

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

CENTRE DE RECHERCHE ET  
DE FORMATION DOCTORALE,  
SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET  
ENVIRONNEMENT  
LABORATOIRE DE  
PHYTOPROTECTION ET DE  
VALORISATION DES RESSOURCES  
VEGETALES



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

POST GRADUATE SCHOOL FOR  
LIFE SCIENCES, HEALTH AND  
ENVIRONMENT  
LABORATORY OF  
PHYTOPROTECTION AND  
PLANT RESOURCES  
VALORISATION

**Evaluation de l'effet de l'amendement des sols avec la  
poudre des coquilles d'huitres et ses dérivés sur la  
qualité des semences plants de cacaoyer (*Theobroma  
cacao L.*) vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*.**

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de  
Doctorat/Ph.D en Biochimie

Par : **TENE TAYO Paul Martial**  
Maître-es Sciences

Sous la direction de  
**Pr BOUDJEKO Thaddée**  
Maître de Conférences  
Université de Yaoundé I  
**Pr OMOKOLO N. Denis**  
Professeur  
Université de Yaoundé I

Année Académique : 2020



REPUBLIQUE DU CAMEROUN  
Pais—Travail—Patrie  
UNIVERSITE DE YAOUNDE I  
FACULTE DES SCIENCES  
B.P. 812 Yaoundé  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROON  
Peace—Work—Fatherland  
UNIVERSITY OF YAOUNDE I  
FACULTY OF SCIENCE  
P.O. Box 812 Yaounde  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

## ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/PhD

Nous, membres du Jury de thèse de Doctorat/Ph.D de Monsieur TENE TAYO Paul Martial (matricule 07R928) préparée sous la co-direction des Professeurs OMOKOLO NDOUMOU Denis et BOUDJEKO Thaddée et intitulée " Evaluation de l'effet de l'amendement des sols avec la poudre des coquilles d'huitres et ses dérivés sur la qualité des semences plants de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*" soutenue le 16 décembre 2020 en vue de l'obtention du grade de Docteur/PhD en Biochimie, attestons que toutes les corrections demandées par le Jury de soutenance ont été effectuées.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir ce que de droit.

Fait à Yaoundé le 09/02/2021

Examineur

Dr. Effa Onomo Dji  
Maître de Conférences  
Biochimie/Phytopathologie

Président du Jury

Pr. Elie Fokou  
Dr d'Etat en Biochimie  
Nutrition et Sciences Alimentaires

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b>  <b>Faculté des Sciences</b>  Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b>  <b>Faculty of Science</b>  Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>	<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>	

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN:** TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA:** ATCHADE Alex de Théodore, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE:** AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC:** ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière:** NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :**  
MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste

6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

**2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)**

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINS ANTE
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épse	Maître de Conférences	En Poste

	MEGAPTCHE		
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
----	-------------------------------	-----------	----------

45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste

21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste

10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
----	------------------	------------	---------------------

11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
31	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
32	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
33	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFACK Augustin Ephrem	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

#### 6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste

13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

### 7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
---	---------------------	------------	-------------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes &amp; Diplômes</i>
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule
---	-------------------------------	-----------------	--------------

			MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

**8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)**

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
---	-------------------------	------------	----------------------------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

**9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)**

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/</i>

			<i>MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste

13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOUA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER

32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

**10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)**

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste

14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance &amp; du Matériel</i>
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste

38	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I**

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (06)	3 (2)	<b>39 (18)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (14)</b>

BPV	06 (0)	11 (02)	9 (06)	07 (01)	<b>33 (9)</b>
CI	10 (1)	9 (02)	12 (02)	03 (0)	<b>34 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	02 (0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (01)	09 (01)	<b>25 (2)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (02)	<b>30 (3)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>18 (5)</b>
PHY	12 (0)	15 (02)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (05)	02 (0)	<b>43(7)</b>
<b>Total</b>	<b>69 (4)</b>	<b>99 (28)</b>	<b>130 (33)</b>	<b>45 (10)</b>	<b>343 (75)</b>

---

Soit un total de **344 (75)** dont :

- Professeurs **68 (4)**
- Maîtres de Conférences **99 (28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes **75**

## **DEDICACE**

A la mémoire de mon Feu père TAKOUGOUM André;  
A ma famille en particulier ma maman DAPONG Antoinette, ma grand-mère MAKAM Cécile, mon Oncle TAKOUGANG Cyprien.

## REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements au DIEU tout puissant, l'Eternel pour m'avoir guidé chaque jour et m'avoir donné la force et la détermination nécessaire dans la réalisation de ce travail. Parvenu au terme de ce travail, j'exprime ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à sa réalisation, notamment:

Le Pr. BOUDJEKO Thaddée, Maître de Conférences à l'Université de Yaoundé I pour avoir dirigé, encadré ce travail, m'avoir guidé, prodigué de fructueux conseils, pour sa disponibilité et pour la confiance portée à mon égard. Ses compétences techniques et sa rigueur ont fortement contribué à la réalisation de ce travail;

Le Pr. OMOKOLO NDOUMOU Denis, Co-superviseur de cette thèse que je remercie pour ses judicieux conseils scientifiques et sa contribution dans la réalisation de ce travail malgré ses multiples responsabilités;

Le Pr. MBANYA Jean Claude, Directeur du CBT et les Doyens des Facultés des Sciences de l'Université de Yaoundé I (Cameroun) et de l'Université de Sherbrooke (Centre SEVE, Quebec-Canada), que je remercie pour m'avoir accueilli et offert un cadre adéquat dans leurs instituts respectifs pour la réalisation de ce travail;

La Pr. Carole BEAULIEU, Professeure titulaire à l'Université de Sherbrooke, je tiens à vous remercier particulièrement pour m'avoir accueilli à bras ouvert dans votre laboratoire; pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes tests pratiques. Je vous remercie beaucoup car en dépit de vos innombrables occupations, vous avez apporté votre contribution à ce travail, pour vos idées, remarques et suggestions pertinentes que vous n'avez cessé de me donner avec un grand cœur généreux;

Le Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul, Chef du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I et tous les enseignants dudit Département, pour la formation dont j'ai bénéficié qui m'a été d'une grande importance lors de la réalisation de ce travail;

L'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) pour m'avoir octroyé la bourse dans le cadre du programme de Collège Doctoral Interrégional en Biotechnologies Végétales et Agroalimentaires qui m'a permis d'effectuer une grande partie de mes travaux de recherche et de participer à plusieurs séminaires de renforcement des capacités à l'échelle internationale pendant trois années successives;

Le Pr Serge Hamon et Mame SEYE pour vos apports et améliorations scientifiques de ce travail durant les trois années d'activités du Collège Doctoral de l'AUF;

L'Honorable KOUINCHE Albert, au travers du Programme d'Appui aux Doctorants (PAD) pour sa contribution financière aux travaux de recherche durant toutes ces années de formation doctorale;

Le Pr EFFA ONOMO Pierre, pour ses aides quotidiennes multiformes qui ont contribué significativement à la réalisation de ce travail;

Le Dr ADAMOU Soulemanou du Laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, pour ses conseils et encouragements durant ces années;

Le Dr PAHANE MBIADA Majeste, pour son soutien incommensurable, ses conseils, encouragements au quotidien et les bons moments partagés durant ces années de thèse;

Mes frères et sœurs pour leur soutien et leur encouragement en toutes circonstances;

M. TCHUENKAM Yannick, M.TSANO Simplicite et M.YOBA Roland, pour vos apports et soutiens multiformes durant mes moments de cure de rééducation psychologique;

L'équipe du LPVRV et particulièrement Pr. EWANE Annie, Dr. DJUIDJE Peguy , Dr MEDIESSE Francine, M. MOUAFO Romaric, M. SIPPING Marius, M. FANGUE George, Mlle DEMGNE Judith, et Mlle KANEMOTO Emery pour la convivialité au laboratoire et le travail accompli ensemble;

Mes camarades de promotion et du college doctoral, les Drs TEKEU Honore , FOTSO Beaulys, GOZOUA Emmanuel, pour leurs encouragements;

Mlle MALOUM SIGNE Christelle, pour sa confiance, sa grande patience, ses encouragements, son amour et pour m'avoir soutenu tout au long de mes études universitaires;

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail et ne sont nommément pas cités.

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS .....	i
DEDICACE .....	xviii
REMERCIEMENTS .....	xix
TABLE DES MATIERES.....	xxi
RESUME .....	xxv
ABSTRACT.....	xxvi
LISTE DES ABREVIATIONS .....	xxvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxx
LISTE DES FIGURES .....	xxxi
LISTE DES ANNEXES.....	xxxv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	5
<b>I.1. Généralités sur le cacaoyer</b> .....	5
<b>I.1.1. Historique</b> .....	5
I.1.2. Taxonomie et diversité de l'espèce.....	5
I.1.3. Botanique et distribution géographique de la plante .....	10
I.1.4. Écologie.....	11
I.1.5. Importance de la culture du cacao .....	13
I.2. Les problèmes liés à la culture du cacaoyer.....	14
I.2.1. Problèmes de semences .....	14
I.2.2. Problèmes phytosanitaires.....	15
I.3. Généralités sur <i>P. megakarya</i> .....	16
I.3.1. Origine, taxonomie et biologie.....	16
<b>I.3.1.1. Origine et taxonomie</b> .....	16
<b>I.3.1.2. Biologie</b> .....	17
I.3.2. Relation hôte-parasites .....	18
I.3.3. Stratégies de lutte contre <i>P. megakarya</i> .....	21
I.4. Les coquilles d'huitres en lutte biologique .....	23
I.4.1. Généralités sur les coquilles d'huitres.....	23
I.4.2. Propriétés physicochimiques des coquilles d'huîtres.....	24
I.4.3. Propriétés biologiques .....	25

I.4.4. Utilisation des coquilles d’huîtres en agriculture.....	26
I.5. Généralités sur les formulations et les compléments de formulations des pesticides....	27
I.5.1. Généralités sur les formulations.....	27
I.5.2. Généralités sur les compléments de formulations. ....	27
I.6. Mécanismes de défenses chez les plantes.....	28
I.6.1. Généralités .....	28
I.6.2. Mécanismes de défense constitutifs.....	29
I.6.3. Résistances systémique induites .....	30
I.7. Marqueurs moléculaires et enzymatiques de la défense .....	36
I.7.1. Les composés phénoliques.....	36
I.7.2. Phénylalanine ammonia-lyase (PAL).....	37
I.7.3. Polyphenoloxydase (PPO) .....	37
I.7.4. Les protéines de défense ( protéines PR).....	38
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>39</b>
II.1. MATERIEL.....	39
II.1.1. Matériel édaphique .....	39
II.1.2. Matériel végétal .....	39
II.1.3. Matériel fongique.....	40
II.1.4. Matériel organique.....	40
II.1.5. Matériel chimique.....	41
II.2. METHODES .....	42
II.2.1. Analyses physicochimiques du sol.....	42
II.2.2. Culture du champignon et préparation de la solution sporale. ....	46
II.2.3. Production des poudres de coquilles d’huîtres.....	48
II.2.4. Production du purin de <i>Tithonia diversifolia</i> . ....	49
II.2.5. Production de l’extrait aqueux de l’oseille.....	49
II.2.6. Effet des coquilles d’huître non traité sur la qualité des semences en serre .....	49
<b>II.2.7. Effets des formulations à base des coquilles d’huîtres sur la production des</b> <b>semences en condition paysanne.....</b>	<b>53</b>
II.2.8. Analyses biochimiques .....	56
II.2.9. Effet du biofongicide ‘ <i>Bio-oyster shell biofungicide</i> ’ sur l’induction du développement précoce des plantes et la production précoce du pool de composé phénolique. ....	63

II.2.10. Analyses statistiques .....	71
<b>CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>72</b>
III.1. Effets bénéfiques de l'amendement des sols sur la qualité des semences en condition contrôlée.....	72
III.1.1. Composition chimique du sol .....	72
III.1.2. Effet des poudres de coquilles d'huitres sur le taux de levée des fèves.....	73
III.1.3. Effet des poudres de coquilles d'huitres sur les paramètres de croissance des plants de cacaoyers en serre.....	74
III.1.4. Variation de la charge fongique de <i>P. megakarya</i> dans le sol et du pH du sol.....	79
III.1.5. Inoculation des feuilles et index de sévérité de la maladie.....	81
III.1.6. Variation de la teneur en composés phénoliques totales.....	82
III.1.7. Variation de la teneur en protéines totales.....	83
III.1.8. Variation de l'activité des polyphenoloxydases.....	84
III.1.9. Variation de l'activité des Peroxydases.....	85
III.1.10. Variation de l'activité des chitinases.....	86
III.1.11. Variation de l'activité des $\beta$ -1,3 glucanases .....	87
III.1.12. Indice de qualité sanitaire .....	88
III.1.13. Discussion Partielle I.....	90
III.1.14. Conclusion partielle I.....	93
III.2. Effet des formulations à base des coquilles traités et non traités sur le développement des plantules en condition paysanne. ....	94
III.2.1. Développement agro-morphologique .....	94
III.2.2. Développement physiologique .....	98
III.2.3. Sévérité et paramètres biochimiques .....	100
III.2.4. Analyses des corrélations entre les différents paramètres biochimiques mesurés ..	107
III.2.5. Analyse en composante principale.....	119
III.2.6. Caractéristiques du biofongicide formulé .....	121
III.2.7. Discussion Partielle II.....	123
III.2.8. Conclusion partielle II .....	126
III.3. Effet du biofongicide " <i>bio-oyster shell biofungicide</i> " sur l'induction de la résistance précoce. ....	127
III.3.1. Développement précoce des plantules et sévérité de la maladie .....	127

III.3.2 Effets du biofongicide “ <i>bio-oyster shell biofungicide</i> ” sur les propriétés physicochimiques du sol et le statut nutritionnel du sol. ....	128
III.3.3 Analyse qualitative des composés phénoliques.....	130
III.3.4. Identification des composés par HPLC-DAD-MS+ .....	132
III.3.5. Variation de la teneur en métabolites identifiés .....	135
III.3.6. Variation du degré d’expression de certains gènes de defenses ( TcChiB ,Tc Per-1, Tc Glu-1 et TcMYBPA ). .....	145
III.3.7. Discussion Partielle III.....	146
III.3.7. Conclusion partielle III.....	150
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>149</b>

## RESUME

La production des semences est une étape clé dans le processus de création des nouvelles plantations de cacaoyers. Les semences de plants de cacaoyers sont généralement obtenues avec des terres de remplissage non stériles ou déjà contaminées par *Phytophthora megakarya*. La présence de *P. megakarya* dans le sol constitue un véritable problème lors de la production des semences de cacaoyers. Pour pallier à ces attaques, le recours aux substances organiques biodégradables à l'instar des coquilles d'huîtres constitue une alternative aux méthodes de luttés chimiques. Le but de ce travail a été d'évaluer l'effet de l'amendement du sol avec un biofongicide ('Bio-Oyster Shell biofongicide') à base de coquilles d'huîtres sur la stimulation des systèmes de défenses de *T. cacao* vis-à-vis de *P. megakarya* en pépinière. A cet effet, le potentiel activateur des coquilles d'huîtres et du biofongicide à base de coquilles d'huîtres à stimuler les mécanismes de défense du cacaoyer a été évalué par amendement des sols à différentes concentrations en condition contrôlée et paysanne. Après amendement des sols, il s'en est suivie l'analyse des paramètres agronomiques et physiologiques de croissance, pédologiques et des marqueurs biochimiques de la résistance. Le degré d'expression des phytoalexines et des gènes de défense a été réalisé par les analyses RP-HPLC-DAD-ESI (+) -MS et RT-PCR respectivement. Les résultats obtenus montrent que le traitement des sols avec ces composites améliore la qualité sanitaire des semences de cacao en condition contrôlée et paysanne à travers la stimulation des paramètres agronomiques et physiologiques de croissance et de la résistance stomatiques. Ces derniers induisent la réduction de la charge de *P. megakarya* dans le sol et entraînent l'augmentation du pH du sol de l'ordre de 32 % ainsi que l'amélioration du statut nutritionnel du sol de l'ordre de 90 %. Ces composites stimulent la production des protéines PR2, PR3, PR9, les composés phénoliques totaux ainsi que les activités enzymatiques des PAL et des PPO. De plus, les analyses RP-HPLC-DAD-ESI (+) -MS démontrent que le biofongicide 'Bio-Oyster Shell biofongicide' induit la synthèse précoce des flavonols et un dérivé d'acide phénolique (brevifoline). Les analyses RT-PCR démontrent que le biofongicide induit la surexpression précoce des gènes TcPer-1, TcGlu1, TcChiB et TcMYBPA avant et après infection. Cette stimulation à base des substances biologiques permet de pré-immuniser les plants de cacaoyers contre d'éventuelles attaques en champ et d'améliorer la qualité des semences ainsi que la productivité du cacao biologique au Cameroun.

