

## **Variation des Composés Phénoliques suite à l'Elicitation du Cotonnier suivie d'Inoculation à *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Vasinfectum**

***N'goran Kouakou Désiré,***

***Koné Tchoa,***

***Yao Koffi Bertin,***

***Adou Bini Yao Christophe,***

Nangui Abrogoua, UFR Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Abidjan, Côte d'Ivoire

***Konan Yao Kouakou François,***

Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie, Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétale, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

***Kouadio Oi Kouadio Samuel***

***Kouakou Tanoh Hilaire***

Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Abidjan, Côte d'Ivoire

Doi: 10.19044/esj.2019.v15n3p336 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2019.v15n3p336](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2019.v15n3p336)

---

### **Résumé**

La fusariose causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum est une maladie qui entraîne le plus de dommages dans la culture cotonnière. Cependant, l'utilisation de pesticides notamment les fongicides comme solution pour faire face à l'agent pathogène s'est avérée non seulement inefficace mais entraîne des problèmes de toxicité, de pollution de l'environnement, de santé et même de biodiversité. L'objectif de ce travail a été d'étudier la variabilité de la production de composés phénoliques impliqués dans le système de défense naturelle du cotonnier. Ainsi, l'application des éliciteurs MeJA et FOS11 (10%) sur les plants de cotonnier suivis d'inoculation à FOV a permis la synthèse *de novode* composés phénoliques en plus des composés préexistants. Par ailleurs, l'accumulation des composés phénoliques a été amplifiée suite à l'application de ces deux éliciteurs suivie de l'inoculation à FOV. Les plants de cotonnier ont été donc équipés de composés qui ont anticipés l'attaque de FOV. Toutefois, la FOS11 (10%) a induit la production d'un plus grand nombre de composés phénoliques que le MeJA. La FOS11 (10%) a donc été retenu comme meilleur éliciteur naturelle de la stimulation des défenses naturelles du cotonnier.

---

**Mots clés:** Éliciteur, fusariose, *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, composés phénoliques.

**Abréviations:** MeJA, méthyle jasmonate ; FOS, fraction oligosaccharidique ; FOV, *Fusarium oxysporum* f. sp vasinfectum

---

## **Variation of Phenolic Compounds following Cotton Elicitation followed by *Fusarium Oxysporum* Inoculation F. Sp. Vasinfectum**

*N'goran Kouakou Désiré,*

*Koné Tchoa,*

*Yao Koffi Bertin,*

*Adou Bini Yao Christophe,*

Nangui Abrogoua, UFR Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Abidjan, Côte d'Ivoire

*Konan Yao Kouakou François,*

Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie, Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétale, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

*Kouadio Oi Kouadio Samuel*

*Kouakou Tanoh Hilaire*

Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Abidjan, Côte d'Ivoire

---

### **Abstract**

*Fusarium* blight caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum is a disease that causes the most damage in cotton growing. However, the use of pesticides, especially fungicides as a solution to the pathogen, has proven to be not only ineffective but also leads to problems of toxicity, environmental pollution, health and even biodiversity. The objective of this work was to study the variability of the production of phenolic compounds involved in the natural defense system of the cotton plant. Thus, the application of the MeJA and OSF 11 elicitors (10%) on the cotton plants followed by inoculation with FOV allowed the de novo synthesis of phenolic compounds in addition to the preexisting compounds. Moreover, the accumulation of phenolic compounds was amplified following the application of these two elicitors followed by inoculation with FOV. The cotton plants were therefore equipped with

compounds that anticipated the FOV attack. However, OSF 11 (10%) induced the production of more phenolic compounds than MeJA. OSF 11 (10%) was therefore chosen as the best natural elicitor of the stimulation of the natural defenses of cotton.

---

**Keywords:** Elicitor, fusarium, *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, phenolic compounds

**Abbreviations:** MeJA, methyl jasmonate; OSF, oligosaccharide fraction; FOV, *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum

## Introduction

Le cotonnier joue un rôle important dans l'économie et dans la sécurité alimentaire des populations africaines. Il est à la fois une plante industrielle et une plante vivrière. Le coton représente 50% du marché des fibres textile (Konan *et al.*, 2014). Cependant, le cotonnier est menacé par de nombreux ravageurs, des parasites et des maladies diverses qui contribuent à la réduction de la production, la qualité des fibres et des graines (Vaissayre, 1994). La fusariose est l'une des principales causes de perte de production dans la culture cotonnière (Konan *et al.*, 2014). Pour contrôler cette maladie, les producteurs ont recours à des fortes quantités de pesticides. Ainsi, la filière coton est l'une des premières utilisatrices de pesticides au monde. Malheureusement, les pesticides, notamment les fongicides sont de plus en plus indexés pour des questions de toxicité, de pollution de l'environnement, de santé et même de biodiversité (Toé *et al.*, 2013). En effet, de nombreux cas d'intoxication aiguë aux pesticides, parfois mortels, ont déjà été décelés en culture cotonnière (Toé *et al.*, 2004). Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de rechercher des alternatives plus efficaces pour le développement d'une agriculture durable. D'après Rees et Harborne (1985), la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Les éliciteurs sont généralement des molécules sécrétées par les microorganismes, des dérivés de la paroi cellulaire du champignon, de la bactérie et/ou de la plante hôte (Korsangruang *et al.*, 2010). D'autres molécules, des oligosaccharides libérés par le pathogène (éliciteurs exogènes) ou les cellules de la plante (éliciteurs endogènes) sont aussi capables d'initier une réaction de défense chez la plante hôte (Li *et al.*, 2003). Des auteurs comme Hahn (1996) et Belhadj *et al.* (2006) ont montré dans le cas de l'interaction plante/champignon, que les oligosaccharides issus de la dégradation de la paroi fongique activent les systèmes de défense chez des plantes supérieures comme le pois, le soja et le persil en boostant la production de composés phénoliques. L'objectif de ce travail est de stimuler les systèmes de défense chez le cotonnier en vue d'augmenter la résistance naturelle à *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum (FOV), responsable de la

fusariose. De façon spécifique, il s'est agi d'étudier la variation des composés phénoliques dans les feuilles des plants de cotonnier traitées aux éliciteurs puis inoculées à FOV.

