

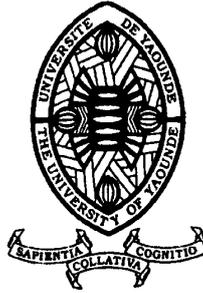
REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
ECOLE NORMALE SUPERIEURE  
DEPARTEMENT DE SCIENCES  
BIOLOGIQUES

\*\*\*\*\*



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL  
SCIENCE

\*\*\*\*\*

**Evaluation de l'effet de l'acide gibbérellique sur la germination, la croissance et de l'acide salicylique sur la teneur en composé phénoliques chez *Prunus africana*(Hook.F.) Kalkman**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de l'Enseignement Secondaire Général Deuxième Grade D I P.E.S. II

Par :

**TCHUINGUEM TAMO Michèle**  
**Licenciée ès Sciences**

Sous la direction  
**NIEMENAK Nicolas**  
**Maître de Conférences**



**Année Académique**  
**2015-2016**



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [biblio.centrale.uyi@gmail.com](mailto:biblio.centrale.uyi@gmail.com)

## WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: [biblio.centrale.uyi@gmail.com](mailto:biblio.centrale.uyi@gmail.com)

## **DEDICACE**

**A mes parents, mes sœurs, frère et neveux**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué pour la réussite de ce travail. Il s'agit de :

- Pr. NIEMENAK Nicolas, Maître de Conférences, pour avoir accepté de diriger ce travail de recherche, pour les suggestions et orientations apportées dans la rédaction de ce mémoire; j'ai bénéficié de sa grande expérience de chercheur.

-Pr. OMOKOLO Denis, pour m'avoir ouvert les portes du Laboratoire de Physiologie Végétales (LAF 314) de l'ENS.

- Pr. SONKE Bonaventure, Maître de Conférences, Chef de Département de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (ENS), pour les moyens qu'il met en œuvre afin de garantir le bon fonctionnement du Département;

-l'ensemble des enseignants du Département de Biologie pour leur disponibilité et leur dévouement dans notre formation ;

- Dr. NZWEUNDJI Justine Germe, pour le suivi tout au long de l'élaboration de ce travail, me prodiguant conseils et encouragements;

-Mes aînés du laboratoire de Physiologie Végétale (L A F 314) de l'ENS pour leurs suggestions, encouragements et conseils. Leurs soutient m'ont été d'un secours inestimable. Il s'agit plus particulièrement de: BOUTCHOUANG Rodrigue, AKOA Simon, MANGA Judes, DJABOU Astride, NOUMI Christelle, EYAMO Jos, DJEUANI Carole, TCHOUATCHEU Audrey, AKITIO Olive, NOAH Alexandre ;

- tous mes camarades de laboratoire pour leur franche collaboration et leur assistance conviviale durant ce travail, en particulier OMONO Diane, NYANGONO Marcelle, FAHA Rodrigue, NKOUNGA William, ELLEME Franck, GOUANLONG Bérénice, KETCHIEMO Franklin, MEKUE Quisselle, Porny Bérangère, ABOU'OU Kelly ;

- tous mes camarades de promotion pour le climat d'entente et l'esprit d'équipe, plus particulièrement à KENGNE Nadine, NOUGAN Nadine, MILAWE Ange, BOBO Manuela;

- TEKEU Honoré pour l'attention, le soutien moral et l'aide apportés pour la réalisation de ce travail ;

- tous mes amis MAKOU Laure, JOU Christelle, MASSO Jully, NJOCK Raphael et OLEMBE Brenda pour leur assistance et encouragement;

-la famille TAMO, qui m'a toujours soutenu et encouragé ;

- tous mes amis et proches qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire et dont les noms n'ont pas été cités, que tous trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

## SOMMAIRE

<b>DEDICACE</b> .....	<b>i</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>ii</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>viii</b>
<b>CHAPITRE I : GENERALITES</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1. <i>Prunus africana</i></b> .....	<b>3</b>
I.1.1. Origine et distribution .....	3
I.1.2. Classification.....	3
I.1.3. Description .....	4
I.1.4. Importance .....	5
I.1.5. Ecologie .....	6
I.1.6. Méthodes de régénération .....	6
<b>I.2. Métabolites secondaires</b> .....	<b>8</b>
I.2.1. Alcaloïdes.....	8
I.2.2. Terpénoides.....	8
I.2.3. Composés phénoliques ou polyphénols.....	8
I.2.4. Rôles, intérêts et propriétés des polyphénols.....	10
I.2.5. Facteurs influençant la synthèse des composés phénoliques .....	10
<b>I.3. Acide salicylique</b> .....	<b>11</b>
<b>I.4. Gibbérellines</b> .....	<b>12</b>
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>14</b>
<b>II.1. Matériel</b> .....	<b>14</b>
<b>II.2. Méthodes</b> .....	<b>14</b>
II.2.1. Effet du temps de conservation et de l'acide gibbérellique sur la germination des graines. ....	14
II.2.2. Effet de l'acide gibbérellique sur la croissance des plantules.....	17
II.2.3. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques chez <i>P. africana</i> . ...	17
II.2.4. Analyses statistiques .....	21
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>22</b>
<b>III.1. RESULTATS</b> .....	<b>22</b>
III.1.1. Effet de la durée de conservation et de la concentration de gibbérelline sur la germination de <i>Prunus africana</i> .....	22

III.1.2. Effet de la gibbérelline sur la croissance des plantules de <i>P. africana</i> .....	23
III.1.3. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	27
<b>III.2. Discussion.....</b>	<b>34</b>
<b>CHAPITRE IV : IMPLICATION DU SUJET SUR LE SYSTEME EDUCATIF .....</b>	<b>37</b>
<b>IV.1. INTERET DIDACTIQUE .....</b>	<b>37</b>
<b>IV.2. FICHE PEDAGOGIQUE DE PREPARATION .....</b>	<b>38</b>
<b>CHAPITRE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>52</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>58</b>

## ABSTRACT

*Prunus africana* is a forest species much prized for the medicinal properties of its bark. Its bark extracts are used for the treatment of prostatic hypertrophy and benign prostatic hyperplasia. Global demand for bark is estimated at more than 4,000 t / year, for a value of 220 million Dollars. Furthermore, it was revealed that the phenolic compounds contained in this species act against the free radicals, which would be responsible for the prevention and treatment of cancer. Hence the objective of this work is to evaluate the efficacy of gibberellic acid (GA3) on growth and salicylic acid on the phenolic content in *P. africana*. For this, the seed germination rate was evaluated based on the storage period at 0; 3 and 16 days and the dose of 0; 10; 50 and 100  $\mu\text{M}$  GA3, and the effect of GA3 on plant growth of *P. africana* non-conserved. Also, the evaluation of the effectiveness of different doses of salicylic acid on the phenolic compounds content in the leaves and stems was performed after transplantation of the seedlings which did not receive the GA3. The results revealed that the germination rate decrease with the conservation of seeds and the doses of 10, 100 and 50  $\mu\text{M}$  GA3 respectively stimulated the germination rate of seeds to 76; 70 and 63%. Also, the dose of 10  $\mu\text{M}$  GA3 has favored the better elongation of roots, stems and increased the leaf area. Furthermore, the foliar application of 2 mM salicylic acid enhanced the total polyphenol content in the leaves and stems. This study improved the phenolic content in *P. africana*.

Key words: *Prunus africana*, germination, gibberellic acid, salicylic acid, phenol compounds.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

JAS : jours après sémis

GA3 : Acide gibbérellique

AS : Acide salicylique

PF : Poids frais

MF : Matière fraîche

EAG : Equivalent d'acide gallique

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distribution de <i>Prunus africana</i> en Afrique et au Cameroun.....	3
Figure 2. Morphologie d'un arbre de <i>P. africana</i> (A) et d'une branche portant les fruits(B). ..	5
Figure 3. Formule chimique de l'acide salicylique. ....	12
Figure 4. Graine avec péricarpe (A) et graines débarrassées de péricarpe (B). ....	14
Figure 5. Protocole d'aseptisation des graines de <i>Prunus africana</i> . ....	15
Figure 6. Schéma du dispositif expérimental. ....	16
Figure 7. Schéma du dispositif expérimental .....	18
Figure 8. Protocole d'extraction des polyphénols totaux .....	19
Figure9. Droite d'étalonnage des polyphénols à partir de l'acide gallique.....	20
Figure 10. Effet du temps de conservation des graines de <i>P. africana</i> sur la germination .....	22
Figure 11. Effet du temps de conservation et de l'acide gibbérellique sur la germination des graines de <i>P. africana</i> .....	23
Figure 12. Effet de l'acide gibbérellique sur la croissance des plantules de <i>P. africana</i> .....	23
Figure13. Effet des différentes doses de gibbérelline sur la longueur des racines.....	25
Figure14. Effet des différentes doses de gibbérelline sur la taille des plants.....	26
Figure15. Dispositif expérimental des plants de <i>Prunus africana</i> transplantés (40 JAS).....	28
Figure16. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles. ..	30
Figure 17. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux dans les tiges. ....	31
Figure 18. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en flavonoides totaux dans les feuilles. ..	32
Figure19. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en flavonoides totaux dans les tiges. ....	33

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification systématique de <i>P. africana</i> . .....	4
Tableau 2 : Principales classes des composés phénoliques.....	9
Tableau 3. Carré moyen issu de l'analyse de la variance des paramètres évalués.....	24
Tableau 4. Effet des traitements sur la surface foliaire. ....	27
Tableau 5. Carré moyen issu de l'analyse de la variance des polyphénols totaux dans les feuilles et tiges.....	27
Tableau 6. Carré moyen issu de l'analyse de la variance des flavonoïdes totaux dans les feuilles et tiges.....	28

## CHAPITRE I : GENERALITES

### INTRODUCTION

#### Contexte et justification

*Prunus africana* (Hook.f.) Kalman est un arbre de la famille des Rosaceae (Hall *et al.* 2000). C'est une espèce récalcitrante (Ondigui 2001), endémique des forêts montagnardes d'Afrique tropicale et de Madagascar (Kalkman 1965). *P. africana* est une essence forestière bien prisée pour les propriétés médicinales de son écorce. La demande mondiale en écorces de *P. africana* est estimée à plus de 4000 tonnes par an pour une valeur financière de 220 millions de Dollars (Cunningham *et al.* 2002). Cette forte demande est en grande partie satisfaite par les populations naturelles de *P. africana* du Cameroun (Amougou *et al.* 2011). En effet, cette grande attraction sur les utilisateurs est liée à la présence des phytostérols comme beta-sitosterol qui a des vertus anti-inflammatoires. On note aussi la présence des triterpènes pentacycliques (acides ursoliques et oléaniques) ayant des propriétés contre les oedèmes d'une part et d'autre part les *ferulic acid nesters* (ndocosanol et tetracosanol) qui réduisent le niveau de prolactine et bloquent l'accumulation du cholestérol dans la prostate. Par ailleurs, les travaux de Sung-jin *et al.* 2008 ont montré que les flavonoïdes sont efficaces pour inhiber le cancer ou induire des mécanismes qui peuvent tuer les cellules cancéreuses et qui inhibent l'invasion tumorale. Les extraits d'écorce de *Prunus africana* sont utilisés dans le traitement de l'hypertrophie de la prostate et de l'hyperplasie prostatique bénigne (Cunningham *et al.* 2002 ; Tassé 2006 ; Njamnshi et Ekati 2008. Ces propriétés font que sa demande sur le marché soit croissante et il en résulte une pression très grande sur la ressource. Au Cameroun, l'espèce *P. africana* est menacée de disparition. Cette menace trouve son explication dans la forte pression exercée sur la ressource et à l'exploitation non durable de l'écorce pour le commerce international de plantes médicinales (Cunningham et Mbenkum, 1993; Hall *et al.*, 2000). Malheureusement, cette situation entraîne une surexploitation de l'espèce. Dans l'optique de palier à cette situation, l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) a classé *P. africana* comme espèce vulnérable et l'a inscrite à l'annexe II du CITES (Convention on International Trade of Endangered Species) en 1995 (Cunningham *et al.* 1997). Par ailleurs, les gibbérellines sont des régulateurs de croissance synthétisés au niveau des embryons, des jeunes feuilles et des méristèmes (Antoun 2013). Les gibbérellines régulent divers processus chez la plante tels la germination des graines, l'élongation des tiges, l'induction de la floraison, le développement des pollens et des fruits

(Sponsel et Hedden 2004), l'expansion foliaire, l'induction de certaines enzymes hydrolytiques (Matsuoka 2003). Des études ont montré que la gibbérelline influence la croissance des plantes. L'on a observé que la gibbérelline endogène contrôle la croissance des racines chez *Lemna minor* (Inada et Shimmen 2000; Inada *et al.* 2000) et *Arabidopsis* (Ubeda-Tomas *et al.* 2008, 2009). Des études réalisées sur *Ficus capensis*, ont montré une amélioration de la germination chez les graines traitées par GA3 (Getahun 2011). De plus, (Bidadi *et al.* 2010) ont montré que l'application de la gibberelline sur la tige améliore l'élongation de la racine primaire chez *Arabidopsis thaliana*. En outre, (Leite *et al.* 2003), ont obtenu une augmentation de la hauteur et du diamètre des tiges, de la surface foliaire et du rendement en matière sèche suite à une application foliaire de GA3 chez le soja. Par ailleurs, il a été révélé que les composés phénoliques agissent contre les radicaux libres (Lahouel 2005) ce qui serait à l'origine de la prévention et du traitement du cancer (Weiguang *et al.*, 2005), de la réduction de risques de développement de plusieurs pathologies comme les maladies inflammatoires (Aruoma 1994 ). Des travaux portant sur les composés phénoliques ont été réalisés chez plusieurs espèces telles *Theobroma cacao* (Niemenak *et al.* 2006), *Allium cepa* (Amin *et al.* 2007), *Zingiber officinale* (Ghasemzadeh et Jaafar 2012). En outre, l'effet de l'acide salicylique sur la production de composés phénoliques a été démontré chez les espèces telles que *Salvia miltiorhiza* (Dong *et al.* 2010), date palm (Dihazi *et al.* 2003), *Houttuynia cordata* (Xu *et al.* 2012). De nombreux travaux ont été réalisés en vue de la domestication de cette espèce (Avana 2006; Tchoundjeu *et al.* 2002; Stewart 2003; Noumi 2011, Tchiéchoua 2012, Nzweundji *et al.* 2015). Cependant, aucune étude n'a été menée au Cameroun en vue de l'amélioration de la production en composés phénoliques chez *P. africana*.

## **Objectifs**

L'objectif général de ce travail est d'évaluer l'effet de l'acide gibbérellique sur la croissance et de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques en vue d'améliorer la productivité de *P. africana*.

Plus spécifiquement, il s'agira de :

- Evaluer l'effet du temps de conservation et de l'acide gibbérellique sur la germination des graines;
- Evaluer l'effet de l'acide gibbérellique sur la croissance des plantules;
- Tester l'efficacité des différentes doses d'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques.

## I. REVUE DE LA LITTÉRATURE

### I.1. *Prunus africana*

#### I.1.1. Origine et distribution

*Prunus africana* (Hook.f.) Kalkman, communément appelé mérisier d'Afrique est une espèce végétale endémique des forêts afro-montagneuses d'Afrique tropicale et de Madagascar. Au Cameroun, on rencontre *P. africana* dans six régions: Adamaoua, Centre, Littoral, Nord-Ouest, Ouest, Sud-ouest (Amougou *et al.* 2011).

