

Influence de la linamarine dans la relation manioc-cochenille

par Paul-André Calatayud⁽¹⁾, Corinne Rouland⁽²⁾ et Bruno Le Rü⁽¹⁾

(1) ORSTOM, Laboratoire des Insectes Nuisibles (L.I.N.) , Biologie et Gestion des Populations (B.G.P.), Parc Scientifique Agropolis II, F-34397 Montpellier Cedex 5

(2) Université de ParisXII-Val de Marne, Laboratoire d'Ecophysiologie des Invertébrés, F-94010 Créteil Cedex

Résumé. - Le manioc *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) se caractérise par la présence de composés cyanés dans les feuilles, les tiges et les tubercules. Dans les tissus de la plante, le groupement -CN est lié avec le D-glucose sous forme de glucosides cyanogéniques, principalement la linamarine. Au Congo, la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Homoptera : Pseudococcidae) constitue l'un des principaux ravageurs du manioc. Cet insecte est étroitement inféodé au genre *Manihot*. Cette oligophagie de *P. manihoti* vis-à-vis du manioc suppose une adaptation de la cochenille aux composés secondaires de sa plante hôte, et notamment à la linamarine. Une telle spécialisation suggère un équipement enzymatique adapté. En effet, nos résultats montrent que cet insecte possède une linamarase (participant à l'hydrolyse de la linamarine) à caractère endogène et inductible. Comme d'autres insectes, la cochenille du manioc possède un équipement enzymatique capable d'hydrolyser la linamarine. L'utilisation des produits d'hydrolyse chez cet insecte est discutée.

Summary. - Cassava *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) is distinguished by the presence of cyanid compounds in leaves, stems and tubers. In plant's tissues, -CN group is linked with D-glucose to form cyanogenic glucosides: mainly linamarin. In Congo, the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Homoptera: Pseudococcidae) is the major pest of cassava. This insect is living mainly on genus *Manihot*. This oligophagy of *P. manihoti* towards cassava suggests that the mealybug is adapted to secondary compounds of its host plant, and more particularly to linamarin. This specialization supposes the presence of an enzymatical fittings adjusted. In fact, our results shows that this insect has a linamarase (participating in hydolysis of linamarin), an endogenous and an inductive enzyme in cassava mealybug. As other insects, *P. manihoti* has an enzymatical fittings hydolysing linamarin. In this insect, the use of hydolysis products is discussed.

Key-words : *Manihot esculenta* - *Phenacoccus manihoti* - linamarin - linamarase - Congo.

I. INTRODUCTION

La présence de composés cyanés constitue une des caractéristiques biochimiques du manioc *Manihot esculenta* Crantz (*Euphorbiaceae*). Ces composés sont présents dans les feuilles, les tiges, les tubercules (Cooke, 1978 ; Cooke, 1979 ; Arguedas et Cooke, 1982 ; Arihantana et Buckle, 1986 ; Ezeala et Okoro, 1986 ; Pancoro et Hughes, 1992) et sont potentiellement transloqués par la sève phloémienne (Calatayud *et al.*, 1994a). Dans les tissus de la plante, le groupement -CN est lié avec le D-glucose sous forme de glucosides cyanogéniques (Conn, 1980), principalement la linamarine (Butler *et al.*, 1965). Lors d'une destruction des tissus du manioc, ceux-ci ont la propriété d'émettre de l'acide cyanhydrique (HCN). Cette propriété, appelée cyanogénèse, est rendue possible notamment par l'action d'une enzyme endogène (β -glucosidasique) : la linamarase (Conn, 1980). La cyanogénèse permettant l'apparition d'une molécule toxique constitue de ce fait un système de protection pour la plante vis-à-vis de l'attaque de ravageurs. Cependant, un tel rôle n'a pas été clairement démontré (Hruska, 1988).