## **Matériel et méthodes**

### **Matériel végétal**

Le matériel végétal est constitué de graines de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar Y331B, fournies par le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de Côte d'Ivoire. Ce cultivar présente un niveau de sensibilité très élevé à *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, agent causal de la fusariose.

### **Matériel fongique**

Le matériel fongique est le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum (FOV). Il a été fourni par le Laboratoire de Phytopathologie de l'Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny (INPHB) de Yamoussoukro (Côte d'Ivoire). Deux souches de FOV de virulence différente ont été utilisées (Abo *et al.*, 2005) : la souche COT 11, moins virulente et la souche COT 6, très virulente.

## **Production *in vivo* de plants de cotonnier**

### **Délintage et sélection de graines**

Dans une petite vase, une petite quantité d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré (96%) a été ajoutée aux graines avec fibres, fournies par le CNRA. Ces graines ont été aussitôt malaxées à l'aide d'une spatule pour être débarrassées de leurs fibres. Ces graines ainsi délintées ont été mises dans un béccher rempli d'eau de robinet pendant 1 min. Celles qui ont été totalement immergées ont été dites viables. Ces graines viables ont été sélectionnées, séchées à l'aire libre puis retenues pour la suite des expérimentations.

### **Dispositif expérimental**

Le dispositif est constitué de blocs distants de 5 m. Chaque bloc contient une à six parcelles élémentaires selon l'expérimentation. Ces parcelles ont été distantes les unes des autres de 2 m. Chaque parcelle élémentaire contient 1 billon de 6 m de long et 60 cm de large. Sur chaque billon, les poquets sont séparés les uns des autres de 50 cm.

### **Semis des graines et obtention de vivoplants de cotonnier**

Des plants de cotonnier âgés de deux mois ont été utilisés. Ces graines ont été imbibées dans 30 mL d'eau distillée stérilisée dans un tube à essai. Deux graines par tube ont été placées à l'obscurité pour faciliter la germination. Après 48 h d'imbibition, les graines dont la radicule de

l'embryon sort ont été semées sur les billons préalablement préparés à raison de trois graines par poquet à 5 cm de profondeur. À la levée, les plants ont été démarrés puis repiqués sur les billons. Chaque billon contient une rangée de 10 plants de cotonniers. Les plants ont été arrosés avec 100 mL d'eau de robinet tous les deux jours pendant 28 jours. Les plants âgés de deux mois ont été utilisés pour les différents tests.

### **Préparation de la fraction oligosaccharidique**

La souche COT 11 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectorum* (FOV), fournie dans des tubes à essai, a été repiquée sous hotte à flux laminaire dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) selon la méthode de Vakili (1968). Les boîtes de Pétri ainsiensemencées ont été incubées pendant 14 jours dans une salle de culture à une température de  $25 \pm 2$  °C sous une photopériode de 12 h. Après culture de FOV sur milieu PDA, les spores ont été mises en suspension dans de l'eau distillée stérilisée contenant du tween 20. Des aliquotes de cette suspension de spores ont été ajoutées au milieu liquide Czapek-Dox modifié, préalablement autoclavé à 121 °C pendant 30 min sous la pression de 1 bar. La concentration finale a été d'environ  $2,5 \cdot 10^4$  spores/mL. Les cultures ont été placées à 21 °C, à l'obscurité et sans agitation, pendant 28 jours (Fanizza et al., 1995). Les suspensions de spores ont été agitées puis filtrées sur papier filtre. Le filtrat obtenu a constitué la fraction oligosaccharidique (FOS) exocellulaire. Cette fraction a été stérilisée à l'autoclave à 121 °C pendant 30 min. Après stérilisation, elle a constitué la fraction oligosaccharidique de FOV.

### **Traitement des plants de cotonnier par la fraction oligosaccharidique**

Le traitement des plants de cotonnier par la fraction oligosaccharidique a été fait selon la méthode de N'goran *et al.* (2014). Ainsi, des plants de cotonnier âgés de deux mois ont été traités avec 10 mL de la fraction oligosaccharidique à 10% additionnée de 0,1 mL de triton X-100 (0,1%). Les plants témoins de cotonnier ont été traités avec le milieu de culture (Czapek-Dox modifié) contenant du Triton X-100 (0,1%). Après 72 h de contact avec la fraction oligosaccharidique, trois feuilles du troisième étage foliaire ont été prélevées, puis lyophilisées pour le dosage des phénols totaux.

### **Traitement des plants de cotonnier par le méthyle jasmonate**

Des plants de cotonniers âgés de deux mois ont été traités avec 10 mL de MeJA (5 mM), préalablement dissout dans 1% d'éthanol, complété avec une solution aqueuse de Triton X-100 (0,1%) (Konan *et al.*, 2014). Les plants témoins de cotonnier ont été pulvérisés avec une solution d'éthanol (1%) additionnée de Triton X-100 (0,1%). 72 h après le traitement, trois feuilles du

troisième étage foliaire ont été prélevées puis lyophilisées pour le dosage des phénols totaux.

