

Influence de l'acide salicylique sur la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase, des polyphénoloxydases et l'accumulation des composés phénoliques chez le manioc (*Manihot esculenta* Crantz)

Denézon O. DOGBO¹, Janat A. MAMYRBEKOVA BEKRO², Yves-Alain BEKRO², Raoul S. SIE¹,
Seu J. GOGBEU ¹& Abdoulaye TRAORE ¹

¹Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales. UFR des Sciences de la Nature. Université d'Abobo-Adjamé.

²Laboratoire de Chimie Bioorganique et de Substances Naturelles. UFR. SFA. Université d'Abobo-Adjamé.

*Auteur pour les correspondances (Email: denezon@yahoo.fr)

Recu le 16-11-2006, accepté le 05-02-2008

Résumé

Pour étudier la réaction de défense du manioc contre les agents pathogènes, nous avons évalué l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et des polyphénoloxydases (PPO), et dosé les composés phénoliques totaux éthano-solubles accumulés avant et après l'inoculation de l'acide salicylique (AS) dans des plants âgés de six semaines. La synthèse des enzymes a été précocement induite (1-4 h). L'activité de la PAL a été 4 à 13 fois stimulée et celle des PPO, 3 à 11 fois plus, selon les cultivars. Les taux de composés phénoliques totaux éthano-solubles ont subi une augmentation significative dès l'inoculation des plantes. Ces taux sont restés quasi constants malgré la baisse de l'activité de la PAL. 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), la synthèse de la PAL et la quantité des composés phénoliques ont été plus élevées dans les feuilles adultes.

Mots clés : manioc, composés phénoliques, PAL, PPO, acide salicylique, réaction de défense

Abstract

*Influence of salicylic acid on synthesis of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidases and accumulation of phenolic compounds in cassava (*manihot esculenta* crantz)*

To study the reaction of defence of cassava against pathogens, we have evaluated the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxidases (PPO) and dosed total ethano-soluble phenolic compounds accumulated before and after inoculation of salicylic acid in six weeks old seedlings. Enzymes synthesis was precociously induced (1-4 h). PAL activity was 4 to 13 times stimulated and those PPO, 3 to 11 fold higher, according to varieties. Dosed total phenolic compounds undergone a significant increase since the plants inoculation, and this rate has remained almost constant despite the decrease of PAL activity. The enzyme synthesis was equally stimulated in immediately situated leaves above (fis) and in under (fii) of the inoculated leaf (fi). Phenolic compounds have also undergone an increase in these leaves. Concerning the age of the inoculated leaf (4 and 6 weeks), the PAL synthesis and the phenolic compounds quantity have become more important in adult leaves.

Key-words: cassava, phenolic compounds, PAL, PPO, salicylic acid, reaction of defence

1. Introduction

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une plante pluriannuelle cultivée dans les régions tropicales de la plupart des pays en voie de développement d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine (Ravi *et al.*, 1996). La facilité de culture de cette plante, sa capacité d'adaptation à différents types de sols et sa tolérance à la sécheresse ont contribué à l'expansion de sa culture (Coulibaly & Séry, 1992).

Le manioc est cultivé surtout pour ses tubercules qui constituent une source importante d'énergie (Bellotti & Van Schoonhoven, 1978). En Côte d'Ivoire, il est le deuxième aliment vivrier après l'igname (*Discorea spp*) (FAO & PAM, 2004). Il est transformé en plusieurs sous-produits (attiéké, attoukou, gari, galette, fougou, tapioca, etc.) consommés par toutes les populations autochtones et allogènes. Depuis l'exportation de sa semoule (gari et attiéké), sa culture n'a cessé de s'intensifier (Coulibaly & Séry, 1992). Pour accroître la production, plusieurs cultivars ont été vulgarisés comme bonoua 2, bonoua 5, IM 84, IM 93 etc. Mais, ceux-ci sont sujets à de nombreuses maladies causées par des agents pathogènes tels que les champignons et les bactéries (Ayesu-Offei & Antwi-Boasiako, 1996; Pereira *et al.*, 2003). Ces maladies peuvent occasionner des pertes de rendements allant de 80% à 100% (N'Zué, CNRA, Adiopodoumé, Côte d'Ivoire, communication personnelle).

Par ailleurs, lorsque les plantes sont attaquées, elles réagissent par des modifications du métabolisme. Celles-ci peuvent se manifester au point d'inoculation de l'agent pathogène par une nécrose entourée de cellules vivantes devenues résistantes aux microorganismes. Ces cellules ont leurs parois renforcées par des dépôts de callose, de lignines et d'autres composés phénoliques (Housti *et al.*, 2002 ; Majourhat & Bendiab, 2002). De multiples enzymes sont activées, entre autres, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et les polyphénoloxydases (PPO); de nombreuses voies biochimiques sont stimulées et le métabolisme secondaire s'accroît. L'ensemble de ces réactions constitue la réponse d'hypersensibilité (RH). Elle

apparaît après la reconnaissance de l'agent pathogène chez les plantes résistantes. Cette réponse induit parallèlement la synthèse de certaines molécules comme l'acide salicylique (AS) qui, lorsqu'il atteint une concentration adéquate, déclenche les réactions de défense dans toutes les parties de la plante (Métraux *et al.*, 1990; Métraux, 2001). On parle alors de réaction systémique acquise (RSA) (Métraux *et al.*, 1990; Métraux, 2001).

La PAL est une enzyme dont l'activité varie avec l'état physiologique de la plante. Elle est stimulée par la blessure, les attaques fongiques ou l'élicitation des plantes (Nugroho *et al.*, 2001; Nugroho *et al.*, 2002 ; He *et al.*, 2002 ; Campos *et al.*, 2003 ; Gúmez-Vásquez *et al.*, 2004). C'est la première enzyme de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Elle convertit la L-phénylalanine en acide trans-cinnamique qui est le précurseur de la synthèse de la plupart des composés phénoliques tels que les lignines et l'acide salicylique (AS) (Nugroho *et al.*, 2002). Les PPO catalysent l'oxydation des phénols en o-quinones qui réagissent avec les acides aminés et les protéines. Ceux-ci, après polymérisation, donnent des composés complexes qui sont à l'origine du brunissement des tissus (Concellün *et al.*, 2004, Colak *et al.*, 2005, Schweiggert *et al.*, 2005).

