

Influence de l'acide salicylique sur l'activité des polyphénoloxydases et l'accumulation des composés phénoliques chez le manioc (*Manihot esculenta* Crantz)

**Denézon Odette DOGBO¹, J. A. Mamyrbékova BEKRO², Yves Alain BEKRO^{2*},
Seu Jonathan GOGBEU¹, Abdoulaye TRAORE¹, et Raoul Sylvère SIE¹**

¹ *Laboratoire de biologie et amélioration des productions végétale, Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.*

² *Laboratoire de chimie bio-organique et de substances naturelles, Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02. Côte d'Ivoire.*

(Reçu le 28 Décembre 2006, accepté le 20 Avril 2007)

* Correspondance, courriel : bekro2001@yahoo.fr

Résumé

Pour étudier la réaction de défense du manioc, nous avons mesuré l'activité des polyphénoloxydases (PPO) et dosé les composés phénoliques éthano-solubles totaux accumulés avant et après l'inoculation de l'acide salicylique (AS) dans des plants âgés de six semaines. L'activité des PPO a été précocement induite (1 h) pour les cultivars bouaga, mamawa, tapioca et écrevisse mais tardive pour les cultivars bonoua (4 h) et yacé (12 h).

Les PPO ont été 3 à 11,50 fois stimulées selon les cultivars. Les composés phénoliques éthano-solubles totaux dosés ont subi une augmentation significative dès l'inoculation, et ce taux est resté quasi constant durant toute l'expérimentation. La synthèse de l'enzyme a été également stimulée dans les feuilles immédiatement situées au-dessus (fis) et en dessous (fii) de la feuille inoculée (fi). Les composés phénoliques ont subi aussi une augmentation dans ces feuilles. Concernant l'âge de la feuille inoculée (4 et 6 semaines), l'activité des PPO et la quantité des composés phénoliques ont été plus élevées dans les feuilles adultes.

Mots-clés : *Manioc, composés phénoliques, polyphénoloxydases, acide salicylique, activité, réaction de défense*

Abstract

Influence of salicylic acid on activity of polyphenol oxidases and accumulation of phenolic compounds in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

To study the reaction of defence of cassava, we have measured the activity of polyphenol oxidases (PPO) and dosed total ethano-soluble phenolic compounds accumulated before and after inoculation of salicylic acid in six weeks old seedlings. PPO activity has been precociously induced (1 h) for the cultivars bouaga, mamawa, tapioca and ecrevisse but tardily for the cultivars bonoua (4 h) and yace (12 h). PPO have been 3 to 11.50 times stimulated according to varieties.

Dosed total phenolic compounds have undergone a significant increase since the inoculation, and this rate has remained almost constant during experimentation. The synthesis of enzyme has been equally stimulated in immediately situated leaves above (fis) and in under (fii) of the inoculated leaf (fi). Phenolic compound have also undergone an increase in these leaves. Concerning the age of the inoculated leaf (4 and 6 weeks), PPO activity and the phenolic compounds quantity have become more important in adult leaves.

Keywords : *Cassava, phenolic compounds, polyphenol oxidases, salicylic acid, activity, reaction of defence*

1. Introduction

Les polyphénoloxydases (PPO; EC 1.14.18.1) sont des enzymes largement répandues dans le règne végétal. Elles catalysent l'oxydation des phénols en o-quinones. Les o-quinones, par polymérisation donnent des pigments bruns qui altèrent la qualité des aliments et des fruits en post-récolte. Du fait de leur implication dans le brunissement enzymatique, les PPO ont été beaucoup étudiées dans les fruits [1-7]. Elles ont été également impliquées dans la défense des plantes [8-10].

Lorsque les plantes sont blessées ou attaquées par des agents pathogènes, elles réagissent par des modifications du métabolisme. Ces modifications peuvent se manifester au point d'inoculation de l'agent pathogène par une nécrose entourée de cellules vivantes dont les parois sont renforcées par des dépôts de callose, de lignines et d'autres composés phénoliques [11,12]. Il y a également induction et stimulation de l'activité de certaines enzymes comme les PPO [9,13,14]. Des études effectuées dans ce domaine ont montré que certains éliciteurs, entre autres, l'acide salicylique (AS) peuvent simuler une infection et, de ce fait, moduler l'activité des PPO.

L'objectif de ce travail est de mesurer le niveau de résistance de six cultivars de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) couramment cultivés en Côte d'Ivoire en utilisant les PPO comme marqueurs. À cet effet, nous avons évalué l'activité des PPO synthétisées et la quantité de composés phénoliques éthano-solubles totaux accumulés, dont certains constituent les substrats des PPO, avant et après l'inoculation à l'AS. Les résultats de cette étude nous ont permis de les classer en cultivars résistants et tolérants.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Six (6) cultivars de manioc couramment cultivés en Côte d'Ivoire ont été utilisés pour l'expérimentation. Ils se répartissent en cultivars amers (tapioca, yacé) et doux (bonoua, bouaga, écrevisse, mamawa). Ce matériel végétal a été gracieusement fourni par l'Agence Nationale d'Appui pour le Développement Rural (ANADER).

2-2. Semis et croissance des plantules

Le semis a été effectué à partir de fragments de tige de 15 cm de long comportant 6 à 10 bourgeons. Chaque fragment a été placé verticalement dans un sachet en polyéthylène perforé, préalablement rempli de 10 Kg de compost stérilisé. Ce substrat a été obtenu par mélange de poudre de feuilles mortes et de terre de sous-bois de la forêt de l'Université d'Abobo-Adjamé. La culture a été placée dans une serre éclairée par la lumière naturelle. La photopériode au cours de l'expérimentation a varié entre 12 et 13 h (mai, juin, juillet 2005) et la température entre 28°C et 32°C. La germination s'est effectuée une semaine après semis. La culture a été arrosée 2 fois par semaine.