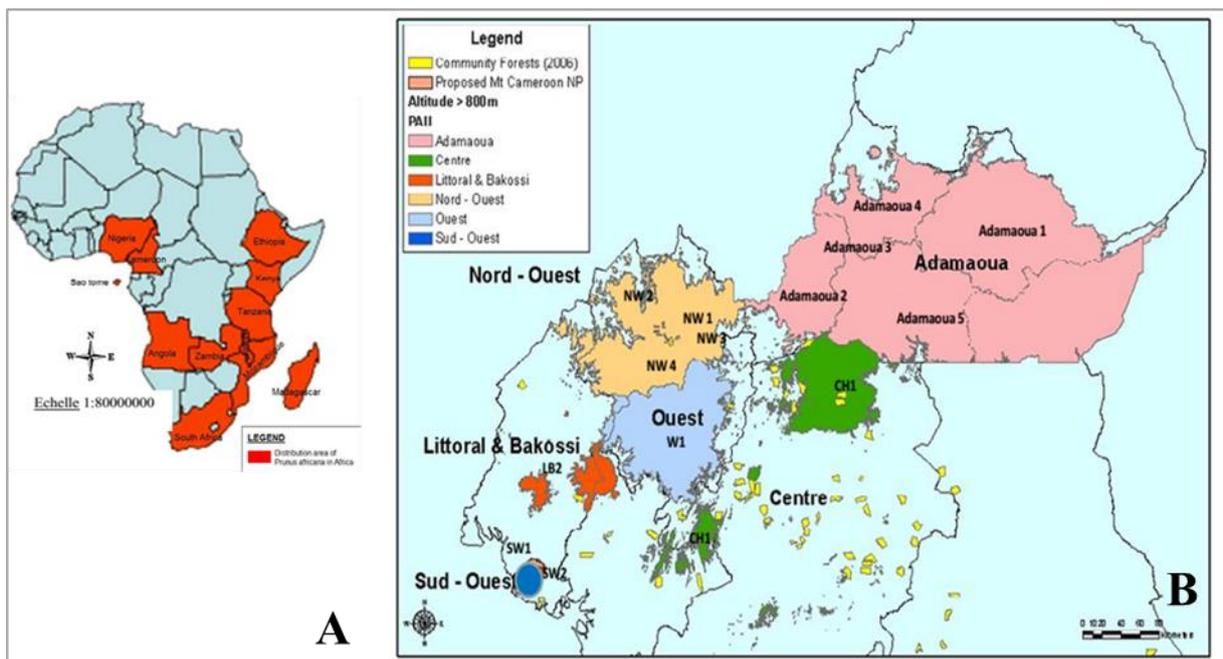


Figure 1. Distribution de *Prunus africana* en Afrique (A) (Nkeng 2010) et au Cameroun (B) (Amougou *et al.* 2011).

#### I.1.2. Classification

*P. africana* (Hook. f.) Kalkman a été décrite pour la première fois par (Hooker 1864) sous le nom de *Pygeum africanum*. (Kalkman 1965) découvre chez cette espèce de nombreuses affinités phylogénétiques avec les espèces du genre *Prunus* et suivant les règles du Code International de Nomenclature Botanique (CINB), décide de la rattacher au sous-genre *Laurocerasus* regroupant les espèces à feuilles persistantes du genre *Prunus* (Avana 2006). Cette espèce de la famille des Rosacées présente la classification systématique suivante (Tableau1):

Tableau 1. Classification systématique de *P. africana*.

<b>Classification</b>	
Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Rosales
Familles	Rosacées
Sous-familles	Amygdaloidées
Genre	Prunus
Sous-genre	Laurocerasus
Espèce	<i>Prunus africana</i> (Hook. f.) Kalkman, 1965

### I.1.3. Description

*P. africana* est un arbre sempervirent (Siyabulela 2006). Son fût est droit et cylindrique. Pouvant mesurer 10 à 40 m de hauteur et 40 à 120 cm de diamètre à l'âge adulte (Njamnshi et Ekati 2008). *P. africana* présente parfois à la base des contreforts ou empattements (Tassé 2006). L'écorce, de texture rugueuse, est brun foncé. Sa tranche épaisse d'environ 1,5 cm, est fibreuse et présente une section rouge rosée virant rapidement au brun, d'odeur caractéristique d'amande amère (Schippmann 2001). L'exsudat est un liquide dont l'odeur, caractéristique du genre *Prunus*, rappelle fortement celle du cyanure (Hall *et al.* 2000). Le bois de couleur rouge-brun est lourd et dur, résistant au feu de brousse (Ondigui 2001). Ses feuilles pétiolées sont simples et alternes, de forme elliptique à oblong, parfois un peu ovale, à phyllotaxie spiralée avec parfois un apex aigu et à marge crénelée (Tassé 2006). La plantule de *P. africana* est facilement identifiable avec des feuilles opposées au niveau des trois premiers nœuds et de forme ovales-lancéolées (Letouzey 1978).

C'est une plante hermaphrodite ayant des fleurs à pétales blancs. La reproduction a lieu entre 15 et 20 ans lorsque l'arbre n'est pas exploité. Ses fruits bilobés sont de petites drupes charnues indéhiscents de dimension de 15X 5-10 mm. La couleur de l'épicarpe change avec la maturation, passant du vert foncé au rouge pourpre (Ondigui 2001; Tassé 2006). Le fruit est une drupe amère de moins de 10 mm de diamètre consommée par de nombreux animaux. Ils présentent un mésocarpe très fin et un endocarpe ligneux (Ondigui 2001). Les graines sont pourvues de cotylédons de couleur blanche. Deux modes de pollinisation sont

observés: l'autogamie et l'allogamie essentiellement entomophile (insecte). Les études sur la biologie de la reproduction de *P. africana* sont peu nombreuses. Selon (Munjuga *et al* 2000) l'espèce est préférentiellement allogame. *P. africana* est une espèce barochore dont la régénération est épisodique car limitée par une fructification irrégulière (Tonye *et al.* 2000). La multiplication de cette espèce peut s'effectuer soit par voie sexuée (graines), soit par voie asexuée ou végétative (rejets et boutures).



Figure 2. Morphologie d'un arbre de *P. africana* (A) et d'une branche portant les fruits(B). (Siyabulela 2006)

(B)

#### I.1.4. Importance

*P. africana* est une essence forestière bien prisée pour les propriétés médicinales de son écorce. Les extraits d'écorce de *P. africana* sont utilisés dans le traitement de l'hypertrophie de la prostate et de l'hyperplasie prostatique bénigne (Tassé 2006 ; Njamnshi et Ekati 2008), les troubles de la sénescence et l'hirsutisme chez la femme (Hall *et al.* 2000). L'écorce peut réguler la pression artérielle, renforcer le système immunitaire, traiter l'asthme, les troubles mentaux et purifier le plasma sanguin (Tonye *et al.* 2000). L'écorce de *P. africana* aurait également des effets analgésique, cicatrisant, aphrodisiaque et tonifiant. Cette espèce aurait également des applications vétérinaires (coccidiose, cholra, diarrhée) (Stewart 2003).

Sur le plan cosmétique, l'extrait d'écorce sert à préparer un fortifiant pour les cheveux (Cunningham *et al* 1997). Pour les populations locales, *P. africana* est une source de bois d'œuvre, de bois de chauffage (Hall *et al.* 2000). Son bois est également utilisé en construction et surtout en artisanat (sculpture) (Orwa 2009).

En agroforesterie, *P. africana* est utilisé comme espèce ombragère et comme brise vent. De plus l'espèce développe des symbioses mycorhizales importantes pour la nutrition minérale. (Haselwandter 1997).

### **I.1.5. Ecologie**

La distribution de *P. africana* est largement influencée par la présence des rayons lumineux. La germination des graines ne nécessite pas la lumière (Tassé 2006) bien que le développement des plantules soit dépendant de la lumière (Ndam 1998). C'est la raison pour laquelle l'espèce est abondante dans les sites perturbés, les trouées. Aussi, cette distribution est significativement influencée par l'altitude, la température, la précipitation, et la couverture nuageuse (Hall *et al.* 2000). En effet, cette plante pousse entre 900 et 3000 m d'altitude au-dessus de la mer (Dorthe 2003). *P. africana* a besoin d'une température comprise entre 24 °C et 29 °C et une pluviométrie moyenne annuelle autour de 1 500 m. C'est l'une des rares espèces qui soit capable de s'adapter à la savane montagnarde et résister aux feux de brousse. Par ailleurs elle pousse sur des sols à matériaux volcaniques évolués présentant un bon drainage (Nkuinkeu 1999).

### **I.1.6. Méthodes de régénération**

La multiplication de cette espèce peut s'effectuer soit par voie sexuée (graines), soit par voie asexuée ou multiplication végétative par boutures et rejets.

#### **I.1.6.1. Bouturage**

Les études préliminaires mettant en œuvre les techniques de multiplication végétative, ont montré que l'enracinement des boutures de *P. africana* était hautement influencé par le milieu de culture, la surface foliaire et la présence des phytohormones tels que l'auxine (Tchoundjeu *et al.* 2002). Par ailleurs, (Avana 2006) a obtenu un meilleur enracinement des boutures (84 %) en utilisant la sciure comme substrat, associé à une phytohormone (auxine).

Au Cameroun (Mbalmayo) des plants de *P. africana* ont été produits dans des bacs de propagation à partir des boutures. Sans utilisation d'hormones, 10 % des plants étaient ancrées au bout de trois mois (Cunningham et Mbenkum 1993).

### **I.1.6.2. Rejets**

Les jeunes arbres produisent des rejets lorsqu'ils sont broutés par les antilopes ou les chèvres. Les grands arbres par contre ont une faible capacité d'émission de rejets. La production de rejets peut avoir lieu quand la surface des racines est endommagée (CITES 2006).

### **I.1.6.3. Germination**

*P. africana* se reproduit principalement à partir des graines. Les graines sont dispersées par les oiseaux et les primates et ont une germination épigée. Elles sont récalcitrantes et perdent leur pouvoir germinatif au bout de trois semaines (Ondigui 2001). À maturité, elles conservent une viabilité élevée pendant au moins trois mois, même à température ambiante comparativement aux graines immatures. Le temps de germination varie entre 30-50 jours.

C'est une espèce héliophile bien que la lumière soit un inhibiteur pour la germination (Tassé 2006) et pour le développement des plantules jusqu'à un certain âge (Sunderland et Nkefor, 1997). Le rayonnement incident direct constitue un inhibiteur car provoque une dessiccation rapide (Sunderland et Nkefor 1997).

Les graines germent mieux lorsqu'elles sont fraîches et perdent rapidement leur viabilité; peu de graines sont viables à plus de 6 mois. La germination peut atteindre 60-80 % si les graines sont mises à germer dans les 50 jours (Mbuya *et al* 1994). La germination des fruits mûrs est meilleure avec une lumière solaire partielle après une courte période de séchage (4 heures) dans un endroit aéré et ombragé. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque ces semences provenaient d'un fruit mûr et avaient été récoltées directement sur les arbres et décortiquées immédiatement après la récolte, puis entreposées, sans séchage, à 5 °C. Toutefois, même dans ces conditions, la germination n'était que de 35 % après 12 mois de stockage. Le stockage à long terme des semences de *P. africana*, comme moyen de conservation *ex situ*, n'est donc pas possible.

Les études sur le pouvoir germinatif des graines de *P. africana* montrent que le taux de germination peut atteindre 90 % si les conditions tels, la maturité des graines, le retrait de la pulpe et un substrat poreux et bien drainé sont réunies (Avana 2006).

## **I.2. Métabolites secondaires**

L'une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (Dixon et Paiva 1995). En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui dérivent des métabolites primaires. Ce sont des molécules organiques qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance, le développement ou la reproduction des plantes (Harborne 1984). Leur fonction physiologique n'est pas toujours évidente. Toutefois, ils représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi variés que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Herbert 1989). Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques (Dixon et Paiva 1995).

### **I.2.1. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont un groupe important et structurellement diversifié de composés. Ils ont des propriétés antibiotiques et sont ainsi impliqués dans la défense (Raghuveer *et al.* 2015).

### **I.2.2. Terpénoïdes**

C'est une famille de composés naturels très diversifiés. Ils sont classés en fonction du nombre d'unités à cinq atomes de carbones qu'ils contiennent (Raghuveer *et al.*, 2015). C'est ainsi qu'on distingue les monoterpènes (C10), à deux unités isoprènes (C5), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterterpènes (C25), les triterpènes (C30), les tétraterpènes ou caroténoïdes (C40) et les polyterpènes (plus de huit unités isoprènes). Les terpénoïdes ont des propriétés antibiotiques (phytoalexines), les caroténoïdes, pigments végétal, jouent un rôle essentiel dans la photosynthèse (Rodney *et al.* 2000).

### **I.2.3. Composés phénoliques ou polyphénols**

Les composés phénoliques constituent l'un des groupes les plus importants et les plus diversifiés des produits secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ils représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines tels que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Herbert 1989). Bien qu'étant très diversifiés, ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

**Tableau 2** : Principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.* 2006)

Squelette carboné	Classe	Exemple
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique
	Coumarines	Myristicin, eugénol
	Isocoumarines	Scopolétine
	Chromones	Myristicine, eugénol
		Eugenine
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol
	Anthraquinones	Anthraquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daidzéine
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol
	Neolignanes	Eusiderine
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Bi flavonoides	Amentoflavone
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins condensés	

### ➤ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques à 15 atomes de carbones, avec deux noyaux aromatiques reliés par un pont à trois carbones C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub>. Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres (Cao *et al.* 1998). Les travaux de Sung-jin *et al.* (2008) ont montré que les flavonoïdes sont efficaces pour induire des mécanismes de défense qui peuvent tuer les cellules cancéreuses et qui inhibent l'invasion tumorale. Les flavonoïdes sont regroupés en cinq sous-classes (Dixon et Paiva 1995; Medic-saric *et al.* 2004) :

-les anthocyanes, pigments rouge ou bleu,

-les flavones

-flavonols de couleur crème ou jaune clair,

-les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins;

-isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine.

Les flavonoïdes sont contenus dans l'écorce et le cœur du bois; les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties extrêmes des fruits, des fleurs et des feuilles. Les flavonoïdes et les anthocyanes contribuent à la coloration des fleurs et des fruits. Ce qui attire les insectes et les animaux facilitant ainsi la pollinisation.

#### **I.2.4. Rôles, intérêts et propriétés des polyphénols**

Les polyphénols sont utilisés dans de nombreux domaines tels que la médecine, l'alimentation et la fabrication des produits tels que l'arôme, les boissons, la teinture, les répulsifs, les parfums, les cosmétiques (Djeridane *et al.* 2006).

Les composés phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes qui participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydatif, le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, l'ostéoporose (Wang et Mazza 2002). En outre ils agissent contre les radicaux libres (Lahouel 2005) ce qui serait à l'origine de la prévention et du traitement du cancer (Weiguang *et al.* 2005), de la réduction de risques de développement de plusieurs pathologies comme les maladies inflammatoires (Aruoma 1994) et cardiovasculaires.

Les composés phénoliques interviennent aussi dans la protection contre des agents biotiques et abiotiques.

#### **I.2.5. Facteurs influençant la synthèse des composés phénoliques**

Plusieurs facteurs peuvent influencer la production des composés phénoliques. L'action des facteurs externes, qu'il soit d'origine biotique (attaque par des microorganismes) ou abiotique (lumière, température, traitements hormonaux, application de fertilisants, irradiations (Dixon et Paiva 1995). Les éliciteurs sont des molécules produites en général par des microorganismes et qui vont déclencher chez la plante l'expression de gènes de défense conduisant à la mise en place de molécules antibiotiques dénommées phytoalexines, parmi lesquelles certains groupes de composés phénoliques sont bien représentés: coumarines, stilbènes, isoflavonoïdes (Dixon et Paiva 1995). (Simo *et al.* 2014) ont obtenus une

amélioration de la synthèse des composés phénoliques chez les plants de cacaoyer infectés par *Phytophthora megakarya*. Aussi, les travaux de Wojdylo *et al* 2007 ont montré qu'il existe une corrélation positive entre les propriétés antioxydantes et la composition en composés phénoliques chez les espèces de différentes familles, Labiatae et Compositae. Afin d'améliorer la production de métabolites secondaires, des stratégies telles que le traitement avec des éliciteurs ont été utilisées, ainsi, les études de (Heidi *et al.* 2012) montrent que les éliciteurs (acide jasmonique (JA), acide salicylique(AS), ethephone et le précurseur acide shicimique (SH) permettent l'amélioration de la production des composés phénoliques chez les suspensions cellulaires de *Vitis vinifera*. Les métabolites secondaires majoritairement présents dans les extraits au méthanol de *Prunus africana* sont les flavonoïdes et les terpènes, on note l'absence des alcaloïdes (Bii *et al.* 2010).

### **I.3. Acide salicylique**

L'acide salicylique (AS) ou acide 2-hydroxybenzoïque ( $C_7H_6O_3$ ) est un composé phénolique considéré comme un régulateur de croissance endogène (Sakhabutdinova *et al.* 2003). Il joue un rôle clé dans la croissance, le développement et la défense des plantes. Il permet en outre l'amélioration de la tolérance au stress biotique et abiotique (Sawada *et al.* 2008). De plus, il joue un rôle important dans la régulation des processus physiologiques de la plante, tels que la stimulation des racines adventives et permet la résistance aux stress biotiques et abiotiques (Noreen *et al* 2009). L'application exogène de AS stimule significativement la production de glucosinolates (Kiddle *et al.* 1994).