L'AS joue un rôle important dans la signalisation de la défense des plantes contre les agents pathogènes (Martinez *et al.*, 2000; Nugroho *et al.*, 2001). Son application simule une attaque de la plante et induit la stimulation de la synthèse de la PAL et des PPO chez les plantes résistantes (Nugroho *et al.*, 2002 ; Wititsuwannakul *et al.*, 2002).

Dans ce travail nous avons, d'une part, évalué en suivant les activités de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) et des polyphénoloxydases (PPO; EC 1.14.18.1), le niveau de résistance de six cultivars de manioc couramment cultivés en Côte d'Ivoire et d'autre part, mesuré les quantités de composés phénoliques totaux éthano-solubles synthétisés après inoculation de l'acide salicylique. Les résultats obtenus nous ont permis de les classer en cultivars résistants, tolérants ou sensibles.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Six cultivars de manioc couramment cultivés en Côte d'Ivoire ont été utilisés pour l'expérimentation. Ils se répartissent en cultivars amers (tapioca et yacé) et doux (bonoua, bouaga, écrevisse et mamawa). Ce matériel végétal a été fourni par l'Agence National 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 h 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 du papier abrasif (blessé), (c) plante inoculée à l'acide salicylique (AS) (10 µl, 5 mM) après blessure (blessé + AS). L'étude de la réaction d'hypersensibilité (RH) a été menée en évaluant l'activité enzymatique de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), des polyphénoloxydases (PPO) et la quantité des composés phénoliques totaux éthano-solubles à des intervalles de temps précis (de 0 à 12 h et à 24, 48, 72 et 96 h) après inoculation. La réaction systémique acquise (RSA) a été évaluée à trois périodes : au temps d'obtention de l'activité maximale de la PAL, à la fin et 2 h après la fin de

l'expression de cette activité maximale. L'influence de l'âge de la feuille a été étudiée en inoculant de l'AS dans des 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 de la phénylalanine ammonia-lyase et des polyphénoloxydases

Les feuilles inoculées ont été utilisées pour l'étude de la réaction d'hypersensibilité et 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 des enzymes ont été faits dans les conditions optima de pH et de température pour chaque cultivar. Un (1) g de limbe a été broyé dans un mortier en agate contenant 5 ml de tampon de phosphate de sodium 0,1 M placé dans de la glace. Le pH du tampon a été de 6,9 et 6,3 (yacé) ; 6,5 et 6,2 (mamawa) ; 6,5 et 7,2 (bonoua) ; 6,0 et 7,2 (bouaga) ; 6,5 et 6,3 (écrevisse) et de 6,5 et 6,3 (tapioca) respectivement pour la PAL et les PPO. Après centrifugation à 5000 trs.min⁻¹ pendant 10 min, le surnageant récupéré a constitué l'extrait brut enzymatique (Gogbeu, 2006; Traoré, 2006).

Le dosage de l'activité enzymatique de la PAL s'est effectué selon la méthode de Van Lelyveld *et al.* (1984). Le milieu réactionnel (3 ml) contenant 10 mM de L-phénylalanine et 0,5 ml d'extrait brut enzymatique a été incubé dans le tampon d'extraction à 30 °C pendant 30 min. La réaction a été arrêtée en plaçant les tubes dans la glace. L'intensité de la coloration a été déterminée à 290 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Baush & Lomb. Le dosage de l'activité enzymatique des PPO a été réalisé selon la méthode de Constabel *et al.* (1995). Le milieu réactionnel (3 ml) contient 5 mM de dopamine et 0,2 ml d'extrait brut enzymatique. L'incubation faite à 29 °C (yacé, mamawa, bonoua et bouaga) et 24 °C (tapioca) à l'obscurité pendant 5 min a été interrompue comme précédemment (Gogbeu, 2006; Traoré, 2006).

2.5. Extraction et dosage des composés phénoliques totaux éthano-solubles

L'extraction des composés phénoliques a été faite selon la technique décrite par Sineiro *et al.*, (1996). Un (1) g de limbe a été broyé dans 10 ml d'éthanol (80%, v/v) en présence de 0,1 g de dithionite de sodium. Le broyat obtenu est centrifugé à 5000 trs.min⁻¹ pendant 10 min à 15 °C. Le surnageant récupéré a constitué l'extrait phénolique total éthano-soluble. La quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles a été déterminée selon la méthode décrite par Swain & Hillis (1959). Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles la plus élevée dans les feuilles de yacé, pris comme témoin (100%).

2.6. Extraction et dosage des chlorophylles

L'extraction des chlorophylles s'est effectuée selon la méthode de Dekok & Graham (1989). Un (1) g de limbe 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 (1941). Les teneurs en chlorophylles des feuilles jeunes sont exprimées en pourcentage par rapport à la quantité de chlorophylles des feuilles adultes de chaque cultivar utilisé comme tube de référence (100%).

2.7. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976). La sérum albumine bovine a été utilisée 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'acide salicylique (AS) sur la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), des polyphénoloxydases (PPO) et la production des composés phénoliques totaux éthano-solubles en réaction d'hypersensibilité