2-3. Traitements

Les plantes âgées de 6 semaines ont été utilisées. Elles ont été divisées en trois groupes: (a) plante intacte (témoin), (b) plante dont la foliole centrale de la 3^{ème} feuille à partir de l'apex a été blessée par pression au moyen de papier abrasif (blessé), (c) plante inoculée à l'acide salicylique (AS) (10 µL, 5 mM) après blessure (blessé + AS). Pour l'étude des réactions d'hypersensibilité (RH) et systémique (RSA), et l'influence de l'âge de la feuille inoculée, 204, 36, et 24 plantules ont été respectivement utilisées, soit 264 plants par cultivar.

L'étude de la RH a été menée en évaluant l'activité des PPO et la quantité des composés phénoliques éthano-solubles totaux toutes les heures, de 0 à 12 h et à 24, 48, 72 et 96 h

après inoculation. La RSA a été évaluée à trois moments : au temps d'obtention de l'optimum de l'activité des PPO au cours de la RH, à la fin et 2 h après la fin de cet optimum. L'influence de l'âge de la feuille a été étudiée en inoculant de l'AS dans les feuilles à deux stades de développement (4 et 6 semaines d'âge). L'état physiologique de ces organes a été différencié par la quantité de chlorophylles synthétisées.

2-4. Extraction et dosage des polyphénoloxydases

Les feuilles inoculées ont été utilisées pour l'étude de la RH et pour celle de l'influence de l'âge de la feuille. En revanche, pour la mise en évidence de la réaction systémique, les feuilles inoculées (fi) ainsi que les feuilles immédiatement situées au-dessus (fis) et en dessous (fii) ont été utilisées. Chez les plantes témoin, les feuilles de même position ont été choisies.

L'extraction et le dosage ont été faits dans les conditions optima de pH et de température pour chaque cultivar. 1 g de limbe frais a été broyé dans un mortier en agate contenant 5 mL d'une solution tampon phosphate de sodium 0,2 M [écrevisse, tapioca, yacé (pH 6,3), bonoua, bouaga (pH 7,2), mamawa (pH 6,2)] refroidi (5°C). Après centrifugation à 5000 trs.min⁻¹ pendant 10 min, le surnageant récupéré a constitué l'extrait brut enzymatique.

Le dosage de l'activité enzymatique s'est effectué selon la méthode modifiée de *Constabel et al.* [15]. Le milieu réactionnel (3 mL) contenant 5 mM de dopamine et 0,2 mL d'extrait brut enzymatique a été incubé dans le tampon d'extraction à 29°C (yacé, mamawa, bonoua, bouaga, écrevisse) et 24°C (tapioca) à l'obscurité pendant 5 min.

La réaction a été ralentie en plongeant les tubes dans la glace. L'intensité de la coloration a été déterminée à 470 nm avec un spectrophotomètre de type Baush & Lomb contre un témoin ne contenant pas de substrat. L'activité spécifique a été exprimée en nanokatal (nkatal) par milligramme de protéines.

2-5. Extraction et dosage des composés phénoliques éthano-solubles totaux

L'extraction des composés phénoliques a été faite par broyage de 1 g de limbe frais dans 10 mL d'éthanol (80 %, v/v) en présence de 0,1 g de dithionite de sodium. Après centrifugation à 5000 trs.min⁻¹ pendant 10 min, le surnageant récupéré a constitué l'extrait phénolique éthano-soluble. La quantité de composés phénoliques éthano-solubles totaux a été déterminée selon la méthode décrite par *Swain et Hillis* [16]. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la quantité la plus élevée (100 %) de composés phénoliques éthano-solubles totaux dans les feuilles de yacé, pris comme témoin.

2-6. Extraction et dosage des chlorophylles

L'extraction des chlorophylles s'est effectuée selon la méthode modifiée de *Dekok et Graham* [17]. 1 g de limbe frais a été broyé dans 5 mL d'acétone (80 %, v/v) en présence de 0,1 g de carbonate de calcium. Après centrifugation à 5000 trs.min⁻¹, la quantité de chlorophylles a été déterminée selon la méthode décrite par *Mac Kinney* [18]. Les teneurs en chlorophylles des feuilles jeunes sont exprimées en pourcentage en prenant la valeur des feuilles adultes de chaque cultivar comme tube de référence (100 %).

2-7. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford [19]. Le sérum albumine bovine a été utilisé comme protéine standard.