### **Préparation de l'inoculum et inoculation des plants**

L'inoculation fongique a été réalisée selon la méthode décrite par Bouhot et Rouxel (1970) modifiée et adaptée à notre matériel végétal. Au terme de 14 jours de croissance sur milieu PDA, la surface de la culture de la souche COT 6 de FOV a été raclée pour préparer une suspension cellulaire à  $2,5 \cdot 10^4$  spores/mL. Cette concentration de spores a été utilisée comme inoculum. Ainsi, trois jours après le traitement des plants par le MeJA (5 mM) et la FOS 11 (10%), 2 mL de suspension de spores de la souche COT 6 de FOV ont été directement injectés dans la partie qui entoure les racines des plants traités et celles des témoins. Soixante-douze heures (72 h) après inoculation, trois feuilles du troisième étage foliaire ont été prélevées, puis lyophilisées pour le dosage des phénols totaux.

### **Analyse qualitative des phénols totaux par chromatographie liquide haute performance (CLHP)**

Les lyophilisats des feuilles des plants inoculés à la souche COT 6 et/ou traités aux éliciteurs (MeJA 5 mM et FOS 11 (10%)) ont été utilisés pour les différents dosages HPLC. Des plants non traités et inoculés ont servi de témoin.

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode de Kouakou *et al.* (2008 ; 2009). Ainsi, un échantillon de 500 mg de lyophilisats de feuilles de chaque traitement a été plongé dans 10 mL de méthanol pur sous agitation pendant une nuit à 4 °C. 2 mL de suspension de spores de la souche COT 6 de FOV ont été directement injectés dans la partie qui entoure la racine après une sonication de 5 min dans l'ultrason (FAME, Emmi-12HC), le mélange a été centrifugé à 10 000 tours/min pendant 10 min. Ensuite, 4 mL du surnageant ont été évaporés à l'aide d'un concentrateur sous vide (Speed Vac). Le résidu sec obtenu a été dissout dans 1 mL de méthanol 30% (v/v) puis placé sur une mini-colonne de silice greffée C18 (Sep pack®; Macherey-Nagel, Düren, German) dans le système Supelco Visiprep™. L'échantillon a été ensuite déposé sur la colonne de silice puis un lavage avec 2 mL d'eau distillée a été effectué. Les composés phénoliques ont été élués avec 4 mL de méthanol 90% (v/v). L'éluât obtenu a été évaporé au Speed Vac puis repris dans 1 mL de méthanol 50% (v/v). Le surnageant obtenu a constitué l'extrait phénolique à analyser.

### **Conditions d'analyse**

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été réalisée selon la méthode de Kouakou (2009) modifiée et adaptée à notre matériel

végétal. Elle a été utilisée pour la séparation et la quantification des différents composés phénoliques extraits des feuilles de cotonnier traitées avec la fraction fongique oligosaccharidique et le méthyle jasmonate. L'analyse des échantillons a été réalisée sur deux chaînes HPLC couplées; la première chaîne est de type Agilent série LC 1100, équipée d'un dégazeur, d'un injecteur automatique d'une pompe binaire à haute pression et d'un détecteur UV-visible. La deuxième chaîne est de type Agilent série LC 1200 et comprend une pompe quaternaire qui est reliée à un détecteur à barrette d'iode. Tout le système HPLC a été enfin couplé à un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (Bruker Avance III) dont la fréquence de fonctionnement est de 600 MHz pour un proton. La colonne utilisée avec les deux chaînes a été une C18 phase inverse (Eclipse XDB-C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Agilent). L'eau distillée filtrée sur membrane millipore (0,45 µm) a été acidifiée par l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% pour constituer le solvant A puis l'acétonitrile (grade HPLC) a été acidifié par le TFA pour constituer le solvant B. L'élution a été réalisée selon un gradient binaire comme l'indique le **tableau I**.

La détection des chromatogrammes a été faite à 280 nm, avec un débit de 0,8 mL/min. Les composés phénoliques utilisés dans cette étude ont été sélectionnés en fonction de leur disponibilité dans le commerce et leur présence éventuelle chez le cotonnier (Kouakou, 2003 ; Kouakou *et al.*, 2009 ; Cruz-Crus *et al.*, 2010 ; Hildago *et al.*, 2016). Ces composés phénoliques sont présentés comme suit :

- acides chlorogéniques : acide chlorogénique, acide 3-*p*-coumaroylquinique ;
- acides hydroxybenzoïques : acide ellagique, acide gallique, acide gentisique, acide syringique, acide vératricque;
- acides hydroxycinnamiques : acide caféique, acide cinnamique, acide férulique, acide *p*-coumarique; cafféoyl-D-glucose
- flavonoïdes : catéchine, épicatechine, génistéine, gossypéine, kaempférol, naringénine, quercétine, quercitrine, rutine, astragaline;
- stilbènes : astringine, picéatannol, ptérostilbène, resvératrol, picéide.

**Tableau I.** Gradient d'élution des composés phénoliques

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0-20	90	10
20-40	70	30
40-41	50	50
41-50	0	100
50-51	90	20
51-60	90	10

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance ; solvant A (0,1% TFA dans de l'eau distillée filtrée) ; solvant B (0,1% TFA dans de l'acétonitrile) ; TFA = acide trifluoroacétique.

## **Séparation et dosage des composés phénoliques par HPLC**

La séparation et le dosage des composés phénoliques ont été réalisés en HPLC sous une pression allant de 170 à 400 bars. L'appareil a été piloté par micro-ordinateur avec un système Workstation. Une aliquote de 10  $\mu$ L de l'extrait hydrométhanolique a été injectée dans le chromatographe et la détection des chromatogrammes a été effectuée à la longueur d'onde de 280 nm, avec un débit de 1 mL/min. Chaque analyse a été répétée trois fois.

Une bibliothèque de composés phénoliques de référence a été déjà réalisée avec des composés purs et identifiés par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette banque de données contient les temps de rétention et les spectres RMN des différents composés phénoliques purs. Les chromatogrammes des extraits phénoliques des feuilles de cotonnier ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention et leur spectre RMN à ceux des composés purs stockés dans le spectromètre de résonance magnétique nucléaire qui est couplé au système HPLC.