3.1.1. Synthèse de la PAL et des PPO

Chez toutes les plantes témoin, l'activité des enzymes a été maintenue à son niveau initial pour chaque cultivar durant l'expérimentation. L'activité de la PAL a été faible pour les cultivars yacé, écrevisse et bouaga (5,50 10² nkatals. mg⁻¹ prot) et multipliée par 2 à 2,5 pour les cultivars tapioca, bonoua et mamawa (12 10² à 14,34 10² nkatals.mg⁻¹ prot) (Fig. 1). Celle des PPO a varié de 8,36 à 10 nkatals. mg⁻¹ prot chez les cultivars mamawa, tapioca, yacé et écrevisse. Les plus fortes valeurs ont été enregistrées pour les cultivars bouaga et bonoua (35,98 et 38,98 nkatals. mg⁻¹ prot) (Fig. 1). Chez les plantes traitées, la synthèse des enzymes a subi une stimulation. Cette synthèse a débuté dès l'inoculation des plantes, excepté le cultivar yacé pour lequel l'activité des PPO a débuté après 1 h. L'optimum de l'activité de la PAL a été obtenu 1 h après l'inoculation chez les cultivars yacé, écrevisse, bouaga et tapioca et après 3 h de contact de l'inoculum chez les cultivars bonoua et mamawa. Les cultivars écrevisse et bonoua ont présenté un deuxième optimum de même amplitude que le premier 48 h après l'inoculation à l'acide salicylique (Fig. 1). L'activité maximale de la PAL enregistrée a été très élevée chez le cultivar mamawa (125 10² nkatals. mg⁻¹ prot), moyenne chez les cultivars bouaga, tapioca et yacé (60 10² à 75 10² nkatals. mg⁻¹ prot) et faible chez les cultivars bonoua et écrevisse (50 10² nkatals. mg⁻¹ prot) (Fig. 1). L'optimum de l'activité des PPO a été obtenu 4 h et 12 h après l'inoculation des plantes respectivement chez les cultivars bonoua et yacé. Pour les autres cultivars, il a été enregistré 1 h après l'inoculation des plantes. A l'optimum, l'activité de l'enzyme évaluée a été très faible pour les cultivars yacé et écrevisse (25,65 et 26,92 nkatals. mg⁻¹ prot) et élevée pour les autres cultivars (80,91 à 101,65 nkatals. mg⁻¹ prot).

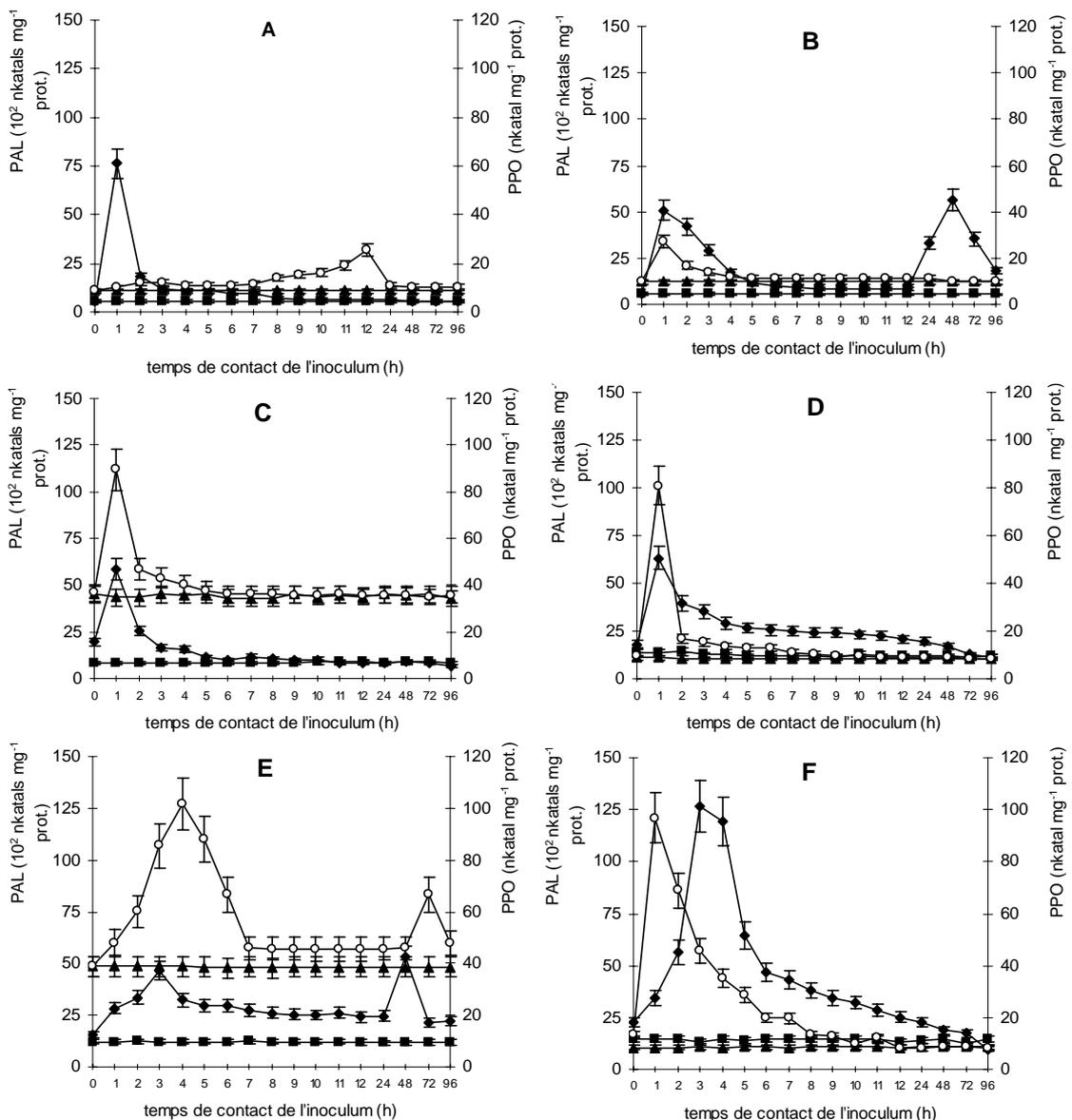


Figure 1 : Activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et des polyphénoloxydases (PPO) de feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge inoculées à l'acide salicylique (5 mM). yacé (A) ; écrevisse (B) ; bouaga (C) ; tapioca (D) ; bonoua (E) ; mamawa (F)

■ — témoin PAL, ◆ — essai PAL, ▲ — témoin PPO, ○ — essai PPO.