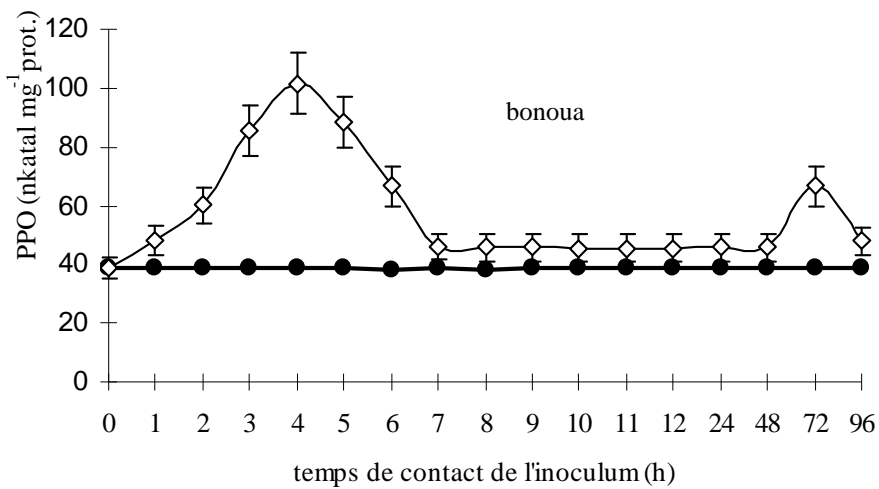
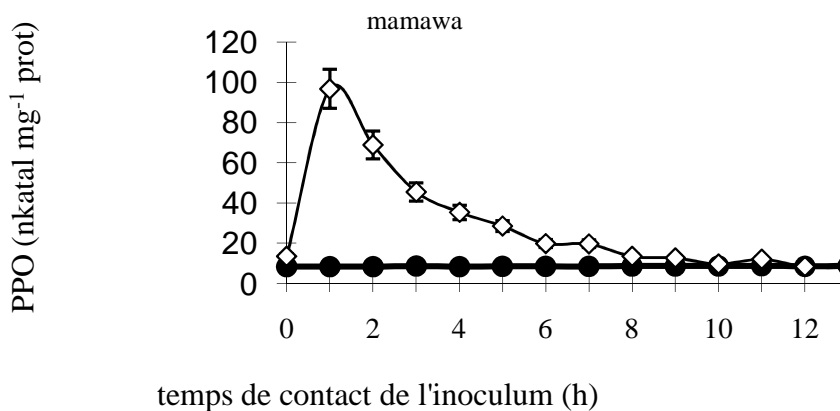
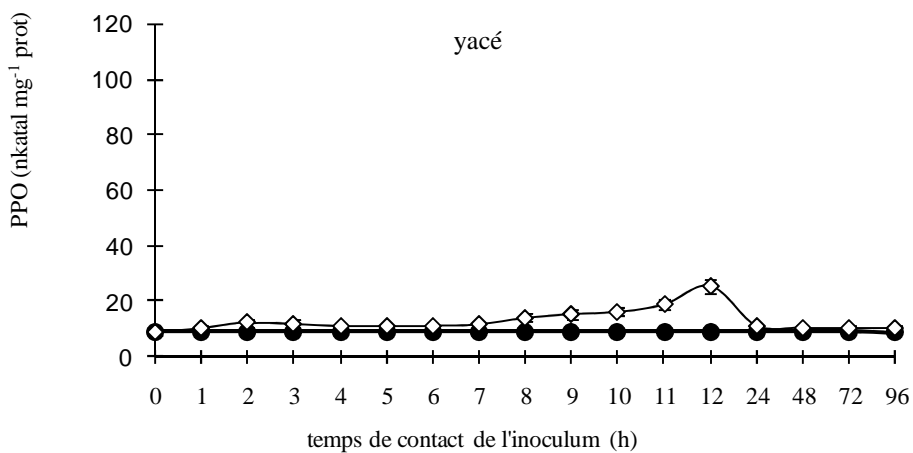
2-8. Analyse statistique

Les données ont été traitées selon l'analyse de variance à un ou deux facteurs en utilisant le logiciel STATISTICA 5.5. Au seuil de 5 %, lorsque la différence est significative, les groupes homogènes sont déterminés par le test de Duncan.

3. Résultats

3-1. Influence du temps de contact de l'AS sur la synthèse des PPO et la production des composés phénoliques éthano-solubles totaux en réaction d'hypersensibilité

Chez les plantes témoin, l'activité des PPO a été maintenue à son niveau initial pour chaque cultivar durant l'expérimentation. Elle a été faible pour les cultivars mamawa, tapioca, yacé et écrevisse (8,36.10² à 9,92.10² nkatals) et élevée pour les cultivars bouaga et bonoua (35,98.10² et 38,92.10² nkatals). Chez les plantes traitées, la synthèse des PPO a subi une stimulation. Cette synthèse a débuté dès l'inoculation chez tous les cultivars, excepté yacé. L'optimum de l'activité a été obtenu 1 h après inoculation chez les cultivars mamawa (96,72.10² nkatals), bouaga (89,54.10² nkatals), tapioca (80,91.10² nkatals) et écrevisse (26,92.10² nkatals) (*Figure 1*).