Les teneurs de chaque composé phénolique, exprimées en mg/g MS, ont été calculées à l'aide des courbes d'étalonnage réalisées avec des composés phénoliques purs isolés à partir des échantillons et/ou ceux obtenus dans le commerce.

## **Analyses statistiques**

La teneur en composés phénoliques des feuilles et le pool phénolique ont été déterminés afin d'apprécier la variabilité dans la synthèse des composés. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel STATISTICA version 7.1. Une analyse de variance (ANOVA) à un critère de classifications a été réalisée sur tous les traitements appliqués aux plants. Lorsque cette analyse montre une différence entre les moyennes, le test de Newman-Keuls a été effectué dans le but de déterminer les différences significatives entre les traitements au seuil de 5%.

## **Résultats**

### **Identification par HPLC des temps de rétention des composés standards**

L'analyse des composés standards par HPLC a permis de comparer et d'identifier avec précision les composés phénoliques présents dans les feuilles de cotonnier traitées. A cet effet, 23 standards phénoliques ont été chromatographiés dans les mêmes conditions que les échantillons. Ceci a permis de déterminer les différents temps de rétention des témoins phénoliques (**Tableau II**). Ainsi, par comparaison du temps de rétention de chaque chromatogramme à ceux des standards, les différents composés phénoliques ont pu être identifiés. Ceci a été possible grâce à une bibliothèque de référence réalisée avec des composés phénoliques disponibles dans le



commerce ou purifiés. Celle-ci contient le temps de rétention et les spectres RMN des standards phénoliques.

**TableauII.** Temps de rétention en HPLC des standards phénoliques à 280 nm

Composés phénoliques	Temps de rétention (min)
Acide gallique	04,305
Epicatéchine	07,850
Gossypine	08,475
Astragaline	9,692
Kaempférol	10,489
Quercitrine	10,891
Genistéine	11,544
Catéchine	12,238
Acide vanillique	13,364
Acide gentisique	13,920
Acide syringique	14,985
Acide férulique	15,700
Acide ellagique	16,205
Acide <i>p</i> -coumarique	16,983
Rutine	18,160
Acide caféique	18,881
Acide vératrique	19,646
Picéatannol	22,400
Resvératrol	25,388
Acide cinnamique	26,467
Ptérositilbène	27,970
Quercétine	28,404
Naringénine	28,993

HPLC, Chromatographie Liquide Haute Performance ; min, minute.

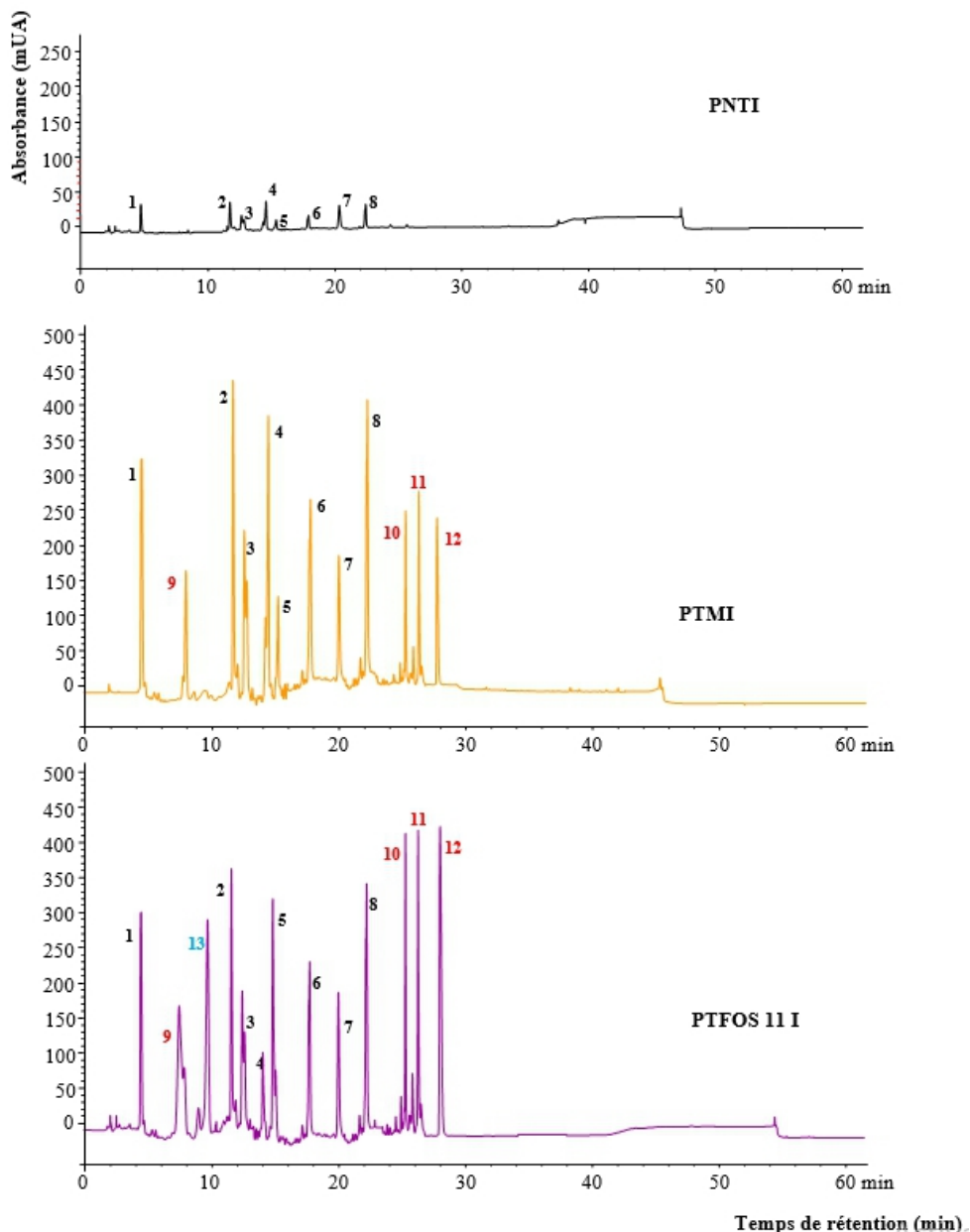
### **Composés phénoliques identifiés dans les feuilles de cotonnier traités par le MeJA et la FOS 11 (10%) puis inoculés par FOV**