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

3.1.2. Synthèse de composés phénoliques totaux éthano-solubles

Les quantités initiales de composés phénoliques totaux éthano-solubles des plantes témoin ont varié

en fonction des cultivars. Elles ont été de 1,5 à 33 fois plus faibles par rapport au témoin du cultivar yacé (Fig. 2). 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 (Fig. 2). Après l'inoculation des plantes, la synthèse des composés phénoliques totaux éthano-solubles a connu une stimulation. Le pourcentage de stimulation calculé au temps d'obtention de

l'activité maximale de la PAL a été très faible pour le cultivar écrevisse (1,1%) et très élevée pour le cultivar bouaga (400%). Le niveau de stimulation a été évalué à 26,4%, 40,5% et 100% respectivement pour les cultivars mamawa, bonoua et tapioca. Ces quantités sont restées

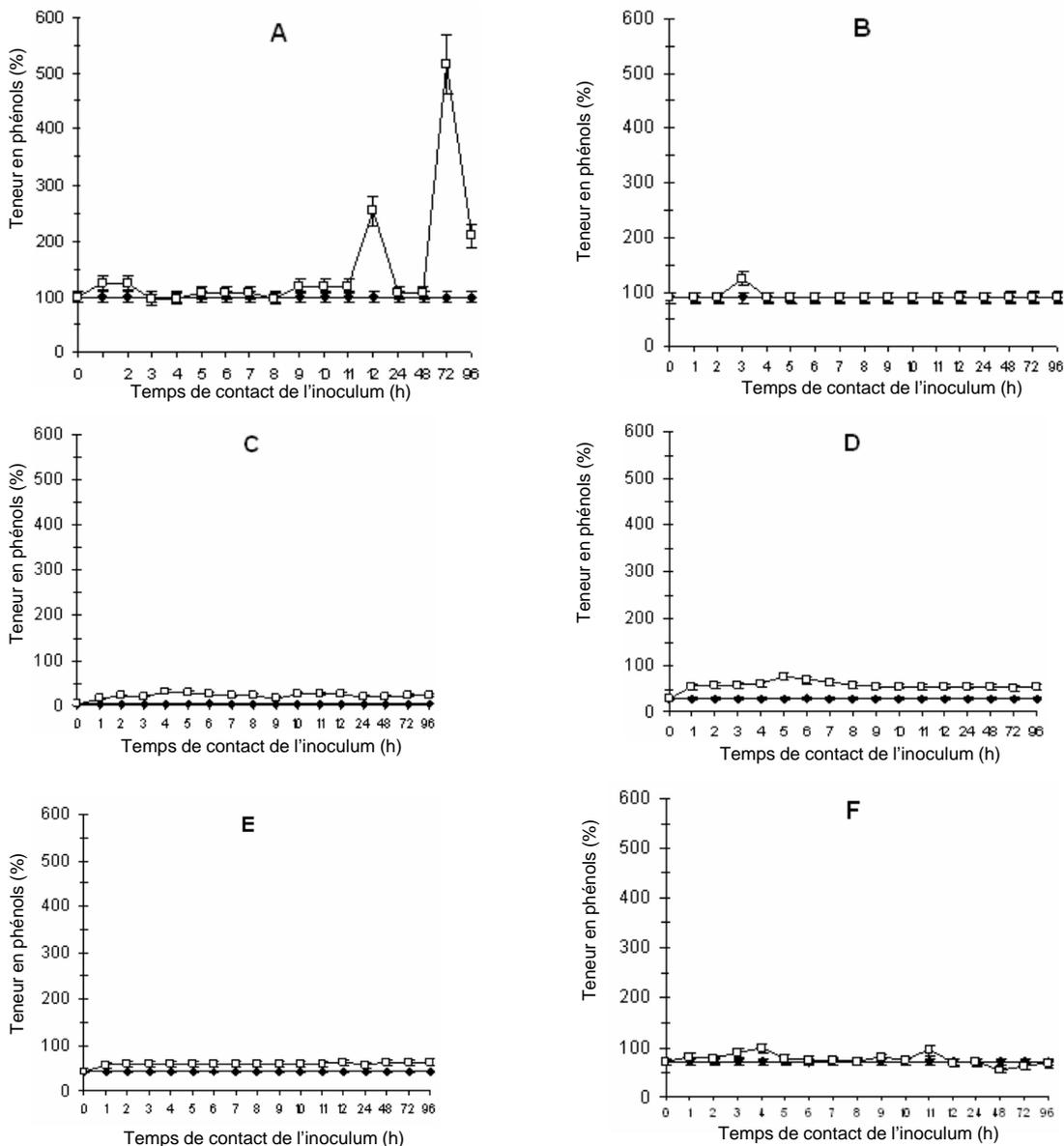


Figure 2: Influence du temps de contact de l'acide salicylique sur l'accumulation de composés phénoliques totaux éthano-solubles dans les feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge (%). yacé (A) ; écrevisse (B) ; bouaga (C) ; tapioca (D) ; bonoua (E) ; mamawa (F). —◆— témoin ; —□— essai.

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

sensiblement identiques au cours de l'expérimentation, excepté le cultivar yacé pour lequel une forte synthèse des composés phénoliques totaux éthano-solubles a été mise en évidence 12 h et 72 h après l'inoculation (Fig. 2).

3.2. Influence de l'AS sur la synthèse de la PAL et la production de composés phénoliques totaux éthano-solubles en réaction systémique acquise (RSA)

Au temps d'obtention de l'activité maximale de la PAL (I), la synthèse de l'enzyme évaluée dans les feuilles inoculées (RH) a été nettement supérieure à celle des feuilles situées au-dessus et en dessous (RSA) chez tous les cultivars, excepté le cultivar tapioca. Chez ce dernier, aucune

différence significative n'a été observée dans les trois types de feuilles (Tableau 1). À la fin (II) et 2 h après la fin de l'activité maximale de la PAL (III), une forte synthèse de l'enzyme a été mise en évidence dans les feuilles situées au-dessus des feuilles inoculées (fis) pour le cultivar yacé. Elle a été évaluée respectivement à $29 \cdot 10^2$ nkatal. mg^{-1} prot et $22,6 \cdot 10^2$ nkatal. mg^{-1} prot aux périodes II et III contre $1,8 \cdot 10^2$ nkatal. mg^{-1} prot et $14,3 \cdot 10^2$ nkatal. mg^{-1} prot pour les feuilles inoculées (Tableau 1). Chez les cultivars bonoua et écrevisse, la synthèse de la PAL a été stimulée dans les fis et fii. Les valeurs sont passées de 48 nkatal. mg^{-1} prot et 122 nkatal. mg^{-1} prot à plus de $15 \cdot 10^2$ nkatal. mg^{-1} prot (Tableau 1). Pour les cultivars bouaga et tapioca, la stimulation de la synthèse de l'enzyme a été identique pour toutes les feuilles analysées (Tableau 1). La quantité des composés

Tableau 1: Effets de l'acide salicylique sur l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) dans les feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge (10^2 nkatal. mg^{-1} prot.).