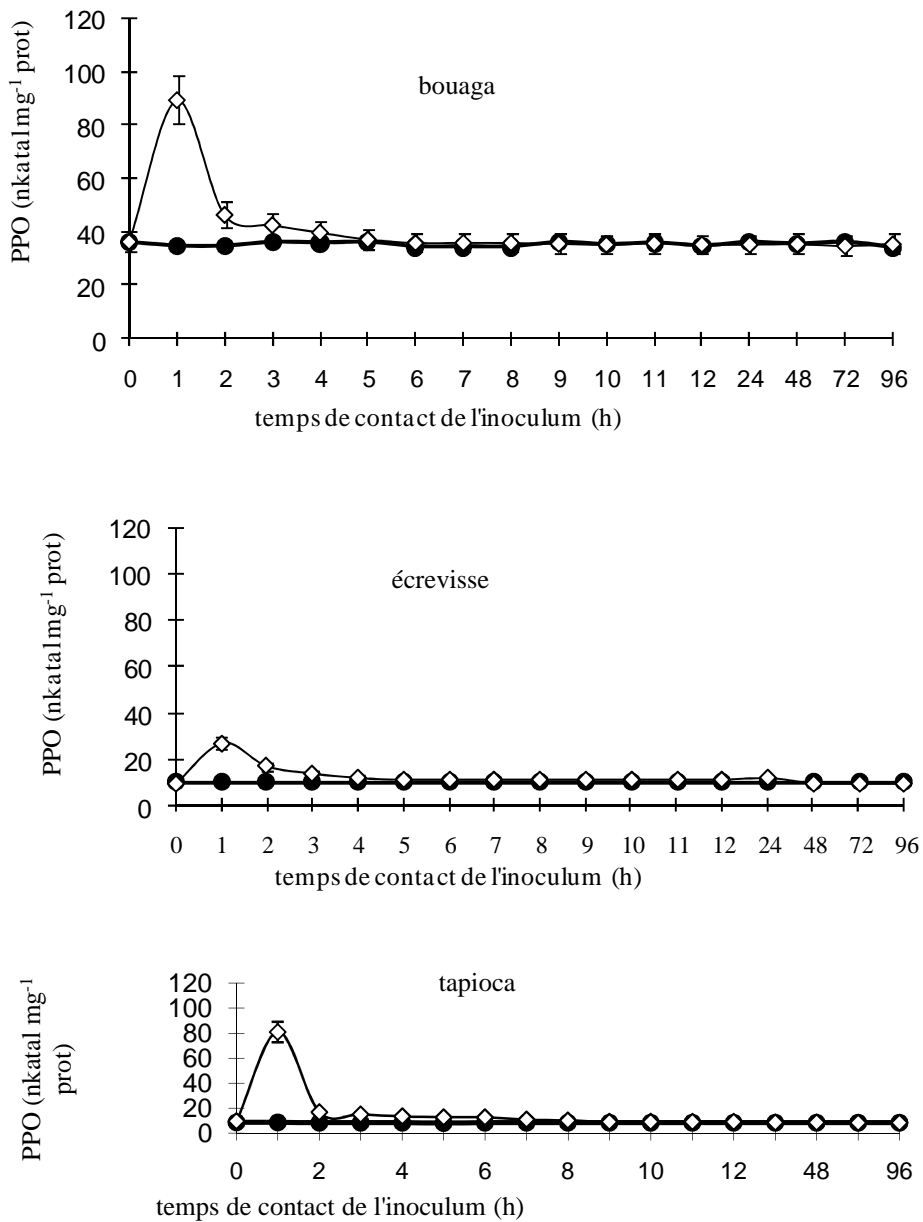


Figure 1 : *Activité des PPO de feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge inoculées à l'acide salicylique (5 mM).*

Chaque point représente la moyenne de 4 répétitions \pm écart-type.

● : témoin; ◇ : essai

Chez les cultivars bonoua et yacé, l'optimum de l'activité des PPO a été tardif. Il a été obtenu 4 h et 12 h après inoculation respectivement pour bonoua et yacé avec des valeurs de 101,65.102 nkatals et 25,65.102 nkatals (**Figure 1**). Après l'optimum, l'activité des PPO a rapidement baissé chez les cultivars yacé, bouaga, écrevisse et tapioca. En revanche, chez les cultivars mamawa et bonoua, l'activité a baissé progressivement. Chez ce dernier, il y a eu une légère hausse de l'activité 72 h après inoculation (**Figure 1**). Dans tous les cas, après la baisse de l'activité, elle a été maintenue à son niveau initial (témoin).

Les quantités initiales de composés phénoliques éthano-solubles totaux ont varié en fonction des cultivars (plante témoin). En prenant comme référence (100 %), la valeur la plus élevée obtenue chez le témoin yacé, ces quantités ont été de 1,50 à 33 fois plus faible. Ainsi, pour les cultivars écrevisse et mamawa, des valeurs de 91 % et 72 % ont été respectivement enregistrées. Ces composés ont été évalués à 42 %, 27 % et 3 % pour les cultivars bonoua, tapioca et bouaga (**Tableau 1**). Après inoculation, la synthèse des composés phénoliques éthano-solubles a connu une stimulation.

Tableau 1 : Influence du temps de contact de l'acide salicylique sur l'accumulation de composés phénoliques éthano-solubles totaux (%) dans les feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge.

Cultivars de manioc						
T	yacé	mamawa	bonoua	bouaga	écrevisse	tapioca
Tc	100*±1,07	72 ±1,98	42 ±1,57	3 ±0,84	91 ±0,74	27 ±0,69
0	100 ±2,00	72 ±0,03	42 ±1,97	3 ±0,11	91 ±0,33	27 ±1,11
1	125 ±1,75	81 ±0,88	58 ±3,16	15 ±0,48	92 ±1,60	54 ±0,43
2	125 ±1,27	77 ±1,62	59 ±1,54	21 ±0,97	92 ±0,81	58 ±3,54
3	96 ±0,77	91 ±1,12	59 ±1,43	20 ±1,27	126 ±1,19	58 ±1,66
4	97 ±0,56	99 ±1,31	59 ±1,39	31 ±0,80	92 ±1,08	60 ±0,37
5	107 ±2,63	78 ±1,22	59 ±2,58	29 ±0,82	92 ±1,60	76 ±0,62
6	107 ±2,05	76 ±1,19	59 ±1,63	24 ±1,25	92 ±1,46	69 ±1,15
7	108 ±1,61	74 ±1,61	59 ±2,93	21 ±2,33	92 ±0,29	63 ±1,24
8	97 ±0,85	73 ±1,97	59 ±2,58	22 ±1,79	92 ±0,58	58 ±0,63
9	120 ±1,65	80 ±1,25	59 ±2,77	17 ±0,32	92 ±1,33	56 ±1,73
10	120 ±1,59	74 ±3,75	59 ±1,64	26 ±1,25	92 ±0,89	56 ±1,16
11	120 ±1,31	95 ±1,91	59 ±3,78	24 ±1,15	92 ±0,96	54 ±2,04
12	253 ±2,76	70 ±1,47	63 ±2,04	24 ±1,50	93 ±0,29	56 ±1,74
24	107 ±0,45	71 ±1,89	57 ±1,25	19 ±1,44	92 ±1,28	56 ±0,29
48	107 ±0,52	55 ±2,15	62 ±2,30	20 ±1,07	93 ±1,83	55 ±1,02
72	517 ±3,30	62 ±2,54	63 ±0,60	22 ±1,33	93 ±2,29	52 ±1,53
96	209 ±3,26	68 ±0,87	64 ±1,89	22 ±1,27	93 ±0,30	54 ±1,15