**Mots clés:** Cacaoyer, semences, *P. megakarya*, coquilles d'huîtres, biofongicide.

## ABSTRACT

Seedling production is a key step in the process of creating new cocoa plantations. Cocoa seedlings are generally obtained from unsterilized soil or soil already contaminated with *Phytophthora megakarya*. The presence of *P. megakarya* in the soil is a real problem in cocoa seedling production. In order to overcome these attacks, the use of biodegradable organic substances such as oyster shells is an alternative to chemical control methods. The aim of this work was to evaluate the effect of soil amendment with an oyster shell biofungicide on the stimulation of the cocoa plant defense systems against *P. megakarya* in the nursery. For this purpose, the activating potential of oyster shells and oyster shell biofungicide to stimulate cocoa plant defense mechanisms was evaluated by soil amendment at different concentrations under controlled and farmers' conditions. After soil amendment, the agronomic parameters of growth, growth physiology, soil parameters and biochemical markers of resistance were analyzed. The degree of expression of phytoalexins and defense genes was carried out by RP-HPLC-DAD-ESI (+) -MS and RT-PCR analyses respectively. The results obtained show that soil treatment with these composites improves the sanitary quality of cocoa seedlings in controlled and farming conditions through the stimulation of agronomic and physiological growth parameters such as chlorophyll and stomatal resistance. The latter induces the reduction of the load of *P. megakarya* in the soil and leads to the increase of the soil pH by about 32 % as well as the improvement of the nutritional status of the soil by about 90 %. These composites stimulate the production of proteins PR2, PR3, PR9, total phenolic compounds as well as the enzymatic activities of PAL and PPO. Moreover, RP-HPLC-DAD-ESI (+) -MS analyses show that the " Bio-Oyster Shell biofungicide " induces the early synthesis of flavonols and a phenolic acid derivative (brevifolin). RT-PCR analyses show that the biofungicide induces the early overexpression of the TcPer-1, TcGlu1, TcChiB and TcMYBPA genes before and after infection. This stimulation based on biological substances makes it possible to pre-immunize cocoa plants against possible attacks in the field and to improve seed quality and productivity of organic cocoa in Cameroon.

**Keywords:** Cocoa plant, *P. megakarya*, seedlings, oyster shells, biofungicide.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	: Analyse en Composantes Principales
ADNc:	: Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
ARN :	: Acide Ribonucléique
ap	: Après infection
av:	: Avant infection
BSA	: Bovin Serum Albumin
BOS	: <i>Bio-oyster Shell biofungicide</i>
CQ	: Coquille
CQT:	: Coquille traitée
CQNT	: Coquille non traitée
CEC	: Cation échangeable
Chit	: Chitinase
Chla	: Chlorophylle a
Chlb	: Chlorophylle b
CP	: Composé Phénolique
DO:	: Densité Optique
DAD	: Diode Array Detector
DEPC	: Diethylpyrocarbonate
dNTP	: Désoxyribonucléotides triphosphate
EqBSA/mg	: Equivalent BSA/mg
ESI	: <i>Electrospray Ionisation</i>

F	: Fongicide
Glu	: Glucanase
HESI	: <i>High Electrospray Ionisation</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICS	: <i>Imperial College Selection</i>
IQS	: Indice de Qualité Sanitaire
IRAD	: Institut de Recherche Agricole pour le Développement
LC	: Liquide Chromatography
LPVRV	: Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales
MAPkinases	: <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MF	: Matière Fraîche
MS	: <i>Mass spectrometry</i>
PDA	: <i>Potato Dextrose Agar</i>
PAL	: Phenylammonia-Lyase
PAMP	: <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PM	: <i>Phytophthora megakarya</i>
POX:	: Peroxydase
PPO	: Polyphenoloxydase
Pro	: Protéine
PR proteine	: <i>Proteins Related to pathogenesis</i>
PTI	: Pathogen Triggered Immunity
qPCR	: <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RLK	: <i>Receptor-Like protein kinases</i>

RTE	: <i>Reverse Transcriptase Enhancer</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SNK	: Selection Nkoemvone
SPAD:	: Système Portable d'Analyses des données
T	: Témoin
Tc	: <i>Theobroma Cacao</i>
UE	: Unité Enzymatique
UPA	: <i>Upper Amazonia</i>
UV	: Ultra-Violet

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Taxonomie du genre <i>Theobroma cacao</i> L. ....	5
<b>Tableau II:</b> Caractéristiques des principaux groupes de <i>Theobroma cacao</i> L. ....	7
<b>Tableau III:</b> Origine et caractéristiques de quelques clones utilisés dans les champs semenciers de la SODECAO .....	9
<b>Tableau IV:</b> Caractéristiques des hybrides utilisés.....	40
<b>Tableau V:</b> Normes de caractérisation de la fertilité des sols .....	65
<b>Tableau VI:</b> Séquence des amorces utilisées pour évaluer le degré d'expression relative des gènes TcChiB, TcGlu-1, TcPer-1 et TcMYBPA. ....	70
<b>Tableau VII:</b> Analyse physico-chimique du sol de "Ndamvout" .....	72
<b>Tableau VIII:</b> Variation du pH des sols traités et non traités aux coquilles d'huitres après les semis .....	80
<b>Tableau IX:</b> Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement témoins.....	109
<b>Tableau X:</b> Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement au fongicide chimique .....	112
<b>Tableau XI:</b> Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement à coquilles traitées. ....	115
<b>Tableau XII:</b> Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement aux coquilles non traitées. ....	118
<b>Tableau XIII:</b> Effet du biofongicide « bio-oyster shell biofongicide » sur les paramètres morphologiques de croissance des jeunes plantules de cacaoyers après deux mois de croissance.....	127
<b>Tableau XIV:</b> Composition physicochimique des sols traités et non traités au biofongicide .....	129
<b>Tableau XV:</b> Variation des équilibres de fertilisation .....	130

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle de Reproduction des <i>Phytophthora megakarya</i> .....	18
Figure 2: Mécanisme d'interaction <i>P. megakarya</i> - <i>T.cacao</i> .....	20
Figure 3: Structure de la chitine.....	25
Figure 4: Représentation schématisée des réponses immunes systémiques .....	31
Figure 5: Mécanisme signalétique d'induction de la résistance systémique .....	33
Figure 6: Les étapes séquentielles de l'induction de la défense précoce ou 'priming' .....	35
Figure 7: Schémas du dispositif expérimental en bloc complètement randomisé.....	53
Figure 8: Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux.....	57
Figure 9: Protocole d'extraction des protéines totales sous condition native.....	59
Figure 10: Photo du dispositif expérimental en serre .....	64
Figure 11: Principe de la PCR quantitative utilisant le colorant SYBR Green. ....	69
Figure 12: Variation du taux de levées des graines en fonction des traitements. ....	73
Figure 13: Tailles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres.....	75
Figure 14: Nombres de feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres. ....	76
Figure 15: Surface foliaire des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres.....	77
Figure 16: Variation du poids frais des racines et de la partie aérienne en fonction des traitements.....	79
Figure 17: Variation de la longueur de nécrose issue de cabosses infectées avec les sols traités et non traités aux coquilles d'huitres. ....	81
Figure 18: Index de sévérités des feuilles issues des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres. ....	82
Figure 19: Variation de la teneur en composés phénoliques totaux avant après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres.....	83
Figure 20: Variation de la teneur en protéines totales avant après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres.....	84
Figure 21: Variation de l'activité polyphénoloxydase avant après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres.....	85
Figure 22: Variation de l'activité peroxydase avant après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres. ....	86
Figure 23 : Variation de l'activité des chitinases avant après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres. ....	87

Figure 24: Variation de l'activité des $\beta$ -1,3 glucanases avant après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres.....	88
Figure 25: Variation de l'indice de qualité sanitaire dans les plantes traitées aux coquilles d'huitres. ....	89
Figure 26: Variation de la taille des plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères.....	95
Figure 27: Variation du nombre de feuilles des plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	96
Figure 28: Variation de la surface foliaire des plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	97
Figure 29: Variation du poids secs des racines et de la partie aérienne des plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères.....	98
Figure 30: Variation de la teneur en chlorophylle dans les feuilles des plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères.....	99
Figure 31: Variation de la résistance stomatique chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	100
Figure 32: Variation de l'indice de sévérité de la pourriture brune en fonction des traitements.....	101
Figure 33: Variation de la teneur en composés phénoliques avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	102
Figure 34: Variation de la teneur en protéines avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	102
Figure 35: Variation de l'activité des chitinases avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	103
Figure 36: Variation de l'activité des $\beta$ 1,3 glucanases avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères.....	104
Figure 37: Variation de l'activité des polyphenoloxydases avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères. ....	105
Figure 38: Variation de l'activité des peroxydases avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères.....	105
Figure 39: Variation de l'activité des peroxydases avant et après infection chez les plantes issues des traitements traités et non traités aux formulations coquillères.....	106

Figure 40: Analyse en Composantes Principales (ACP) des données à la protection des plants de cacaoyer par les amendements aux formulations coquillères et chimiques. ....	120
Figure 41: Variation du pouvoir hygroscopique du biofongicide et du fongicide chimique. ....	122
Figure 42: Variation de l'index de sévérité de la maladie en fonction des traitements. ....	128
Figure 43: Chromatogramme issu de l'analyse par chromatographie liquide de haute pression des composés phénoliques des feuilles de cacaoyers avant infection.....	131
Figure 44: Chromatogramme issue de l'analyse par chromatographie liquide de haute pression des composés phénoliques des feuilles de cacaoyers après infection. ....	132
Figure 45: Variation de la teneur des composés identifiés avant infection .....	133
Figure 46: Spectre de masse et structure hypothétique des composés identifiés avant infection. ....	134
Figure 47: Variation de la teneur des composés identifiés après infection.....	135
Figure 48: Spectre de masse et structure hypothétique des composés identifiés après infection .....	136
Figure 49: Spectre d'absorption UV des métabolites identifiés avant infection et après infection . ....	137
Figure 50: Variation de la teneur des composés induis spécifiquement par le biofongicide avant et après infection. ....	138
Figure 51: Spectre de masse et structures hypothétique des composés spécifique au biofongicide identifiés avant infection.....	139
Figure 52: Spectre de masse et structures hypothétique des composés spécifique au biofongicide identifiés après infection.....	140
Figure 53: Spectre d'absorption UV des composés spécifique au biofongicide identifiés avant infection et après infection .....	144
Figure 54: Variation du degré d'expression relative de certains gènes de defences à l'état précoce avant et après infection.....	145

## LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Plant de cacaoyer du groupe Forastero dans le champ semencier N°2 de Nkoémvone. .....	10
Photo 2 : Carte décrivant les zones de production du cacao au Cameroun. ....	12
Photo 3: Plants de cacaoyers attaqués par <i>Phytophthora megakarya</i> en pépinière .....	15
Photo 4: Cabosses de cacao infectées par <i>Phytophthora megakarya</i> .....	19
Photo 5: Site de dépôts des coquilles d’huitres dans la localité de Mouanko.....	24
Photo 6: Coquilles d’huitres.....	25
Photo 7: Produits biologiques à base des coquilles d’huitres utilisés pour la production horticole en Amérique du nord .....	27
Photo 8: Feuilles et fleur du tournesol mexicain .....	28
Photo 9: Photos du substrat édaphique .....	28
Photo 10: Photos du matériel végétal .....	39
Photo 11: Photos des coquilles et de la poudre de coquilles d’huitres .....	40
Photo 12: Photos du matériel chimique .....	41
Photo 13: Souche de <i>P. megakarya</i> sur milieu PDA .....	41
Photo 14: Souche de <i>P. megakarya</i> sur cabosses après 6 jours de croissance .....	47
Photo 15: Étapes de production du jus de purin .....	48
Photo 16: Feuilles entières non inoculées et inoculées avec <i>P. megakarya</i> .....	49
Photo 17: Photo de l’hygroscomètre .....	52
Photo 18: Photos des jeunes plants de cacaoyers après douze semaines de croissance .....	56
Photo 19: Photos des racines des plants âgés de douze semaines .....	74
Photo 20: Photo des plantes traitées et non traitées aux formulations coquillères. ....	78
Photo 21: Formulation poudreuse du biofongicide ‘‘bio-oyster shell biofongicide’’ conditionné et non conditionné.....	94
Photo 22: Photos montrant la présence ou l’absence des grumeaux dans différents formulations après dix mois d’exposition à température ambiante.. ....	121

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1: Préparation des solutions.....	xxxv
Annexe 2: Préparation du milieu de culture .....	xxxvi
Annexe 3: Traitement du sol.....	xxxvi
Annexe 4: Courbes d'étalonnages .....	xxxvii
Annexe 5: Etiquette du biofongicide ‘’ Bio-oyster shells biofongicide .....	xxxviii
Annexe 6: Chromatogramme de l'épicatéchine et de l'acide caféique.....	xxxviii
Annexe 7: Liste des Publications issues de la thèse .....	xl

# *Introduction*

## INTRODUCTION

Au Cameroun comme partout ailleurs en Afrique, la recherche agricole occupe une place importante dans le développement de l'économie nationale et dans la contribution à la réduction des problèmes d'insécurité alimentaire et de pauvreté qui sévissent quotidiennement au niveau local. Les activités de ce secteur sont dominées d'une part par les innovations technologiques sur toute la chaîne de valeur agricole partant de la production semencière jusqu'à la production primaire et d'autre part par la promotion de la durabilité des cultures de rente à l'instar du cacaoyer.