Cultivars	Temps de réaction									
	témoin	I			II			III		
		fis	fi	fii	fis	fi	fii	fis	fi	fii
yacé	5,07 ± 0,01	8,12 ± 0,12	13,85 ± 0,33	4,8 ± 0,10	29,06 ± 0,12	1,86 ± 0,10	5,83 ± 0,07	22,62 ± 0,93	14,37 ± 0,71	2,35 ± 0,05
mamawa	5,8 ± 0,20	37 ± 1,10	57 ± 1,70	45 ± 5,00	31,7 ± 1,20	36,7 ± 1,20	37 ± 1,00	35 ± 1,70	31,3 ± 0,60	34 ± 1,00
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	15,8 ± 0,20
bouaga	0,55 ± 0,01	1,83 ± 0,19	3,25 ± 0,20	2,84 ± 0,34	2,07 ± 0,06	2,27 ± 0,03	2,53 ± 0,04	1,95 ± 0,03	1,99 ± 0,07	2,03 ± 0,18
écrevisse	5,66 ± 0,11	9,15 ± 0,18	14,6 ± 0,01	7,63 ± 0,15	15,21 ± 0,47	1,22 ± 0,42	15,06 ± 3,00	11,8 ± 0,72	1,47 ± 0,02	20,73 ± 2,11
tapioca	5,7 ± 0,10	16 ± 0,30	17 ± 2,20	17,5 ± 1,90	15,8 ± 1,70	16,2 ± 4,20	13,2 ± 0,90	14,4 ± 1,60	16,1 ± 2,50	13,5 ± 0,90

I: obtention de l'activité maximale de la PAL en réaction d'hypersensibilité (RH) ou optimum de la RH; II: fin de l'optimum de la RH; III: 2 heures après la fin de l'optimum de la RH; fi: feuille inoculée; fii: feuille située immédiatement en dessous de fi; fis: feuille située immédiatement au-dessus de fi.

Tableau 2 : Effets de l'acide salicylique sur l'accumulation systémique de composés phénoliques totaux éthano-solubles dans les feuilles de plants de manioc de 6 semaines d'âge (%).

Cultivars	Temps de réaction									
	I			II			III			
	témoin	fis	fi	fii	fis	fi	fii	fis	fi	fii
yacé	100*	209	202	217	239	209	208	258	154	134
	± 0,61	± 1,55	± 1,88	± 1,29	± 2,23	± 0,81	± 1,32	± 3,31	± 1,54	± 2,58
mamawa	60	105	121	129	101	121	120	99	129	120
	± 1,65	± 1,24	± 2,12	± 0,97	± 1,63	± 0,83	± 2,43	± 1,48	± 1,80	± 2,36
bonoua	26	71	111	114	100	99	91	111	113	117
	± 1,68	± 0,94	± 1,36	± 1,63	± 1,63	± 0,70	± 0,33	± 1,89	± 0,80	± 0,81
bouaga	25	27	31	30	29	29	32	32	33	33
	± 1,60	± 1,00	± 0,88	± 1,15	± 1,28	± 0,55	± 0,47	± 1,21	± 0,47	± 1,40
écrevisse	102	370	216	143	205	178	206	312	212	228
	± 1,91	± 0,7	± 0,45	± 0,91	± 0,83	± 0,95	± 2,84	± 1,88	± 1,80	± 3,53
tapioca	26	38	45	42	40	51	46	30	29	40
	± 2,06	± 1,59	± 1,28	± 0,47	± 1,68	± 2,16	± 1,17	± 1,43	± 0,05	± 1,08

*La quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles la plus élevée chez le témoin yacé a été prise comme référence (100%) (100% = 1106 µg de composés phénoliques totaux éthano-solubles). Chaque valeur utilisée pour calculer le pourcentage a été la moyenne ± écart type de 4 répétitions.

phénoliques totaux éthano-solubles a aussi augmenté dans les trois catégories de feuilles des 6 cultivars après l'inoculation. Cette augmentation a été forte dans les fis (III) des cultivars yacé et écrevisse (258% et 312% contre 154% 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 2).

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

Les feuilles jeunes inoculées dans cette étude ont des teneurs en chlorophylles totales supérieures à 50%, excepté le cultivar yacé pour lequel la feuille

jeune contient 42% de chlorophylles (Tableau 5). Les résultats consignés dans le tableau 3 indiquent que la synthèse de la PAL 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. Chez le cultivar mamawa, l'activité de la PAL est passée de 10 10² à 44,7 10² nkatals. mg⁻¹ prot de la jeune feuille à la feuille adulte. Chez tous les cultivars, les valeurs ont varié dans le même ordre. La quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles a également augmenté avec le traitement et l'âge. Chez tous les cultivars, elle a été multipliée par un facteur supérieur à 2, excepté chez le cultivar bouaga qui a subi une faible augmentation (Tableau 4).

Tableau 3: Influence de l'âge de la feuille traitée à l'acide salicylique sur l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) des plants de manioc (10² nkatals. mg⁻¹ prot.).