Le pourcentage de stimulation calculé à l'optimum de l'activité des PPO a été très faible pour le cultivar écrevisse (1 %) et très élevée pour le cultivar bouaga (400 %). Le niveau de stimulation a été évalué à 4 %, 12,5 %, 100 % et 153 % respectivement pour les cultivars bonoua, mamawa, tapioca et yacé. Ces quantités sont restées sensiblement identiques au cours de l'expérimentation, excepté le cultivar yacé pour lequel une forte synthèse de ces composés a été mise en évidence à 72 h et 96 h après inoculation (*Tableau 1*).

Pour mieux comparer les cultivars, les teneurs en composés phénoliques ont été exprimées en % en prenant comme référence (100 %), la quantité de composés phénoliques la plus élevée chez le cultivar yacé (100 % = 1226,83 µg de composés phénoliques). Chaque valeur utilisée pour calculer le pourcentage a été la moyenne de 4 répétitions. La quantité des phénols dosés chez les témoins de chaque cultivar a été identique durant l'expérimentation tc : temps de contact de l'acide salicylique (h), T : témoin

3-2. Influence de l'AS sur l'activité des PPO et l'accumulation de composés phénoliques éthano-solubles totaux en réaction systémique acquise

À l'optimum de la RH, l'activité des PPO évaluée dans les feuilles inoculées (RH) a été nettement supérieure à celle des feuilles situées au-dessus et en dessous (RSA) chez les cultivars bonoua (15,33.102 nkatals), écrevisse (8,16. 102 nkatals), et tapioca (26,07.102 nkatals). Dans les feuilles non inoculées, l'activité de l'enzyme a été généralement faible, excepté le cultivar tapioca pour lequel ces feuilles ont présenté une activité élevée des PPO.

Elle a été de 17,19.102 nkatals et 22,68.102 nkatals respectivement dans les fis et fii. Chez les autres cultivars, aucune différence significative n'a été observée dans les trois types de feuilles (*Tableau 2*).

À la fin de l'optimum de la RH, l'activité des PPO n'a présenté aucune différence dans les feuilles analysées des cultivars mamawa et tapioca. Toutefois, l'activité enzymatique a été stimulée dans les feuilles non inoculées des cultivars yacé, bonoua, bouaga et écrevisse. La stimulation a été plus élevée dans les fis des cultivars yacé (2,46.102 nkatals) et bouaga (77,4.102 nkatals).

Tableau 2 : Effets de l'acide salicylique sur l'activité des PPO (nkatal. mg-1 prot.) dans les feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge

Cultivars	Temps de réaction									
	Tém- oin	I			II			III		
		fis	fi	fii	fis	fi	fii	fis	fi	fii
Yacé	0,99 ±0,03	3,75 ±0,25	3,85 ±0,11	3,76 ±0,01	2,46 ±0,10	1,00 ±0,02	0,82 ±0,01	0,60 ±0,08	2,43 ±0,04	0,19 ±0,01
Mama- wa	51,00 ±0,08	45,50 ±3,18	47,63 ±3,09	40,31 ±0,56	46,1 ±3,00	42,52 ±4,63	41,98 ±1,28	26,39 ±3,49	26,70 ±0,65	26,06 ±1,41
bonoua	4,73 ±0,11	2,99 ±0,01	15,33 ±0,05	1,39 ±0,56	15,7 ±0,10	0,48 ±0,01	18,01 ±6,23	14,06 ±0,32	8,24 ±0,06	15,82 ±0,20
bouaga	21,51 ±1,24	77,46 ±3,62	78,34 ±14,73	72,80 ±16,26	77,40 ±3,25	66,48 ±2,73	61,80 ±3,67	48,39 ±7,18	45,07 ±4,27	45,06 ±0,73
écrevisse	1,80 ±0,20	3,63 ±0,01	8,16 ±0,36	2,90 ±0,24	7,10 ±0,04	3,06 ±0,16	6,75 ±0,25	6,13 ±0,26	2,89 ±0,18	6,38 ±2,11
tapioca	5,37 ±0,21	17,19 ±8,38	26,07 ±9,11	22,68 ±11,51	19,42 ±4,77	29,46 ±9,36	24,63 ±13,90	19,18 ±1,53	20,68 ±0,90	19,68 ±1,48

Chez les cultivars bonoua et écrevisse, les PPO ont été activées dans les fis et fii. Les valeurs ont été respectivement de 15,7.102 nkatal et 18,01.102 nkatal pour le cultivar bonoua et de 7,10.102 nkatal et 6,75.102 nkatal pour le cultivar écrevisse (*Tableau 2*). Deux heures après la fin de l'optimum, l'activité des PPO a été stimulée dans les feuilles non inoculées des cultivars bonoua et écrevisse. Les valeurs enregistrées ont été en moyenne de 13,43.102 nkatal pour le cultivar bonoua et de 6,25.102 nkatal pour le cultivar écrevisse. Chez les autres cultivars, aucune différence significative n'a été constatée dans l'activité des PPO des feuilles analysées (*Tableau 2*).