Le cacao (*Theobroma cacao L*) est une culture importante pour les pays producteurs. On estime à ce jour 5 à 6 millions de petits cultivateurs dans le monde qui travaillent sur des plantations de cacao et font vivre environ 40 à 50 millions de personnes (Hütz-Adams *et al.*, 2016). La production mondiale du cacao est assurée à 70 % par l'Afrique ; le Cameroun couvrant 5,3 % de cette production, est le cinquième pays producteur. Au Cameroun, la culture du cacao représente près de 30 % des exportations directes non pétrolières et génère environ 250 millions de dollars US de revenus par an à plus de 600000 producteurs (ICCO, 2016). L'évolution de sa production annuelle nationale en «dent de scie» au fil des années [232 530 tonnes (2015), 269 495 tonnes (2016), 231642 tonnes (2017), 214825 tonnes (2018)] est loin des prévisions du plan de relance de la filière cacao axée sur 600000 tonnes à l'horizon 2020; promulgué par les instances gouvernementales camerounaises (ONCC, 2017). Sa production est estimée à 264253 tonnes en 2019 et devrait augmenter de 50 % à l'horizon 2027 au regard du plan stratégique de la SODECAO 2020-2027 mise sur pied en mars 2019 pour redynamiser la filière cacao avec un accent particulier sur la filière semence (Essian, 2019). La chaîne de valeur autour de la filière cacao est une niche d'opportunité qui génère des revenus avec l'univers semencier du cacao; qui est un marché fort déséquilibré avec une offre annuelle moyenne de 5 à 6 millions de plants pour une demande de près de 20 millions de plants (Essian, 2019).

Malgré la relance de sa culture, la cacaoculture camerounaise fait face à plusieurs problèmes parmi lesquels la pourriture brune des cabosses causée par *Phytophthora megakarya* (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2004) , l'indisponibilité quantitative et qualitative des semences en constituent les majeures. *P. megakarya* en champs ainsi qu'en pépinière peut causer des pertes de rendements variant de 30 à 90 % de la production totale (Ndoumbe-Nkeng *et al.*, 2004; Tchameni *et al.*, 2017). Cet Oomycète tellurique attaque la plante de cacaoyer à tous les stades

de développement, causant ainsi des dégâts énormes au niveau des pépinières (ONCC, 2017). Par ailleurs au niveau des unités de production de semences de cacaoyers, les terres de remplissage généralement utilisées sont non stériles ou pas assainies. Ces terres sont très souvent prélevées dans les zones contaminées par *P. megakarya* et constituent ainsi des vecteurs de dissémination du pathogène (Mfegue *et al.*, 2012). De plus, les sols issus des zones forestières possèdent généralement un pH compris entre 5 et 6,5 favorable à la croissance des mycéliums fongiques (Ten Hoopen *et al.*, 2016). Le sol étant le foyer d'infection primaire de *P. megakarya*, ce dernier constitue un véritable vecteur d'infection des plants en pépinière ainsi que des cabosses en champ (Ristaino *et al.*, 2000, Mfegue *et al.*, 2012).

Pour remédier aux pertes occasionnées par *P. megakarya* sur les plants de cacaoyers en pépinière, la méthode de lutte chimique basée sur l'amendement des sols et la vaporisation foliaire avec les fongicides chimiques est la plus utilisée et la plus vulgarisée. Toutefois, le coût onéreux des fongicides chimiques et leurs effets néfastes sur la santé des agriculteurs et sur l'environnement ne sont plus à démontrer (Ten hoopen *et al.*, 2016). Face à cette limite, la recherche s'oriente donc vers des stratégies de lutte basées sur un concept de préimmunisation et des traitements curatifs des plantes via l'utilisation des substances organiques biodégradables.

La lutte biologique basée sur l'utilisation des microorganismes efficaces ou des matières organiques biodégradables à l'instar des résidus chitineux apparaît comme une solution novatrice pour le contrôle de la pourriture brune du cacaoyer au niveau des pépinières. A notre connaissance, très peu de travaux font état de la lutte biologique contre les pathogènes telluriques au niveau des pépinières (Ten hoopen *et al.*, 2016). Une somme des études réalisées au Cameroun met en exergue les capacités de plusieurs genres microbiens susceptibles d'être utilisés dans un schéma de lutte biologique dans le contrôle de la pourriture brune du cacaoyer au niveau des pépinières. Ainsi, le traitement du sol avec la souche *Streptomyces cameroonensis* réduit significativement l'incidence de la pourriture brune chez les plants de cacaoyers et stimule la croissance ainsi que la synthèse accrue des marqueurs biochimiques de résistances (Boudjeko *et al.*, 2017). Par ailleurs, les souches des champignons mycorhiziens à arbuscule et de *Trichoderma asperellum* ont montré des activités antagonistes *in vivo* vis-à-vis de *P. megakarya* chez les plants de cacaoyers en pépinière (Nana *et al.*, 2016, Tchameni *et al.*, 2017). Outre ces microorganismes, les résidus chitineux présentent un important potentiel dans le contrôle des maladies phytopathogènes. Ainsi, plusieurs travaux mettent en exergue leurs implications dans le

contrôle de plusieurs maladies phytopathogènes (Roy *et al.*, 2010 ; Benhamou *et al.*, 2012). De même, nos travaux récents montrent que l'amendement du sol au chitosane et coquille d'escargot réduit l'incidence de la pourriture brune des cabosses de cacaoyers au niveau des pépinières et stimule la synthèse accrue des composés phénoliques totaux et des protéines PR9 (Tene *et al.*, 2017). Toutefois, la disponibilité permanente du chitosane et des coquilles d'escargots constitue un problème majeur pour le cultivateur. D'où l'intérêt de s'orienter vers d'autres sources de chitines plus riches en oligoéléments à l'instar des coquilles d'huitres qui foisonnent sur les côtes camerounaises. Du fait de leur teneur élevée en chitine et carbonate de calcium, les coquilles d'huitres sont reconnues pour leurs propriétés antifongiques vis-à-vis de plusieurs phytopathogènes parmi lesquels *P. megakarya* (Xi *et al.*, 2013). Les études sur les coquilles d'huitres ont démontré que le traitement des sols par ces derniers augmente le pH du sol et réduit l'incidence de la maladie de la tache bactérienne chez le tabac en stimulant l'activité des microorganismes bénéfiques du sol et des enzymes impliqués dans sa biodégradation (Shen *et al.*, 2017).

## **Hypothèses**

H1: L'amendement des sols avec les poudres de coquille d'huitres améliore la qualité des semences plants de cacao en condition contrôlée .

H2: Les formulations à base des dérivés des poudres de coquille d'huitres permettent l'obtention des semences plants de cacao plus robustes en condition paysanne comparé au traitement conventionnelle.

H3:L'amendement du sol avec le biofongicide "Bio-Oyster Shell biofongicide" induit la protection précoce des jeunes semences plants de cacao.

## **Questions de recherche**

Q1: L'amendement des sols avec les poudres de coquille d'huitres améliore t-il la qualité des semences de cacaoyers en condition contrôlée ?

Q2: L'amendement des sols avec les formulations à base des dérivés de poudres de coquilles d'huitres, "Bio-Oyster Shell biofongicide" améliore t-il la qualité des semences en condition paysanne ?

Q3: L'amendement du sol avec le biofongicide "*Bio-Oyster Shell biofungicide*" induit-il une préimmunisation précoce des plants de cacaoyers?

### **Objectif général**

Évaluer l'effet de l'amendement des sols avec les poudres de coquille d'huitres et ses dérivés sur la stimulation des systèmes de défense des semences plants de cacaoyer (*T. cacao*) vis-à-vis de *P. megakarya*.

### **Objectifs spécifiques**

1. Evaluer l'impact bénéfique de l'amendement des sols avec la poudre des coquilles d'huitres sur la qualité des semences;
2. Etudier l'effet des formulations à base des poudres de coquilles d'huitres, "*Bio-Oyster Shell biofungicide*" sur la production des semences en condition paysanne;
3. Evaluer l'effet du biofongicide «*Bio-Oyster Shell biofungicide*» sur le degré d'expression des composés phénoliques et des gènes de défense chez les plantules de cacaoyers.

*Chapitre I :*  
*Revue de la Littérature*

## CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE

### I.1. Généralités sur le cacaoyer

#### I.1.1. Historique

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante pérenne originaire des forêts intertropicales humides du continent Américain, précisément des forêts méso-américaines et du bassin Amazonien (Almeida et Valle, 2007). La domestication du cacaoyer a été faite par les Mayas, les Olmèques et les Aztèques pour leurs fèves destinées à des usages multiples (monnaie d'échange, boisson reconstituante) ensuite, les conquistadores arrivèrent en Amérique et exportaient les fèves vers l'Europe. Grâce à l'expansion rapide du commerce Européen, la culture du cacao s'est progressivement orientée des îles des Caraïbes, du Venezuela et de la Colombie vers le Sud en passant par l'Inde Oriental. Par ailleurs, au début du XIX<sup>e</sup> siècle, une série d'introduction a été réalisée par les Anglais au Sri Lanka à partir de Trinidad, par les Hollandais à Java et par les Allemands en Papouasie-Nouvelle-Guinée à partir de plusieurs régions d'Amérique Latine (DOMORI, 2012). Son introduction en Afrique s'est faite par le Ghana à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle et sa culture est pratiquée au Cameroun dans le jardin Botanique de Victoria (Limbé) depuis 1876 (Efombang *et al.*, 2008).

#### I.1.2. Taxonomie et diversité de l'espèce

Le cacaoyer appartient à la famille des *malvaceae* et au genre *Theobroma* (Withlock *et al.*, 2001). Le genre *Theobroma* compte 22 espèces dont les plus communes sont réparties en 6 sections (Tableau I) (Cuatrecasas, 1964).

Tableau I: Taxonomie du genre *Theobroma cacao* L. (cuatrecasas, 1964).

Sections	Espèces
Rhithidocarpus	<i>T. bicolor</i>
Oeanthes	<i>T. sylvestre</i> , <i>T. speciosum</i> , <i>T. velutinum</i> , <i>T. glaucum</i> , <i>T. bernouilli</i>
Theobroma	<i>T. cacao</i>
Telmatocarpus	<i>T. gileri</i> , <i>T. microcarpum</i>
Glossopetalum	<i>T. cirmolinae</i> , <i>T. stipulatum</i> , <i>T. simiarum</i> , <i>T. chocoense</i> , <i>T. angustifolium</i> , <i>T. grandiflorum</i> , <i>T. obovatum</i> , <i>T. sinuosum</i> , <i>T. canumanense</i> , <i>T. subincanum</i> , <i>T. hylacum</i> , <i>T. nemorale</i>
Andropetalum	<i>T. mammosum</i>

Le cacaoyer est une Cormophyte dont la systématique est la suivante (Whitlock *et al.*, 2001):

<b>Règne :</b>	Végétal
<b>Embranchement :</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe :</b>	Dilleniidae
<b>Ordre :</b>	Malvales
<b>Famille :</b>	Malvaceae
<b>Genre :</b>	<i>Theobroma</i>
<b>Espèces :</b>	<i>Theobroma cacao</i>

La grande variabilité observée chez les cacaoyers, au niveau de la forme des fruits et des feuilles, de la couleur et des dimensions des différentes parties des fleurs, de la couleur des fruits et des graines, a permis leur discrimination. Sur la base de leurs caractères morphogéographiques, les cacaoyers peuvent être classés en trois grands groupes : les Criollo, les Forastéro et les Trinitario (Ondobo , 2014) .

Les principales caractéristiques de ces groupes de *Theobroma cacao* sont récapitulées dans le Tableau II et la photo 1.

**Tableau II:** Caractéristiques des principaux groupes de *Theobroma cacao* L. (Ondobo , 2014)

Caractéristiques	Groupes		
	Criollo	Forastero	Trinitario
Zone de prédilection	Mexique Colombie Venezuela	Amérique Latine Afrique (Centrale et Ouest)	Afrique centrale
Productivité	Peu productif (1 à 5 %)	Très productif (80 à 90%)	Hybride des deux premiers groupes, Ils ont des caractères intermédiaires et fournissent 10 à 20 % de la productivité mondiale (ICCO,2013)
Sensibilité	Très sensible à la pourriture bûne	Tolérance accrue aux maladies	
Forme des cabosses	Allongées et Pointues, sillons profonds	Ovoïdes, sillons peu profonds	
Couleur des cabosses	Verte ou violette avant maturité Jaune ou orange après maturité	Verte avant maturité Jaune après maturité	
Fèves	Blanches ou violettes Pâles, rondes	Violettes foncées, aplaties	



Photo 1: Photos des cabosses caractéristiques des grands groupes (Yi , 2010) .

Il existe en plus les variétés Cupuaçu et Nacional qui sont plus rares et cultivées en Amérique du Nord et centrale. Au Cameroun les Forastero et les Trinitario constituent les groupes les plus représentatifs ( Tableau III) avec environs 80 clones dont on peut citer :

- Les SNK (sélection de Nkoemvone) du groupe Trinitario;
- Les ICS (sélection de l'impérial College de Trinidad) du groupe Trinitario ;
- Les UF (sélection d'United Fruit) de Costa Rica du groupe Trinitario ;
- Les UPA (Upper Amazonia) du groupe de Forastero (Domori, 2012).

Tableau III: Origine et caractéristiques de quelques clones utilisés dans les champs semenciers de la SODECAO (Ondobo, 2014)

<b>Clones parentaux</b>						
<b>Caractéristiques</b>	ICS40	SCA12	SNK16	SNK413	T79/467	T79/501
<b>Origine</b>	Sélectionné à Trinidad	à Equateur,	Ebolowa, Nkoemvone	Ebolowa, Nkoemvone	Sélectionné à Tafo (Ghana)	Sélectionné à Tafo (Ghana)
<b>Type/variété</b>	Trinitario supérieur	très Haut Amazonien	Trinitario	Trinitario	Haut Amazonien	Haut Amazonien
<b>Vigueur végétative</b>	Très vigoureux	Très vigoureux	Très vigoureux	Très vigoureux	Vigoureux	Très vigoureux
<b>Productivité</b>	Moyenne	Productif	Très productif	Peu productif	Très productif	Très productif
<b>pourriture brune</b>	Sensible	Résistant	Tolérant	Résistant	Tolérant	Résistance
<b>Précocité</b>	Très précoce	Très précoce	Précoce	précoce	Très précoce	Très précoce
<b>Floraison</b>	Abondante	très abondante	Abondante	Peu abondante	très abondante	très abondante

### I.1.3. Botanique et distribution géographique de la plante

Le cacaoyer adulte est un arbuste pouvant atteindre 5 à 7m de hauteur en plantation et 25 m à l'état sauvage (Jagoret *et al.*, 2011). La plante issue des semis (fèves) présente un dimorphisme orthotrope et plagiotrope dans le développement de la tige et des branches (Photo 2).



Photo 2: Plant de cacaoyer du groupe Forastero (UPA 134) dans le champ semencier N°2 de Nkoémvone (Photographié par Tene, 2016).