Cultivars	feuille jeune		feuille adulte	
	témoin	acide salicylique	témoin	acide salicylique
yacé	0,009 ± 0,00	0,016 ± 0,01	3,45 ± 0,09	39,26 ± 0,14
mamawa	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,01	6,87 ± 1,82	44,75 ± 0,40
bonoua	0,014 ± 0,01	0,048 ± 0,01	7,3 ± 0,03	19,83 ± 0,23
bouaga	0,079 ± 0,01	0,31 ± 0,03	4,61 ± 0,57	26,63 ± 0,16
écrevisse	0,075 ± 0,04	0,85 ± 0,21	3,28 ± 0,25	17,01 ± 0,12
tapioca	0,01 ± 0,00	0,83 ± 0,18	7,3 ± 0,46	30,8 ± 0,27

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

Tableau 4 : Effets de l'acide salicylique sur l'accumulation des composés phénoliques totaux éthano-solubles dans les feuilles jeunes (4 semaines) et adulte (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

*La quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles la plus élevée chez le témoin adulte yacé a été prise comme référence (100%) (100% = 1234,42 µg de composés phénoliques totaux éthano-solubles). Chaque valeur utilisée pour calculer le pourcentage a été la moyenne ± écart type de 4 répétitions.

Tableau 5 : Teneur en chlorophylles totales des feuilles des cultivars de manioc (%)*.

Cultivars	feuille jeune	feuille adulte
yacé	42	100
mamawa	85,6	100
bonoua	66,2	100
bouaga	77	100
écrevisse	77	100
tapioca	54,8	100

*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 ± écart type de 4 répétitions. Feuille jeune: 4 semaines; feuille adulte: 6 semaines

3.4. Classification

Les cultivars yacé et mamawa qui ont présenté une forte synthèse de la PAL ainsi qu'une intense accumulation des composés phénoliques totaux éthano-solubles ont été classés résistants. Les autres cultivars sont tolérants (Fig. 1 et 2).

4. Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence la stimulation de la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et des

polyphénoloxydases (PPO) dans les feuilles de cultivars de manioc âgé de 6 semaines après traitement à l'acide salicylique (AS). Des résultats similaires avaient été obtenus, d'une part, par De Meyer *et al.* (1996), Bucciarelli *et al.* (1998), Klazynski *et al.* (2000) et Martinez *et al.* (2001) et, d'autre part, par Constabel *et al.* (2002), Kim *et al.* (2001) et Wititsuwannakul *et al.* (2002) qui ont mesuré respectivement l'activité de la PAL et des PPO après élévation à l'AS, blessure et / ou inoculation des plantes par un agent pathogène. Cette stimulation démontre leur implication dans les réactions de défense de la plante.

Le rôle capital que joue la PAL dans les réactions de défense de la plante a fait l'objet de nombreux travaux. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de l'AS et d'autres composés phénoliques comme les lignines intervenant dans le renforcement des parois pectocellulosiques (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996; Shirasu *et al.*, 1997; Chen & Mc Clure, 2000). Les PPO interviennent dans la défense des plantes contre les agents pathogènes par diverses actions. Par leur activité protéolytique, elles accélèrent l'apoptose des cellules et limitent la progression des agents pathogènes dans les organes infectés (Kuwabara & Katoh, 1999). En outre, certains phénols comme la scopoletine et l'esculetine deviennent toxiques pour les champignons lorsqu'ils sont oxydés par les PPO (Gümez-Vásquez *et al.*, 2004). Ce rôle des PPO dans la défense des plantes contre les agents pathogènes

a été confirmé par Wititsuwannakul *et al.* (2002) qui a mis en évidence une forte activité de ces enzymes dans le latex du clone GTI de l'hévéa le plus résistant aux maladies.

La stimulation de la synthèse des enzymes étudiées a été précoce dans les cultivars testés (1 à 4 h), excepté l'activité des PPO qui a été tardive (12 h) chez le cultivar yacé. Ce résultat diffère de ceux obtenus par Martinez *et al.* (2001) et Gúmez-Vásquez *et al.* (2004) respectivement chez le melon après traitement des cotylédons par la cellulase extraite de *Trichoderma longibrachiatum* et, dans les feuilles et suspensions cellulaires de manioc élicitées. Dans le melon, le premier pic de la PAL a été obtenu après 6 h d'infiltration et 12 h après l'inoculation. Dans nos travaux, la précocité de l'obtention de l'optimum de la synthèse des enzymes présente un avantage pour la défense des cultivars de manioc étudiés. En effet, l'acide cinnamique produit par la PAL à partir de la L-Phénylalanine est un intermédiaire clé dans la voie de biosynthèse des lignines et de l'acide salicylique (Dixon & Paiva, 1995; Chaman *et al.*, 2003). Les lignines par imprégnation, renforcent les parois cellulaires et arrêtent l'invasion des cellules par les microorganismes (Chen & Mc Clure, 2000). Cette action est renforcée par celle des PPO qui induisent la nécrose des organes végétaux par leur activité protéolytique (Kuwabara & Kato, 1999). Les cultivars bonoua et écrevisse ont présenté deux pics de synthèse de la PAL d'amplitude sensiblement égale. Le second pic est apparu 48 h après l'application de l'AS. Un résultat identique avait été obtenu par Martinez *et al.* (2001). Comme chez le melon, nous pensons qu'une autre voie de signalisation pourrait exister chez le manioc; ce qui renforcerait la résistance de ces deux cultivars.

La synthèse de la PAL et le dosage de son activité enzymatique chez les témoins ont permis de classer, par ordre décroissant, les cultivars en trois groupes: le groupe 1 renferme les cultivars bonoua, tapioca et mamawa dont le niveau varie de $12 \cdot 10^2$ à $14 \cdot 10^2$ nkatals. mg^{-1} prot; le groupe 2 est constitué de cultivar bouaga ($8 \cdot 10^2$ nkatals. mg^{-1} prot) et le groupe 3 est composé des cultivars yacé et écrevisse ($= 6 \cdot 10^2$ nkatals. mg^{-1} prot). Après l'inoculation des plantes, l'activité de la PAL chez yacé a été multipliée par 13 et celle de mamawa et écrevisse par 9. Les cultivars les moins stimulés

ont été bonoua et tapioca ($= 4 \cdot 10^2$ nkatals. mg^{-1} prot). L'activité des PPO a été multipliée de 2 à 11,5 fois selon les cultivars.