L'analyse de la **figure 1** montre que le profil chromatographique des feuilles des plants traités par le Méthyle jasmonate et inoculé (PTMI), de celles des plants traités par le filtrat oligosaccharidique à (10%) et inoculé (PTFOS 11 I) et de celles des plants non traités (témoin) et inoculé (PNTI), présente des similitudes et des différences. En effet, les PNTI ont synthétisé huit composés phénoliques de très faibles amplitudes qui sont : les composés 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8. Le traitement PTMI a induit la synthèse de 12 composés phénoliques. Le traitement PTFOS 11 I a induit la synthèse de 13 composés phénoliques. Les résultats ont révélé qu'en plus des huit composés présents chez les PNTI, les composés 9, 10, 11 et 12 sont synthétisés de *novo* à la fois par les feuilles PTMI et PTFOS 11 I à de très fortes amplitudes. Il y'a eu l'apparition de *novo* du composé 13 chez les PTFOS 11 I par rapport aux PTMI. Les résultats ont également montré que tous les composés identifiés après traitement avec les

éliciteurs présentent des pics phénoliques de grandes amplitudes par rapport au témoin (PNTI). Les composés détectés ont tous été identifiés comme étant des composés phénoliques grâce à leur temps de rétention et leur profil RMN. Ainsi, les composés ont été identifiés comme étant 1. Acide gallique (4,301 min) ; 2. Cafféoyol-D-glucose (11,769 min) ; 3. Catéchine (12,234 min) ; 4. Acide 3-*p*-coumaroylquinique (14,543 min) ; 5. Acide férulique (15,697 min) ; 6. Gossypétine (17,998 min) ; 7. Acide chlorogénique (20,076 min) ; 8. Picéatannol (22,395 min) ; 9. Épicatéchine (7,848 min) ; 10. Resvératrol (25,384 min) ; 11. Picéide (26,307 min) ; 12. Ptérosilbène (27,965 min) ; 13. Astragaline (9,692 min).

### **Comparaison des teneurs moyennes des composés phénoliques identifiés dans les feuilles de plants de cotonnier traités et inoculés**

La teneur de tous les composés phénoliques identifiés dans les feuilles de cotonnier augmente dans les PTMI et dans les PFOS 11 I (**Tableau III**). Les teneurs en acide gallique, cafféoyol-D-glucose, catéchine, acide 3-*p*-coumaroylquinique, acide férulique, gossypétine, acide chlorogénique et picéatannol, faibles dans les feuilles des PTNI, ont considérablement augmenté dans les PTMI et dans les PFOS 11 I. L'épicatéchine, le resvératrol, le picéide et le ptérostilbène qui ne sont pas présents dans le PNTI apparaissent à la fois dans PTMI et dans les PFOS 11 I. Par ailleurs, l'astragaline est synthétisé uniquement dans les PFOS 11 I. L'acide gallique, le cafféoyol-D-glucose, le catéchine et l'épicatéchine ont des teneurs significativement identiques chez les PTMI que chez les PTFOS 11 I. L'acide 3-*p*-coumaroylquinique, la gossypétine et le picéatannol ont des teneurs qui sont significativement plus élevées chez les PTMI que chez les PTFOS 11 I. Cependant, l'acide férulique, l'acide chlorogénique, le resvératrol, le picéide et le ptérostilbène ont des teneurs qui sont significativement plus élevées chez les PTFOS 11 I que chez les PTMI. Par ailleurs, l'analyse du pool phénolique total des différents traitements a montré que les PTMI ont une teneur (349,72 mg/g de MS) 22 fois supérieure par rapport au PNTI témoin (15,88 mg/g de MS). Les PTFOS 11 I ont une teneur (460,38 mg/g de MS) 28 fois supérieure par rapport au PNTI témoin.



**Figure 1.** Chromatogrammes des composés phénoliques extraits des feuilles de cotonnier traités par les éliciteurs puis infectés par FOV

1. Acide gallique (4,301 min) ; 2. Cafféoyol-D-glucose (11,769 min) ; 3. Catéchine (12,234 min) ; 4. Acide 3-*p*-coumaroylquinique (14,543 min) ; 5. Acide férulique (15,697 min) ; 6. Gossypétine (17,998 min) ; 7. Acide chlorogénique (20,076 min) ; 8. Picéatannol (22,395 min) ; 9. Épicatéchine (7,848 min) ; 10. Resvératrol(25,384 min) ; 11. Picéide (26,307 min) ; 12. Ptérosilbène (27,965 min) ; 13. Astragaline (9,692 min) ; PTMI: plant traité par le Méthyle jasmonate et inoculé; PTFOS 11 (10%) I: plant traité par le filtrat oligosaccharidique à (10%) et inoculé; PNTI: plant non traité (témoin) et inoculé; FOV: *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum.