Les feuilles du cacaoyer sont simples, entières, alternes et pétiolées ; elles apparaissent après les pluies, leur production sur les branches aériennes se fait par poussées foliaires (flushes) et elles ont une durée de vie d'un an. D'abord rouge-bordeaux, puis vertes, elles mesurent 15 à 30 cm de longueur et 7 à 12 cm de largeur en moyenne.

Plante diploïde ( $2n = 20$  chromosomes et un génome d'une taille de 430 Mb), le cacaoyer peut fleurir toute l'année et la cauliflorie est de règle. Les inflorescences sont portées sur le tronc (cauliflorie) ou sur les branches maîtresses (ramiflorie) (Argout *et al.*, 2011). Les fleurs de petite taille sont hermaphrodites, régulières, pentamères formées de cinq sépales, cinq pétales, cinq étamines alternant avec cinq ou six staminodes stériles. Les pétales sont composés de deux parties distinctes la cuculle attachée au réceptacle floral et la ligule. Les anthères sont recouvertes par les cuculles et produisent du pollen dont la durée de vie n'excède pas 48 heures. Ces fleurs sont à ovaire supère comptant 30 à 60 ovules. Le cacaoyer peut produire un très grand nombre de fleurs (plus de 100 000 en une année pour certains génotypes), mais environ 2 % des fleurs reçoivent suffisamment de pollen pour assurer la nouaison. Le cacaoyer est fortement auto incompatible; ce qui rend la plante essentiellement allogame. La pollinisation naturelle

essentiellement entomophile est souvent insuffisante (Royaert *et al.*, 2011). Cette faible pollinisation est la cause principale de la chute des fleurs. La production des fruits débute 2 à 3 ans après la plantation ; la durée nécessaire au développement du fruit varie de 5 à 7 mois.

Le fruit résulte de la double fécondation ; cette baie indéhiscente de forme fusiforme est appelée chérelle au jeune âge et cabosse à l'âge adulte. La cabosse reste rattachée à l'arbre par le pédoncule fortement lignifié. Ainsi la cabosse une baie indéhiscente de 12 à 15 cm ressemble à une balle de rugby ayant en moyenne une taille de 15 à 25 cm sur 7 à 9 cm de large ; pouvant peser selon les variétés 200 g à 1 kg. Cependant, la cabosse peut être lisse ou verruqueuse selon les variétés ; présentant des sillons dont cinq sont plus ou moins profondes et cinq autres sont superficiels. L'épiderme généralement de couleur verte prend diverses couleurs à maturité. Le péricarpe, constitué de l'extérieur vers l'intérieur de l'épicarpe, du mésocarpe et de l'endocarpe, renferme environ 20 à 60 graines ou fèves. La graine de forme su-trapézoïdale, arrondie et plate mesure 2 à 3 cm de long (Santos *et al.*, 2012). A l'état frais, le tégument est recouvert par une pulpe appelé mucilage. Les fèves entourées de mucilages sont reliées au tissu maternel par des fibres. Le système racinaire du cacaoyer est très développé ; avec une racine pivotante très profonde et de nombreuses racines adventives portant des poils absorbants. La plante issue des semis émet une racine pivotante de longueur variable tandis que, celle issue des boutures plagiotropes possède un système racinaire fasciculé, le rendant sensible au stress hydrique et au vent (Santos *et al.*, 2012).

Le cacaoyer est un arbre tropical qui pousse dans des climats chauds et humides .C'est ainsi que l'on distingue une répartition du cacao autour de l'équateur plus précisément dans les pays d'Afrique équatoriale (Côte d'ivoire, Ghana, Cameroun), dans les pays d'Amérique centrale, en Inde, Trinidad et Tobago, Equateur, Brésil Au Cameroun, les zones écologiquement favorables à la culture cacaoyère sont les zones où règne un climat équatorial.

#### **I.1.4. Écologie**

Le cacaoyer se développe entre la latitude 15 ° sud et 20 ° nord. C'est un arbuste de sous-bois qui, pour pousser normalement, exige une température comprise entre 24 °C et 28 °C, une pluviométrie annuelle comprise entre 1500 à 2500 mm d'eau par an régulièrement répartie et une atmosphère peu chaude et très humide. L'arbre exige aussi des sols profonds, meubles (de texture sablo-argileuse), perméables, toujours frais, bien drainés, bien aérés et abondamment pourvus en humus et en matières minérales légèrement acides. Un ombrage provisoire est indispensable pendant les premières années de culture. Les forêts au climat chaud et humide, sans saison sèche prolongée sont donc favorables pour la croissance du cacaoyer. Au Cameroun,

les zones écologiquement favorables à la culture cacaoyère sont les zones où règne un climat équatorial. Ainsi, la zone sud camerounaise possède un sol propice au cacaoyer. A l'exception des deux régions septentrionales ( Nord et Extrême-Nord), le cacao est cultivé dans les autres 8 régions du pays (Centre, Littoral, Est, Nord-ouest, Ouest, Sud , Adamoua et Sud-ouest), sur une superficie globale estimée à quelques 400.000 hectares (Photo 3). Les régions du centre et du sud-ouest représentent plus de 80 % de la production nationale avec la région du centre comme principale bassin de production du pays (soit 60-70 % des exportations nationales) (ONCC, 2017).

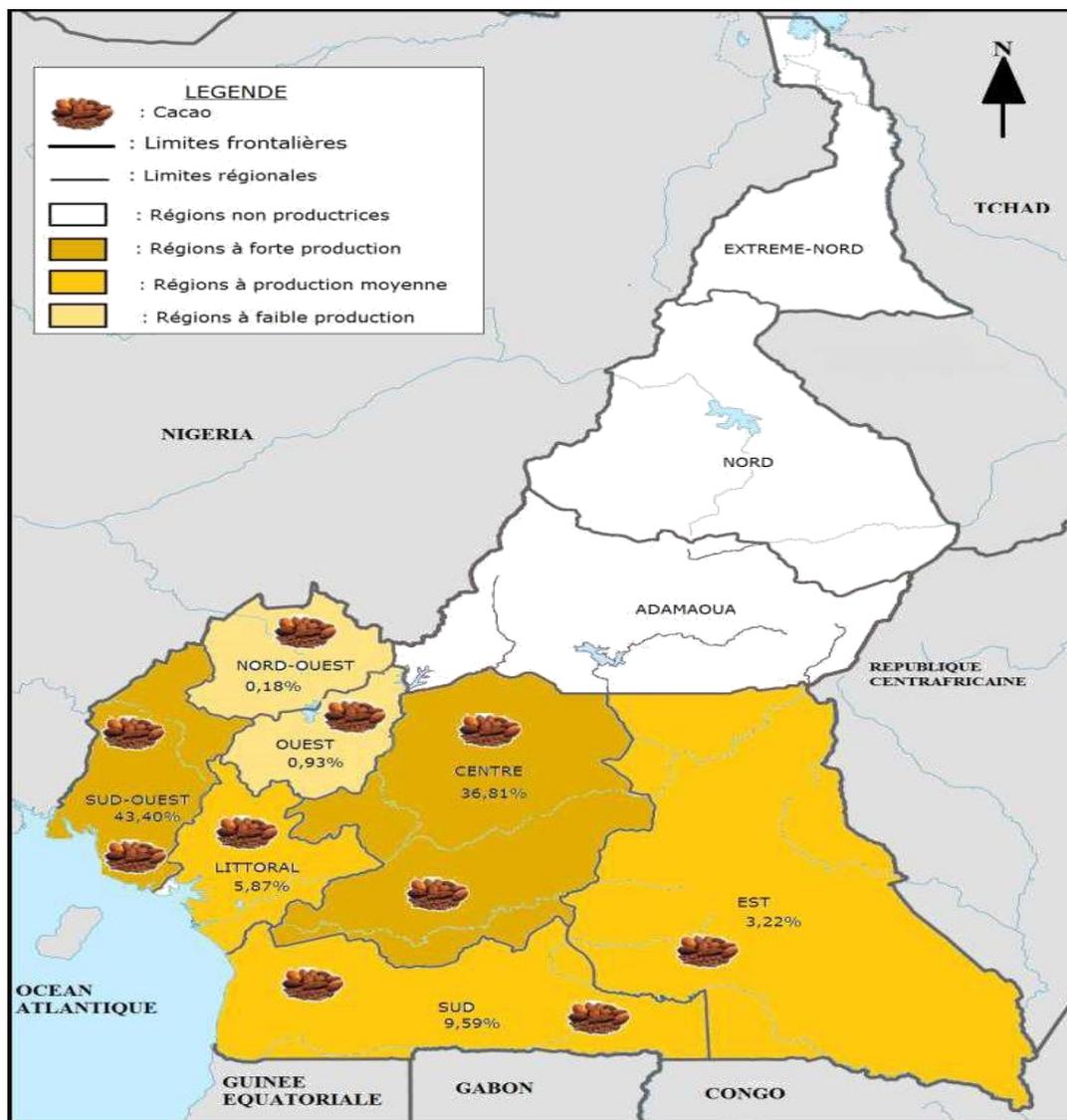


Photo 3: Carte décrivant les zones de production du cacao au Cameroun.

## **I.1.5. Importance de la culture du cacao**

### **I.1.5.1. Cacao conventionnel**

Le cacaoyer constitue une des principales cultures de rente pour le Cameroun et d'autres pays situés en Afrique de l'ouest et centrale (ICCO, 2017). Plus de 90 % du cacao mondial provient des petits planteurs. Il est cultivé pour ses fèves et ses semences qui constituent une niche économique pour les petits planteurs et les exploitants agricoles. L'Afrique quant à elle assure plus de 70 % de la production mondiale. Au Cameroun, la culture du cacao mobilise 600.000 producteurs dispersés sur une superficie d'environ 400.000 ha (Langrand , 2013).

Elle représente près de 30 % des exportations directes non pétrolières et génère environ 250 millions de dollars US de revenus par an. Sa production est estimée à 264 253 tonnes en 2019 ; hissant ainsi le Cameroun au quatrième rang africain et cinquième rang mondial après la Côte d'Ivoire, le Ghana et le Nigeria (ONCC, 2019). Le cacaoyer est cultivé pour ses fèves utilisées dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Le chocolat produit alimentaire issue de la transformation des fèves sèches de cacao; est devenu aujourd'hui une denrée très prisée sur le marché mondial et constitue par conséquent un important centre d'intérêt commercial (sa valeur commerciale mondiale représente environ 75 milliards d'euros, soit 105 milliards de dollars). Les États-Unis sont les plus grands consommateurs au monde et absorbent entre 1 et 1,4 millions de tonnes de chocolat par an. Par ailleurs, le chocolat occupe la première place dans le commerce mondial de la confiserie estimé à plus de 80 milliards de dollars américains par année (ICCO, 2016). Le cacao possède de nombreuses vertus nutritionnelles (lutte contre le mauvais cholestérol grâce à l'acide oléique, contre la constipation grâce aux tanins hydrolysables) et thérapeutique (traitement des brûlures, des lèvres sèches, des fièvres, du paludisme, du rhumatisme et des morsures de serpents).

Au niveau thérapeutique, les feuilles, tiges et écorces du cacaoyer sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour soigner les brûlures, refroidissements, lèvres sèches, fièvre, paludisme, rhumatisme, morsures de serpents et autres blessures. Les fèves renferment des alcaloïdes tels que : la théobromine et la caféine qui leur confèrent des propriétés stimulantes. Les produits contenant du cacao possèdent des propriétés antimicrobiennes et antioxydants bénéfiques à la santé humaine. Les effets bénéfiques du cacao sur le cancer, le contrôle du diabète, les maladies cardiovasculaires et la prévention des hépatites ont été rapportées dans plusieurs travaux de recherche (Rusconi et Conti, 2010 ; Sarmadi *et al.*, 2012).

### **I.1.5.2. Cacao biologique**

Le cacao biologique est un cacao issu d' un système de gestion holistique de la production cacaoyère qui favorise la santé de l'agrosystème, y compris la biodiversité, les cycles biologiques et les activités biologiques des sols. La production des aliments biologiques certifiés a connu un grand essor ces dernières années avec un marché de plus en plus fleurissant. Le marché du cacao biologique est un marché en plein extension et génératrice des sources de revenus. Le cacao biologique est vendu plus cher que le cacao conventionnel (Agencebio, 2017). La production mondiale de cacao bio s'est élevée à environ 155 750 tonnes en 2016 (soit près de 3,5 % de la production mondiale de cacao). Le cacao biologique représente environ 0,5 % du marché mondial du cacao. D'après les experts, le marché du cacao biologique va se développer avec la production biologique. Le marché mondial du chocolat bio a été estimé à 734 millions \$ en 2012 contre 304 millions \$ en 2005 et 171 millions \$ en 2002. D'après les experts, il pourrait atteindre 886 millions \$ en 2021. L'Europe est le premier marché pour le chocolat bio devant l'Amérique du Nord (IFOAM, 2017). L'Afrique possède 15% de surface cultivable de cacao biologique à l'échelle mondial et la République Démocratique du Congo est le premier pays producteur du cacao biologique en Afrique (72 % de surface cacaoyère biologique). Le Cameroun figure parmi la liste des pays producteurs de cacao biologique et ne dispose pas encore des grandes surfaces cultivables de cacao biologique (IFOAM, 2017).

## **I.2. Problèmes liés à la culture du cacaoyer**

Malgré l'importance du cacao, la production de cette culture connaît un déclin considérable au Cameroun. Sa production annuelle évolue en « dent de scie » au fil des années (232 530 tonnes (2015), 269 495 tonnes (2016), 231 642 tonnes (2017), 214 825 tonnes (2018)) malgré les programmes de relance étatique de la filière cumulés au financement des organismes internationaux (ONCC, 2019). Cette variation loin des objectifs escomptés du gouvernement camerounais (600000 tonnes à l'horizon 2020) ; est liée au faible rendement des variétés cultivées mais surtout aux contraintes phytosanitaires couplé à l'indisponibilité quantitative et qualitative des semences. Le cacaoyer est une plante particulièrement sensible aux maladies et ravageurs qui entravent une bonne partie de sa production à tous les stades phénologiques de son développement (Ploetz *et al.*, 2007).

### **I.2.1. Problèmes de semences**

La semence est le premier maillon dans la chaîne de culture du cacaoyer. Le marché du matériel végétal de cacao au Cameroun est un marché fort déséquilibré avec une offre annuelle et

actuelle de 5 à 6 millions de plants pour une demande de près de 20 millions de plants. Ce déséquilibre est dû à la baisse de l'offre en matériel végétal au niveau des champs semencier qui fournissent moins de 85000 cabosses par an (Essian, 2019). A cet effet les exploitants agricoles font recourt à plusieurs stratégies parmi lesquels l'usage des cabosses "mal connu" pour la production des semences et l'achat des semences auprès de certaines populations dont les fèves utilisées ont des origines douteuses. De plus les semences à plant généralement obtenues sont produites avec les terres de remplissages prélevées dans les zones contaminés par les pathogènes telluriques. Les effets délétères de ces pathogènes sur la qualité des jeunes plants en pépinières sont pléthores (Photo 4) (Ten hoppen *et al.*, 2016).