Au Congo, la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Homoptera : Pseudococcidae) représente l'un des principaux ravageurs du manioc (Cox et Williams, 1981 ; Neuenschwander et Herren, 1988). Cet insecte piqueur-suceur se nourrit principalement de sève phloémienne (Calatayud *et al.*, 1994b) et est étroitement inféodé au genre *Manihot*. Cette oligophagie de *P. manihoti* vis-à-vis du manioc suppose une adaptation de la cochenille aux composés secondaires de sa plante hôte, et notamment à la linamarine. Une telle spécialisation suggère un équipement enzymatique adapté. De précédents travaux ayant montré que les composés cyanés auraient un rôle plutôt phagostimulant pour la cochenille qui, toxique, ces quelques constatations nous conduisent à rechercher si une des enzymes participant à l'hydrolyse de ces glucosides, telles que la linamarase, est présente chez la cochenille.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Nous avons retenu dans cette étude la variété de manioc appelée M'pembe, car c'est la variété la plus communément cultivée en milieu paysan dans la région du Pool au Congo où se sont effectuées nos recherches. Une plante de substitution de *P. manihoti*, dépourvue en composés cyanés, est également retenue : le talinum (*Talinum triangulare* Jacq., *Portulacaceae*). Précisons qu'il est possible d'observer des infestations occasionnelles de cochenille sur talinum en conditions naturelles (Neuenschwander *et al.*, 1986). Cette plante constitue un hôte occasionnel pour la cochenille et est appelée plante de substitution.

Toutes les plantes utilisées sont cultivées en pot sous serre à 21-32 °C et 70 % d'hygrométrie relative moyenne, pendant trois mois. La photophase est de 12 h.

Matériel animal

La souche de *P. manihoti* utilisée provient de la ceinture maraîchère de Brazzaville.

Pour les expérimentations, les cochenilles sont maintenues d'une part sur la variété de manioc M'pembe et d'autre part sur talinum depuis au moins trois générations au laboratoire à 21-32 °C et 70 % d'hygrométrie relative moyenne. La photophase est de 12 h.

Broyage

Les échantillons broyés sont les suivants : feuilles de manioc (variété M'pembe) et de talinum, cochenilles élevées sur M'pembe et sur talinum. Les tissus ont été broyés à 1-2 °C à l'ultraturax dans un tampon citrate 0,1 M - phosphate 0,2 M à pH 6,0 (30 mg de matière fraîche minimum dans 2 ml de tampon). Les broyats sont ensuite centrifugés à 4 °C à 15000 *tr/min* pendant 20 mn. Les surnageants sont récupérés et dialysés pendant 12 h dans des boyaux d'animaux (à membranes résistantes aux cellulases) dans un grand volume d'eau distillée. Cette dialyse va permettre l'élimination des sucres réducteurs qui risqueraient de gêner les dosages des activités glucosidasiques.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976).

Mise en évidence d'activités oligosaccharidasiques

Le dosage du glucose libéré par les activités oligosaccharidasiques est effectué selon la méthode de Trinder (1969). Les substrats utilisés sont les suivants : maltose, saccharose, raffinose, salicine, cellobiose et linamarine à une concentration de 17,1 g/l.

Mise en évidence d'activités β -glucosidasiques

Le substrat utilisé est un hétéroside : le 2-nitrophényl- β -D-glucopyranoside à une concentration de 6,025 g/l. Le milieu réactionnel comprend : 20 μ l de tampon citrate 0,1 M - phosphate 0,2 M (pH 6,0), 50 μ l d'une solution de 2-nitrophényl- β -D-glucopyranoside et 50 μ l d'essai (contenant l'enzyme). Des témoins, enzyme (sans substrat), substrat (sans enzyme) et réactif (sans enzyme ni substrat), sont effectués en parallèle. L'incubation se déroule à 37 °C pendant 15 mn. Un volume de 3 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2 % est ensuite ajouté et permet l'arrêt de la réaction. L'intensité de la coloration est déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm.

Mise en évidence d'activités polysaccharidasiques

Le dosage des sucres réducteurs libérés par les activités polysaccharidasiques est réalisé selon la méthode de Somogyi (1945) et Nelson (1944). Les substrats utilisés sont les suivants : amidon (10 g/l) et laminarine (9 g/l).