De nombreuses études ont montré l'effet de AS sur la production des métabolites secondaires. Ainsi, (Ali *et al.* 2006) et (Shabani *et al.* 2009) ont montré que AS induit l'accumulation de triterpénoïdes, ginsénosides dans le ginseng et la glycyrrhizine chez la licorice respectivement, la production de sesquiterpènes, comme bilobalide dans ginkgo (Kang *et al* 2006), crepidiaside, deoxylactucin et sonchuside dans la chicorée (Malarz *et al.* 2007) et l'artémisinine dans *Artemisia annua* (Pu *et al.* 2009) pourrait aussi être stimulée par AS. Bien qu'il n'y ait que peu d'informations sur les monoterpènes, AS accumule les diterpènes y compris ginkgolides (Kang *et al.* 2006), et le taxol, et la biosynthèse monoterpène est supprimée chez les plantes transgéniques d'*Arabidopsis* SA-déficient (Wang *et al.* 2007). L'application foliaire de l'AS a entraîné une accumulation marquée de monoterpènes totaux chez *Houttuynia cordata* (Xu *et al* 2012). Dong *et al.* 2010 ont montré que l'acide salicylique (AS) permet une l'accumulation de composés phénoliques dans les

cultures cellulaires *Miltiorrhiza Salvia*. Le déclenchement de l'accumulation de l'acide phénolique dépendant de la dose d'application et du temps écoulé après application.

L'effet de l'acide salicylique sur les processus physiologiques des plantes varie selon les espèces, le stade de développement, la concentration de AS et les conditions environnementales (Shraiy et Hegazi. 2009).

L'application de l'AS entraîne une stimulation de la synthèse des acides phénoliques (cinnamic acid, vanillic acid, ferulic acid and gallic acid) et une baisse de la teneur en flavonoïdes (quercetin, catechin and kaempferol) chez deux variétés de ginger : Halia Bentong et Halia Bara cultivés en serre. (Ghasemzadeh et Jaafar 2012 )

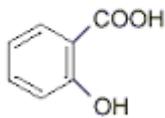


Figure 3. Formule chimique de l'acide salicylique.

#### I.4. Gibbérellines

Les gibbérellines sont des régulateurs de croissance appartenant à la classe des diterpénoides. Elles ont été isolées à partir des produits des métabolites du champignon pathogène du riz, *Gibberella fujikuroi*, en 1935, (Yamaguchi 2008). Les gibbérellines, représentées principalement par la GA3 (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>), sont synthétisées au niveau des embryons, des jeunes feuilles et des méristèmes des plantes (Antoun 2013). La structure des GAs varie en fonction de la position de certains groupements (hydroxyle, méthyle, aldéhyde, carboxyle, époxyde, ou encore cétone) sur le squelette du noyau gibbérellane. 136 gibbérellines différentes ont été identifiées et désignés de GA1 à GA136. (Gallach 2015). Cependant, les seules GA biologiquement actives sont GA1, GA3, GA4, GA5 GA6 et GA7 tandis que d'autres GAs sont soit précurseurs de GAs bioactive, soit des formes inactives (Bidadi *et al.* 2010). La présence ou l'absence d'un groupement hydroxyl en position C2, C3, C13 détermine l'existence de l'activité biologique de la GA. Ainsi, l'hydroxylation en C3 semble être crucial pour l'activité biologique (Talón 2000). Les gibbérellines régulent divers processus chez la plante tels la germination des graines, l'élongation des tiges, l'induction de la floraison, le développement des pollens et des fruits (Sponsel et Hedden 2004), l'expansion foliaire, l'induction de certaines enzymes hydrolytiques (Matsuoka 2003). Des études ont

montré que GAs endogène contrôle la croissance des racines chez *Lemna minor* (Inada et Shimmen 2000, (Inada *et al.* 2000) et *Arabidopsis* (Ubeda-Tomas *et al.* 2008, 2009). Des études réalisées sur *Ficus capensis*, espèce appartenant à l'ordre des Rosales ont montré une amélioration de la germination chez les graines traitées par GA3 (Getahun 2011). En outre, Leite *et al.* (2003) ont obtenu une augmentation de la hauteur et du diamètre des tiges, de la surface foliaire et du rendement en matière sèche suite à une application foliaire de GA3 chez le soja.

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Les travaux ont été réalisés au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I.

### II.1. Matériel

Le matériel végétal est constitué des graines fraîches de *P. africana* (Figure 4) provenant du Centre International pour la Recherche en Agroforesterie (ICRAF) de Bamenda (ville localisée dans la région du Nord-Ouest, Cameroun). Ces graines ont été décortiquées, aseptisées et ensemencées.



Figure 4. Graines de *Prunus africana* (A) et graines débarrassées de leur tégument séminal (B).

### II.2. Méthodes

#### II.2.1. Effet du temps de conservation et de l'acide gibbéréllique sur la germination des graines.

Les graines de *P. africana* ont été subdivisées en trois lots:

- le premier lot était constitué des graines mises à germer immédiatement (J0),
- le deuxième lot a été conservé au réfrigérateur (4°C) pendant 3 jours (J3)
- le troisième lot a été conservé au réfrigérateur (4°C) pendant 16 jours (J16)

Les graines de chacun des lots ont été décortiquées, aseptisées et ensemencées, suivi de l'application de l'acide gibbérellique.

### II.2.1.1. Aseptisation du matériel végétal

Les graines ont été aseptisées avant l'ensemencement selon le protocole ci-dessous (figure 5).

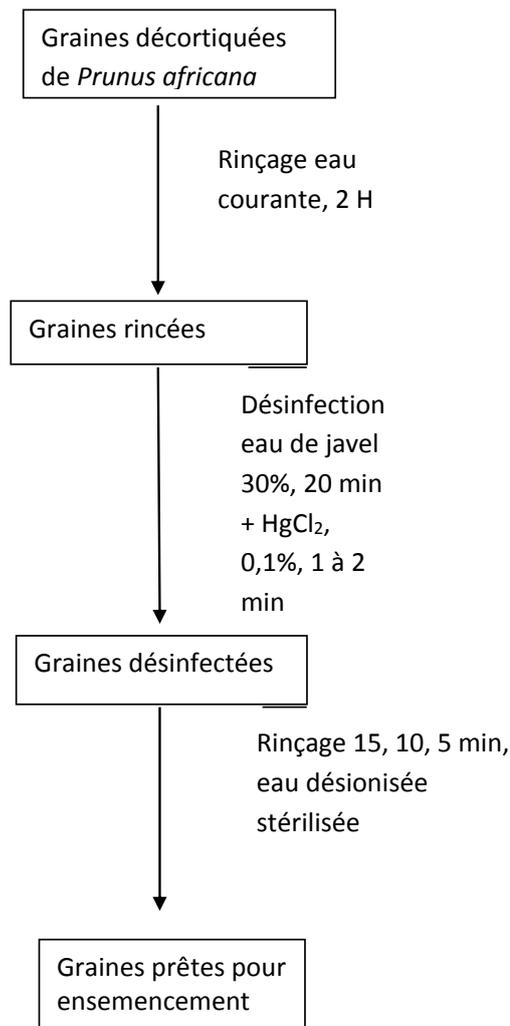


Figure 5. Protocole d'aseptisation des graines de *Prunus africana*.

Le processus d'aseptisation permet d'obtenir des graines indemnes de microorganismes et de favoriser ainsi la germination des graines.

Les graines sont au préalable rincées à l'eau courante pendant 2h afin d'éliminer les microorganismes présents à la surface des graines. Ensuite celles –ci sont désinfectées à l'eau de javel 30% pendant 20 minutes et au chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) 0,1% pendant 1 à 2

minutes afin de tuer les microorganismes qui n'ont pas pu être éliminés après rinçage à l'eau courante du robinet.

Enfin, les trois rinçages successifs de 15, 10 et 5 minutes à de l'eau désionisée stérile ont permis d'éliminer l'eau de javel et le chlorure mercurique utilisés pour la désinfection.

### II.2.1.2. Préparation des solutions de gibbérelline et application.

Une masse de 86,59 mg de gibbérelline est pesée, solubilisée dans l'éthanol 95 % et complétée à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge 250 ml. La solution stock de gibbérelline 1 mM ainsi préparée est conservée au réfrigérateur. Par la suite, des volumes de 1 ml, 5 ml et 10 ml de la solution stock d'acide gibbérellique 1 mM ont été prélevés à l'aide d'une pipette, introduit dans une fiole jaugée de 100 ml et complétées à l'eau distillée afin de préparer 100 ml des différents traitements soit 10µM, 50 µM et 100 µM respectivement.

### II.2.1.3. Ensemencement du matériel végétal

Les graines ont été mises en germination au laboratoire de Physiologie Végétale après 0 ; 3 et 16 jours de conservation. Ces graines ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri suivant un dispositif en bloc non randomisé avec 10 répétitions par traitement (Figure 6). Ces boîtes de Pétri contenaient du coton imbibé d'eau distillée et placées à l'obscurité et à température ambiante (25°C). L'arrosage à de l'eau distillée a été effectué quotidiennement et 7 jours après semis, 100µL d'acide gibbérellique a été appliqué à différentes concentrations dans chaque boîte de Pétri contenant 10 graines chacune. Le témoin n'ayant reçu que de l'eau distillée. 14 jours après semis, le taux de germination (TG) a été évalué pour chacun des lots en fonction de la durée de conservation et de la concentration en acide gibbérellique suivant la formule:

$$TG = \frac{\text{Nombre de graines ayant germées}}{\text{Nombre total de graines mises à germer}} \times 100$$

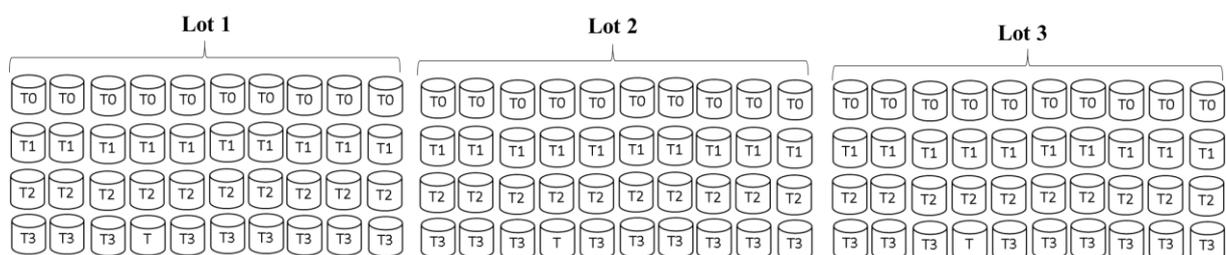


Figure 6. Schéma du dispositif expérimental.

Lot 1: 0 jour de conservation; Lot 2: 3 jours de conservation ; Lo 3: 16 jours de conservation

T0= Eau distillée (témoin); GA3; T1=10 µM GA3; T2= 50 µM GA3; T3= 100 µM GA3

### **II.2.2. Effet de l'acide gibbérellique sur la croissance des plantules.**

L'effet de l'acide gibbérellique sur la croissance des plantules a été évalué après germination. En effet, après apparition des premières folioles, les jeunes plantules ont été exposées à la lumière solaire dans des boîtes en verre et les paramètres de croissance ont été mesurés à partir de 14 jours après semis, uniquement sur les plantules du lot 1 (0 jour de conservation) après application de l'acide gibbérellique.

Ce faisant, chaque plantule a reçu 1 ml de l'acide gibbérellique tous les 7 jours et au total, trois applications ont été effectuées. Les plants témoins n'ont reçu que de l'eau distillée. L'effet de différentes concentrations de gibbérelline sur la croissance a été évalué à l'intervalle d'une semaine à partir de 14 JAS à travers la prise des variables morphologiques telles que:

- longueur de la racine principale (cm), mesurée à l'aide d'une règle graduée;
- La hauteur de la tige (cm): mesurée du collet jusqu'à la dernière feuille grace à la règle graduée.
- La surface foliaire, calculée suivant la formule de (Mouton 1966):  $S = K \times L \times l$ , où K représente le coefficient de forme dépendant de la forme de la feuille (K= 0,676 pour les feuilles ovale/ obovale); L, la longueur de la feuille et l, la largeur de la feuille mesurées à l'aide de la règle graduée.

### **II.2.3. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques chez *P. africana*.**

L'évaluation des différentes concentrations d'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques chez *P. africana* a été réalisée après transplantation des jeunes plantules dans des bacs.

#### **II.2.3.1. Préparation des solutions d'acide salicylique et application.**

Une masse de 690 mg de poudre d'acide salicylique est pesée à l'aide d'une balance de marque KERN et trempée dans l'éthanol 95% afin de permettre une bonne solubilité, puis agitée à l'aide d'un agitateur magnétique; le pH de la solution est ajusté à 7 à l'aide d'un pH-mètre. et celle-ci est complétée à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge 250 ml. La solution stock 20mM ainsi préparée est conservée au réfrigérateur. Ainsi 150 ml de chacun des traitements soit 20 µM, 200 µM, 2 mM est préparé en prélevant respectivement 150 µL; 1,5 mL et 15 ml de solution stock d'acide salicylique 20 mM.

### II.2.3.2. Transplantation et application de l'acide salicylique

Seuls les plants témoins (0  $\mu$ M GA3) du lot 1 (0 jour de conservation) ont été transplantés dans des bacs (40 cm x 30cm). En effet, la transplantation s'est effectuée 40 jours après semis, lorsque les plants avaient atteint une taille d'environ 8 à 13 cm au stade 2 à 3 feuilles. Ces bacs contenaient un substrat constitué du mélange terre- sciure dans les proportions 1:1 v/v. Les plants ont été enterrés jusqu'au collet et bornés fortement. La terre, bien tassée autour du plant pour permettre une bonne reprise. L'entretien a consisté en l'arrosage à l'eau du robinet (7h du matin et 18h le soir) et au désherbage manuel régulier. A partir de 54 jours après semis, les plantules témoins du lot 1 transplantées ont été traitées à différentes concentrations d'acide salicylique.

L'application foliaire des différentes doses d'acide salicylique (0  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 2 mM) s'est faite en matinée (7h) et a débuté au 54<sup>e</sup> jour après semis et un volume de 3 ml a été pulvérisé par plant. Par la suite, elle s'est effectuée tous les 7 jours et au total, 3 applications ont été effectuées. Les plants témoins n'ont reçu que de l'eau de robinet. A partir de 61 jours, les prélèvements ont été effectués tous les 7 jours. Au total trois prélèvements ont été effectués à raison de 10 plantules par traitement et par prélèvement.

Pour l'évaluation de l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques, 4 traitements au total et deux répétitions ont été considérés (Figure 7).

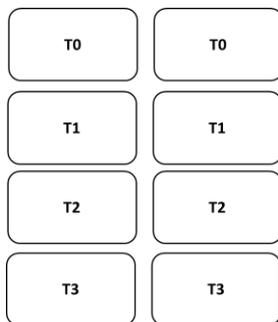


Figure 7. Schéma du dispositif expérimental

T0= eau du robinet (témoin) ; T1= 20  $\mu$ M AS; T2: 200. $\mu$ M AS ; T3= 2 mM AS

Ainsi, 3 prélèvements de tiges et feuilles ont été effectués pour chacun des quatre traitements (3x8=24 échantillons). Les échantillons de feuilles et tiges des plants prélevés ont été pesés et conservés au congélateur (0°C), afin d'évaluer ultérieurement l'effet des différentes concentrations de AS sur la teneur en composés phénoliques par extraction et dosage.

### II.2.3.3. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux a été faite suivant la méthode de (Hansen 1998) modifiée. En effet, 100 mg de matériel végétal (feuille et tige) ont été broyés à 2 ml de solution tampon constituée de méthanol et d'eau (80%) à 4 °C dans un mortier. Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un vortex et centrifugé à 4500 g pendant 20 minutes. Le premier surnageant a été recueilli dans des tubes d'épandorfs stériles correspondants et le culot quant à lui a été dilué avec 1 ml de méthanol, vortexé et centrifugé à nouveau à la même vitesse afin d'obtenir un volume important d'extrait brut. Le mélange des deux surnageants obtenus a constitué l'extrait brut de phénols totaux introduit dans les épandorfs de 1,5ml préalablement étiquetés. Les extraits ainsi obtenus ont été conservés à une température de -20 °C pour des dosages ultérieurs (Figure8.).