Photo 4: Plants de cacaoyers attequés par *Phytophthora megakarya* en pépinière (Photographié par Tene, 2017).

### **I.2.2. Problèmes phytosanitaires**

Les pertes dues aux diverses maladies et parasites touchent environ 20 à 40 % de la production totale (ICCO, 2016). Les maladies cryptogamiques sont plus importantes et variées. On distingue:

- Le balai de la sorcière due à *Crinyellis perniciososa* et la moliniose qui sévissent en Amérique Centrale et du Sud ;
- Les maladies virales, dont la plus importante est le 'swollen shoot' (l'œdème des pousses) ;
- Les ravageurs tels que les mirides (insectes), les foreurs de tige de cacaoyer, les guis, les termites, les mauvaises herbes sévissent en Afrique de l'Ouest.

De toutes ces maladies, la pourriture brune des cabosses (surtout en Afrique) due à *Phytophthora* spp provoque la grande perte de production. Sept champignons ont été identifiés comme causant la pourriture brune du cacao mais deux ont une grande incidence pour la prévalence à savoir:

- *Phytophthora palmivora* : Présent dans les zones tropicales et sub-tropicales, il se retrouve pratiquement dans le monde entier ;
- *Phytophthora megakarya* : Uniquement présent en Afrique Centrale (principalement au Cameroun) et de l'Ouest ; il serait venu d'un arbre hôte de la forêt locale avant d'atteindre le cacao. Il a été identifié sur les fruits des variétés Cola et Irvingia (Vos Janny *et al.*, 2003). Les études effectuées sur l'ensemble des zones cacaoyères du Cameroun ont révélé la présence d'une seule espèce majoritaire : *P. megakarya* responsable de la pourriture brune (Nyassé, 1992).

*P. megakarya* attaque le cacaoyer au niveau des feuilles, des troncs et des fruits. Plusieurs organes de *P. megakarya* sont susceptibles de provoquer la maladie sur les fruits du cacaoyer quelques soit leur stade de développement (hyphes, sporocystes, spores). Mais les zoospores joueraient le rôle de dissémination le plus important. Les fruits atteints présentent, une ou plusieurs tâches brunes dures au toucher, recouvertes d'un revêtement sporifère blanc- crème. Les cabosses momifiées sont les principales sources d'infection au *P. Palmivora*. Le sol est en revanche la principale source d'infection à *P. megakarya* (Shahin *et al.*, 2017).

### **I.3. Généralités sur *P. megakarya***

#### **I.3.1. Origine, taxonomie et biologie.**

##### **I.3.1.1. Origine et taxonomie**

Le nom *Phytophthora* vient du grec « *Phyton* » et « *Phthéiōro* » et signifie « *destructeur des plantes* ». Le genre fut décrit pour la première fois en 1875 par Anton de Barry qui élucida le cycle de vie de *P. infestans*, agent pathogène de la pomme de terre et posa les fondements même de la pathologie végétale (Matta, 2010). En Afrique *Phytophthora megakarya* a été isolée pour la première fois au Togo en 1982 (Djeckpor *et al.*, 1982). Au Cameroun, elle est essentiellement l'espèce responsable de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer (Nyassé, 1992). Sa systématique décrite par Attard *et al.* (2008) est la suivante :

- **Embranchement** : Thallophytes
- **Classe** : Siphomycètes
- **Sous-classe** : Oomycètes

- **Ordre** : Péronosporales
- **Famille** : Peronosporaceae
- **Genre** : *Phytophthora*
- **Espèce** : *P. megakarya*.

### **I.3.1.2. Biologie**

Tout comme les autres Oomycètes, *P. megakarya* est un organisme à structure végétative diploïde qui possède des spores portant deux flagelles s'apparentant aux algues plutôt qu'aux champignons. Cependant les Oomycètes se distinguent des algues par l'absence de chlorophylle. L'appareil végétatif de *P. megakarya* est un thalle filamenteux formé de mycélium coenocytique présentant des hyphes peu ou abondamment ramifiés. Les Oomycètes sont des organismes affectionnant l'humidité et possédant une paroi riche en chitine. Contrairement aux autres mycètes, il a une paroi riche en glucane et en cellulose (Mfegue, 2012; Shahin *et al.*, 2017). Son mode de reproduction est sexuée et asexuée. Toutefois dans les conditions naturelles, la multiplication asexuée est la plus fréquente (Nyassé, 1997). Au cours de la reproduction sexuée, il se produit une fusion entre une anthéridie (gamète male) et une oogone (gamète femelle) sous le contrôle des hormones Mat (Harutyunyan *et al.*, 2008). La fusion des gamètes en présence de stérols aboutit à la formation des oospores qui sont des structures sphériques à parois épaisses (Figure 1). Cette reproduction sexuée est homothallique si les gamètes sont formés sur le même thalle et hétérothallique si les gamètes sont formés sur des thalles différents. Ainsi dans le cas du *Phytophthora*, le champignon est considéré comme étant hétérothallique.

La reproduction asexuée quant à elle consiste en la production de zoospores qui jouent un rôle prépondérant dans le pouvoir pathogène des *Phytophthora*. Certaines espèces dont fait partie *P. megakarya* produisent également des chlamydospores à parois épaisses qui sont des structures de conservation dans le sol et les débris végétaux lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Mfegue, 2012). Chez *P. megakarya*, lorsque les conditions deviennent favorables, l'on note une prolifération de sporanges et la libération de zoospores en présence d'eau libre. Les zoospores nagent ensuite par chimiotactisme à la surface de l'eau vers les organes à infecter, pendant une période variant de quelques minutes à plusieurs heures (en fonction de la température et du pH du milieu), puis ils s'enkystent (Shahin *et al.*, 2017). Trente minutes après enkystement, la germination se produit et l'hyphe pénètre les tissus de l'hôte dans les 48h par temps très humide, marquant ainsi le début du processus infectieux. Les deux modes de reproduction sont représentés dans la Figure 1.

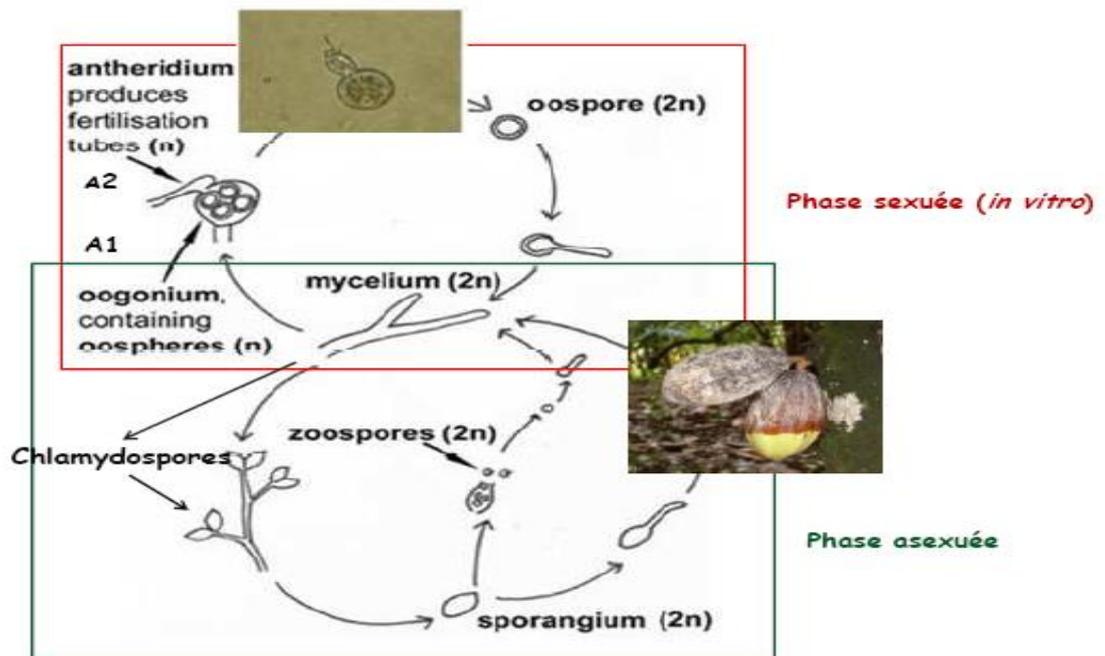


Figure 1: Cycle de Reproduction de *P. megakarya* ( Mfegue, 2012)

La reproduction sexuée consiste en la fusion des gamétanges mâle (anthéridie) et femelle (oogone) en présence des stérols pour produire des oospores (2n) qui sont des structures à parois épaisses, capables dans la nature de résister aux conditions extrêmes et à l'absence prolongée d'hôte. La reproduction asexuée quant à elle consiste en la production de zoospores qui jouent un rôle prépondérant dans le pouvoir pathogène des *Phytophthora*. Certaines espèces dont fait partie *P. megakarya* produisent également des chlamydospores à parois épaisses qui sont des structures de conservation dans le sol et les débris végétaux lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Chez *P. megakarya*, lorsque les conditions deviennent favorables, l'on note une prolifération de sporanges et la libération de zoospores en présence d'eau libre. Les zoospores nagent ensuite par chimiotactisme à la surface de l'eau vers les organes à infecter, pendant une période variant de quelques minutes à plusieurs heures. L'encadré vert représente la phase asexuée. La photographie montre des sporocystes (blanchâtres) couvrant les taches brunes à la surface des cabosses infectées. L'encadré rouge représente la phase sexuée du cycle .

### I.3.2. Relation hôte-parasites

#### I.3.2.1. Description de la pourriture brune et épidémiologie

En dehors des cabosses, la pourriture brune se manifeste sur plusieurs parties de l'arbre à savoir le tronc, les jeunes branches les cotylédons et les feuilles ; mais l'attaque des cabosses revête un impact économique. Les attaques des feuilles sont limitées en pépinière provoquant

ainsi les dégâts importants. La pourriture brune des cabosses se caractérise par l'apparition sur le cortex des fruits d'une petite tache translucide qui brunit au bout de deux jours. La tache devient brun chocolat puis noircit et se répand rapidement jusqu'à ce que la cabosse soit entièrement couverte. Cette tache se couvre après quelques jours de fructifications du champignon sous forme de revêtement blanchâtre plus ou moins abondants. La destruction des fruits intervient une dizaine de jours plus tard. Les hyphes, les sporanges et les spores représentent les principaux organes disséminateurs du parasite (Gidoïn *et al.*, 2013). La source primaire d'inoculum la plus efficace serait le sol, les fruits les plus bas étant contaminés par projection des particules de terre contenant des propagules infectieuses lors des pluies. Il existe aussi une possibilité d'infection par les coussinets floraux (Babacauch, 1980), ainsi que par les insectes. En champ, la dissémination du parasite revêt deux aspects :

- Une dissémination verticale qui s'effectue de cabosse à cabosse, du bas vers le haut par contact direct ou grâce aux insectes ;
- Une dissémination horizontale qui se fait d'arbre à arbre par les rongeurs et des insectes.

La plupart des attaques se situent dans la zone apicale ou dans la zone pédonculaire du fruit où stagne l'eau de pluie. Les attaques latérales peuvent se faire au point de contact de deux cabosses ou de la cabosse avec le tronc qui conserve l'eau ou l'humidité. Des études épidémiologiques ont permis de connaître quantitativement les endroits du cortex où apparaissent les premiers symptômes de la maladie. Ndoumbè-Nkeng (2002) a montré que 46 % des débuts d'infection se réalisaient en zone proximale, 26 % en zone médiane et 28 % en zone distale (Photo 5)

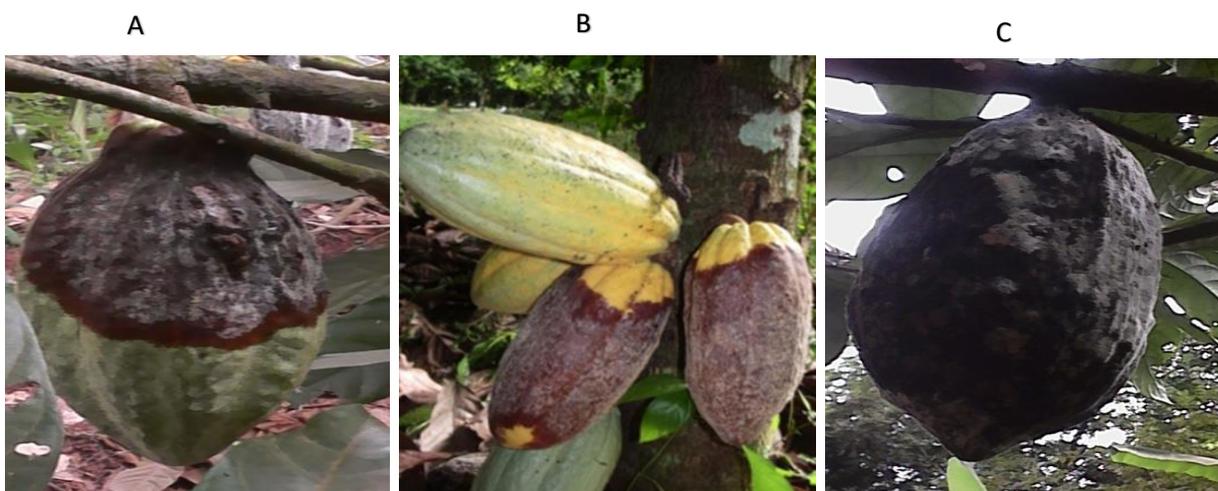


Photo 5: Cabosses de cacao infectées par *Phytophthora megakarya* [(A) Attaque apicale; (B) Attaque distale; (C) Forme momifiée] (Photographié par Tene, 2016).