**Tableau III.** Teneurs des composés phénoliques identifiés dans les feuilles de cotonnier traités avec le MeJA et FOS11 (10%) puis inoculés à FOV

Composés phénoliques	Teneur (mg/g de MS)		
	PNTI	PTMI	PTFOS 11 I
1. Acide gallique	02,57 ± 0,02 <sup>c</sup>	18,10 ± 0,50 <sup>g</sup>	16,50 ± 0,40 <sup>g</sup>
2. Cafféoyl-D-glucose	02,05 ± 0,01 <sup>c</sup>	12,97 ± 0,70 <sup>i</sup>	13,16 ± 0,20 <sup>i</sup>
3. Catéchine	01,11 ± 0,01 <sup>d</sup>	15,23 ± 0,30 <sup>h</sup>	14,30 ± 0,50 <sup>ih</sup>
4. Acide 3- <i>p</i> -coumaroylquinique	02,83 ± 0,03 <sup>c</sup>	77,15 ± 1,10 <sup>e</sup>	40,22 ± 0,70 <sup>k</sup>
5. Acide férulique	0,61 ± 0,04 <sup>e</sup>	18,98 ± 0,50 <sup>g</sup>	54,19 ± 0,30 <sup>m</sup>
6. Gossypétine	04,35 ± 0,06 <sup>b</sup>	73,60 ± 0,90 <sup>e</sup>	68,21 ± 0,80 <sup>n</sup>
7. Acide chlorogénique	0,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	13,81 ± 0,40 <sup>i</sup>	55,80 ± 0,90 <sup>m</sup>
8. Picéatannol	01,40 ± 0,01 <sup>d</sup>	59,20 ± 0,60 <sup>f</sup>	51,33 ± 0,70 <sup>m</sup>
9. Épicatéchine	-	10,70 ± 0,20 <sup>j</sup>	10,11 ± 0,20 <sup>j</sup>
10. Resvératrol	-	17,08 ± 0,30 <sup>g</sup>	31,29 ± 0,50 <sup>p</sup>
11. Picéide	-	12,15 ± 0,10 <sup>j</sup>	40,13 ± 0,30 <sup>k</sup>
12. Ptérosilbène	-	20,75 ± 0,70 <sup>g</sup>	46,30 ± 0,70 <sup>p</sup>
13. Astragaline	-	-	18,84 ± 0,50 <sup>g</sup>
<b>Pool phénolique</b>	<b>15,88</b>	<b>349,72</b>	<b>460,38</b>

Dans une colonne et sur une même ligne, les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Newman Keuls à 5%) ; les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions.

PTMI: plant traité par le Méthyle jasmonate et inoculé; PTFOS (10%) I: plant traité par le filtrat oligosaccharidique à 10% et inoculé ; PNTI: plant non traité inoculé(témoin) ; FOS, fraction oligosaccharidique ; FOV: *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum ; (-), absence du composé ; ± S, erreur standard ;

## Discussion

Le cotonnier comme tout autre plante a des capacités remarquables pour produire un grand nombre de composés phénoliques (Lambert, 2011 ; Konan *et al.*, 2014). Des travaux ont rapporté une corrélation entre l'activation du système de défense de la plante et la production de composés phénoliques. Ceci a été montré lors d'un stress biotique comme l'attaque d'un pathogène (Belhadj *et al.*, 2006 ; Below, 2012 ; Konan, 2015).

Dans le but de comprendre les mécanismes de défense mis en place par le cotonnier au cours de l'infection à FOV, une étude biochimique a été conduite. Ainsi, l'analyse HPLC a permis d'isoler 13 composés dans les feuilles des plants de cotonnier. Ces composés phénoliques sont repartis en cinq grands groupes chimiques qui sont : les acides chlorogéniques (acide chlorogénique et acide 3-*p*-coumaroylquinique), les acides hydroxybenzoïques (acide gallique), les acides hydroxy-cinnamiques (acide férulique et cafféoyl-D-glucose), les flavonoïdes (catéchine, gossypétine, épicatechine et astragaline) et les stilbènoïdes (picéatannol, resvératrol, picéide et

ptérosilbène). Cette pluralité de biosynthèse de composés phénoliques a été déjà signalée par Konan *et al.* (2014) chez le cotonnier stimulé au MeJA et N'goran *et al.* (2016) chez le cotonnier élicité avec la fraction oligosaccharidique de la souche 14 de FOV.

Les profils des composés présents dans les feuilles témoins (PNTI) ont permis de révéler la présence de huit composés phénoliques à l'intérieur des plants de cotonnier. Ces composés sont potentiellement impliqués dans la défense naturelle des plantes de cotonnier. Ils sont présents dans la tige, la racine et dans les feuilles des plants de cotonnier. Cette analyse de l'HPLC a permis d'observer une baisse drastique des pics phénoliques dans les PNTI. Ce qui pourrait s'expliquer par le fait que sans application d'éliciteur et inoculation, les composés phénoliques constitutifs n'ont pu être synthétisés. La fusariose causée par FOV étant une maladie vasculaire, le champignon est beaucoup plus présent au niveau de la tige. Il bouche les vaisseaux conducteurs de la plante, empêchant ainsi la sève brute d'aller aux feuilles pour la réalisation de la photosynthèse et la sève élaborée (les sucres, assimilât de la photosynthèse) de migrer vers les racines pour nourrir la plante (Delattre, 1973 ; Assigbetse, 1993). Les plants de cotonnier sensibles sont exposés à l'attaque du pathogène car leur système de défense n'ayant pas été mis en état de veille par une élicitation.

