (dites glycophytes) qui ne parviennent pas à éliminer ce sel, par les divers processus métaboliques classiques. Ce qui provoque des interférences avec les phénomènes de photosynthèse foliaire (Levitt, 1980). La hausse des teneurs de composés glucidiques, protéiques et phénoliques dans notre étude pourraient donc résulter

de la mise en place des mécanismes biochimiques similaires. Il s'agirait d'une réponse immunitaire de la plante vis-à-vis du stress salin. Les traitements seraient ainsi perçus comme des agressions abiotiques nécessitant chez la plante hôte la synthèse et la mobilisation des molécules de défense, parmi lesquelles figureraient les composés glucidiques, protéiques et phénoliques (Lepoivre et Semal, 1993). Des exemples de réponses biochimiques analogues sont assez bien connus en biologie. C'est le cas des protéines PR, de la plupart des plantes, la pisatine du pois, la phaséoline du haricot, ou la nicotine du tabac (Guignard, 1996 ; Heller et al., 2006), qui sont

généralement secrétées en réponse à des stress biotiques et abiotiques. Les baisses des teneurs chlorophylliennes pourraient être des variantes de la physiologie de ce stress chimique (Denden et al., 2005). La toxicité saline provoquerait dans ce cas, des dégradations de chlorophylles proportionnellement aux concentrations salines. De tels phénomènes ont également déjà été rapportés par Lépengué et al. (2010) sur le maïs (*Zea mays*, L), Symarayitis et al. (1992) sur *Nicotiana plumbaginifolia*, et Piri (1991) sur le blé (*Triticum aestivum*, L.), en réponses aux toxicités salines.

CONCLUSION

Le NaCl provoque la hausse des teneurs des composés glucidiques, protéiques et phénoliques des cultivars de roselle, proportionnellement aux doses appliquées. Il induit en revanche, des pertes chlorophylliennes des plantes. Les troubles

morphologiques de croissance des cultivars de roselle observés en serre sont donc précédées des perturbations physiologiques de nombreux composés métaboliques primaires et secondaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Askri H, Rejeb S, Jebari H, Nahdi H, Rejeb MN, 2007. Effet du chlorure de sodium sur la germination des graines de trois variétés de pastèque (*Citrus lanatus* L.). Science et changements planétaires/ Sécheresse 18 (1) : 51-55.
- Boulanger J, Follin JC, Bourley J, 1984. Les hibiscus textiles en Afrique tropicale : conditions particulières de production du kénaf et de la roselle. *Coton et Fibres tropicales*, série « Documents, étude et synthèse », 81 p.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 : 248-254
- Chenu J, Ouvry P, Lavergne R, 1986. Les plantes médicinales tropicales, tome 5. Edition Darenki, Libreville, 102 p.
- Denden M, Bettaieb T, Salhi A, Mathlouthi M, 2005. Effect of Chloride Sodium on Chlorophyll Fluorescence, Plant Proline Content and flowers production of three ornamental species. *Tropicultura* 23 (4) : 220-225.
- El Jaafari S, 1993. Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé. Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, 214 p.
- Folin O. and Ciocalteu V, 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73 : 627-650.
- Guignard J L, 1996. Biochimie végétale. Éditions Masson, Paris, 255 p.
- Heller R, Esnault R, Lance C, 2006. Physiologie végétale. Développement. 6^e édition de l'abrégé, Editions Dunod, Paris, 366 p.
- Lépengué AN, M'batchi B, Aké S, 2007. Impact de *Phoma sabdariffae* Sacc. sur la croissance et la valeur marchande de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 10 : 207-216.
- Lépengué AN, 2008. Contribution à la protection de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*), contre la pourriture engendrée par *Phoma sabdariffae* Sacc. et *Trichosphaeria* sp., au Gabon : Etude des mécanismes d'action fongiques phytotoxiques. Doctorat d'Université, UFR Biosciences, Univ. Cocody-Abidjan, 294 p.
- Lépengué AN, Mouaragadja I, Chérif M, M'batchi B, Aké S, 2009. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance de la roselle au Gabon. *Afrique Science* (5) 3 : 97-110.
- Lépengué AN, Mouaragadja I, M'batchi B, Aké S, 2010. Effet du Chlorure de sodium (NaCl) sur la germination et la croissance du maïs (*Zea*

- mays L. Poaceae) au Gabon. Int. J. Biol. Chem. Sci. 4 (5) : 1602-1609.
- Lépengué AN, Mouaragadja I, Chérif M, M'batchi B, Aké S, 2011. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur Le développement des cultivars de roselle au Gabon. Soumis aux Annales de l'Université d'Abomey Calavi.
- Lepoivre P. and Semal J, 1993. Les relations hôtes parasites. Traité de pathologie végétale. Les presses agronomiques de Gembloux, pp 249-302.
- Levigneron A, Lopez F, Vansuyt G, Berthomieu P, Fourcroy P, Casse DF, 1995. Les plantes face au stress salin. Cahier Agriculture 4 : 263-273.
- Levitt J ; 1980. Salt and ion stress. In Levitt J. (eds). Response of plant to environmental stresses; Vol. II, water radiation salt and others stresses. New York Academic Press, 365-406.
- Mouaragadja I. and M'batchi 1998. Etude et identification de la pourriture de l'oseille de Guinée au Gabon. Fruits 53 (1): 57-68.
- Nabors MW, Gibbs SE, Bernstein CS, Neis ME, 1980. NaCl-tolerant tobacco plant from cultured cells. Z.P.F. Lauzen Physiol. 97 : 13-17.
- Piri K, 1991. Contribution à la sélection *in vitro* des plantes androgéniques de blé pour leur tolérance à NaCl. Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, 168 p.
- Roudani M, 1996. Physiologie comparée de deux espèces de blé en relation avec les conditions de nutrition. Métabolisme racinaire en milieu salé. Thèse d'Univ. Sci. Biol. Univ. Tunis II, 180 p.
- Savouré J.C., 1980. Les manipulations pratiques en physiologie végétale. Edition Masson, Paris, France, 258 p.
- Soltani A, 1988. Analyse des effets de NaCl et de la source d'azote sur la nutrition minérale de l'orge. Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté de Sciences de Tunis, 322 p.
- Symaraytis S, Neigrotiu I, Jacobs M, 1992. Salt and water resistant mutant isolated from potato plants of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). Med. Fac. Landouw Univ. Gent 57/4a, 1507-1516.