### I.3.2.2. Parasitisme

L'infection du cacaoyer par *P. megakarya* se déroule en trois étapes (Legavre *et al.*, 2015). A la suite du contact avec la plante, les zoospores émettent des tubes germinatifs qui traversent l'épiderme de façon passive (à travers les ouvertures naturelles) ou de manière active (lyse des parois des cellules épidermiques grâce à l'action des hydrolases produite par le parasite). L'apparition des tâches nécrotiques à la surface de l'épiderme caractérisent l'invasion de la plante par le parasite. Pendant ces phases *P. megakarya* sera reconnu par les récepteurs des protéines kinases (''Receptor-Like protein Kinases : RLK'') de la plante. Cette interaction *P. megakarya*-RLK va induire l'activation des voies de signalisation cellulaire du cacaoyer qui conduira à l'activation des facteurs de transcription et l'expression des gènes de défenses. La cascade de signalisation est régulée par l'activité des phytohormones telles que l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'éthylène, l'acide gibbérellique et l'auxine (Figure 2). Par ailleurs ces gènes précédemment exprimés codent pour le développement et la mobilisation de l'arsenal des substances défensives de la plante à l'instar des substances de défenses préexistantes (phytoanticipines), les phytoalexines et les protéines liés à la pathogénèse (Legavre *et al.*, 2015)

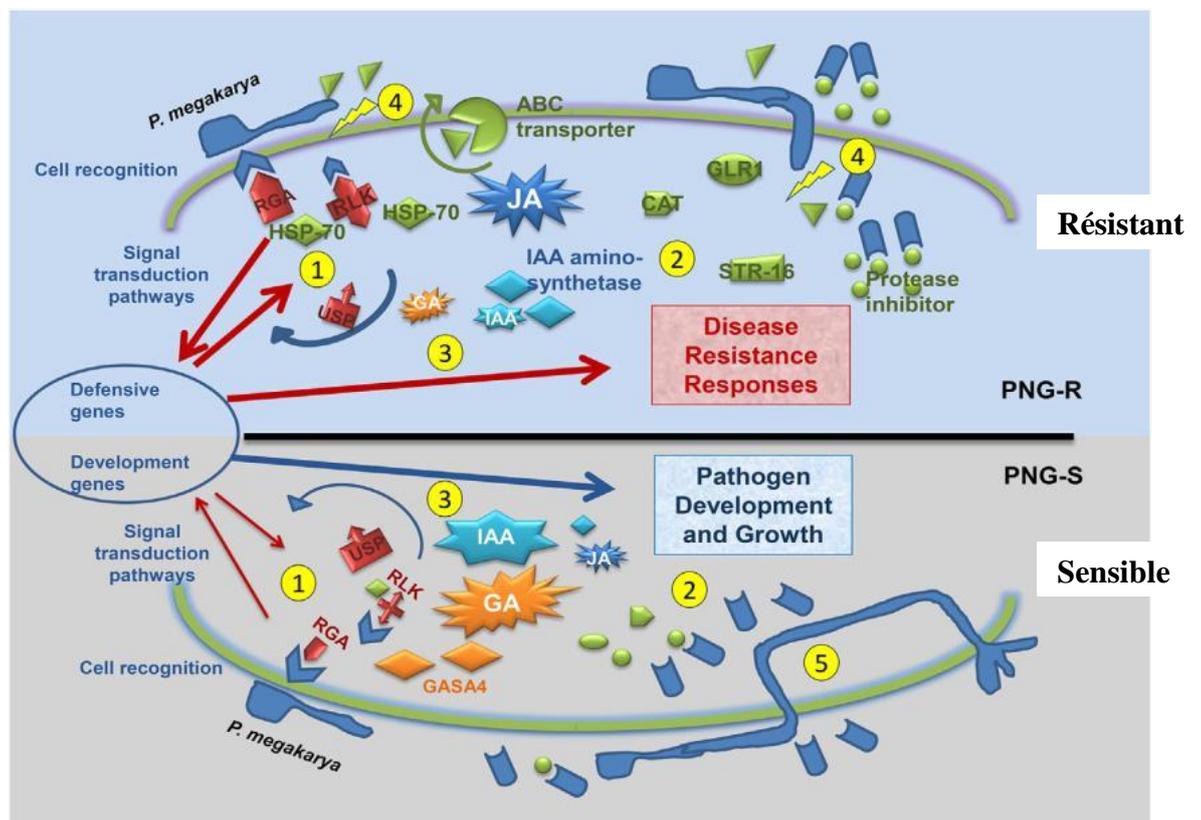


Figure 2: Mécanisme d'interaction *P. megakarya* / *T.cacao* (Legavre *et al.*, 2015).

La figure 2 décrit un modèle de défense moléculaire chez deux clones du cacaoyer (sensible et résistant) lors de l'interaction *P.megakarya* /*T. Cacao*. La reconnaissance rapide et efficace des éliciteurs de *P. megakarya* par les récepteurs de *T. cacao*, tels que la protéine de résistance aux maladies (RGA) et la protéine kinase de type récepteur (RLK), donne un avantage au clone résistant (PNG-R) (1). En effet, elles sont impliquées dans la transduction du signal de stress et stimulent ensuite une plus grande expression de certains gènes de défense généraux et spécifiques (2). Ils codent pour une protéine de choc thermique de 70 kDa (HPS-70), le transporteur ABC, l'inhibiteur de protéase, la protéine sulfurtransférase (STR-16), le glycérol kinase (GLR1) et l'isozyme catalase (CAT). Certains de ces gènes qui ont été plus exprimé ou induits spécifiquement chez le clone résistant (PNG-R) lors des d'attaques du pathogène ont également été décrits comme étant des phytohormones telles que l'acide jasmonique (JA) impliqué dans les réponses aux attaques de pathogènes (3). De même, l'expression du gène de l'IAA-amido synthétase chez le clone résistant (PNG-R) entraîne considérablement la réduction de l'auxine libre (IAA), une phytohormone qui augmente la propagation des agents pathogènes. Pour ce clone, cela implique la production d'antagonistes qui bloquent plus ou moins rapidement la propagation de l'agent pathogène (4). En revanche, l'expression de la protéine universelle de stress (UPS) et de la protéine 4 régulée par la gibbérelline (GASA4) était sous le contrôle de l'acide gibbérellique (GA), une autre phytohormone qui a un effet négatif sur la résistance aux maladies. Ainsi, chez le clone sensible (PNG-S), l'hypothèse pourrait être que les actions hormonales de l'IAA combinées à l'AG favorisent la propagation de l'agent pathogène (5).

### **I.3.3. Stratégies de lutte contre *P. megakarya***

La pourriture brune des cabosses causée par *P. megakarya* est à l'origine de pertes de production de l'ordre de 80 %, voire 100 % en conditions de très forte humidité. Toutes les tentatives d'éradication de l'agent pathogène sont cependant restées vaines (Acebo-Guerrero *et al.*, 2011). Ainsi plusieurs méthodes de lutte ont été testées à ce jour pour combattre la pourriture brune des cabosses de cacaoyers. A ce jour, plusieurs stratégies ont été mises au point pour éradiquer la pourriture brune des cabosses. Les méthodes les plus courantes sont les techniques culturales, la lutte biologique, génétique et chimique.

#### **I.3.3.1. Lutte culturale**

La lutte culturale vise à créer des conditions défavorables au développement d'un agent pathogène et à optimiser le rendement de la plantation en améliorant les techniques culturales telles que : l'élimination progressive des cabosses infectées, la taille régulière des cacaoyers, la

gestion rigoureuse de l'ombrage qui a un impact à la fois sur le développement des adventices, du pathogène et des ravageurs (Babin *et al.*, 2010).

### **I.3.3.2. Lutte génétique**

La lutte génétique repose sur la sélection et sur la multiplication par hybridation des cacaoyers qui présentent un bon niveau de tolérance à *Phytophthora megakarya*. Elle exploite l'ensemble des méthodes basées sur les techniques de marquage moléculaire qui ont pour but de développer des variétés résistantes à la pourriture brune des cabosses de cacaoyer. Cependant la lutte génétique est difficile à exploiter à court terme à cause de la longueur du cycle de *T. cacao* (Ondobo, 2014 ; Manga *et al.*, 2018). Afin de raccourcir le cycle de sélection, des méthodes d'évaluation précoce de la résistance par les inoculations artificielles ont été développées sur les feuilles et ont ouvert des voies de recherche sur la sélection des cacaoyers ayant une moindre sensibilité (Iwaro *et al.*, 1997 ; Djocgoué *et al.*, 2011). La principale difficulté est qu'aucune résistance complète à *P. megakarya* n'a été identifiée à ce jour chez le cacaoyer, d'où l'intérêt de chercher l'hôte natif potentiel de cet agent pathogène.

### **I.3.3.3. Lutte chimique**

La lutte chimique est la principale méthode utilisée contre *P. megakarya* chez le cacaoyer. Elle consiste en l'utilisation périodique des pesticides en pépinière et en champs (fongicides, insecticides) qui sont des agents chimiques capables de tuer ou d'inhiber le développement du pathogène ou du ravageur. Il existe deux types de fongicides à savoir : le fongicide de contact qui reste à la surface de plante où il a été appliqué et ne possède plus d'activité après infection. Le fongicide systémique quant à lui, est absorbé dans les tissus de la plante via la sève pour atteindre d'autres organes et peut exercer son activité fongicide après infection. Les fongicides de type phénylamide (Metalaxyl) sont les plus utilisés. Ce type de molécule interfère avec la biosynthèse des ARN, en ciblant les ARN polymérase, enzymes présentes dans tous les organismes vivants (Jespers *et al.*, 1994). Bien qu'étant efficace, cette méthode de lutte entraîne de nombreuses contraintes telles que la fréquence des applications, le coût élevé des produits, la main d'œuvre, la pollution, la toxicité, l'accumulation de ces produits dans les différents maillons de la chaîne alimentaire. Ces substances ont également des conséquences néfastes sur l'environnement, la santé des agriculteurs et sur la qualité des fèves de cacao. C'est le cas des fongicides chimiques à base de métalaxyl qui ont été interdits de commercialisation en zone CEMAC car reconnus comme molécules cancéreuses par le comité inter-états des pesticides en Afrique Centrale (ICCO, 2016). C'est dans la même lancée que lors de la COP 21 tenue en France en Décembre 2015, l'une des résolutions majeures pour palier au

mal actuel qui est le changement climatique, c'est le développement de l'agro-écologie visant à la réduction de l'émission des gaz à effet de serre de 20-60 % à l'horizon 2030 (<http://agriculture.gouv.fr/dossier-COP-21>). Cependant, cette agro-écologie devrait contribuer au développement des méthodes alternatives pour une agriculture durable, compétitive, très peu dépendante des produits chimiques et à la fois respectueuse de l'environnement. De nos jours, la mission des chercheurs consiste à trouver des réponses pour augmenter la production tout en protégeant l'environnement. Pour cela, la mise en place des variétés adaptées, la sédentarisation des cultures, le renouvellement des vergers vieillissants et l'amélioration de la durabilité des productions sont d'un intérêt majeur. Actuellement, la mise au point des méthodes efficaces de lutte contre les maladies se fait à travers différentes voies.

#### **I.3.3.4. Lutte biologique**

La lutte biologique consiste en l'utilisation des composés organiques et / ou d'organismes vivants pour limiter la pollution et la nocivité de plusieurs ennemis des cultures. Cette méthode efficace est moins toxique aussi bien pour l'homme que pour l'environnement . Elle utilise la matière organique, les extraits de plantes, les microorganismes tels que les champignons et les bactéries (Taiwo *et al.*, 2016). Elle implique une série d'interactions complexes avec l'hôte, l'agent pathogène, l'agent antagoniste et l'environnement. Le principe repose sur le fait que, des relations antagonistes peuvent limiter ou réduire le développement d'un agent pathogène via la compétition (pour les nutriments, l'oxygène et/ou l'espace), l'antibiose (inhibition d'un microbe par l'antibiotique d'un autre) et le parasitisme ou d'autres formes particulières d'inférence. En ce qui concerne la lutte biologique contre la pourriture brune du cacaoyer au niveau des pépinières; plusieurs agents antagonistes ont été utilisés pour contrôler la pourriture brune du cacao à savoir : *Streptomyces cameroonensis* (Boudjeko *et al.*, 2017), *Trichoderma asperillum* (Tondje *et al.*, 2007; Tchameni *et al.*, 2011), *Arbuscular mycorrhizal* fungi (Tchameni *et al.*, 2017), les champignons endophytes (*geniculosporim* sp) isolé à partir des feuilles de cacaoyer et plus précisément la souche BC177 qui réduit la sporulation de *P. megakarya in vitro* (Tondje *et al.*, 2006). Par ailleurs, des études ont également montré l'utilisation des molécules organiques tels que le chitosane et coquilles d'escargots dans un schéma de lutte biologique contre *P. megakarya* agent responsable de la pourriture brune au niveau des pépinières (Tene *et al.*, 2017).

### **I.4. Coquilles d'huitres en lutte biologique**

#### **I.4.1. Généralités sur les coquilles d'huitres**

Les huîtres (*Crassostrea spp*) sont des mollusques vivants en milieu aquatique appartenant à la famille des *Ostreidae*. Leur corps, typique des gastéropodes, est recouvert d'une

épaisse couche de coquille. La croissance pondérale des huîtres correspond surtout à celle de leur coquille. Elle peut représenter, en fonction des saisons, 50 à 75% du poids de l'animal (Xing *et al.*, 2013). Au Cameroun, le bassin de production des coquilles d'huîtres se trouve dans la ville de Mouanko (Département de la Sanaga Maritime) . Les coquilles d'huîtres sont disponibles durant toute l'année; les prix oscillent en fonction des saisons entre 6 000 FCFA et 12 000 FCFA pour un sac de 100 kg. De plus, les coquilles d'huîtres sont utilisées dans plusieurs provenderies localisés dans les huit régions propices à la culture du cacao au Cameroun (Anonyme, 2017).

#### **I.4.2. Propriétés physicochimiques des coquilles d'huîtres**

Des travaux sur la caractérisation des coquilles d'huîtres montre qu'elles contiennent plus de 40 % de carbonate de calcium et de chitine. A côté de ces constituants majeurs, on note la présence des protéines (0,5 %), du potassium (214 mg/ kg de coquille), phosphore (48 mg/kg de coquille), magnésium (2040 mg /kg de coquille), fer (285 mg/kg de coquille), sodium (5 g/kg de coquille) et zinc ( 8 g/kg de coquille) variant selon les espèces (Chang hoon *et al.*,2008; Xing *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2017). Le zinc et le magnésium sont généralement présents sous forme d'oxyde de zinc et d'oxyde de magnésium . Les études ont également montré que le chauffage des poudres de coquilles à 1050 °C entraîne la transformation du carbonate de calcium en oxyde de calcium (Xing *et al.*, 2013). Par ailleurs, un autre constituant majeur des coquilles d'huîtres est la chitine ; deuxième polymère le plus abondant sur la terre après la cellulose. La chitine est présente dans les capsules d'œufs des Cnidaires, les cuticules des arthropodes (insectes, crustacées, arachnides) et les parois cellulaires des champignons, des algues. La structure chimique de la chitine est un enchaînement de monomères N-acétylglucosamine reliés par une liaison glycosidique (1→4) (Figure 3) et sa structure physique présente trois formes différentes en fonction de l'arrangement spatial de la chaîne de cette macromolécule à savoir la chitine  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Chang *et al.*, 2010). C'est un polysaccharide de haut poids moléculaire et de faible solubilité. Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes de chitine. Dans la chitine  $\alpha$  ; celle généralement présente dans les coquilles d'huîtres, les chaînes polysaccharidiques sont disposées de façon antiparallèle, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogènes, et entraîne une rigidité importante et une faible sensibilité aux agents de désacétylation (Xing *et al.*, 2013, Shen *et al.*, 2017).