Cependant, l'analyse HPLC a permis de constater que pour les plants de cotonnier traités par le Méthyle jasmonate (MeJA) 5 mM et la fraction oligosaccharidique (FOS 11 (10%)) puis inoculés à FOV, la qualité et la quantité de composés phénoliques varient en fonction du type de traitement. Ainsi, l'analyse HPLC des PTMI a révélé la présence de 12 composés. Celle des feuilles traitées à la FOS 11 (10%) a révélé 13 composés phénoliques. Ces résultats indiquent que l'équipement phénolique a augmenté suite au traitement MeJA et à FOS 11(10%). Il y a donc eu en plus des 8 composés observés chez les PNTI, la synthèse *de novo* de composés phénoliques (l'épicatchine, le resvératrol, la picéide, la ptérosilbène en commun aux deux éliciteurs et l'astragaline en plus pour la FOS 11 (10%)). Une synthèse *de novo* de composés a déjà été rapporté par N'goran *et al.* (2014), après stimulation du cotonnier par FOS 14 et par Konan *et al.* (2014), après stimulation du cotonnier au MeJA. Toutefois, la quantité (8) des composés observés chez les PNTI a fortement augmenté suite à l'application du MeJA ou de la FOS 11 (10%) suivie d'inoculation. Ce qui laisse supposer un rôle important de ces molécules élicitrices dans l'accumulation des composés phénoliques chez le cotonnier. L'application d'éliciteur ayant mis en état de veille le système de défense de la plante, elle agit plus rapidement suite à une attaque et induit l'accumulation des composés phénoliques. Les travaux de N'cho (2017), de N'goran (2015) et de Konan (2015) ont montré de façon similaire qu'après application d'éliciteurs et inoculation d'un agent pathogène, la teneur des

composés constitutifs augmente et il apparait des composés induits dans les plantes de cotonnier ou de bananier.

Par ailleurs, hormis l'acide férulique et l'acide chlorogénique, le resvératrol, la picéide, le ptérosilbène et l'astragaline ont eu des teneurs plus élevées après application à la FOS 11 (10%) que lors d'un traitement au MeJA. Ce qui signifierait que la FOS 11 (10%) induit plus la production de composés phénoliques stilbéniques que le MeJA. D'après Hain *et al.* (1993) et Jeandet *et al.*(2002), la synthèse de phytoalexines stilbéniques est considérée comme une réaction cruciale liée aux mécanismes de défense globale de la plante. La synthèse de phytoalexines stilbéniques contribue donc fortement à l'établissement des mécanismes de résistance du cotonnier à FOV. Par ailleurs, l'astragaline est synthétisé uniquement dans les feuilles traitées à la FOS11 (10%). Ce qui expliquerait le pool phénolique plus important (460,38 mg/g de MS) observé chez PTFOS11 (10%) par rapport à celui observé chez les PTMI (349,72 mg/g de MS). En étudiant les résultats après quantification des composés phénoliques, il ressort que les acides chlorogéniques, les flavonoïdes et les stilbènoïdes constituaient à eux seuls plus de 80% du pool phénolique total. Ces groupes phénoliques sont définis comme des polyphénols ayant des activités antifongiques et, selon plusieurs auteurs, seraient impliqués fortement dans la défense des plantes (Mugnai *et al.* 1999 ; Amborabé *et al.* 2004 ; Belhadj *et al.*, 2006 ; Leiss *et al.*, 2009 ; Ahuja *et al.*, 2012). Dans le même ordre, Shimoda *et al.* (2013) ont rapporté que les composés phénoliques de nature stilbénique sont impliqués dans la résistance des plantes à divers agents pathogènes. Selon Faurie *et al.*(2009), ils inhibent la germination des conidies et la croissance mycélienne de plusieurs champignons.

## Conclusion

L'application des éliciteurs MeJA et FOS11 (10%) sur les plants de cotonnier suivie d'inoculation à FOV a permis la synthèse *de novode* composé phénoliques en plus des composés préexistants. Par ailleurs, l'accumulation des composés phénoliques a été amplifiée suite à l'application des deux éliciteurs suivie de l'inoculation à FOV. Les plants de cotonnier ont été donc équipés de composés qui ont anticipé l'attaque de FOV. Cependant, la FOS 11 (10%) s'est révélée plus efficace que le MeJA.

## References:

1. Abo K., Klein K.K., Edel-Hermann V., Gautheron N., Traoré D. & Steinberg C. (2005). High genetic diversity among strains of *Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfectedum from cotton in Ivory Coast. *Phytopathology*, 95(12): 1391-1396.

2. Ahuja I., Kissen R. & Bones A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Science*, 17(2): 73-90.
3. Amorabé E., Aziz A., Trotel-aziz P., Quantinet D., Dhucq L. & Guy V. (2004). Stimulation des défenses naturelles de la vigne. Essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*. *Phytoma*, 571:26-29.
4. Assigbetse K.B. (1993). Pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum : agent de la fusariose du cotonnier. Thèse de doctorat. Université de Montpellier II, Montpellier ; France 158p.
5. Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J. & Corio-costet M.F. (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(24): 9119-9125.
6. Bellow S. (2012). Etude des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au mildiou. Thèse de l'Université de Paris sud, France 134p.
7. Bouhot D. & Rouxel F. (1970). Deux techniques de détermination du pouvoir pathogène des *Fusarium oxysporum*. *Annales de Phytopathologie*, 2: 591-594.
8. Cruz-Cruz C.A., Ramírez-Tec G., García-Sosa K., Escalante-Erosa F., Hill L., Osbourn A.E. & Peña-Rodríguez L.M. (2010). Phytoanticipins from banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine) plants, with antifungal activity against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, the causal agent of black Sigatoka. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 459-463.
9. Delattre R. (1973). Parasites et maladies en culture cotonnière. IRCT, Paris, 146 p.
10. Fanizza G., Bissignano V., Pollastro S., Miazzi M. & Faretra F. (1995). Effects of polysaccharides from *Botryotinia fulkeliana* (*Botrytis cinerea*.) on in Vitro culture of table and wine grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 34: 41-44.
11. FAurie B., Cluzert S., Corio-costet M.F. & Merillon J.M. (2009). Methyl jasmonate/ethephon cotreatment synergistically induce stilbene production in *Vitis vinifera* L. cell suspensions but fails to trigger resistance to *Erysiphe necator*. *Journal Interface Science*, 43(2): 99-110.
12. Hahn M.G. (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual review of phytopathology*, 34: 387-412.
13. Hain R., Reif H.J., Krause E., Langerbartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmeizer E., Schreier P.H., Stocker R.H. & Stenzel K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361: 153-156.