La quantité des composés phénoliques éthano-solubles totaux a généralement augmenté dans les trois catégories de feuilles des 6 cultivars après inoculation. Cette augmentation a été forte dans les fis (III) des cultivars yacé et écrevisse (250 % et 312 % contre 149 % et 212 % pour les fi). Une forte valeur a été relevée pour la fis (I) du cultivar écrevisse (370 % contre 216 % pour la fi) (*Tableau 3*). Cette augmentation a été faible pour le cultivar bouaga et moyenne pour le cultivar bonoua.

Tableau 3 : *Effets de l'acide salicylique sur l'accumulation systémique de composés phénoliques éthano-solubles totaux (%) dans les feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge*

Cultivars	Temps de réaction									
	témoin	I			II			III		
		fis	fi	fii	fis	fi	fii	fis	fi	Fii
yacé	100* ±0,61	203 ±0,20	196 ±0,30	211 ±0,20	232 ±0,10	203 ±0,10	202 ±0,20	250 ±0,10	149 ±0,10	131 ±0,10
mamawa	60 ±1,65	102 ±0,60	117 ±0,10	125 ±0,20	97 ±0,00	117 ±0,50	115 ±0,40	96 ±0,40	125 ±0,50	116 ±0,20
bonoua	26 ±1,68	44 ±0,10	69 ±0,20	71 ±0,00	62 ±0,10	62 ±0,00	57 ±0,20	69 ±0,10	71 ±0,20	73 ±0,00
bouaga	25 ±1,60	27 ±1,00	31 ±0,88	30 ±1,15	29 ±1,28	29 ±0,55	32 ±0,47	32 ±1,21	33 ±0,47	33 ±1,40
écrevisse	102 ±1,91	370 ±0,70	216 ±0,45	143 ±0,91	205 ±0,83	178 ±0,95	206 ±2,84	312 ±1,88	212 ±1,80	228 ±3,53
tapioca	26 ±2,06	38 ±1,59	45 ±1,28	42 ±0,47	40 ±1,68	51 ±2,16	46 ±1,17	30 ±1,43	29 ±0,05	40 ±1,08

3-3. Influence de l'âge de la feuille inoculée sur l'activité des PPO et la quantité des composés phénoliques éthano-solubles totaux

Dans cette étude, les feuilles jeunes inoculées ont des teneurs en chlorophylles totales supérieures à 50 %, excepté le cultivar yacé pour lequel la feuille jeune contient 42 % de chlorophylles (*Tableau 4*).

Tableau 4 : *Teneur en chlorophylles totales des feuilles des cultivars de manioc exprimée en %*

Cultivars de manioc						
	yacé	mamawa	bonoua	bouaga	écrevisse	tapioca
F.A	100	100	100	100	100	100
F.J	42	85,60	66,20	77	77	54,81

La teneur des chlorophylles des feuilles jeunes a été calculée en prenant comme tube de référence (100 %), la quantité de chlorophylles des feuilles adultes de chaque cultivar. Chaque valeur utilisée pour calculer le pourcentage a été la moyenne de 4 répétitions. F.A : feuille adulte (6 semaines) ; F.J : feuille jeune (4 semaines).

Tableau 5 : *Influence de l'âge de la feuille traitée à l'acide salicylique sur l'activité des PPO (nkatal. mg-1 prot.) des plants de manioc*

Cultivars de manioc	Feuille jeune		feuille adulte	
	témoin	acide salicylique	témoin	acide salicylique
yacé	02,02 ± 0,23	05,47 ± 0,60	06,63 ± 0,52	10,67 ± 0,52
mamawa	03,65 ± 0,40	06,45 ± 0,81	05,08 ± 0,13	50,55 ± 1,80
bonoua	07,43 ± 0,91	12,60 ± 2,44	23,00 ± 2,03	53,37 ± 2,33
bouaga	07,64 ± 0,52	13,04 ± 1,02	20,53 ± 0,92	50,17 ± 2,24
écrevisse	01,93 ± 0,60	05,89 ± 0,72	05,75 ± 0,70	15,50 ± 0,92
tapioca	03,66 ± 0,61	05,88 ± 0,54	05,24 ± 0,30	40,96 ± 1,63

Chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions. Feuille jeune : 4 semaines; feuille adulte: 6 semaines

Les résultats consignés dans le tableau 5 indiquent que l'activité des PPO a été stimulée à plus de 50 % par l'inoculation de l'AS dans les feuilles jeunes et adultes. Cependant, cette stimulation a été plus forte dans les feuilles adultes que dans les jeunes feuilles traitées sauf celles des cultivars écrevisse et yacé. Chez le cultivar tapioca, l'activité des PPO est passée de 5,88.102 nkatal à 44,75.102 nkatal et celle de mamawa de 6,45.102 nkatal à 50,55.102 nkatal, de la jeune feuille à la feuille adulte. Chez tous les cultivars, l'activité de l'enzyme a subi une stimulation dans les feuilles adultes traitées. La quantité de composés phénoliques éthano-solubles totaux a également augmenté avec le traitement et l'âge.