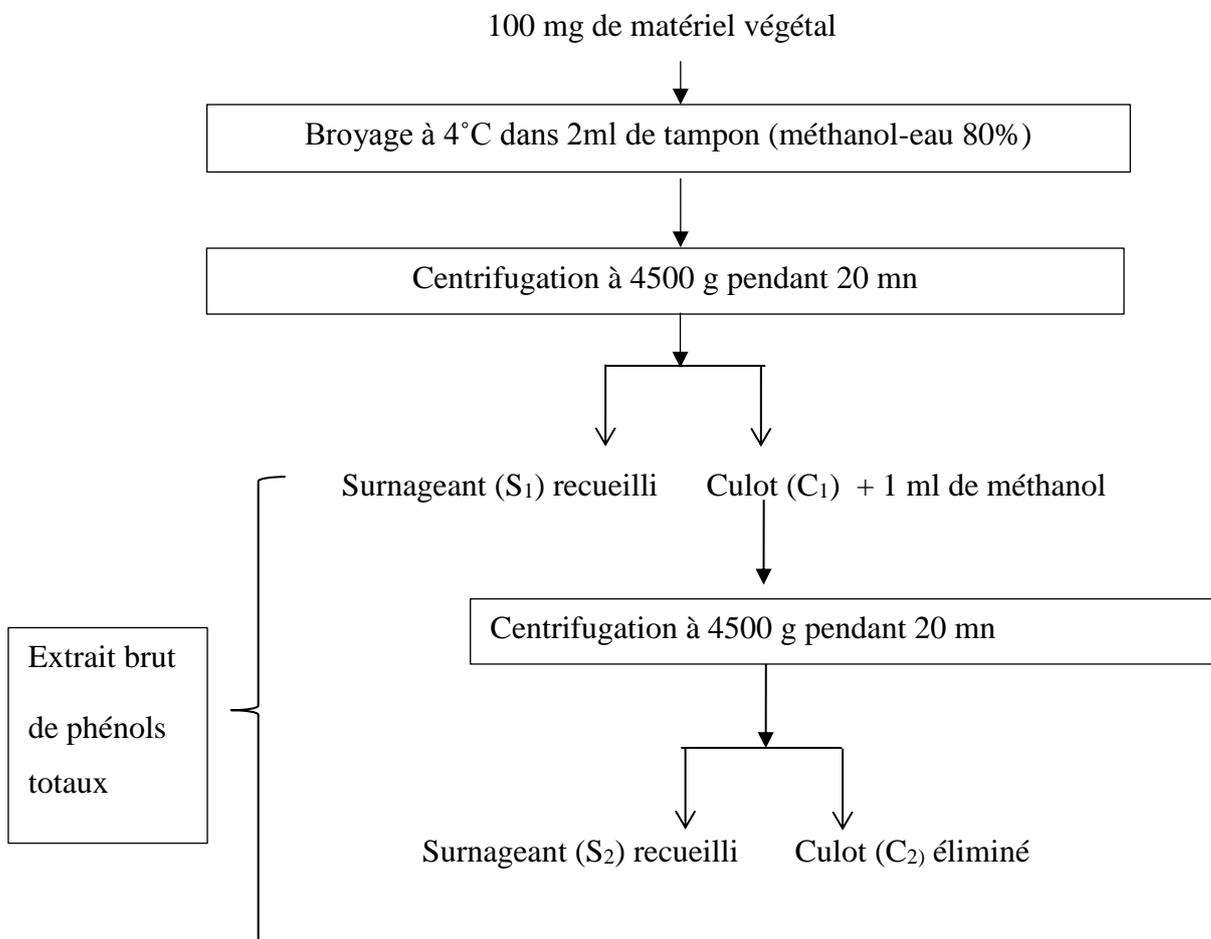


Figure 8. Protocole d'extraction des polyphénols totaux (Hansen 1998).

### II.2.3.4. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

#### ➤ Polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux dans les feuilles et tiges de *Prunus africana* a été déterminée suivant la méthode modifiée de ( Singleton et Rossi 1965) qui utilise le réactif de Folin et Ciocalteu (mélange des acides phosphomolybdique et phosphotungstique). Cette méthode est basée sur la réduction d'un chromogène phosphomolybdique-tungstenique par un antioxydant. Cette réduction entraîne la formation d'un complexe de coloration bleue qui absorbe la lumière à 725 nm. Le réactif est constitué d'un mélange phosphotungsténique et phosphomolybdique, en milieu alcalin (carbonate de sodium).

Un volume de 100 µl d'extrait phénolique est prélevé et introduit dans un tube à essai, 3,5 ml d'eau distillée, 1 ml de réactif de Folin-ciocalteu 0,2N et 1 ml de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 20 % (m/v) sont additionnés et le mélange obtenu a été incubé au bain-Marie à 40 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement, les densités optiques du complexe bleu formé ont été lues à 725nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc dans lequel l'extrait phénolique est remplacé par le méthanol 80%. Les essais ont été réalisés en triplicata et les teneurs en phénols totaux ont été exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière fraîche (mg d'EAG/g de MF) et sont déterminés à partir d'une droite d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 9).

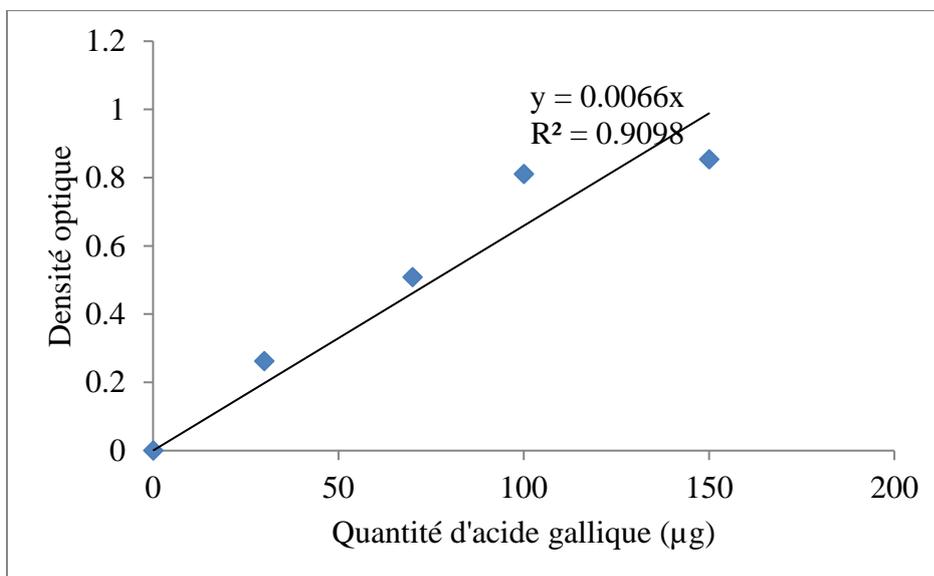


Figure 9. Droite d'étalonnage des polyphénols à partir de l'acide gallique.

➤ **Flavonoïdes totaux.**

La teneur en flavonoïdes totaux contenus dans l'extrait brut a été déterminée suivant le protocole décrit par (Kramling et Singleton 1969). En présence de formaldéhyde, les flavonoïdes contenus dans les extraits bruts précipitent et le surnageant obtenu constitue l'extrait de composés non flavonoïdes dosé selon la méthode modifiée de (Singleton et Rossi

1965) décrite précédemment. Les essais ont été réalisés en triplicata et les teneurs en flavonoïdes totaux ont été exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière fraîche (mg d'EAG/g de MF) et sont déterminés à partir de la droite d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 9).

#### **II.2.4. Analyses statistiques**

Les données collectées ont été soumises à l'analyse de la variance en utilisant le logiciel le logiciel SPSS, version 20. La comparaison des moyennes a été faite en utilisant le test de Student Newmann Keul au seuil de significativité à 5%.

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1. RESULTATS

#### III.1.1. Effet de la durée de conservation et de la concentration de gibbérelline sur la germination de *Prunus africana*.

L'évaluation de l'effet de la durée de conservation et de la concentration de gibbérelline sur la germination chez *P. africana* a nécessité la mesure du taux de germination des graines 14 jours après semis. Les analyses ont montré de grandes variabilités du taux de germination à 0 ; 3 et 16 jours de conservation (Figure11), relativement aux différentes concentrations de GA3 utilisées (Figure10).



Figure 10. Effet du temps de conservation sur la germination des graines de *P. africana* (35 jours après sémis). A: 0 jour de conservation ; B: 3 jour de conservation ; C: 16 jours de conservation

A 0 jour de conservation, les valeurs de taux de germination obtenues ont variées de 58 (0 $\mu$ M GA3) à 76 % (10  $\mu$ M GA3) avec une moyenne de 66.75 %. A 3 jours de conservation, ces valeurs ont variées de 37 (0 $\mu$ M GA3) à 52.5 % (50  $\mu$ M GA3), avec une moyenne de 47.88 %, comparativement à 16 jours de conservation, ou ces valeurs ont variées de 22 (0 $\mu$ M GA3) à 54 % (10  $\mu$ M GA3), montrant une moyenne de 37 %.

De manière générale, on note une diminution du taux de germination chez les graines de *P. africana*, proportionnellement à la durée de conservation. En outre, l'application de l'acide gibbérellique a stimulé la germination des graines de *P. africana*. Ce faisant, le traitement [10 $\mu$ M] GA3 s'est montré le plus efficace à 0 jour et à 16 jours de conservation, comparativement au traitement [50 $\mu$ M] GA3 qui a été meilleur à 3 jours de conservation.

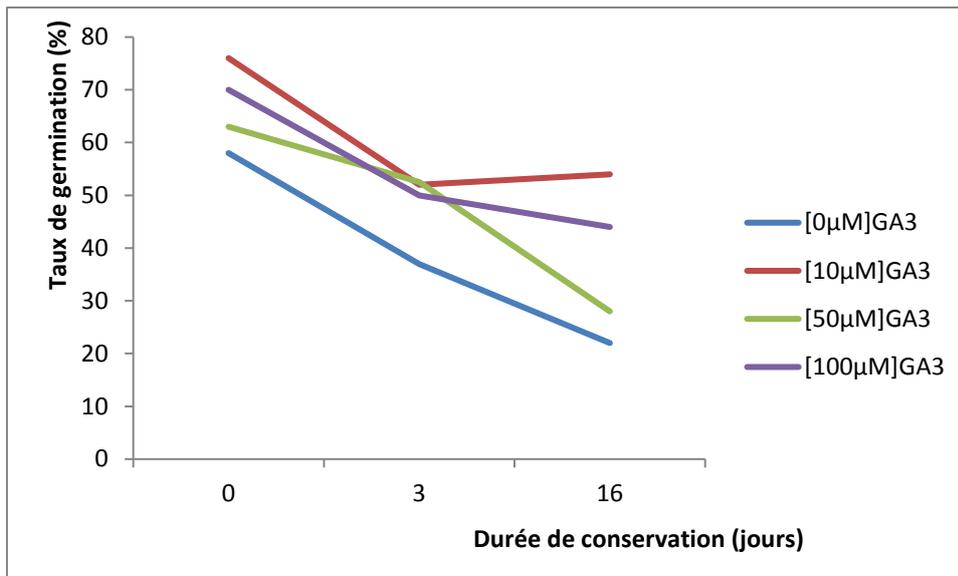


Figure 11. Effet du temps de conservation et de l'acide gibbérellique sur la germination des graines de *P. africana*

### III.1.2. Effet de la gibbérelline sur la croissance des plantules de *P. africana*.

Afin d'évaluer l'effet de la gibbérelline sur la croissance des plantules de *P. africana*, trois variables telles l'élongation racinaire, la taille de la tige et la surface foliaire ont été mesurées.



Figure 12. Effet de l'acide gibbérellique sur la croissance des plantules de *P. africana*.

T0= 0 μM GA3; T1=10 μM GA3; T2= 50 μMGA3; T3= 100 μM GA3

L'analyse de la variance a montré des différences significatives entre les différentes concentrations de GA3, pour toutes les variables évaluées en fonction du temps (Tableau 3).

Tableau 3. Carré moyen issu de l'analyse de la variance des paramètres évalués

Source de Variation	ddl	J14RAC	J14TIG	J21RAC	J21TIG	J28RAC	J28TIG	J35SFO
Traitements	3	0.892*	0.651*	1.758*	5.067*	4.292*	44.492*	1.825*
Erreur		0.08	0.19	0.10	0.14	0.13	0.33	0.12

SV: source de variation, ddl : degré de liberté; \* : significatif à  $P < 0,05$ ; J14RAC, J21RAC, J28RAC: élongation racinaire respectivement à 14, 21 et 28 jours après semis; J14TIG, J21TIG, J28TIG: taille de tige respectivement à 14, 21 et 28 jours après semis, J35SFO: Surface foliaire a 35 jours après semis.

### III.1.2.1. Longueur des racines.

Les différentes concentrations de GA3 (T0= 0  $\mu\text{M}$  GA3; T1=10  $\mu\text{M}$  GA3; T2= 50  $\mu\text{M}$ GA3; T3= 100  $\mu\text{M}$  GA3) ont présentées une importante variabilité pour l'élongation racinaire (Figure 13).

A 14 jours après semis (JAS), les résultats obtenus de la longueur des racines montrent une variation des moyennes comprise entre 0,30 (T0) et 1,00 (T1). Malgré la différence de moyenne observée, les résultats indiquent que les traitements T0 (0,30), T2 (0,80) et T3 (0,60) n'ont pas présenté de différence significative entre eux. De même, aucune différence n'a été observée entre les différentes doses d'acide gibbérellique testées (T1, T2 et T3). Toutefois, une différence significative est observée entre T0 et T1.

A 21 JAS, les données obtenues de la longueur des racines varient de 0,30 (T0), 1,30 (T1), 0,60 (T2) et 0,70 (T3). Aucune différence significative n'est observée entre le témoin et les traitements à l'exception de T1 chez qui on observe un meilleur développement des racines.

A 28 JAS, on note une différence significative entre le témoin (0,40) et tous les autres traitements, mais aucune différence entre les doses de GA testées soit T1 (1,80), T2 (1,60) et T3 (1,70).

Les résultats obtenus de la longueur des racines en fonction du temps et des différentes doses de gibbérelline montrent qu'il existe une différence significative au seuil de 5 % entre les traitements comparativement au témoin, ceci se traduisant par les faibles valeurs obtenues pour les plantes non traitées comparativement aux plantes traitées.

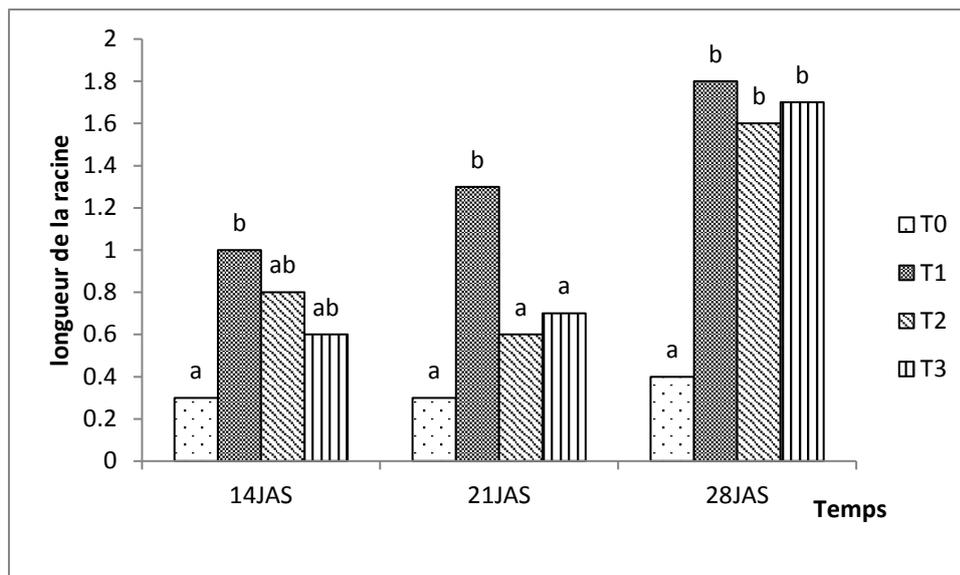


Figure13. Effet des différentes doses de gibbérelline sur la longueur des racines.