À l'optimum de l'activité de la PAL, le traitement à l'AS a induit très significativement la synthèse des composés phénoliques totaux éthano-solubles dans tous les cultivars, excepté écrevisse. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Housti *et al.* (2002) qui avaient démontré l'accumulation des lignines et des précurseurs des lignines dans les parois des cellules de *T. alata* traité à l'AS. Dans les feuilles des cultivars yacé et mamawa, l'augmentation de la quantité des composés phénoliques totaux éthano-solubles a été concomitante de la stimulation de la synthèse de la PAL. En revanche, dans les cultivars bouaga et tapioca, l'accumulation des composés phénoliques éthano-solubles s'est effectuée après l'obtention de l'optimum de la PAL. Toutefois, la quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles évaluée, a été maintenue relativement constante, après avoir atteint sa valeur la plus élevée, malgré la baisse de l'activité de la PAL, jusqu'à son niveau initial (témoin). La synthèse de ces derniers pourrait s'expliquer par l'activation des voies différentes de celle de la PAL, entre autres, la voie de la tyrosine ammonia-lyase (TAL) (Rösler *et al.*, 1997). En outre, l'activité de la PAL, dans les feuilles traitées, a été plus élevée ($x \cdot 10^2$ nkatals. mg^{-1} prot) que celle des PPO (enzyme oxydant les phénols).

L'évaluation de l'activité de la PAL dans les différentes feuilles après l'optimum de la RH, démontre la mise en place de la réaction systémique acquise (RSA) dans tous les cultivars. Chez le cultivar yacé, la fi a été très activée, et cette activité de la PAL a été corrélée à la quantité de composés phénoliques totaux éthano-solubles dosés. En revanche, chez bonoua et écrevisse la RSA a été identifiée dans les fis et fii. Dans les cultivars bouaga et tapioca, aucune différence significative n'a été relevée entre les trois types de feuilles. La mise en place de la RSA confirme deux faits. D'abord, l'activation de la voie de la biosynthèse des composés phénoliques et ensuite le transport de l'AS dans d'autres parties de la plante (Nawrath & Métraux, 1999). Chez le cultivar yacé, la voie privilégiée de la circulation de l'AS pourrait être le xylème tandis que dans les autres cultivars, les faisceaux libéro-ligneux seraient impliqués. Cette dernière voie de circulation de

l'AS est un avantage pour la défense des systèmes foliaire et racinaire.

L'étude de l'influence de l'âge de la feuille inoculée a été faite sur les feuilles de 4 et 6 semaines. Les jeunes feuilles utilisées dans cette expérimentation sont aptes à effectuer la photosynthèse. Le taux de chlorophylles estimé est supérieur à 50%, à l'exception des feuilles du cultivar yacé qui contiennent 42%. Les résultats obtenus démontrent que l'inoculation à l'AS stimule l'activité de la PAL et la synthèse des composés phénoliques. Toutefois, cette activation est plus importante dans les feuilles adultes. En effet, ces dernières contiennent des cellules différenciées capables d'initier les principales voies du métabolisme secondaire en particulier celles impliquées dans la biosynthèse des composés phénoliques. Dans ces conditions, les jeunes organes des plantes sont plus exposés aux attaques des agents pathogènes que les organes adultes.

5. Conclusion

L'évaluation de l'activité de la PAL, des PPO et de la teneur en composés phénoliques totaux éthano-solubles des feuilles de manioc a permis de comparer et de classer les différents cultivars vulgarisés en Côte d'Ivoire. Ces paramètres physiologiques ont été examinés avant et après l'élicitation à l'AS. Aussi, les cultivars yacé et mamawa classés dans la catégorie des résistants présentent-ils à la fois une quantité élevée de composés phénoliques totaux éthano-solubles et une forte activation de la PAL. Les autres cultivars qui ont eu l'un des facteurs (activité de la PAL, des PPO ou teneur en composés phénoliques totaux éthano-solubles) maintenu à un niveau élevé sont considérés comme tolérants. Sur cette base, aucun cultivar n'a été classé sensible.

Remerciements

Nous remercions le Prof. Kouamé Patrice, Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments, UFR-STA, Université d'Abobo-Adjamé pour sa contribution très appréciée.

Références citées

Ayesu-Offei E.N., & Antwi-Boasiako C., 1996. Production of microconidia by *Cercospora*

henningsii Allesch, cause of brown leaf spot of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and tree cassava (*Manihot glaziovii* Muell-Arg.). *Ann. Bot.* **78**: 653-657.

Bellotti A.C., & Van Schoonhoven A., 1978. Mite and insect pests of cassava. *Annu. Rev. Entomol.* **23**: 39-67.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Bucciarelli B., Jung H.G., Ostry M.E., Anderson N.A., & Vane C.P., 1998. Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Can. J. Bot.* **76** (7): 1282-1289.

Campos A.D., Ferreira A.G., Hampe M.M.V., Antunes F.I., Brancão N., Silveira E.P., da Silva J.B., & Osório V.A., 2003. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Braz. J. Plant Physiol.* **15** (3): 129-134.

Chaman M.F., Copaja S.V., & Argandona V.H., 2003. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and resistance of barley to aphid infestation. *J. Agric. Food. Chem.* **51** (8): 2227-2231.

Chen M., & Mc Clure J.W., 2000. Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase inhibited radish seedlings: implication for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. *Phytochemistry.* **53**: 365-370.

Colak A., Özen A., Dincer B., Güner S., & Ayaz A., 2005. Diphenolases from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruit at an early stage of maturation. *Food Chem.* **90**: 801-807.

Concellün A., Aðün M.C., & Chaves A.R., 2004. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chem.* **88**: 17-24.

Constabel C.P., Bergey D.R., & Ryan C.A., 1995. Systemic activates synthesis of wound inducible tomato leaf polyphenol oxidase via octadecanoid defence signalling pathway. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** : 407-411.