La quantité de ces substances a été généralement multipliée par un facteur supérieur à 2 dans les feuilles jeunes de tous les cultivars, excepté chez le cultivar bouaga qui a subi une faible augmentation (**Tableau 6**). Dans les feuilles adultes, leur quantité a doublé dans les feuilles traitées du cultivar mamawa. En revanche, dans les autres cultivars, l'augmentation a été faible.

Tableau 6 : *Effets de l'acide salicylique sur l'accumulation des composés phénoliques éthanosolubles totaux dans les feuilles jeunes (4 semaines) et adultes (6 semaines) des plants de manioc*

Cultivars	feuille jeune		feuille adulte	
	Témoin	acide salicylique	témoin	acide salicylique
yacé	10 ± 0,16	61 ± 0,75	100* ± 1,99	145 ± 1,39
mamawa	24 ± 0,09	96 ± 0,57	61 ± 0,39	128 ± 1,18
bonoua	11 ± 0,29	43 ± 0,72	69 ± 1,01	84 ± 3,97
bouaga	25 ± 0,53	44 ± 0,82	51 ± 0,98	56 ± 1,35
écrevisse	13 ± 0,87	55 ± 1,52	95 ± 0,97	132 ± 1,88
tapioca	26 ± 0,15	68 ± 0,99	58 ± 0,99	80 ± 0,69

4. Discussion

L'activité des PPO évaluée dans les feuilles de cultivars de plants de manioc âgé de 6 semaines a été stimulée après traitement à l'AS. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par *Kim et al.* [1], *Constabel et al.* [9], *Wititsuwannakul et al.* [10], *Constabel et Ryan* [14] qui ont mesuré l'activité des PPO après blessure et/ou élicitation. Les PPO ont été impliquées dans plusieurs fonctions, entre autres, les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes [9,10,12,20].

La stimulation des PPO a été précoce dans les plants blessés (résultats non publiés) et inoculés après blessure dans les cultivars mamawa, bouaga, tapioca et écrevisse (1h). Toutefois, elle a été tardive pour les cultivars bonoua (4h), et yacé (12h). Ces résultats diffèrent de ceux respectivement obtenus par *Kim et al.* [1] et de *Constabel et al.* [9] au terme de leurs travaux sur le pommier et le peuplier pour lesquels l'optimum des PPO a été obtenu 24 h après blessure. Le niveau d'activation a varié avec les cultivars.

Les cultivars tapioca et mamawa ont été fortement stimulés par l'AS (9,70 et 11,50 fois). Chez tous les autres cultivars, l'activité des PPO a triplé. L'activation des PPO après inoculation des plantes au moyen de l'AS démontre leur implication dans les réactions de défense des plantes. Les travaux effectués par certains auteurs militent en faveur de cette hypothèse. En effet, *Subroto et al.* [8] ont montré que la fraction de latex recueillie à la base de laticifère contient plusieurs protéines liées à la pathogénie [pathogenesis-related (PR) proteins] comme les chitinases et la β-1,3-glucanase.

Or, dans une fraction similaire de latex du clone GT1 de l'hévéa le plus résistant aux maladies, *Wittsuwannakul et al.* [10] ont obtenu une forte activité des PPO. En outre, l'activité protéolytique des PPO mise en évidence par *Kuwabara et Kato* [20] dans l'épinard renforce l'implication de ces enzymes dans la défense des plantes. La destruction de certaines protéines accélère l'apoptose des cellules et, de ce fait, limite la progression des agents pathogènes dans les organes infectés.

Eu égard à l'activité des PPO mise en évidence dans les témoins, nous avons classé les cultivars étudiés en 2 groupes. Le groupe 1 renferme les cultivars bonoua et bouaga dont le niveau initial des PPO avoisine 40.102 nkatals et le groupe 2 composé de yacé, mamawa, tapioca et écrevisse avec une activité des PPO inférieure à 20.102 nkatals. Dans le 1er groupe, l'activité des PPO est constitutive et inductible par l'AS. En revanche, dans le second groupe, l'activité de ces enzymes est inductible chez mamawa et tapioca par l'élicitation à l'AS et non inductible chez yacé et écrevisse.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par *Constabel et al.* [9] et *Thipyapong et Steffens* [13]. Les premiers ont montré que la transcription des ARNm des PPO chez l'hybride du peuplier est maximale 16 h après blessure tandis que les seconds ont relevé que chez la tomate, la quantité de l'ARNm de la PPO F subit une augmentation systémique dans les jeunes feuilles des plants lorsque les feuilles adultes sont blessées. Le traitement à l'AS a induit très significativement la synthèse des composés phénoliques éthano-solubles totaux dans tous les cultivars.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par *Housti et al.* [12] qui ont montré l'accumulation des lignines et de leurs précurseurs dans les parois des cellules de *T. alata* traitées à l'AS. Dans les feuilles des cultivars étudiés, l'activité des PPO n'a pas affecté le taux des composés phénoliques éthano-solubles. Ce taux a été maintenu à un niveau relativement élevé après l'optimum de l'activité de ces enzymes. Nous pensons que ce dernier point est justifié par l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui convertit la L-phénylalanine en acide trans-cinnamique, précurseur de la plupart des composés phénoliques [21].