14. Hidalgo W., Chandran NJ., Menezes RC., Ojalvaro F. & Schneider B. (2016). Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* More letandarede activated by metabolic conversion. *Plant Cell and Environment*, 39: 492-513.
15. Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. & Adrian M. (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50(10): 2731-2741.
16. Konan Y K.F., Kouassi K.M., Kouakou K.L., Koffi E., Sekou D., Kone M. & Kouakou T.H. (2014). Effect of methyl jasmonate on phytoalexins biosynthesis and induced disease resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. vasinfectum in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *International Journal of Agronomy*, volume 2014, 11p
17. Konan Y.K.F. (2015). Stimulation des défenses naturelles du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L., Malvaceae) par le méthyle jasmonate et l'éthéphon : Effet sur la biosynthèse des composés phénoliques et sur la résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, agent causal de la fusariose. Thèse de doctorat. Université Nangui Abrogoua, Abidjan, Côte d'Ivoire 207p.
18. Korsangruang S., Soonthornchareonnon N., Chintapakorn Y., Saralamp P. & Prathanturug S. (2010). Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var *candolle* and *P. candollei* var *mirifica*. cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3: 333-342.
19. Kouakou T.H. (2003). Contribution à l'étude de l'embryogénèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : Evolution de quelques paramètres biochimiques au cours de la callogénèse et de cultures de suspensions cellulaires. Thèse de doctorat 3<sup>e</sup> cycle, Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody, Abidjan Côte d'Ivoire 137p.
20. Kouakou T.H., Koné M., Koné D., Kouadio Y.J., Amani N.G., Waffo T.P., Decendit A. & Mérillon J.M. (2008). Trans-resveratrol as phenolic indicator of somatic embryogenesis induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cell suspensions. *African Journal of Biochemistry Resources*, 2: 15-23.
21. Kouakou T.H. (2009). Embryogénèse somatique chez le cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) : variation des composés phénoliques au cours de la callogénèse et de la culture des suspensions cellulaires. Thèse de doctorat d'état, Laboratoire de biologie et Amélioration des productions végétales, UFR SN, Université Abobo-Adjamé Abidjan Côte d'Ivoire 137p.



22. Kouakou T.H., Kouadio Y.J., Waffo T.P., Valls J., Badoc A., Decendit A. & Mérillon J.M. (2009). Polyphenol levels in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) callus cultures. *Acta Botanica Gallica*, 152: 223-231.
23. Lambert C. (2011). Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne malade contre les maladies du bois. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux 2, France 179p.
24. Leiss K.A., Maltese F., Choi Y.H., Verpoorte R. & Klinkhamer P.G.L. (2009). Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in *Chrysanthemum* L. *Plant Physiology*, 150: 1567-1575.
25. Li M.Y., Lan W.Z., Chen C. & Yu L.J. (2003). The effects of Oligosaccharides and spores from *Aspergillus niger* on the defense responses of *Taxus chinensis* leaves *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, 151: 540-545.
26. Mugnai L., Graniti A. & Surico G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease*, 83(5): 404-418.
27. N'cho X.E. (2017). Élicitation du bananier par le méthyle jasmonate et l'acide salicylique : impact sur les composés phénoliques, efficacité sur *Mycosphaerella fijiensis* Morelet responsable de la maladie des raies noires. Thèse de doctorat de l'Université Nangui Abrogoua, Abidjan-Côte d'Ivoire, 198p
28. N'goran A.R. (2015). Stimulation des défenses naturelles du cotonnier [*Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae)] par des éliciteurs oligosaccharidiques extraits des suspensions de *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, intérêt phytopathologique des composés phénoliques. Thèse de doctorat de l'Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan-Côte d'Ivoire, 169p.
29. N'goran A.R.B., Yapo S.E., Kouassi K.M., Koffi E., Konan K.N., Sékou D., Koné D. & Kouakou T.H. (2014). Stimulation of polyphenols production in cell suspensions of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by oligosaccharide fraction of *Fusarium oxysporum* f. sp. Vasinfectum, causal agent of Fusarium wilt. *International Journal of Agriculture and Crop Science*, 7(15): 1570-1576.
30. N'goran A.R.B., Kouakou T.H., Konan F.K.H., Camara B., Kouassi N.K. & Kone D. (2016). Effet de la fraction oligosaccharidique de *Fusarium oxysporum* f. Sp. vasinfectum sur la protection du cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.) contre la fusariose. *Agronomie Africaine*, 28(3): 1-10.
31. Rees S. et Harbone G. (1985). The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochimie*, 24: 2225-2231.

32. Shimoda K., Hamada M., Takemoto M. & Hamada H., (2013). Synthesis of resveratrol glycosides by cultured plant cells. *Natural Product Communications*, 8(7): 907-909.
33. Toé A. M., Kinane M. L., Kone S. & Sanfo-Boyarm E. (2004). Le non respect des bonnes pratiques agricoles dans l'utilisation de l'endosulfan comme insecticide en culture cotonnière au Burkina Faso : quelques conséquences pour la santé humaine et l'environnement. *Revue Africaine de Santé et de Production Animale (RASPA)*, 2(3-4): 275-278.
34. Toé A. M., Ouedraogo M., Ouedraogo R., Ilboudo S. & Guissou P. 1. (2013). Pilot study on agricultural pesticide poisoning in Burkina Faso. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(4): 185-191.
35. Vaissayre M. (1994). Dix années d'expérimentation pour la protection du cotonnier en Côte D'Ivoire (1981-1990). *Document CIRAD /CA*, 3(93): 1-57.
36. Vakili NG. (1968). Response of *Musa acuminata* species and edible cultivars to infection by *Mycosphaerella musicola*. *Tropical Agriculture*, 45: 13-22.