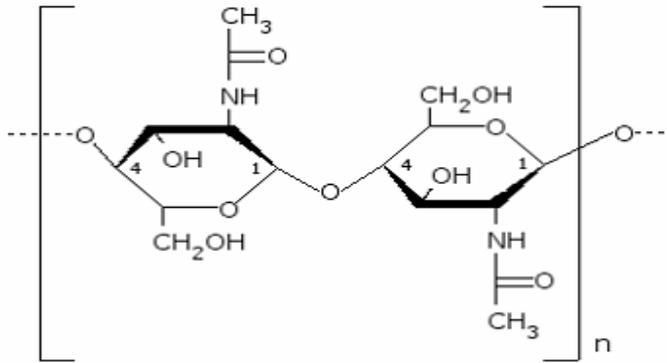


Figure 3: Structure de la chitine

### I.4.3. Propriétés biologiques

Les coquilles d’huitres sont des substances organiques non toxiques et biodégradables ayant montré un potentiel antimicrobien vis-à-vis de plusieurs microorganismes parmi lesquels *P. megakarya* (Photo 6) (Xing *et al.*, 2013, Shen *et al.*, 2017) . Xing *et al.* (2013) ont montré que les coquilles d’huitres et les poudres de coquilles d’huitres chauffées possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes. Des études ont montré que les coquilles d’huitres exercent un contrôle sur la prolifération des oomycètes et des champignons soit par l’arrêt de la croissance du pathogène ou par l’induction du contrôle des modifications morphologiques, des altérations structurales et des désorganisations moléculaires des cellules fongiques. Ainsi, il a été suggéré que les charges positives, situées sur les groupements aminés des molécules de chitine présente dans les coquilles d’huitres, interféraient avec les charges négatives situées à la surface des cellules fongiques (Figure 3). Par ailleurs, plusieurs travaux démontrent la capacité des coquilles d’huitres à modifier la flore microbienne du sol et à exercer un contrôle sur le métabolisme de plusieurs genres microbiens à l’instar des actinobactéries et des champignons mycorhiziens à arbuscule (Chang hoon *et al.*, 2008, Shen *et al.*, 2017).



Photo 6: Coquilles d’huitres (photographié par Tene, 2015)

#### **I.4.4. Utilisation des coquilles d’huîtres en agriculture**

Les compositions minérales et organiques des coquilles de mollusques leur confèrent une importance sur le plan agronomique indéniable. La teneur élevée en calcium des coquilles permet leur utilisation sous forme d’amendement calcique pour améliorer le pH et les propriétés chimiques des sols dans les régions de forte pluviométrie. Des études ont montré qu’une application de 20T/ha de poudre de coquilles d’huître améliorerait le pH des sols acides de +0,4 au bout d’un mois. Cette augmentation du pH concourt à l’amélioration de la qualité du sol agricole et à l’inhibition des microorganismes se développant dans des milieux de faible acidité (Gauvin, 2014). A ce jour , plusieurs produits à base des coquilles d’huîtres sont utilisés comme agent de calandrage pour la production des cultures horticoles (Photo 7). Les coquilles de mollusques sont d’importantes sources de chitine. La chitine et l’une de ses formes dérivées le chitosane ont plusieurs applications dans le domaine agricole. Leurs caractères polycationiques leur permettent d’avoir des propriétés antimicrobiennes et élicitrices des réactions de défenses chez la plante sans pour autant qu’il soit phytotoxique (Benhamou *et al.*, 2012). Ce sont des molécules inhibitrices des activités des bioagresseurs tout en stimulant le système immunitaire impliqué dans la résistance de la plante hôte face à une infection du pathogène. Ces polymères sont également des stimulateurs de germination et de croissance des plantes cultivées. Ainsi, l’application de la chitine comme engrais foliaire, dans les concentrations de 100-125 ppm, augmente le taux de croissance; la teneur en matière sèche totale ; la capacité photosynthétique et la teneur en chlorophylle des feuilles chez le gombo (Renukaradhya *et al.*, 2010). De plus, l’addition au sol de carapaces de crustacés, dont la chitine est le constituant majeur et de composts fabriqués à partir de résidus chitineux ont permis le contrôle de certains agents phytopathogènes tels que *Streptomyces scabiei* (Roy *et al.*, 2010). A notre connaissance très peu d’études font état de l’utilisation des coquilles d’huîtres comme agent de biocontrôle de maladies causées par les phytopathogènes. En revanche, la teneur en chitine et calcium des coquilles d’huîtres font de ce dernier un outil de protection et de restauration de l’environnement (Ung-Kyu *et al.*, 2011).



Photo 7 : Produits biologiques à base des coquilles d’huitres utilisés pour la production horticole en Amérique du nord (A) :’’Potting and garden oyster shell’’, (B) :’’All Natural Oyster Shell’’ (Shen *et al.*, 2017)

## **I.5. Généralités sur les formulations et les compléments de formulations des pesticides**

### **I.5.1. Généralités sur les formulations**

La formulation d’un pesticide est un procédé physique, consistant à mélanger un ou plusieurs composés ayant une activité biologique spécifique en vue de la recherche du juste équilibre et de l’efficacité biologique du pesticide obtenu.

Il existe différents types de formulations :

- Les formulations liquides: elles regroupent les concentrés huileux, émulsionnants, émulsionnants inverses et aqueux mais également des solutions aqueuses ; c’est le cas de plusieurs pesticides retrouvés dans les marchés, c’est l’exemple de lamina gold 12EC, colibri 50EC, Parastar et Miridor 60EC ;
- Les formulations poudreuses : elles regroupent les bases ou concentrés, les dispersions dans l’eau, les poudres pour poudrages, poudre mouillable. C’est le cas de plusieurs fongicides : plantomil, okmil, dimetalmgold et bien d’autres ;
- Autres types de formulations : elles regroupent les aérosols, les fumigants, les fumées et brumisations.

### **I.5.2. Généralités sur les compléments de formulations.**

Les compléments de formulations sont les substances de nature varié ajouté à la formulation de base afin d’augmenter la charge du produit final. Ils sont généralement appelés éléments de charge. Les compléments de formulations peuvent être les substances chimiques, les extraits des plantes, les parties des plantes, les extraits des animaux. Dans le cadre de notre travail nous avons utilisé *Tithonia diversifolia* .

### **I.5.2.1. Généralités sur *Tithonia diversifolia***

*T. diversifolia* ou tournesol mexicain est une plante en cohissante originaire d'Amérique Centrale et largement répandue sous les tropiques (Photo 8). Au Cameroun elle est répandue dans toutes les zones propices à la culture du cacao. Elle est connue sous plusieurs appellations à savoir fleur marguerite ou fleur jalousie. Du point de vue agronomique, sa présence dans une plantation est indicatrice d'un sol riche en matière organique. De par sa richesse en macroéléments, microéléments et en métabolites secondaires, le tournesol mexicain est reconnu pour ses propriétés antifongiques, antibactériennes ainsi que stimulatrices de la croissance et des systèmes de défenses des plantes ( Kerebba *et al.*, 2019). Ainsi une somme des travaux réalisées au Cameroun a montré que les flocons secs et les extraits fermentés (purin) du tournesol mexicain exercent une activité antifongiques vis-à-vis de plusieurs phytopathogènes et stimulatrice des mécanismes de défenses des jeunes plants de bananiers plantain lors de l'interaction *Musa spp* / *Mycosphaerella fijiensis* ( Ewane *et al.*, 2020). Les travaux de caractérisations du purin montrent qu'elle contient les sesquiterpènes lactones, les flavonoïdes, azote, calcium, phosphore, magnésium (Nyami *et al.*, 2015 ; Kerebba *et al.*, 2019).



Photo 8 : Feuilles et fleur du tournesol mexicain (photographié par Tene, 2016).

## **I.6. Mécanismes de défenses chez les plantes**

### **I.6.1. Généralités**

Les plantes cultivées, sont exposées à des agresseurs présents dans leur environnement, tels que les champignons, les Oomycètes, les bactéries, les virus, les viroïdes, les nématodes, les insectes et même d'autres plantes parasites (Dreher et Callis, 2007). Pour se protéger, elles sont

équipées d'un arsenal de mécanismes de défense. Les mécanismes de défenses sont l'ensemble des processus efficaces mis en place par la plante pour retarder ou stopper son envahissement par les pathogènes. À la suite d'une infection, dépendamment de l'agresseur, les plantes vont déclencher un remaniement rapide de l'expression des gènes afin de moduler certaines voies métaboliques et d'induire des réponses de défense appropriées (El Oirdi *et al.*, 2011). Cependant, lorsque les mécanismes de résistance des plantes sont inefficaces contre un agent pathogène, celui-ci réussit à infecter son hôte ce qui mène au développement de la maladie. Lors de cette agression deux cas de figure peuvent se présenter :

- L'interaction incompatible qui correspond à une incapacité de l'agent pathogène à infecter la plante. Elle peut être due à la présence de barrières physiques (cuticule, paroi végétale) et /ou chimiques (composés antimicrobiens) (EL Mnouchi, 2015).
- L'interaction compatible qui correspond à une capacité de l'agent pathogène à infecter la plante. Elle commence par une reconnaissance du pathogène par la plante avec l'intervention de différentes molécules préexistantes. Ensuite, au point d'entrée de l'agresseur, les cellules s'autodétruisent pour limiter la progression du pathogène par la réaction d'hypersensibilité. A l'intérieur de la plante trois types de stratégies sont mises en œuvre à savoir le renforcement des parois cellulaires, la production d'antibiotiques (phytoalexines) et la synthèse des protéines de défense (protéines PR).

### **I.6.2. Mécanismes de défense constitutifs**

Les défenses préformées ou constitutives constituent une composante majeure de la résistance non hôte. Cette défense préformée ne requiert, en effet, aucun stimulus préalable. Elle peut être aussi bien structurale que chimique. En effet, face aux attaques pathogènes, la cuticule et la paroi pectocellulosique constituent les premières barrières protectrices des plantes. De même pour se défendre, les plantes utilisent les composés qui peuvent être présents dans leurs tissus avant l'attaque du pathogène (Meteignier, 2015). Ces composés de défenses sont encore appelés les phytoanticipines. Leur nature et leur concentration varie en fonction du génotype, de l'âge et des facteurs externes à l'hôte. Les phytoanticipines peuvent être : les diterpénoïdes , les saponines , les isoflavonoïdes, les défensines et les lysozymes. Lorsque les barrières physiques et les phytoanticipines ne parviennent pas à stopper la progression du parasite, la plante induit d'autres mécanismes de défense.

### I.6.3. Résistances systémique induites

#### I.6.3.1. Généralités

Elle regroupe un ensemble de mécanismes actifs qui constituent des réponses à l'invasion par le parasite (Figure 4). Ces réponses interviennent à différents niveaux de la plante. Au moins trois classes séparées de réponses de défense active peuvent être identifiées dans les tissus des plantes résistantes :

- **Les réponses primaires** sont localisées au niveau des cellules en contact avec le pathogène. Elles se manifestent par la mort programmée de celles-ci. C'est la réaction d'hypersensibilité (RH) dont le but serait de retarder l'invasion microbienne afin de favoriser la mise en place d'autres mécanismes de défense. En effet, la réaction d'hypersensibilité (HR) se caractérise par une réaction nécrotique qui se manifeste précocement chez des plantes résistantes. La HR débute par un burst oxydatif caractérisé par une production importante de formes actives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS). Ce mécanisme permet à la plante de limiter la progression de l'agent pathogène car ces composés sont toxiques. Les ROS et en particulier l'oxyde nitrique (NO), aurait aussi un rôle de signalisation chez les végétaux et déclencherait l'activation d'autres réponses de défense (Meteignier *et al.*, 2015). Ceci est efficace contre les biotrope mais pas contre les nécrotrope.
- **Les réponses secondaires** sont induites dans les cellules adjacentes entourant le site initial de l'infection, en réponse aux molécules signales, les éliciteurs, libérées par des cellules en état de mort cellulaire . On parle ainsi d'une résistance locale acquise (R.L.A). Celle-ci se manifeste généralement autour de la zone où la RH s'est produite (Sansregret *et al.*, 2015). C'est une zone particulière où la mise en place de la résistance est très forte (Sansregret *et al.*, 2015). Dans ce halo en hyperactivité, les cellules subissent de profonds changements tant métaboliques que structuraux. Elles synthétisent et accumulent un grand nombre de métabolites à potentiel antimicrobien (Meteignier *et al.*, 2015), à l'instar des phytoalexines. Ces cellules autour de la nécrose subissent également un épaissement de la paroi par incorporation de nouveaux composés structuraux tels la lignine et la callose, par incrustation de composés phénoliques et par dépôts de glycoprotéines riches en hydroxyproline (Benhamou, 2009). En résumé, les réponses secondaires se caractérisent par la production de nouvelles armes chimiques après la reconnaissance du pathogène par la plante.

- **Les réponses tertiaires** ne sont pas localisées. Elles se manifestent au niveau des parties non infectées de la plante, souvent éloignées des sites d'attaque et induisent une résistance systémique acquise (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Celle-ci consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance de la plante entière contre un large spectre d'agents pathogènes. Ce type de résistance, plus tardive et moins intense, met la plante dans un état de veille permanent qui la rend prompte à réagir contre toute nouvelle attaque. Ce phénomène est connu sous le nom d'immunité physiologique acquise ou résistance induite. Elle se manifeste par l'accumulation de diverses molécules de défense, à distance des sites infectieux, à l'instar des protéines de stress, des phytoalexines, des composés structuraux et des inhibiteurs de protéases (Benhamou, 2009). Par ailleurs, son induction nécessite la propagation systémique d'un signal émis par les tissus infectés vers les tissus sains. Pour ce fait, les messagers secondaires ont été identifiés pour servir de relai : à savoir l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène, le peroxyde d'hydrogène, et les protéines phosphorylées (Holly *et al.*, 2013).

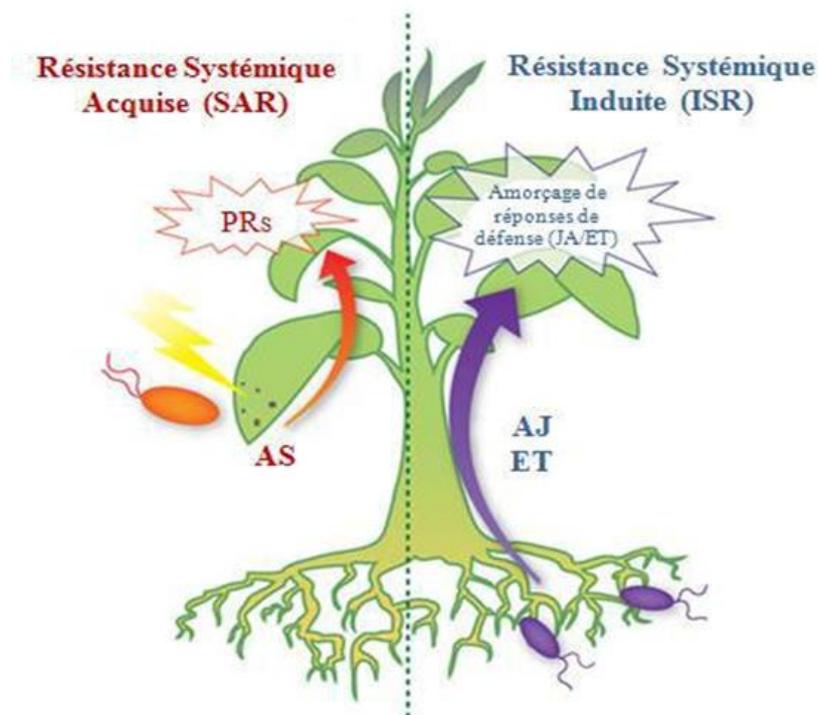


Figure 4: Représentation schématique des réponses immunes systémiques (Meteignier *et al.*, 2015).