Electrophorèses

Des électrophorèses sont réalisées à partir de 20 à 200 μ l de dialysats (contenant environ 2 à 50 μ g de protéines) issus des broyats de feuilles de manioc et de cochenilles entières élevées sur manioc. Des gels de polyacrylamide non dénaturants sont préparés et coulés dans des tubes en verre (0,5 x 10 cm). Les gels contiennent 5 ml d'une solution composée de 40 g d'acrylamide et 1,06 g de N-N'-méthylène-bis-acrylamide dans 100 ml d'eau distillée, 10 ml de solution de ferricyanure de potassium à 0,03 g/l et 10 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 4,8 g/l. Les chambres d'électrophorèse contiennent du tampon tris 0,25 M - glycine 1,92 M (pH 8,5) dilué extemporanément au 1/10 dans l'eau distillée. L'échantillon est additionné d'environ 50 μ l d'une solution aqueuse de bleu de bromophénol à 0,5 %, et déposé sur le gel à l'aide d'une micropipette. La migration est effectuée à 4 °C sous 200 V. Après environ 15 minutes de migration, les gels subissent soit une coloration pour visualiser les bandes protéiques, soit un découpage (épaisseur de 2 mm) pour localiser l'activité linamarasique dans ces bandes. Pour chaque disque issu du découpage, nous effectuons une mise en évidence de l'activité linamarasique selon le protocole décrit précédemment. Quant à la coloration des protéines des gels, celle-ci est faite pendant 1 h dans 20 ml d'une solution contenant 200 mg de bleu de Coomassie, 45 ml de méthanol, 45 ml d'eau distillée et 10 ml d'acide acétique. Les gels sont ensuite décolorés à 37 °C pendant 12 h dans 500 ml d'une solution contenant 200 ml d'alcool méthylique, 70 ml d'acide acétique et 730 ml d'eau distillée. La valeur du R_f^1 dépend ici du poids moléculaire et de la charge de la protéine.

Semi-purification pour la détermination du pH optimum

Pour déterminer le pH optimum de la linamarase de cochenille et de celle du manioc, une purification partielle est réalisée au préalable. Pour cela, 200 μ l de lyophilisats issus des broyats de cochenilles élevées sur manioc, ou de feuilles de manioc, sont déposés sur une colonne de DEAE sépharose (5 mm de diamètre, 4 cm de haut). Cette colonne est équilibrée par une solution de tampon phosphate à 5 mM, pH 7,8. A ce pH, la colonne est chargée positivement. Après le dépôt de l'échantillon, plusieurs tampons sont passés successivement (élution par palier) dans la colonne, à pH 7,8 et à des concentrations croissantes en chlorure de sodium (de 10 mM à 1600 mM). La détection des protéines se fait en sortie de colonne sous UV (à 280 nm) et l'élution s'effectue à 4 °C. Pour chaque fraction collectée nous réalisons un dosage de l'activité linamarasique éventuellement présente (selon la méthode employée précédemment). Les fractions présentant l'activité recherchée sont dialysées, puis concentrées. Après dosage des protéines, des dosages de linamarase à différents pH allant de 5,03 à 6,96 (tampons citrate 0,1 M - phosphate 0,2 M) sont effectués pour déterminer le pH optimum de l'enzyme semi-purifiée présente dans l'essai.

¹ R_f : rapport frontal. Après la migration électrophorétique, il s'agit du rapport de la distance de migration de la protéine étudiée à celle du solvant.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un screening enzymatique sur un broyat de cochenilles élevées sur manioc en laboratoire permet d'observer que sur six oligosaccharides, un hétéroside et deux polysaccharides testés comme substrats, l'essentiel de l'activité glucosidasique est sous forme d'une β -glucosidase à activité linamarasique (voir Tableau 1).

Les caractéristiques biochimiques des linamarases d'origine animale et végétale que nous avons étudiées sont présentées sur le tableau 2. Notons que les résultats concernant le pH optimum de la linamarase de manioc sont comparables à ceux rapportés par Yeoh (1988), qui indiquent que ce pH est compris entre 6,0 et 7,4 pour beaucoup de variétés de manioc.