Chaque histogramme représente la moyenne obtenue pour 30 plantules et les comparaisons sont faites par rapport au témoin

T0= Eau distillée (témoin); GA3; T1=10 µM GA3; T2= 50 µM GA3; T3= 100 µM GA3

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0,05$ )

### III.1.2.2. Elongation de la tige.

Les résultats obtenus de l'évolution de la taille en fonction du temps et en fonction des différentes concentrations de GA3 montrent de manière générale des valeurs faibles enregistrées pour les plantes non traitées (T0) comparativement aux plantes traitées qui ont montrées des valeurs élevées (Figure 14). Entre 14 et 28 JAS, la taille des plants de *P. africana* évolue de manière croissante.

A 14 JAS, la taille varie entre 1,17 (T0) et 2,00 (T2); toutefois, malgré la différence de moyenne observée, l'analyse des variances au seuil de 5 % indique qu'il n'existe aucune différence significative entre les traitements T1 (1,80), T2 (2,00) et T3 (1,83) d'une part et le témoin (1,17) d'autre part.

A 21 JAS, les valeurs de la taille des plantes chez les différents traitements sont 1,30 (T0) 2,70 (T1) 2,30 (T2) 2,90 (T3). Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements T1, T2 et T3 qui ont montré la même efficacité sur le développement de la tige indépendamment de la dose de gibbérelline appliquée. Cependant, une différence significative est observée entre ces traitements d'une part et le traitement T0 d'autre part.

A 28JAS, les valeurs obtenues sont 3,00 (T0) 7,10 (T1) 6,80 (T2) 7,60 (T3). Les valeurs de taille les plus faibles ont été enregistrées chez le traitement T0. Tout comme à 21JAS, les analyses statistiques montrent une différence significative entre le témoin T0 et les

traitements T1, T2 et T3. Malgré la différence de moyenne observée, l'analyse des variances indique qu'il n'existe aucune différence entre les traitements T1, T2 et T3.

Ces résultats traduisent que les doses de gibbérelline testées contribuent à stimuler l'augmentation de la taille des plantules.

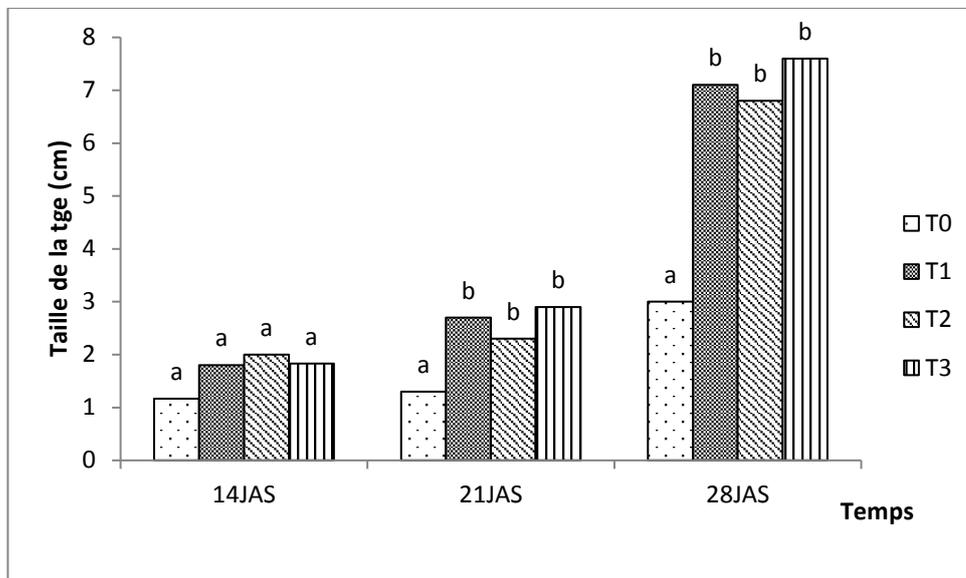


Figure14. Effet des différentes doses de gibbérelline sur la taille des plants.

Chaque histogramme représente la moyenne obtenue pour 30 plantules et les comparaisons sont faites par rapport au témoin

T0= Eau distillée (témoin); GA3; T1=10  $\mu$ M GA3; T2= 50  $\mu$ M GA3; T3= 100  $\mu$ M GA3

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents à (P <0,05)

### III.1.2.3. Surface foliaire.

Les résultats obtenus de l'évolution de la surface foliaire en fonction des différentes doses testées montrent une très grande variabilité (tableau 4).

Les valeurs de surface foliaire les plus faibles ont été obtenues pour les traitements T3 (100  $\mu$ M), tandis que les valeurs les plus élevées ont été enregistrées chez les plants ayant reçus la dose de 10  $\mu$ M (T1). Malgré les différences de moyenne observées les analyses statistiques indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre le témoin (2,53) et le traitement T2 soit 50  $\mu$ M (3,39), cependant, une différence significative au seuil de 5% entre T0 (2,53), T1 (4,32) et T3 (1,44).

Tandis que T1 (10  $\mu$ M) permet une amélioration de la surface foliaire comparativement au témoin, on note plutôt une diminution de la surface foliaire chez T3. Le meilleur traitement est donc T1. On note des réponses différentes des plantules aux différentes doses appliquées signifiant que la dose de gibbérelline influence le développement foliaire.

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que la gibbérelline améliore le développement foliaire pour de faible dose (10µM), tandis que les doses élevées ont pour conséquence une inhibition du développement foliaire (100µM). Quant à la dose 50µM, elle est sans effet sur le développement foliaire chez les plantules de *Prunus africana*. En définitive, le meilleur traitement est T1 (10µM) en raison du bon développement foliaire observé.

Ainsi, de faibles valeurs de gibbérelline (T1) permettent un bon développement foliaire; à contrario, les doses élevées (100 µM) inhibent le développement foliaire.

Tableau 4. Effet des traitements sur la surface foliaire.

Traitements	code	Surface foliaire (cm <sup>2</sup> )
Témoin	T0	2.53 ± 2.16 b
[10µM] GA3	T1	4.32 ± 3.25 c
[50µM] GA3	T2	3.39 ± 2.75 bc
[100µM] GA3	T3	1.44 ± 1.09 a

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents à (P <0,05)

### III.1.3. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

L'analyse des variances de l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux dans les feuilles et tiges de *P. africana* a montré une importante variabilité entre les différents traitements (Tableau 5 et 6).

Tableau 5. Carre moyen issu de l'analyse de la variance des polyphénols totaux dans les feuilles et tiges

Source de Variation	ddl	PPTF61JAS	PPTF68JAS	PPTF75JAS	PPTT61JAS	PPTT68JAS	PPTT75JAS
Traitements	3	1*	1.889*	4.75*	0.667*	8.444*	7.778*
Erreur		0.15	0.23	0.35	0.21	0.50	0.43

ddl : degré de liberté; \* : significatif à P < 0,05; PPTF61JAS, PPTF68JAS, PPTF75JAS: Teneur en polyphénol totaux dans les feuilles respectivement à 61, 68 et 75 jours après semis; PPTT61JAS, PPTT68JAS, PPTT75JAS: Polyphénol totaux dans les tiges respectivement à 61, 68 et 75 jours après semis

Tableau 6. Carre moyen issu de l'analyse de la variance des flavonoïdes totaux dans les feuilles et tiges

Source de Variation	ddl	FLAF61JAS	FLAF68JAS	FLAF75JAS	FLAT61JAS	FLAT68JAS	FLAT75JAS
Traitements	3	0.0833	0.889*	0.08	0.00	0.11	4.556*
Erreur		0.08	0.17	0.08	0.00	0.11	0.34

ddl : degré de liberté; \* : significatif à  $P < 0,05$ ; FLAF61JAS, FLAF 68JAS, FLAF 75JAS: Teneur en flavonoïde totaux dans les feuilles respectivement à 61, 68 et 75 jours après semis; FLAT61JAS, FLAT 68JAS, FLAT 75JAS: flavonoïde totaux dans les tiges respectivement à 61, 68 et 75 jours après semis.

L'effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes chez *P. africana* a été évalué dans les tiges et feuilles, à partir de 61 jours après semis lorsque les plantules avaient été transplantées dans des bacs (Figure 15).

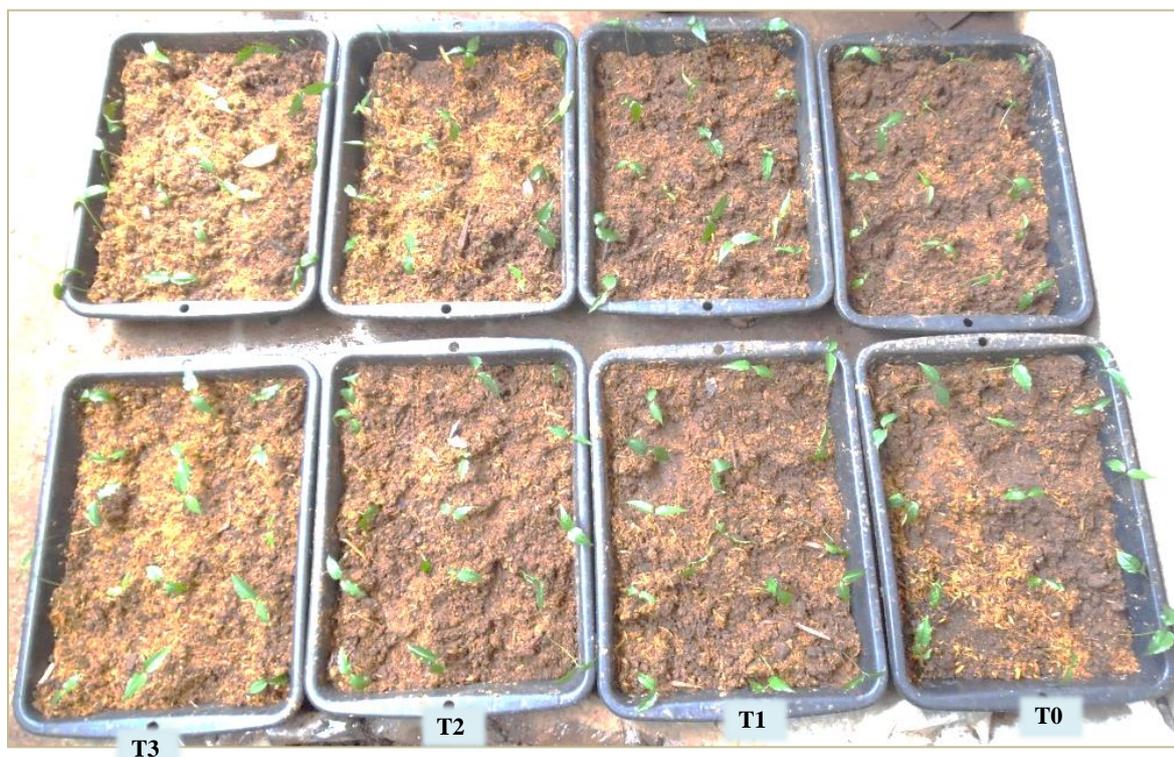


Figure15. Plants de *Prunus africana* transplantés (40 JAS).

T0= Eau du robinet (témoin) ; T1= 20  $\mu\text{M}$  AS; T2: 200. $\mu\text{M}$  AS ; T3= 2 mM AS

### III.1.3.1. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles de *Prunus africana*.

Les résultats obtenus de la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles des jeunes plantules de *P. africana* montrent de manière générale une augmentation de la teneur en polyphénols totaux chez chacun des traitements au fil du temps (Figure 16).

A 61JAS les teneurs varient entre (2,87) et (3,86). De faibles valeurs sont observées chez le témoin. De plus, les analyses statistiques montrent une différence entre le témoin et les traitements à l'exception de T1 (2,94). Ainsi, à 61JAS, avec l'augmentation de la concentration de l'acide salicylique de 20 $\mu$ M à 2 mM, on obtient une amélioration de la teneur en composés phénoliques qui passe de 2,94 à 3,68mg/g PF. De fortes teneurs étant obtenues pour de fortes concentrations. Ainsi, de fortes doses permettent une forte accumulation des composés phénoliques au niveau des feuilles.

A 68JAS, teneurs obtenues sont de (3,33), (4,67), (3) et (2,87) respectivement pour T0, T1, T2 et T3. Les plus faibles valeurs correspondent aux fortes concentrations; cependant, les analyses statistiques indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre T0, T2 et T3. Seule la plus faible dose (T1 (20 $\mu$ M) permet alors une amélioration de la teneur en composés phénoliques. Lorsque la concentration d'acide salicylique augmente de 20  $\mu$ M à 2mM, la teneur en phénols totaux baisse de 4,67 mg/g à 3mg/g.

A 75JAS, la tendance est contraire, car de fortes valeurs sont obtenues plutôt chez les plantules non traitées. De plus, il existe une différence significative entre le témoin et les traitements. Les valeurs de teneurs en phénols totaux obtenus sont de (5,67), (2,67) et (4). (4,67) respectivement pour T0, T1, T2 et T3.

La teneur en phénols totaux augmente avec l'augmentation de la concentration en AS. L'application d'AS améliore l'accumulation des composés phénoliques. Cependant, la réponse de la plante dépend non seulement de la dose appliquée, mais aussi et surtout du stade de croissance, ainsi, chez les plus jeunes plantules (âgées de 61-68 jours), de fortes teneurs en phénols totaux sont obtenues chez les plants traités. A 61JAS, les fortes doses se sont montrées favorables (200 $\mu$ M et 2mM) tandis que à 68JAS, la dose (20 $\mu$ M) permet une meilleure accumulation des phénols totaux. Par contre, chez les plantules plus âgées, (75jours), une meilleure accumulation est observée chez les plants non traités,. Ces résultats traduiraient que la plante synthétise naturellement les composés phénoliques, cette synthèse augmente graduellement au fil du temps. Toutefois, dans ses stades les plus jeunes, un apport en AS favorise l'accumulation rapide en composés phénoliques.

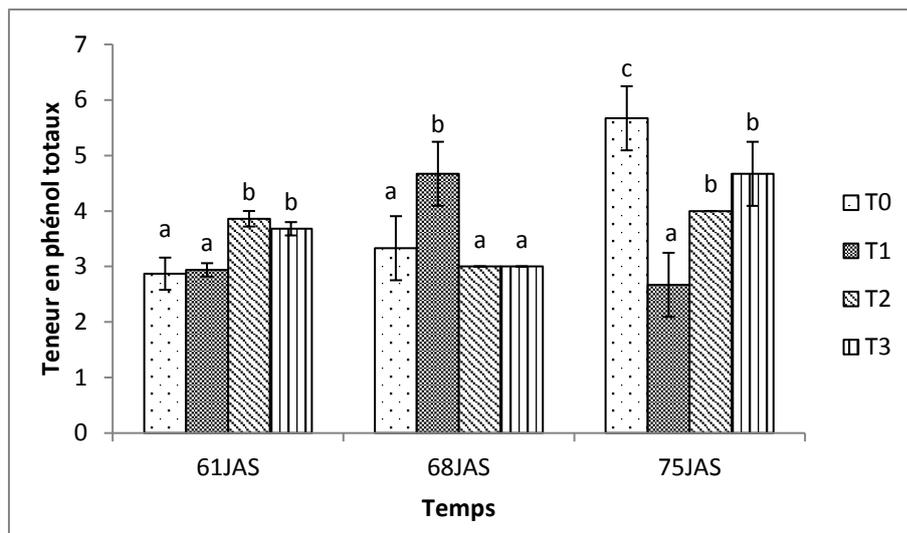


Figure 16. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles.

Chaque histogramme représente la teneur moyenne obtenue à l'issue de trois répétitions et les comparaisons sont faites par rapport au témoin

T0= eau du robinet (témoin) ; T1= 20  $\mu$ M AS; T2: 200  $\mu$ M AS ; T3= 2 mM AS

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents à ( $P < 0,05$ )

### III.1.3.2. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux dans les tiges de *Prunus africana*.

Les résultats obtenus de la teneur en phénols totaux dans les tiges des jeunes plantules de *Prunus africana* montrent de manière générale une augmentation de la teneur en phénols totaux chez chacun des traitements au fil du temps (figure 17).

A 61JAS les moyennes obtenues sont de 3,67 mg/g PF; 6,67 mg/g PF ; 6 mg/g PF et 3 mg/g PF respectivement pour T0, T1, T2 et T3. De faibles valeurs sont observées chez le témoin. De plus, les analyses statistiques montrent une différence entre le témoin et les traitements à l'exception de T3 (3). Ainsi, à 61JAS, avec l'augmentation de la concentration de AS de 20  $\mu$ M à 2mM, la teneur en composés phénoliques baisse de 6,67 à 3 mg/g PF. De fortes teneurs étant obtenues pour les concentrations les plus faibles (20  $\mu$ M et 200  $\mu$ M).