- Constabel C.P., Lynn Y., Patton J.J., & Christopher M.E., 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant. Physiol.* **124**: 285-295.
- Coulibaly N., & Séry Z., 1992. Situation de la culture et de la recherche sur le manioc en Côte d'Ivoire. IDESSA, 6 pp.
- De Meyer G., Capieau K., Audenart K., Buchela A., Métraux J.P., & Hofte M., 1996 Nanogram amounts of salicylic acid produced by the *Rhizobacterium pseudomonas aeruginosa* TNSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12** (5): 450-458.
- Dekok L., & Graham M., 1989. Levels of pigments, soluble proteins, amino acids and sulphhydryl compounds in foliar tissues of *Arabidopsis thaliana* during dark-induction and natural senescence. *Plant Physiol. Biochem.* **27** (2): 203-209.
- Dixon R.A., & Paiva N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* **7**: 1085-1097.
- FAO & PAM, 2004. Mission d'évaluation des récoltes et des disponibilités alimentaires en Côte d'Ivoire. Système Mondial d'Information et d'Alerte Rapide (SMIAR-FAO). <http://www. irad.fr/girw/french/smiar.htm>
- Gogbeu S.J., 2006. Etude comparative de l'influence de l'acide salicylique comme inoculum sur les réactions d'hypersensibilité et systémique de trois cultivars de *Manihot esculenta* Crantz : Yacé, Bonoua et Ecrevisse. Mémoire de DEA. Université d'Abobo-Adjamé, Abidjan, Côte d'Ivoire. 63 pp.
- Gümez-Vásquez R., Day R., Buschmann H., Randles S., Beeching J.R., & Cooper R., 2004. phenylpropanoids, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta* Crantz) suspension cells and leaves. *Ann. Bot.* **94**: 87-97.
- He C.Y., Hsiang T., & Wolyn D.J., 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.* **51**: 225-230.
- Housti F., Andary C., Gargadanne A., & Amssa M., 2002. Effects of wounding and salicylic acid on hydroxycinnamoylmalic acids in *Thunbergia alata*. *Plant. Physiol. Biochem.* **40**: 761-769.
- Kim K.K., Seo S.S., Kim J.E., Sung S.K., Kwan J.S., An G., & Kim W.T., 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development in the Fuji apple. *Plant Science.* **161**:1145-1152.
- Klanzynski O., Plesse B., Joubert J.M., Yvin J.C., Knopp M., Kloareg B., & Fritig B., 2000. Linear beta-1,3 glucans are elicitor of defense responses in tobacco. *Plant. Physiol.* **124** (3): 1027-1038.
- Kuwabara T., & Katoh Y., 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* **40**: 1029-1035.
- Mac Kinney G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**: 315-322.
- Majourhat K., Baaziz M., & Bendiab K., 2002. Diversité des peroxydases et des polyphénoloxydases chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Congrès de Biochimie. Casablanca, 9,10,11 mai 2002. Biochimie et Environnement. pp 86-90.
- Martinez C., Baccou J.C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.F., Jalloul A., Montillet J.L., Geiger J.P., Assigbetsé K., & Nicole M., 2000. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic response of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant. Physiol.* **122**: 757-766.
- Martinez C., Blanc F., Le Claire E., Besnard O., Nicole M., & Baccou J.C., 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat -denaturated cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant. Physiol.* **127**: 334-344.
- Mauch-Mani B., & Slusarenko A.J., 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell.* **8**: 203-212.
- Métraux J.P., Signer N., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W., & Inverard D., 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* **250**: 1004-1006.
- Métraux J.P., 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current of knowledge. *Eur. J. Plant. Pathol.* **107**: 13-14.

- Nawrath C., & Métraux J.P., 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*. **11**: 1393-1404.
- Nugroho L.H., Verberne M.C., & Verpoorte R., 2001. Salicylic acid produced by isochorismate synthase and isochorismate pyruvate lyase in various parts of constitutive salicylic acid producing tobacco plants. *Plant Sci*. **161**: 911-915.
- Nugroho L.H., Verberne M.C., & Verpoorte R., 2002. Activities of enzymes involved in phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem*. **40**: 755-760.
- Pereira L.F., Goodwin P.H., & Erickson L., 2003. Cloning of peroxidase gene from cassava with potential as molecular marker for resistance to bacterial blight. *Braz. Arch. Biol. Technol*. **46** (2): 149-154.
- Ravi V., Aked J., & Balagopalan C., 1996. Reviews on tropical root and tuber crops I .Storage methods and quality changes. Critical reviews. *Food Sci. Nut*. **36**: 661-709.
- Rösler J., Krekel F., Amrhein N., & Schmid J., 1997. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol*. **113** : 175-179.
- Schweiggert U., Schieber A., & Carle R., 2005. Inactivation of peroxidase, polyphenol oxidase and lipoxygenase in paprika and chilli powder after immediate thermal treatment of the plant material. *Innov. Food. Sci. Emerging Technol*. **6**:403-411.
- Shirasu K., Nakajima V.K., Dixon R.A., & Lamb C., 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*. **9** (2): 261-270.
- Sineiro J., Dominguez H., Nunez M. J., & Lema J. M., 1996. Ethanol extraction of polyphenols in an immersion extractor. Effect of pulsing flow. *J. Am. Oil Chem. Soc*. **73** (9) :1121-1125.
- Swain T., & Hillis W.E., 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenol constituents. *J. Sci. Food Agric*. **10**: 63-68.
- Traoré A., 2006. Etude comparée de la résistance de trois cultivars de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) : Tapioca, Bouaga, Mamawa. Mémoire de DEA. Université d'Abobo-Adjamé, Abidjan, Côte d'Ivoire. 67 pp.
- Van Lelyveld L.J., Gerrish C., & Dixon R.A., 1984. Enzyme activities and polyphenols related to mesocarp discoloration of avocado fruit. *Phytochemistry*. **23** (8): 1531-1534.
- Wititsuwannakul D., Chareonthiphakorn N., Pace M., & Wititsuwannakul R., 2002. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry*. **61**:115-121.