Le tableau 2 montre que le Rf et le pH optimum de la linamarase de cochenille sont différents de ceux de la linamarase de manioc. Contrairement aux travaux de Bani (1990), qui ont montré que l'enzyme présente chez le criquet puant (*Zonocerus variegatus*, Orthoptera, Pyrgomorphidae) se nourrissant de manioc est d'origine végétale, celle rencontrée dans *P. manihoti* semble propre à l'insecte. Cette différence paraît logique lorsqu'on compare les modes alimentaires de ces deux insectes, le criquet ingérant bien entendu tous les tissus foliaires, qui contiennent l'enzyme d'origine végétale.

Par ailleurs, l'enzyme de *P. manihoti* semble relever d'un système inductible puisque les cochenilles élevées sur talinum (plante où aucun composé cyanogénique n'a pu être décelé) ne présentent pas d'activité linamarasique.

La présence d'une linamarase (i.e. d'une β -glucosidase à activité linamarasique) propre à un insecte n'est pas un fait nouveau. Franzl *et al.* (1989) ont étudié une linamarase propre au Lépidoptère *Zygaena trifolii* Esper sur *Fabaceae*, présente dans l'hémolymphe de cet insecte. Pour *P. manihoti*, la localisation tissulaire de l'enzyme ne peut pas être précisée actuellement. La libération du -CN de la linamarine peut aussi bien être localisée dans le tube digestif que dans un autre compartiment tissulaire (hémolymphe, bactériome).

Par ailleurs, le niveau en acides aminés libres de la sève phloémienne de manioc en fait, comparée à beaucoup d'espèces végétales, une plante particulièrement pauvre en ces composés. Le rapport molaire des composés cyanés présents dans la sève au total des acides aminés libres étant de 2,4 (Calatayud *et al.*, 1994a), l'utilisation de l'atome d'azote cyané constituerait un appoint nutritionnel conséquent. L'utilisation du groupement -CN étant connu chez les microorganismes (Segretain et Bories, 1986), ainsi que chez certains insectes (Meyers et Ahmad, 1991), il est tentant d'imaginer une telle possibilité chez *P. manihoti*.

Conn (1980) rapporte qu'au moins 200 espèces végétales ont des glycosides cyanogéniques. On en trouve chez les Rosacées, les Légumineuses, les Graminées, les Aracées, les Composées, les Euphorbiacées et les Passifloracées. Cette caractéristique biochimique paraît donc répandue à un grand nombre de familles végétales. Franzl *et al.* (1989) précisent que des β -glucosidases responsables de l'hydrolyse de ces glycosides sont rencontrées chez des Coléoptères, des Hétéroptères, des Hyménoptères et des Lépidoptères. De telles observations sont révélatrices de l'importance jouée par les β -glucosidases dans l'alimentation et l'inféodation à une espèce végétale d'un bon nombre d'insectes.

Tableau 1.- Capacité aux glucosidases de *P. manihoti* à hydrolyser quelques glycosides.Table 1.- Ability of *P. manihoti* glucosidases to hydrolyse some glycosides.

* quantité en µg de glucose libérée par mg de protéine et par minute.

N.B. Les cochenilles ont été élevées sur manioc (variété M'pembe).

Substrats testés	Activités*
<i>Oligosaccharides</i> :	
Maltose	5,6
Saccharose	13,4
Raffinose	0,1
Salicine	1,2
Cellobiose	0,8
Linamarine	54,1
<i>Hétéroside</i> :	
2-Nitrophényl-β-D-glucopyranoside	56,7
<i>Polyaccharides</i> :	
Amidon	0,2
Lamarine	-

Tableau 2.- Caractéristiques physico-chimiques de la linamarase de manioc et de cochenille.

Table 2.- Physico-chemical characteristics of cassava and mealybug linamarases.

* quantité en µg de glucose libérée par mg de protéine et par minute.