A 68JAS, teneurs obtenues sont de (3,33), (5,33), (2) et (5,33) respectivement pour T0, T1, T2 et T3. Les plus faibles valeurs correspondent à T0 et T2. Les analyses statistiques indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre T1 et T3 qui ont permis une augmentation significative de la teneur en phénols totaux.

A 75JAS, de fortes teneurs en phénols totaux sont obtenues chez les traitements T0 (8,33), T2 (9), et T3 (8). La plus faible valeur est obtenue chez le traitement T1. On note des différences significative entre les diverses doses testées. La meilleure dose étant 200  $\mu$ M. Les analyses statistiques montrent qu'il n'existe pas de différence significative entre le témoin

d'une part, et les traitements T2 et T3 d'autre part. On note en outre, une augmentation significative de la teneur en phénol avec l'augmentation de la concentration. Lorsque la concentration d'acide salicylique augmente de 20  $\mu\text{M}$  à 2mM, la teneur en phénols totaux augmente de 5,33 mg/g à 8 mg/g.

La teneur en phénols totaux augmente avec l'augmentation de la concentration en acide salicylique.

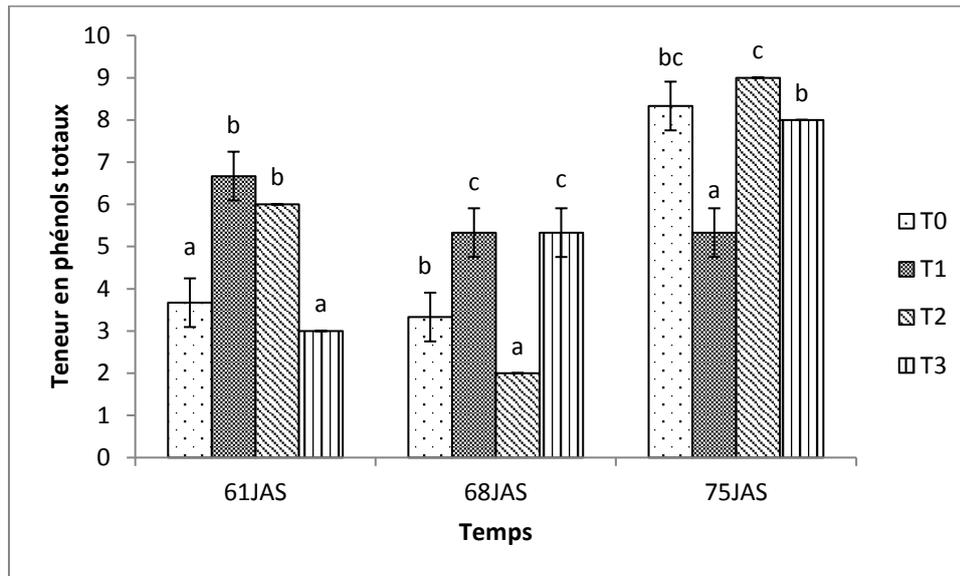


Figure 17. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en polyphénols totaux dans les tiges.

Chaque histogramme représente la teneur moyenne obtenue à l'issue de trois répétitions et les comparaisons sont faites par rapport au témoin

T0= eau du robinet (témoin) ; T1= 20  $\mu\text{M}$  AS; T2= 200.  $\mu\text{M}$  AS ; T3= 2 mM AS

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents à ( $P < 0,05$ )

### III.1.3.3. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en flavonoïdes totaux dans les feuilles de *Prunus africana*.

L'augmentation de la teneur en flavonoïdes est flagrante chez les plantules au fil du temps pour tous les traitements, au début et à la fin de l'expérimentation, on note des valeurs légèrement plus élevées chez le traitement témoin (Figure 18).

A 61JAS, les moyennes obtenues sont de 1,33mg/ g PF; 1 mg/ g PF; 1 mg/ g PF; 1mg/ g PF respectivement pour les traitements T0, T1, T2 et T3. Malgré la légère différence observée, les résultats indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre le témoin et les autres traitements.

A 68JAS, on note une baisse de la teneur en flavonoïdes chez le témoin qui passe de 1,33 à 0,33. Cependant celle-ci reste inchangée chez T1 et T2, et augmente chez T3 de 1 à

1,67. Malgré les différences de moyennes observées, les analyses statistiques signalent qu'il n'existe pas de différence significative entre le témoin et les traitements à l'exception de T3. De même, aucune différence entre les doses testées (T1, T2 et T3) n'a été observée. De faibles teneurs en flavonoïde ont été obtenues en T0, tandis que T3 a présenté de fortes teneurs.

A 75JAS, aucune différence n'est observée entre les traitements, cependant on note, tout comme à 61JAS, une teneur légèrement élevée pour les plants non traités.

Les doses d'acide salicylique testées n'ont pas permis une amélioration de la teneur en flavonoïdes dans les feuilles des jeunes plantules de *P. africana*.

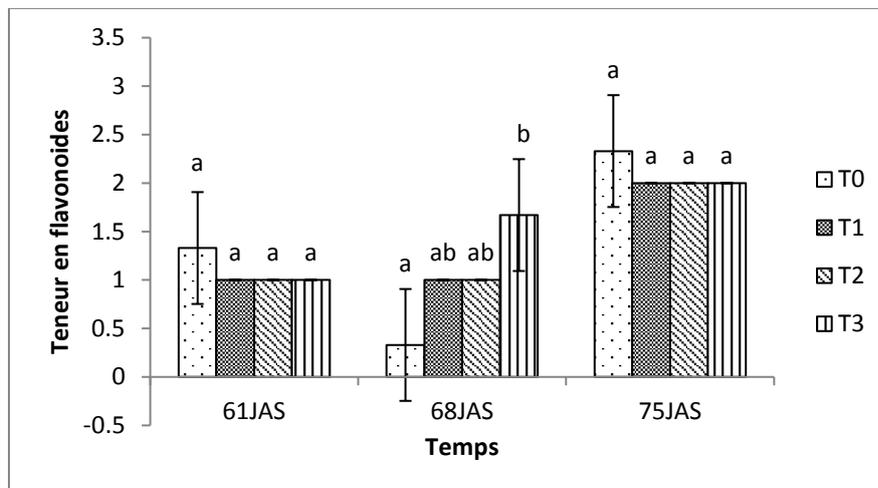


Figure 18. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en flavonoïdes totaux dans les feuilles.

Chaque histogramme représente la teneur moyenne obtenue à l'issue de trois répétitions et les comparaisons sont faites par rapport au témoin

T0= eau du robinet (témoin) ; T1= 20 µM AS; T2: 200,µM AS ; T3= 2 mM AS

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents à ( $P < 0,05$ )

#### III.1.3.4. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en flavonoïdes totaux dans les tiges

L'effet de l'acide salicylique a montré une variabilité importante entre les différents traitements pour la teneur en flavonoïde dans les tiges de *P. africana* (Figure 19).

A 61 et 68JAS, malgré les différences de moyennes observées, les analyses statistiques permettent d'affirmer qu'aucune différence significative n'est notée entre le témoin et les différentes doses d'acide salicylique testées.

Cependant, à 75JAS, on note de forte teneur en flavonoïdes chez le traitement témoin (4,33mg/g) tandis que les faibles doses sont observées chez les plants traitées à l'acide salicylique. De plus, les analyses statistiques confirment qu'il existe une différence significative entre le témoin et les doses testées d'acide salicylique, toutefois aucune

différence notable n'est signalée quant 'aux différentes doses testées, soit T1 (2 mg/g), T2 (1,67 mg/g) et T3 (2 mg/g).

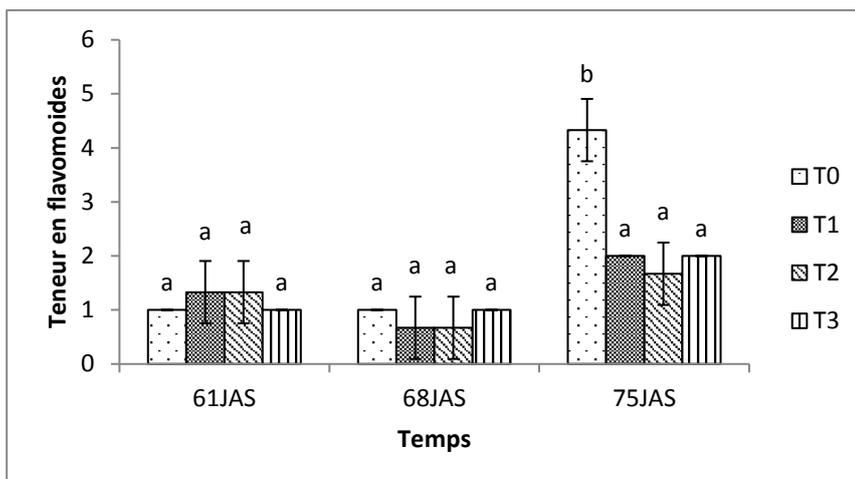


Figure19. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en flavonoïdes totaux dans les tiges.

Chaque histogramme représente la teneur moyenne obtenue à l'issu de trois répétitions et les comparaisons sont faites par rapport au témoin

T0= eau du robinet (témoin) ; T1= 20 µM AS; T2: 200,µM AS ; T3= 2 mM AS

Les traitements suivis des lettres différentes sont significativement différents à (P <0,05)

### III.2. Discussion

A l'effet de contribuer à l'amélioration de la production des composés phénoliques chez *P. africana*, l'évaluation de l'effet du temps de conservation et de l'acide gibbérellique (GA3) sur la germination des graines et la croissance des plantules a été premièrement effectuée. De plus, l'acide salicylique a été utilisé afin d'évaluer son effet sur la teneur en composés phénoliques.

Les résultats montrent une diminution du taux de germination en fonction de la durée de conservation. Ces résultats sont similaires aux données rapportées par (Ondigui 2001), qui atteste que les graines de *Prunus africana* sont récalcitrantes et perdent rapidement leur pouvoir germinatif lorsqu'elles sont conservées. Par ailleurs, la germination a été mieux stimulée par la dose de 10  $\mu\text{M}$  (GA3). De même, (Getahun 2011) a étudié l'effet de différentes concentrations de GA3 (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , et 0,1  $\mu\text{M}$ ) sur la germination des graines de *Ficus capensis* et a obtenu un meilleur taux de germination à la dose de 10  $\mu\text{M}$ .

En outre, les différentes concentrations de GA3 ont permis une amélioration de la croissance des plants de *Prunus africana*. Ces résultats montrent une amélioration de l'allongement des racines suite à l'application de gibbérelline. En effet, l'appauvrissement en GA3 artificiel provoque une dilatation anormale et une suppression de l'allongement des racines (Tanimoto 2005). De plus, ces résultats obtenus sont similaires à ceux de (Bidadí *et al.* 2010) qui ont montré que l'application de 5 à 10  $\mu\text{L}$  au niveau de l'apex de la tige améliore l'élongation de la racine primaire chez les plants de *Arabidopsis thaliana* cultivés sur milieu Murashige et Shook (MS).

Les résultats obtenus montrent que l'application de gibbérelline permet une amélioration de la taille des plantules de *Prunus africana*, ce résultat est conforme à ceux obtenus par (Leite *et al.* 2003) qui ont étudié l'effet de GA sur la croissance végétative du soja cultivé en pot et ont montré que l'application de GA3 foliaire [100 mg/L] permet une augmentation de la hauteur de la plante, hauteur des entrenœuds et diamètre de la tige. Aussi il est à noter que l'amélioration de la taille a été observée chez les plantules indépendamment de la dose testée. A contrario, lors d'une étude menée par (Zalewska et Antkowlak 2013) sur les plants de *Ajania pacifica*, la dose de GA3 [500mg /dm<sup>3</sup>] a permis un meilleur allongement des tiges comparativement à [GA3 250mg/ dm<sup>3</sup>]. On note également une élongation plus importante de la tige chez les plants ayant reçus trois applications de GA3, comparativement au témoin et à ceux n'ayant reçus qu'une seule application (Zalewska et Antkowlak 2013).

En outre, un meilleur développement foliaire a été observé chez les plantules ayant reçues le traitement T1 (10  $\mu$ M). Le traitement T2 (50  $\mu$ M) s'est montré inefficace tandis que la dose 100  $\mu$ M (T3) a eu une action inhibitrice. Ce résultat est contradictoire à celui de (Leite *et al.* 2003), qui ont obtenu une augmentation de la surface foliaire suite à l'application de GA<sub>3</sub> foliaire [100 mg /L], contrairement à l'application de GA [50mg /L] sur les semences de soja qui a entraîné une diminution de la surface foliaire. Les résultats montrent un contraste entre les doses testées, pouvant s'expliquer par le fait qu'en plus des doses appliquées, la plante tout d'abord, produit naturellement et à faible dose de la gibbérelline dont elle a besoin. La gibbérelline étant un régulateur de croissance agissant à faible dose, un apport en faible quantité peut être favorable. Cependant, de fortes doses de gibbérelline sont plutôt néfastes pour la plante et ne sont donc pas nécessaire, ou mieux encore inhibe le développement.

Par ailleurs, les phénols totaux s'accumulent plus au niveau de la tige comparativement aux feuilles. L'acide salicylique (AS) améliore la synthèse des composés phénoliques chez *P. africana* dans les stades les plus jeunes de la plante (stade deux feuilles). Or pour des plants plus âgés (stade 3 à 4 feuilles), on note de forte teneur chez le témoin. De manière générale, lorsque la concentration en AS augmente de 20 $\mu$ M à 2mM, la teneur en polyphénols totaux augmente également, sauf à 68JAS où la teneur baisse avec l'augmentation de la concentration. Ainsi, l'effet de l'acide salicylique dépend de la dose testée et de l'âge de la plante. De même, (Shraiy et Hegazi 2009) ont démontré que l'effet de l'acide salicylique sur les processus physiologiques des plantes varie selon les espèces, le stade de développement, la concentration de AS et les conditions environnementales. Parallèlement, ( Ghasemzadeh et Jaafar 2012), ont obtenu de fortes teneurs en polyphénols totaux chez les plants traités, à contrario, lorsque la concentration en AS augmente la teneur en phénols totaux diminue).

Par ailleurs, (Dong *et al.* 2010) ont montré que AS (3,125 à 50 mg/l) améliore la production en composés phénoliques chez les cultures cellulaires de *Salvia miltiorrhiza* dépendamment de la dose et de la durée après traitement. De faibles doses permettent une amélioration tandis que de fortes doses entraînent une baisse de la teneur en phénols totaux.

De plus, (Amin *et al.* 2007) ont montré que l'application foliaire de concentrations faibles et modérées de AS (50 et 100mg/l) sont plus efficaces que les fortes doses car permettent une plus forte accumulation en phénols totaux chez les bulbes d'*Allium cepa*, comparativement aux fortes concentrations (200mg/l).

Les résultats obtenus montrent que les différentes doses d'acide salicylique testées ne permettent pas une amélioration de la teneur en flavonoïdes. On note bien au contraire au

niveau des tiges une meilleure accumulation des flavonoïdes chez les plants témoin. De même, (Ghasemzadeh et Jaafar 2012) suite à l'application de l'acide salicylique ( $10^{-3}$  M et  $10^{-5}$  M) ont obtenus de forte teneur en flavonoïdes totaux chez *Zingiber officinale* chez les plants témoin cultivés en serre. Par contre, (Ali *et al.* 2007) ont plutôt obtenus de fortes teneurs en flavonoïdes suite à l'application de AS (200 $\mu$ M) chez les suspensions cellulaires des racines de *Panax ginseng* et une augmentation parallèle de la teneur en flavonoïdes et en phénols totaux. L'augmentation de la teneur en phénols totaux due à AS (chez les plants traités) résulterait de l'augmentation non pas en flavonoïdes, mais en composés non flavonoïdes.

## CHAPITRE IV : IMPLICATION DU SUJET SUR LE SYSTEME EDUCATIF

### IV.1. INTERET DIDACTIQUE

*Prunus africana* (Hook.f.) Kalman est une essence forestière connue pour les propriétés médicinales de son écorce ; qui est utilisée pour le traitement de l'hypertrophie de la prostate et de l'hyperplasie prostatique bénigne. Au Cameroun, cette espèce est menacée de disparition. Cette menace trouve son explication dans la forte pression exercée sur la ressource et l'exploitation non durable de l'écorce pour le commerce international de plantes médicinales.