L'activité des PPO évaluée dans les feuilles (fis, fi, fii) à différentes périodes de la RH (I, II, III) a mis en évidence la RSA dans tous les cultivars. Cependant, l'activité des PPO enregistrée dans les fis et fii du cultivar bonoua a été inférieure à celle obtenue dans le témoin et dans les fi. La situation a été inversée chez le même cultivar aux périodes II et III. L'activité des PPO a été 32 à 37 fois supérieure à la fin de la RH et environ 2 fois plus, 2 h après la RH. Les quantités des composés phénoliques éthano-solubles accumulés sont très élevées, confirmant ainsi, que l'activité des PPO n'amenuise pas ces substances. Ils sont donc produits de novo grâce à l'induction de la PAL par l'AS [12].

L'étude de l'influence de l'âge de la feuille inoculée a été faite sur les feuilles de 4 et 6 semaines. Les résultats obtenus montrent, comme précédemment, que l'inoculation à l'AS stimule l'activité des PPO et la synthèse des composés phénoliques. Toutefois, cette activation est plus importante dans les feuilles adultes. Ces résultats diffèrent de ceux de *Thipyapong et Steffens* [13], de *Constabel et al.* [15] et de *Thipyapong et al.* [22] qui ont eu une forte activité des PPO dans les jeunes feuilles de tomate et de pomme de terre. Selon nous, cette différence s'explique apparemment par une différence dans l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des PPO.

Des travaux ont montré que les PPO sont codées par plusieurs familles de gènes différemment régulés par certains facteurs, entre autres les éliciteurs, le génotype de l'espèce végétale, le stade phénologique et la nature des organes de la plante [1,10,13, 22-25]. Ces résultats attestent bien que les jeunes feuilles des cultivars de manioc étudiés sont plus exposées aux attaques des agents pathogènes.

5. Conclusion

Au moyen de l'évaluation de l'activité des PPO et de la teneur en composés phénoliques éthano-solubles des feuilles de manioc, nous avons comparé puis classifié les différents cultivars répandus en Côte d'Ivoire. Ces paramètres physiologiques ont été examinés avant et après l'élicitation à l'AS. Aussi, les cultivars yacé, mamawa et écrevisse classés dans la catégorie des résistants ont-ils présenté une quantité de composés phénoliques éthano-solubles totaux élevée et induite et / ou une forte activation des PPO. Les autres cultivars (bonoua, bouaga, tapioca) qui ont eu l'un des facteurs maintenu à un niveau relativement élevé sont considérés comme tolérants. Ainsi, aucun cultivar n'a été classé sensible.

Références

- [1] - K. K. Kim, S. S. Seo., J. E. Kim, S. K. Sung, J. S. Kwan, G. An , W. T. Kim, *Plant Science*, 161 (2001) 1145-1152.
- [2] - A. M. C. N. Rocha, A. M. M. B. Morais, *Food Control*, 12 (2) (2001) 85-90.
- [3] - C. Carbonaro, M. Mattera, *Food Chem.*, 72 (4) (2001) 419-424.
- [4] - V. M. Gómez-López, *Food Chem.*, 77 (2002) 163-169.
- [5] - P. F. P. Goulart, J. D. Alves, M. M. Magalhaes, L. C. O. Lima, L. E. Meyer, *Food Chem.*, 83 (2003) 7-11.
- [6] - A. Concellón, M. C. Añón, A. Chaves, *Food Chem.*, 88 (1) (2004) 17-24.

- [7] - G. Rapeanu, A. Van Loey, C. Smout, M. Hendrickx, *Food Chem.*, 94 (2006) 253-261.
- [8] T. Subroto, J. J. Beintema, H. A. Schreuder, U. M. S. Soedjanaatmadja, G. A. Van Koningsveld, *Phytochemistry*, 43 (1996) 29-37.
- [9] C. P. Constabel, Y. Lynn, J. J. Patton, M. E. Christopher, *Plant. Physiol.*, 124 (2000) 285-295.
- [10] D. Wititsuwannakul, N. Chareonthiphakorn, M. Pace, R. Wititsuwannakul, *Phytochemistry*, 61 (2002) 115-121.
- [11] O. Klarzynski, B. Fritig, C. R. *Acad. Sci. III.*, 324 (2001) 953-63.
- [12] F. Housti, C. Andary, A. Gargadenne, M. Amssa, *Plant. Physiol. Biochem.*, 40 (2002) 761-769.
- [13] P. Thipyapong, J. C. Steffens, *Plant Physiol.*, 115 (1997) 409-418.
- [14] C. P. Constabel, C. A. Ryan, *Phytochemistry*, 47 (1998) 507-511.
- [15] C. P. Constabel, D. R. Bergey, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 407-411.
- [16] T. Swain, W. E. Hillis, *J. Sci. Food Agric.*, 10 (1959) 63-68.
- [17] L. Dekok, M. Graham, *Plant Physiol. Biochem.*, 27 (2) (1989) 203-209.
- [18] G. Mac Kinney, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 315-322.
- [19] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- [20] T. Kuwabara, Y. Katoh, *Plant Cell Physiol.*, 40 (1999) 1029-1035.
- [21] I. H. Nugroho, M. C. Verberne, R. Verpoorte, *Plant Physiol. Biochem.*, 40 (2002) 755-760.
- [22] P. Thipyapong, M. D. Hunt, J. C. Steffens, *Phytochemistry*, 40 (1995) 673-676.
- [23] P. Thipyapong, D. Joel, J. C. Steffens, *Plant Physiol.*, 113 (1997) 707-718.
- [24] K. Majourhat, M. Bazziz, K. Bendiab, in actes du "Congrès de Biochimie, Casablanca, 9, 10, 11 mai 2002", Biochimie et Environnement, (2002) 86-90. Ed. Société Marocaine de Biochimie.
- [25] S. Doğan, O. Arslan, F. Özen, *Food Chem.*, 91 (2005) 341-345.