Les purifications relatives sont de 8,6 ng/µg pour le manioc et de 16 ng/µg pour la cochenille du manioc (ng de protéines purifiées par µg de protéines déposées)

Linamarase	Activité spécifique*	Rf	pH optimum
Manioc	7 214,0	0,11	6,0 - 6,5
Cochenilles élevées sur manioc	106,0	0,06	5,0 - 6,2
Cochenilles élevées sur talinum	0,0	-	-

BIBLIOGRAPHIE

- Arguerdas P. & R.D. Cooke. 1982.- Residual cyanide concentrations during the extraction of cassava starch. *J. Fd. Technol.*, **17**, 251-262.
- Anhaniana M.B. & K.A. Buckle. 1986.- Effect of non-enzymic browning, starch and sugars on total cyanide determination in cassava by an enzymic assay. *Journal of Food Technology*, **21**, 189-197.
- Bani G., 1990.- Interaction *Zonocerus variegatus* (Orthoptera : Pyrgomorphidae) - manioc au Congo : bioécologie d'un ravageur du manioc. *Thèse d'Etat Sci.* Université de Rennes I, 87p.
- Bradford M.M., 1976.- A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytic. Chem.*, **72**, 248-254.
- Butler G.W., R.W. Bailey & L.D. Kennedy. 1965.- Studies on the glucosidase "linamarase" *Phytochemistry*, **4**, 369-381.
- Calatayud P.A., Y. Rahbe, B. Delobel, F. Khuon-Huu, M. Tertuliano & B. Le Rü, 1994a.- Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Entomol. exp. appl.*, **72**, 47-57.
- Calatayud P.A., Y. Rahbe, W.F. Tjallingii, M. Tertuliano & B. Le Rü, 1994b.- Electrically recorded feeding behaviour of cassava mealybug on host and non-host plants. *Entomol. exp. appl.*, **72**, 219-232.
- Conn E. E., 1980.- Cyanogenic compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 433-451.
- Cooke R.D., 1978.- An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sci. Food. Agric.*, **29**, 345-352.
- Cooke R.D., 1979.- Enzymatic assay for determining the cyanide content of cassava and cassava products. *Cassava Information Center - CIAT*, **3**, 3-14.
- Cox J.M. & D.J. Williams, 1981.- An account of cassava mealybug (Hemiptera : Pseudococcidae) with a description of new species. *Bull. Entomol. Res.*, **71**, 247-258.
- Ezeala D.O. & N. Okoro, 1986.- Processing techniques and hydrocyanic acid content of cassava-based human foodstuffs in Nigeria. *J. Food. Biochem.*, **10**, 125-132.

- Franzl S., I. Ackermann & A. Nahrseidl, 1989.- Purification and characterization of a β -glucosidase (linamarase) from the haemolymph of *Zygaena trifolii*. 1783 (Insecta, Lepidoptera). *Experientia*, **45**, 712-718.
- Hruska A.J. 1988.- Cyanogenic glucosides as defense compounds: a review of the evidence. *J. Chem. Ecol.*, **14**, 2213-2217.
- Meyers D. M. & S. Ahmad, 1991.- Link between L-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity of insects. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1075**, 195-197.
- Nelson N., 1944.- Photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.
- Neuenschwander P., F. Schultess & E. Madojemu, 1986.- Experimental evaluation of the efficiency of *Epidinocarsis lopezi*, a parasitoid introduced into Africa against the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Entomol. exp. appl.*, **42**, 133-138.
- Neuenschwander P. & H.R. Herren, 1988.- Biological control of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* by the exotic parasitoid *Epidinocarsis lopezi* in Africa. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., B*, 319-333.
- Pancoro A. & M.A. Hughes, 1992.- *In situ* localization of cyanogenic β -glucosidase (linamarase) gene expression in leaves of cassava (*Manihot esculenta* Cranz) using non-isotopic riboprobes. *The Plant Journal*, **2** (5), 821-827.
- Segretain C. & A. Bories, 1986.- Le cyanure et les glucosides cyanogénétiques du manioc: dosages et réponses des microorganismes à ces composés. Rapport INRA, 40p.
- Somogyi M., 1945.- Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, **160**, 61-68.
- Trinder P., 1969.- Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24-30.
- Yeoh H.-H., 1988.- Variation in kinetic properties of Cassava Leaf β -glucosidase. *Biochemical Systematics and Ecology*, **16** (6), 525-528.