Les manipulations effectuées sont essentielles car permettent aux élèves des lycées et collèges de l'enseignement général, d'apprendre à observer, à émettre des hypothèses, recueillir des résultats, les confronter, les interpréter et de dégager des conclusions. Ceci correspondant aux objectifs fixés en classes de seconde A et C, à savoir développer chez l'apprenant le raisonnement scientifique, l'exploitation des graphiques. Celui-ci sera également capable de gérer rationnellement son environnement et ce, de façon responsable.

Le présent travail s'inscrit dans le programme officiel des classes de S<sup>nde</sup> A et C et a permis de mettre en exergue des notions développées dans les programmes officiels :

- Les biotechnologies qui permettent d'améliorer la production des composés utiles à l'homme

- L'éducation environnementale : l'Homme doit apprendre à gérer ses ressources naturelles, celles-ci n'étant pas inépuisables.

Ce document pourra également servir de support contenant des protocoles de germination de *Prunus africana*, ainsi que pour l'extraction et le dosage des composés phénoliques.

L'intérêt pédagogique ayant été relevé, une fiche pédagogique de préparation de leçon a été élaborée pour la classe de 2<sup>nde</sup> de l'enseignement secondaire général.

## IV.2. FICHE PEDAGOGIQUE DE PREPARATION

<b>ETABLISSEMENT:</b>	Lycées et Collèges de l'Enseignement Secondaire Général	<b>Nom et Prénom de l'enseignant: TCHUINGUEM TAMO Michèle</b>	
<b>THEME :</b>	ORGANISATION FONCTIONNELLE DES VEGETAUX CHLOROPHYLLIENS :	<b>Matricule: 07S357</b>	
<b>CHAPITRE :</b>	CHAPITRE VI : RESULTATS DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE : LA PRODUCTION VEGETALE	<b>Date :</b>	
<b>TITRE DE LA LEÇON :</b>	BIOTECHNOLOGIE ET AMELIORATION DE LA TENEUR EN COMPOSES BIOCHIMIQUES DES PLANTES.	<b>Classe :</b>	S <sup>nd</sup>
		<b>Effectif :</b>	<b>G : F :</b>
		<b>Durée :</b>	1h
		<b>Période :</b>	
<b>Objectif(s) Pédagogique(s) Opérationnel(s) :</b>	<p><b>OPO :</b> A l'issue de la leçon de SVTEEHB portant sur Biotechnologie et amélioration de la production des composés biochimiques des plantes, chaque élève de la classe de S<sup>nd</sup> sera capable de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Dire comment peut-on obtenir des plants à partir des graines.</li> <li>-Déterminer l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés biochimiques chez les plantes.</li> <li>-Relever l'importance des composés phénoliques.</li> </ul>		

**Domaine :** Sciences de la Vie et de la Terre de l'Education à l'Environnement, Hygiène et Biotechnologie (SVTEEHB)

<b>ETAPES</b>	<b>Objectifs Pédagogique Intermédiaire (O.P.O.I)</b>	<b>Contenus Spécifiques aux O.P.O.I.</b>	<b>Matériels ou Supports Didactiques</b>	<b>Activités D'enseignement / apprentissage</b>	<b>Evaluation de l'atteinte des OPOI</b>	<b>DUREE</b>
<b>I N T R O D U C T I O N</b>	1. Etablir le contrat professeur-élèves	-Dire comment peut-on obtenir des plants à partir des graines. -Déterminer l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés biochimiques chez les plantes. -Relever l'importance des composés phénoliques		-Ecriture du titre de la leçon au tableau ; -Communication des objectifs aux apprenants ; -Prise de notes par les apprenants		10 minutes
	2. Vérifier les prérequis : mobiliser les ressources (savoir-faire, savoir-être)	-Biotechnologie : Ensemble de techniques appliquées aux êtres vivants (animaux et végétaux) pour la production des biens et services  -Agent stimulateur : substance utilisée pour accroître la production.	-Cours et apprentissages précédents -vécu quotidien	-Pose les questions de l'évaluation diagnostique. réfléchir et répond aux questions procéder à une évaluation diagnostique si nécessaire. -rémediation si nécessaire.	- Définir -Biotechnologie -Agent stimulateur	
	3. déterminer l'intérêt de la leçon	L'intérêt de cette leçon est de prendre connaissance d'une technique d'amélioration de la teneur en composés biochimiques	tavernier -vécu quotidien	Brainstorming / échanges		

		chez les plantes.			
	4. Formuler le(s) problème(s) scientifiques et émettre les hypothèses	<p>Le bien-être de l'homme nécessite une bonne nutrition et une bonne santé. Les plantes constituent la matière première dans l'industrie pharmaceutique.</p> <p>De nombreuses plantes présentes dans notre environnement produisent des substances utiles pour le traitement de nombreuses maladies. Malheureusement leur production naturelle par la plante reste faible pour répondre à la forte demande.</p> <p><b>Problème scientifique:</b> Comment améliorer la production des substances utiles chez les plantes ?</p> <p><b>Hypothèse:</b> en stimulant la plante</p>	Situation contextualisée	<p>-poser aux apprenants, des questions, qui les amènent à identifier et à formuler le problème scientifique</p> <p>-identifient et formulent les problèmes scientifiques ainsi que des hypothèses vérifiables</p>	<p>-Quel est le problème scientifique ?</p> <p>-Quelles hypothèses pouvons-nous formuler?</p>



	<p>-Déterminer l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés biochimiques</p>	<p><b>VI.2 Effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques</b></p> <p>l'acide salicylique améliore la teneur en composés phénoliques chez <i>Prunus africana</i></p>	<p>Document2</p>	<p><b>Activité 2 :</b></p> <p>-Observent les planches et répondent aux questions</p> <p>-</p>	<p>1- Identifier la substance appliquée aux plantes ?</p> <p>2- Comparer les teneurs en composés biochimiques obtenues chez les plantes traités à l'acide salicylique et chez celles non traitées</p> <p>3- Tirer une conclusion</p>	
--	--	---	------------------	---	--	--

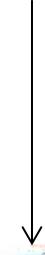
	<p>-Relever l'importance des composés phénoliques</p>	<p><b>VI.3. - Importance des composés phénoliques</b></p> <p>Les composés phénoliques ont des propriétés anti oxydantes</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-ils agissent contre les radicaux libres</li> <li>-sont utilisés pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies (stress oxydatif, vieillissement cellulaire, maladies cardiovasculaires, cancer)</li> </ul> <p>Ex : les écorces de <i>Prunus africana</i> sont utilisées pour le traitement de l'hypertrophie et de l'hyperplasie bénigne de la prostate</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Les composés phénoliques interviennent aussi dans la protection des plantes contre des agents biotiques et abiotiques</li> </ul>	<p>Document3</p>	<p><b>Activité 3</b></p> <p>-Observer le document et répondent aux questions</p>	<p>1- Donner l'importance des composés phénoliques ?</p>	
--	---	---	------------------	--	--	--

<p><b>C</b> <b>O</b> <b>N</b> <b>C</b> <b>L</b> <b>U</b> <b>S</b> <b>I</b> <b>O</b> <b>N</b></p>	<p>Au vu de l'importance des composés produits par les plantes, l'amélioration de leur production est nécessaire et peut alors être réalisée par l'utilisation des substances stimulatrices.</p>	<p>1- Quelles sont les conditions de germination de <i>Prunus africana</i> ? 2- quel est l'effet de la conservation sur la germination des graines ? 3- quel est l'effet de l'acide gibbéréllique sur la germination des graines ? 4- quel est l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques ? 5-Quelle est l'importance des composés phénoliques ?</p>	<p>10min</p>
--	--	--	--------------

**Médiagraphie :**

- Programme officiel.
- Livre de Sciences de la Vie et de la Terre Snd S , collection Bordas 1993.
- Livre de Biologie Snd, collection Bordas 1987.

**DOCUMENT 1**



**Fig 1: De la graine à la plante.**

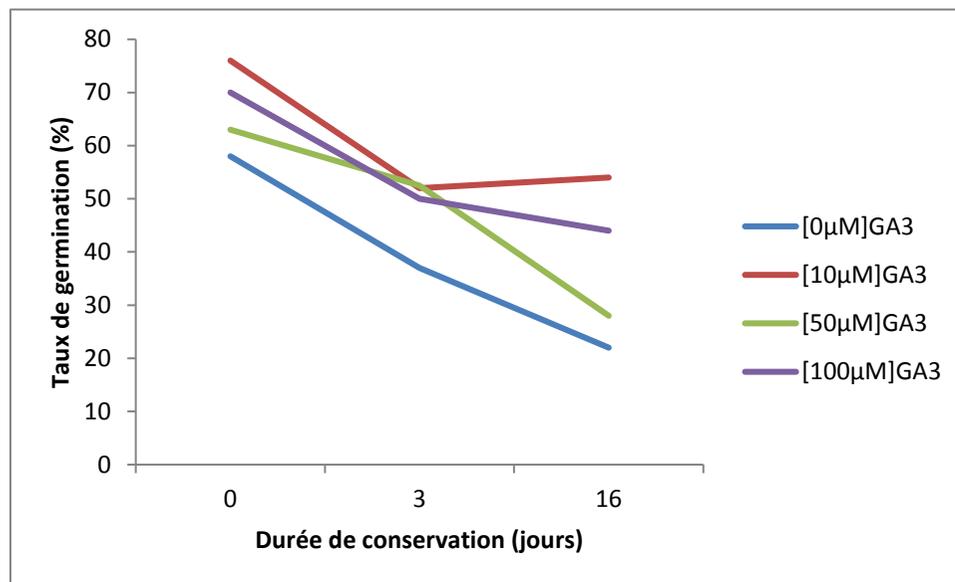
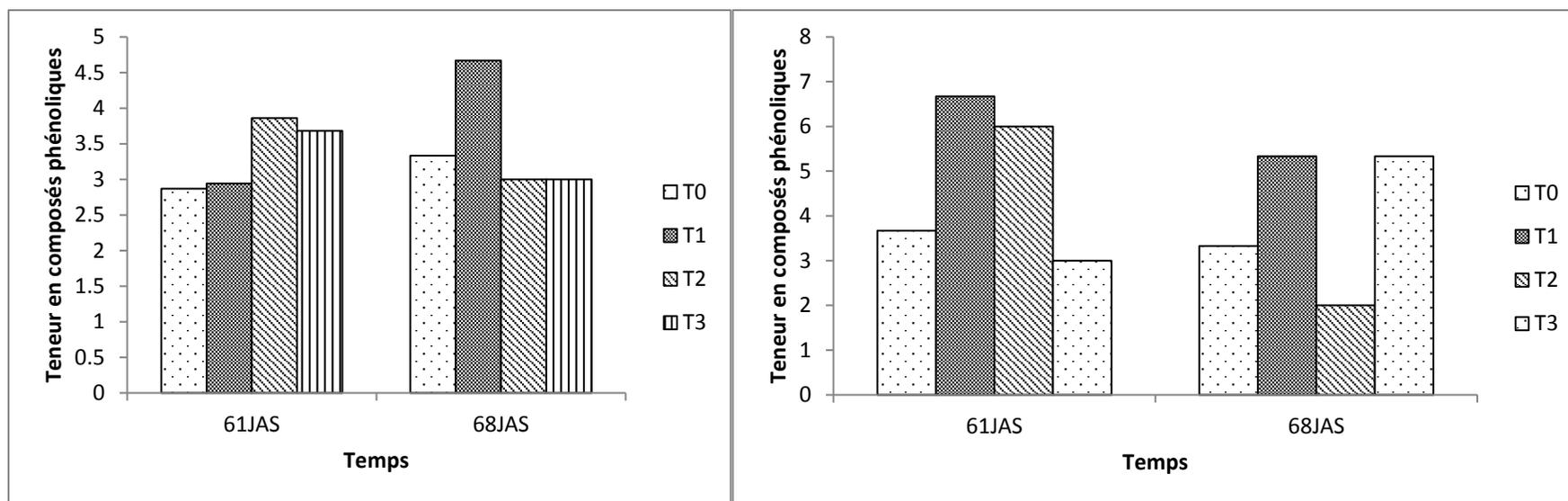


Figure2. Effet du temps de conservation et de l'acide gibbérellique sur la germination des graines de *P. africana*

## DOCUMENT 2 :



### FEUILLES

### TIGES

Figure 1. Effet de l'application de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques dans les feuilles (à gauche) et dans les tiges (à droite) chez *Prunus africana*.

T0: plantes non traitées à l'acide salicylique ; T1, T2 et T3 : plantes traitées à l'acide salicylique

**Document 3** : Importances de *Prunus africana*.

<b>Importance des composés phénoliques</b>
➤ Propriétés anti-oxydantes
➤ Agissent contre les radicaux libres
➤ Prévention et le traitement du stress oxydatif, maladies cardiovasculaires, cancer
➤ Protection de la plante contre des agents biotiques et abiotiques

## CONTENU DU COURS

### CHAPITRE VI : RESULTATS DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE : LA PRODUCTION VEGETALE

#### Leçon : BIOTECHNOLOGIE ET AMELIORATION DE LA TENEUR EN COMPOSES BIOCHIMIQUES DES PLANTES.

**OPO** : A l'issue de cette leçon, chaque élève de la classe de S<sup>nd</sup> sera capable de :

- Dire comment peut-on obtenir des plants à partir des graines.
- Déterminer l'effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés biochimiques chez les plantes.

#### Introduction

On appelle **biotechnologies** l'ensemble des techniques appliquées aux êtres vivants (animaux et végétaux) pour la production des biens et services. Pour accroître la productivité, l'Homme a recours à plusieurs moyens parmi lesquels les **substances stimulatrices**.

#### VI. 1. Obtention des plantes à partir des graines

Pour qu'une graine arrivée à maturité germe, plusieurs conditions doivent être réunies :

- Conditions de l'environnement favorable qui se traduit par une présence d'eau, d'oxygène, de lumière ou obscurité, substrat, température compatible avec la germination de la graine étudiée.
- Conditions internes favorables : la graine doit être arrivée à maturité et elle doit avoir conservé son pouvoir germinatif qui est variable selon les espèces.
- Absence de dormances et d'inhibitions tégumentaires : les téguments peuvent être imperméables à l'eau, imperméables à l'oxygène ou encore résistants à la percée de la radicule. Ces inhibitions sont levées dans les conditions artificielles par plusieurs méthodes dont les scarifications chimiques et mécaniques.

Pour optimiser la germination des graines en condition de laboratoire, il est important de mimer les conditions naturelles de germination. Les graines de *Prunus africana* ont besoin pour germer de :

- l'eau distillée
- obscurité,
- température ambiante (25°C),
- substrat (coton stérile)
- aseptisation (afin d'éliminer les microorganismes présents à la surface des graines.)

Les graines de *Prunus africana* conservées perdent leur pouvoir germinatif

L'acide gibbérellique améliore la germination des graines.

#### VI.2. Effet de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques

L'acide salicylique améliore la teneur en composés phénoliques chez *Prunus africana*

### **VI.3. Importance des composés phénoliques**

Les composés phénoliques ont des propriétés anti oxydantes  
-ils agissent contre les radicaux libres  
-sont utilisés pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies (stress oxydatif, vieillissement cellulaire, maladies cardiovasculaires, cancer  
Ex : les écorces de *Prunus africana* sont utilisées pour le traitement de l'hypertrophie et de l'hyperplasie bénigne de la prostate  
Les composés phénoliques interviennent aussi dans la protection contre des agents biotiques et abiotiques

### **Conclusion**

Au vu de l'importance des composés produits par les plantes, l'amélioration de leur production est nécessaire et peut alors être réalisée par l'utilisation des substances stimulatrices.

## CHAPITRE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### CONCLUSION

Au terme de cette étude dont l'objectif était d'évaluer l'effet de l'acide gibbérellique sur la croissance et de l'acide salicylique sur la teneur en composés phénoliques en vue d'améliorer la productivité de *P.africana*, il en ressort que:

- le taux de germination de *P. africana* baisse avec la conservation;
- les doses 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M et 50  $\mu$ M d'acide gibbérellique stimulent respectivement le taux de germination des graines à 76, 70 et 63%.
- la dose de 10  $\mu$ M d'acide gibbérellique a favorisé une meilleure croissance des plants de *P. africana*.
- l'application foliaire de la dose de 2 mM d'acide salicylique à améliorer la teneur en polyphénols totaux dans les feuilles et tiges.
- Les concentrations testées n'ont pas amélioré la teneur en flavonoïdes chez *P. africana*.

### PERSPECTIVES

Cette étude a permis d'améliorer la teneur en composés phénoliques chez *P. africana*. Pour des études futures, il serait judicieux de:

- Faire des analyses quantitative et qualitative en utilisant la méthode HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ;
- Evaluer l'efficacité d'autres composés tels que l'acide jasmonique, BTH et chitosan sur la production des composés phénoliques chez *P. africana*.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ali M., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y. (2006). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reproduction*. 25: 613-620.
- Amougou A., Betti J. L., Ewusi N. B., Mbarga N., Akagou Z. H. C., Fonkoua C., MALA A. W., Nkouna A. C. (2011). Preliminary report on sustainable harvesting of *Prunus africana* (Rosaceae) in the mount Cameroon. 24 p.
- Antoun M. (2013). Effet de la température sur le développement chez *Arabidopsis thaliana*. Mémoire de maîtrise en biologie, Université du Québec à Montréal, 76 p.
- Aruoma O.I. (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem.Toxic.*, 32: 671-683.
- Avana M. L. (2006). Domestication de *Prunus Africana* (Hook. f.) Kalkam (Rosaceae) : étude de la germination et du bouturage. Thèse Ph.D, Université de Yaoundé I. Faculté des Sciences, Cameroun. 132 p.
- Bidadi H., Yamaguchi S., Asahina M., Satoh S. (2010) Effects of shoot-applied gibberellin/gibberellin-biosynthesis inhibitors on root growth and expression of gibberellin biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Root* 4: 4-11.
- Bii C., Korir K. R., Rugutt J., Mutai C. (2010). The potential use of *Prunus africana* for the control, treatment and management of common fungal and bacterial infections. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(11): 995-998.
- Cao G., Russell R.M., Lischner N., Prior R.L. (1998). Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *Journal of Nutrition* 128 : 2383-2390.
- CITES. (2006). Etude du commerce important de *Prunus africana*, White Gum Valley – Australie. 33p
- Cunningham A.B., Ayuk E., Franzel S., Duguma B., Asanga C. (2002). An economic evaluation of medicinal tree cultivation *P. africana* in Cameroon. *People and Plants Working Paper* 35 p.
- Cunningham M., Cunningham A. B., Schippmann U. (1997). Trade in *Prunus africana* and the implementation of CITES. German Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 52 p.
- Cunningham A.B., Mbenkum F.T. (1993). Sustainability of harvesting *Prunus africana* bark in Cameroon. *People and Plants Working Paper No. 2*. UNESCO, Paris. 38p.
- Dihazi A., Jaiti F., Zouine J., El Hassni M., El Hadrami I. (2003). Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*. 42: 9 -16.
- Dixon R.A., Paiva N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoïdes metabolism. In Macheix J.J., Fleuriet A., Christian A. (eds) *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique : 1085-1097*. PPTUR Lausanne. *plant Cell* .

- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97: 654-660.
- Dong, Guowei W., Zongsuo L. (2010) Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology* 148: 99–104
- Dorthe J. (2003). *Prunus africana* ( Hook. f.) Kalkman. Seed Leaflet. Danida Forest Seed Centre. Denmark. 2 p
- Gallach R. P. (2015). Gibberellins regulate cell division and parthenocarpic fruit set in Citrus. Doctorat thesis. Universita Degli Studi di Palermo. 129p.
- Getahun S. (2011). Studies on seed germination physiology, germinant establishment and seedling growth performance of *Ficus* sur Forssk. (Moraceae). Mémoire de Master, Addis ababa university .71P.
- Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E. (2012). Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (5) 790-795.
- Hall J. B., O'Brien E. M., Sinclair F. L. (2000). *Prunus africana*: a Monograph. School of Agricultural and Forest Sciences Publication Number 18. University of Wales, Bangor. 104 pp.
- Hansen C. E. (1998) Burric. Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of Science. Food Agriculture*. 77: 273-281.
- Harborne J.B (1984). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 2nd eds. Chapman and Hall, New York. 54p.
- Haselwandter K. (1997). Soil micro-organisms, mycorrhiza, and restoration ecology. In: Urbanska, K.M., Webb,N.R., Edwards, P.J. (Eds.), *Restoration Ecology and Sustainable Development*. Cambridge University Press,pp. 65–80.
- Heidi R., Akumo D. N., Nay Min Min T. S., Onur K., Neubauer P., Smetanska I. (2012). Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture. *African Journal of Biotechnology* 11(12) 3000-3008.
- Herbert R.B. (1989). *The Biosynthesis of secondary metabolites*. 2éme edition Chapman and Halle 115p.
- Inada S., Shimmen T. (2000) Regulation of elongation growth by gibberellin in root segments of *Lemna minor*. *Plant Cell Physiology*. 41: 932-939.
- Inada S., Tominaga M., Shimmen T. (2000) Regulation of root growth by gibberellin in *Lemna minor*. *Plant Cell Physiology*. 41: 657-665.
- Kalkman C. 1965. The Old World species of *Prunus* subg. *Laurocerasus* including those formerly referred to as *Pygeum*. *Blumea*. In Marshall N.T., Jenkins M. (eds) *Hard times for hardwood Indige*: 1-115 UNEP-WCMC.
- Kang S.M., Min J.Y., Kim Y.D., Kang Y.M., Park D.J., Jung H.N., Kim S.W., Choi M.S. (2006). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. *In Vitro Cell Development*. Plant 42: 44-49.

- Kiddle G.A., Doughty K.J., Wallsgrove R.M. (1994). Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. *Journal of Experimental Botanic*. 45: 1343-1346.
- Kramling T. E., Singleton V. E. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20(2), 86–92.
- Lahouel M. (2005) Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux, Thèse de doctorat, Université Mentouri de Constantine. 189p
- Leite V.M., Rosolem C.A., Rodrigues J.D. (2003). Gibberellin and cytokinin effects on soybean growth. *Scientia Agricola* 60 (3) 537-541.
- Letouzey R. (1978). Rosacees. Flore du Cameroun. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. ISBN 2-85654-153-4.
- Malarz J., Stojakowska A., Kisiel W. (2007). Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus*. *Acta Physiology Plant* 29: 127-132.
- Matsuoka M. (2003). Gibberellins signaling : How do plant cells respond to GA signals ? *Journal of Plant Growth Regulator*. 22 : 123- 125.
- Mbuya L. P., Msanga C. K., Ruffo A., Birnie, Tengas B. (1994). Useful trees and shrubs for Tanzania. SIDA Regional Soil Conservation Unit, English Press, Nairobi.43p
- Medic Saric M., Jasprica I., Smoleic-Bubalo A., Mornar A. (2004). Optimisation of chromatographic condition in thin layer chromatography of flavonoïdes and phenolic acids. *Croatian chemical acta*.77(12): 361-366.
- Mouton J. A. (1966). Les types biologiques foliaires de Raunkiaer. Etat actuel de la question, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 113:sup2, 28-36, DOI: 10.1080/00378941.1966.10838471
- Munjuga M., Were J., Dawson I., Ruigu S., and Simons A. (2000). Reproductive biology of the over-exploited, medicinal tree *Prunus africana*: studies in Central Kenya. *East African Journal of Forestry and Agric*.16: 21-25.
- Ndam N., (1998) Tree regeneration, vegetation dynamics and the maintenance of biodiversity on Mount Cameroon: the relative impact of natural and human disturbance. Ph.D. thesis, University of Wales Bangor, UK.174p.
- Njamnshi B., Ekati J. (2008). Le cas du *Prunus africana*. Troisième atelier panafricain de capacités en matière d'accès aux ressources génétiques et de partage des avantages. Antsirananana, Madagascar. 21 p.
- Nkuinkeu R. (1999). Medicinal plants and forest exploitation. In Sunderland T.C.H., Clark L.E., Vantomme P. (eds.). *The NWFP of Central Africa: Current research issues and prospects for conservation and development*:143-157. FAO.Rome.
- Noreen S., Ashraf M., Hussain M. (2009). Exogenous application of salicylic acid enhances antioxidative capacity in salt stressed sunflower (*Helianthus annuus* L) plant. *Pakistan. Journal. of Botanical*. 4: 473-479.
- Noumi N. C. (2011). Essai de microbouturage et germination *in vitro* des graines de *Prunus*

- africana* (Hook.f.) Kalkam (*Rosaceae*). Mémoire DI.P.E.S. II , Université de Yaoundé I. 70p
- Niemenak N., Rohsius C., Elwers S., Omokolo N.D., Lieberei R. (2006). Comparative study of different cacao (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis* 6: 616-618.
- Nzweundji J.G., Niemenak N., Oumar, Tsafack J.J., Konan K., Nyochembeng L., Noumi C., Tchinda N.D., Omokolo N. D. (2015). Biochemical profile of cuttings used for in vitro organogenesis of *Prunus africana*: An endangered species in Cameroon African Journal of Biotechnology Vol. 14(33) 2568-2575 DOI: 10.5897/AJB2014.14198.
- Ondigui B. (2001). Gestion de *Prunus africana* : situation et perspectives au Cameroun et ailleurs. Rapport GTZ. 85 p.
- Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Simons A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 40 p
- Pu G.B., Ma D.M., Chen J.L., Ma L.Q., Wang H., Li G.F., Ye H.C., Liu B.Y. (2009). Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reproduction*. 28: 1127-1135.
- Raghuveer I., Anurag K., Anumalik y., Nitika G., Swadesh K., Nikhil G., Santosh K., Vinay Y., Anuj P. and Himanshu G., (2015). Metabolites in plants and its classification. *wjpps* Vol 4, Issue 1, 287-305. Review Article ISSN 2278 – 4357.
- Rodney C., Toni M.K., Norman G. L. (2000). Natural Products Secondary Metabolites Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. 2000, American Society of Plant Physiologists. 1251p
- Sakhautdinova A.R., Fatkhutdin D.R., Bezorukova M.V., Shakirova F.M. (2003). Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. Bulgaria. *Journal of Plant Physiology*. pp. 314 319.
- Sawada H., Shim I.S., Usui K., Kobayashi K., Fujihara S. (2008). Adaptive mechanism of *Echinochloa crus-galli* Beauv. var. *formosensis* Ohwi under salt stress: Effect of salicylic acid on salt sensitivity. *Plant Science*. 174: 583-589.
- Schippmann U. (2001). Medicinal plants Significant Trade study Bonn, Germany: German Federal Agency for Nature Conservation. CITES Projekt S-109. Plants Committee Document PC(rev.).109 p
- Shabani L., Ehsanpour A., Asghari G., Emami J. (2009). Glycyrrhizin production by in vitro cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl Jasmonate and salicylic acid. *Russian Journal. Plant Physiology*. 56: 621-626.
- Shraiy A.M.E., Hegazi A.M. (2009). Effect of acetylsalicylic acid, indole-3-butyric acid and gibberellic acid on plant growth and yield of pea (*Pisum Sativum*L.). *Australian Journal. of Basic Application. Science*. 3: 3514–3523.
- Simo C., Djogoué P.F., Mbouobda H.D., Effa P.O., Boujeko T., Ndiang Z., Omokolo D.N. (2014). Assessing relationship between phenolic compounds and resistance to *Phytophthora megakarya* using two cocoa (*Theobroma cacao*) families. *African Journal of Biotechnology* 13(29) 2956-2965.
- Singleton V., Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phostungtic acid reagent. *American Journal. of Enology. Viticulture*. 37: 44-58.

- Siyabulela N. (2006). *Prunus africana* (Hook.f.) Kalkman, KwaZulu-Natal National Botanical Garden 83p.
- Sponsel V. M., Hedden P. (2004). Gibberellin biosynthesis and inactivation. *Plant Hormones* 63:94.
- Stewart K. M., (2003). The African cherry (*Prunus africana*): can lessons be learned from an over-exploited medicinal tree? *Journal. of Ethnopharmacology* 89: 3-13.
- Sung-Jin P.H.M., Young-Youn K., Jun-Young P., Jun-Woo P., Myung-Jin K., Soon-Min H. (2008). Anticancer effects of genistein, green tea catechins, and cordycepin on oral squamous cell carcinoma. *Korean Journal. Oral Maxillofac. Surg.* 34: 1-10.
- Sunderland T., Nkefor J. (1997) Conservation through cultivation. A case study: the propagation of *P. africana*. *Tropical Agriculture Association* 4: 11-14
- Talón M. (2000). Giberelinas. In: Azcón-Bieto, J., and Talón, M., Eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain 341. pp
- Tanimoto E. (2005) Regulation of root growth by plant hormones: Roles for auxin and gibberellin. *Critical. Review. in Plant Science.* 24: 249-265.
- Tassé B. (2006) Impact écologique de l'exploitation de l'écorce de *Prunus africana* (Hook.f.) kalkman dans la région du Mont Cameroun : cas de la zone Bokwaongo-Mapanja. Mémoire d'ingénierie : Faculté d'Agronomie et des Sciences Agricoles, Université de Dschang. 113p.
- Tchiéhoua Y.H. (2012). Étude morphologique et moléculaire des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) associés à *Prunus africana* dans deux zones agro écologiques du Cameroun (Hook.f.) Kalkman. Mémoire Master, Université de Yaoundé I, 66p.
- Tchoundjeu Z., Avana M. L., Leakey R. R. B., Simons A. J., Asaah E., Duguma B., Bell J. M. (2002). Vegetative propagation of *Prunus africana*: effects of rooting medium auxin concentrations and leaf area. *Agroforestry Systems* 54: 183–192.
- Tonye M., Stella A., Ndam N., Blackmore P. (2000). State of knowledge of *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman. Report established for Central Africa region at program for the Environment (CARPE). Washington Dc. 82 p.
- Ubeda-Tomás S., Swarup R., Coates J., Swarup K., Laplaze L., Beemster G., Hedden P., Bhalerao R., Bennett M. (2008). Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Natural Cell Biology.* 10: 625-628.
- Ubeda-Tomás S., Federici F., Casimiro I., Beemster G., Bhalerao R., Swarup R., Doerner P., Haseloff J., Bennett M. (2009) . Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Current Biology.* 19:1194-1199.
- Wang J., Mazza G. (2002). Effect of Anthocyanins and other phenolic compounds on the Production of Tumor Necrosis Factors  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW.264.7.Macrophages. *Journal of .Agricultural.Food and Chemistry* 50: 4183-4189,
- Wang Y.D., Wu J.C., Yuan Y.J.(2007). Salicylic acid-induced taxol production and isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei. *Cell Biology. International.* 31: 1179-1183.
- Weiguang Y., Joan F., Casimir C.A. (2005). Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics *in vitro*. *Journal of .Agricultural.Food and Chemistry* 53: 8804–8812.

- Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940-949.
- Xu Y.W., Shuai L., Zhao D., Chen J.W., Yang W.T., Wu W. (2012). Effects of salicylic acid on monoterpene production and antioxidant systems in *Houttuynia cordata*. *African Journal of Biotechnology* 11(6) 1364-1372. DOI: 10.5897/AJB11.1524
- Yamaguchi S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*. 59:225–251.
- Zalewska M., Antkowiak M. (2013). Gibberellic acid effect on growth and flowering of *Ajania pacifica* /nakai/ bremer et Humphries. *Journal of Horticultural Research* 21(1): 21-27 DOI: 10.2478/johr-2013-0004.

## ANNEXES



Annexe1. Graines de *Prunus africana* mises à germer.



Annexe2. Tube d'ependorf contenant les extraits phénoliques



Annexe 3. Tubes contenant les composés non flavonoïdes



Annexe 4. Graines de *Prunus africana* mises à germer à l'obscurité.

**Tableau 6 : Principaux pays importateurs et exportateurs du Prunus (1995 - 2004)**

<b>Pays importateur</b>	<b>Quantité (tonne)</b>	<b>%</b>	<b>Pays exportateurs</b>	<b>Quantité (tonne)</b>	<b>%</b>
France	7585	61,17	Cameroun	4729	38,14
Espagne	3680,5	29,68	Kenya	3176,6	25,62
Madagascar	454,9	3,67	R.D. Congo	1684,2	13,58
Belgique	160,5	1,29	Madagascar	1278,7	10,31
Inde	157,9	1,27	Guinée Equatorial	1254,6	10,12
Singapour	150	1,21	Burundi	120	0,97
Royaume Unie	100,1	0,81	Rép. Congo	80	0,65
USA	71,5	0,58	Tanzanie	60,6	0,49
Chine	17,3	0,14	Espagne	8,7	0,07
Autres pays	21,5	0,17	Autres pays	6,8	0,05
Total	12399,2	100,00	Total	12399,2	100

Source : Traffic Europe (2006)

Annexe 5. Principaux pays importateurs et exportateurs de *P.africana* (1995-2004)