### **I.6.3.2. Description du processus signalétiques de la résistance systémique induite**

Le processus de la résistance systémique induite peut être divisé en trois étapes principales que sont la perception du signal, la transmission d'un signal systémique et l'expression des mécanismes de défenses de l'hôte.

En effet, l'activation de la réponse immunitaire induite se manifeste premièrement par un premier contact plante-pathogène qui se traduit par une reconnaissance des motifs moléculaires associé à l'agent pathogène du pathogène cible (également désignés éliciteurs généraux) par des récepteurs transmembranaires au niveau de la cellule végétale PRRs (pour « pattern recognition receptor » ou récepteur de reconnaissance des motifs de l'agent pathogène) (Figure 5 ). Cette reconnaissance à travers les récepteurs PRR va induire une cascade de signalisation faisant intervenir la voie des MAPKinases (Mitogen Activated Proteins) (Mishra *et al.*, 2006). Les MAPKs vont moduler l'expression de facteurs de transcription des plantes tels que les WRKY (Eulgem et Somssich, 2007) et permettre ainsi d'amorcer l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la résistance (Gohre et Robatzek, 2008). Les plus importants gènes marqueurs du PTI (immunité induite par les PAMPs) sont *FRK1* (Flagellin-Induced Receptor Kinase 1) et les gènes *PR* (Pathogenesis-Related) responsable de l'expression des protéines PR. L'expression de ces gènes vont orchestrés différents évènements post-reconnaissance parmi lesquels : la perturbation du développement physiologique du pathogène à travers une alcalinisation de son milieu de croissance *via* des flux d'ions  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  et  $Ca^{++}$ ; ensuite la production de ROS (Reactive Oxygen Species), le dépôt de callose ainsi que la libération de composés antimicrobiens et parfois la fermeture des stomates (Faulkner et Robatzek, 2012) pour bloquer l'intrusion de l'agent pathogène.

En plus des gènes exprimés et des protéines mises en jeu, ce mécanisme implique une régulation hormonale de la cellule. En effet, l'acide salicylique (AS), induit en réponse aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes va inhiber la voie de signalisation qui passe par l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène (Et) induits en réponse aux agents pathogènes nécrotrophes. De plus, il y a répression de l'auxine (Holly *et al.*, 2013) (Figure 5).

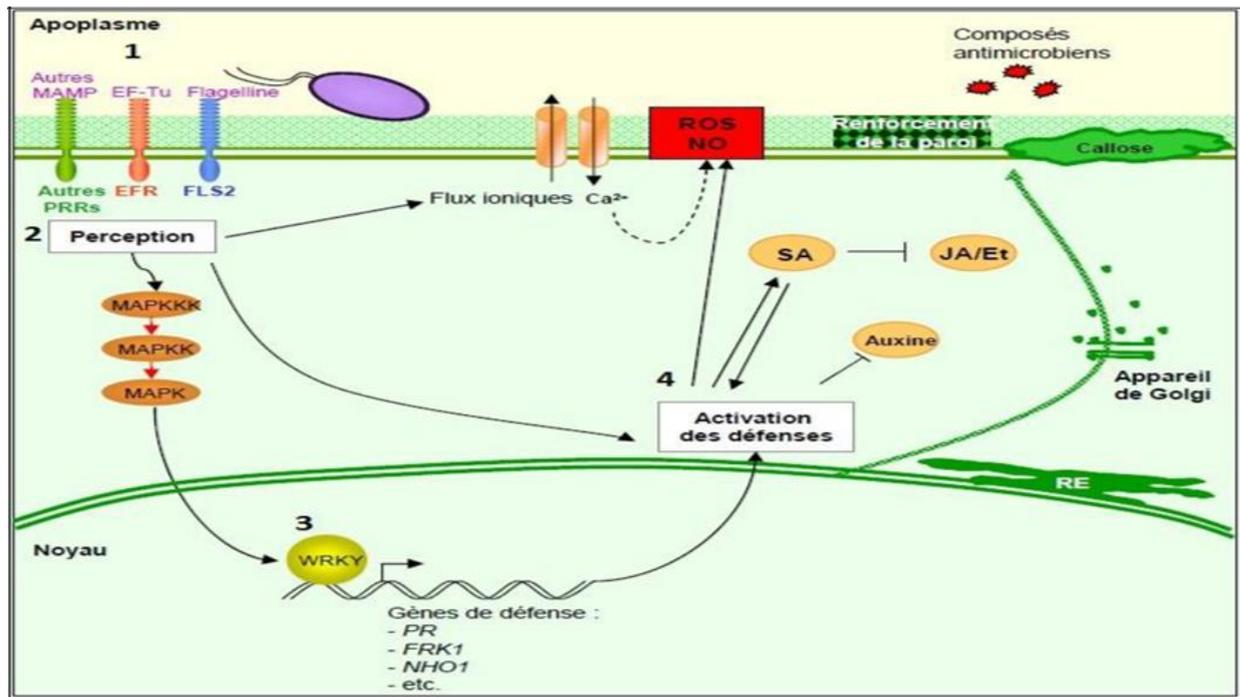


Figure 5: Mécanisme signalétique d'induction de la résistance systémique (Poueymiro, 2009).

(1) L'agent pathogène est reconnu *via* l'interaction de son PAMP avec le PRR de la cellule. (2) La perception déclenche une cascade de signalisation par les MAPKs et un flux de  $Ca^{++}$  qui engendre la libération de ROS et d'azote. (3) Les MAPKs amorcent des facteurs de transcription qui activent l'expression des gènes de défense. (4) L'activation des défenses s'exprime par une régulation des hormones de la plante comme l'acide salicylique (AS), jasmonique (AJ), l'éthylène (Et) et l'auxine. Il s'ensuit l'induction de la callose au niveau de la membrane.

### I.6.3.3. Mécanisme d'induction à l'état précoce ou mécanisme de « priming »

Le mécanisme d'induction à l'état précoce ou mécanisme de « priming » fait partie intégrante de tous les mécanismes d'induction de la résistance systémique et a pour but d'améliorer les capacités de défenses de la plante (Pastor *et al.*, 2012). Elle est caractérisée par une activation accrue des mécanismes de défenses des plantes par les stimuli et l'induction des changements physiologiques, transcriptionnels, métabolique et épigénétiques au niveau des plantes en les conférant une résistance accrue en vue des attaques pathogènes ultérieures. Elle est induite par les stimuli de nature variée à l'instar des microorganismes, les composés chimiques et biologiques qui confèrent un type de mémoire immunitaire à la plante permettant une réponse rapide et un degré de résistance élevé en cas de provocations ultérieures (Mauch Mani *et al.*, 2017) .

Le mécanisme de 'priming' se caractérise par deux événements majeurs à savoir la phase précoce et la phase post précoce. La phase précoce est l'ensemble des processus biologique qui s'opère dans la plante après perception du signal d'un stimulus spécifique. Elle

est caractérisée par l'activation rapide et robuste des systèmes de défenses de la plante qui se traduit par les changements physiologiques, moléculaires et épigénétiques (Figure 6). Un ensemble des travaux a démontré que ces changements peuvent se maintenir tout le long de la vie de la plante ou peuvent être même héritable d'une génération à une autre. En effet, les changements épigénétiques initiaux dans la structure de la chromatine via la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles fournissent une mémoire à long terme au sein d'une génération qui permet à la plante de garder les mécanismes de défense bien préparés pour des futures attaques (Pastor *et al.*, 2012; 2013). Luna *et al.* (2012) ont montré que l'histone méthyltransférase KRYPTONITE (KYP) est nécessaire pour que l'acide  $\beta$ -aminobutyrique puisse s'amorcer durablement contre *H. arabidopsidis* chez *Arabidopsis Thaliana*. La phase post précoce est caractérisée par une réactivité renforcée qui se traduit par les réactions de défenses rapide de la plante vis-à-vis du pathogène et l'augmentation du degré de résistance via une production pléthore des molécules de défenses (Figure 6).

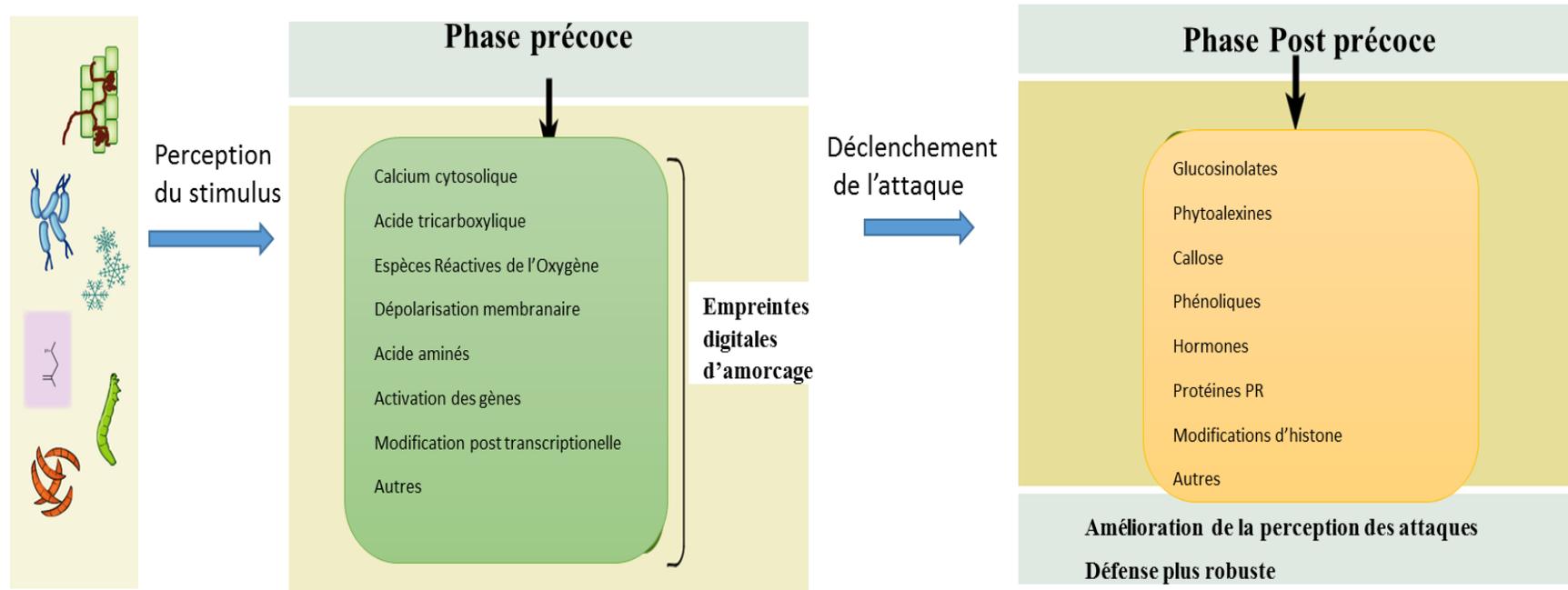


Figure 6: Les étapes séquentielles de l'induction de la défense précoce ou "priming". (Mauch Mani *et al.*, 2017).

Elle débute par une reconnaissance des agents de signalisations (extraits des plantes, microorganismes, molécules et insectes) par la plante qui conduira à l'induction rapide de l'expression des composés variés. Ces composés sont les marqueurs de la phase précoce. Les composés exprimés sont commun à tous les stimuli. Ensuite, on a la phase post précoce caractérisé par une réactivité renforcé qui se traduit par les réactions de défenses rapide de la plante vis-à-vis du pathogène et l'augmentation du degré de résistance via une production pléthore des molécules de défenses.

## **I.7. Marqueurs moléculaires et enzymatiques de la défense**

### **I.7.1. Composés phénoliques**

Chez les végétaux supérieurs, plusieurs phénomènes et rôles sont attribuables aux composés phénoliques. Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal. Localisés dans les vacuoles, ils sont soit libres, soit liés aux glucides (glucose, rhamnose, mannose, galactose). Ce sont des substances connues pour leur potentiel antifongique et antimicrobien (Boudjeko *et al.*, 2007; Djocgoue *et al.*, 2011; Simo *et al.*, 2014). Les principales classes de composés phénoliques sont : les phénols simples (catéchol, résorcinol), les acides hydrobenzoïques (acide salicylique, acide gallique), les acides hydroxycinnamiques (acides feruliques), les flavonoides, les hydroxycoumarines, les lignanes et les polyflavanes (Dicko *et al.*, 2006). Ces composés jouent un rôle important dans le métabolisme, mais aussi dans la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques (Holly *et al.*, 2013). Plusieurs auteurs ont montré l'implication des différentes classes des composés phénoliques comme de marqueurs de résistance dans l'interaction *T.cacao/P.megakarya* à l'instar des isoflavones, des composés dérivés de la lutéoline, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et les proanthocyanidines (Boudjeko *et al.*, 2007, Minyaka *et al.*, 2017, Manga *et al.*, 2018). Ils peuvent agir comme phytoanticipines (phénols constitutifs), phytoalexines (phénols induits), barrières structurales (précurseurs de la synthèse de la lignine) et/ou activateurs de l'expression des gènes de défense (acide salicylique) (Holly *et al.*, 2013).

A cet effet plusieurs gènes sont impliqués dans la régulation de l'expression des composés phénoliques parmi lesquels le gène TcMYBPA. En effet ce gène est impliqué dans la régulation de la biosynthèse des anthocyanidines (flavonoides) (Yi *et al.*, 2015). Le gène TcMYBPA active l'expression accrue de plusieurs gènes clés codant pour les principales enzymes structurales de la voie de biosynthèse des flavonoides et de l'anthocyanidine, notamment la dihydroflavanol réductase, la leucoanthocyanidine dioxygénase et l'anthocyanidine réductase (Yi, 2010). Par ailleurs, plusieurs travaux démontrent l'existence d'une corrélation directe entre le degré de résistance du cacaoyer contre la pourriture brune et la teneur élevée en composé phénolique (Djocgoué *et al.*, 2011 ; Effa *et al.*, 2016; Tchameni *et al.*, 2017).

### **I.7.2. Phénylalanine ammonia-lyase (PAL).**

La phénylalanine ammonia-lyase (EC.4.3.1.5) est une enzyme clé impliquée dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes. C'est une enzyme à localisation subcellulaire présente chez tous les plantes supérieures. Elle intervient dans la synthèse des métabolites secondaires, spécialement la production des phytoalexines et de l'acide salicylique (Yaping *et al.*, 2017). L'augmentation de son activité est associée à la biosynthèse des phénols et de la lignine, métabolites intervenant dans la défense des plantes (Dae *et al.*, 2014). La PAL intervient dans la désamination de L-phénylalanine pour donner l'acide trans-cinnamique et l'ammoniac. L'ammoniac ainsi libéré est fixé par la glutamine synthétase pour produire la glutamine. Par ailleurs, la dégradation de la phénylalanine en acide cinnamique par la PAL est induite en réponse à la présence des agresseurs ou éliciteurs chez de nombreuses plantes (Yaping *et al.*, 2017). Les travaux d'Ondobo *et al.* (2017) et Manga *et al.* (2018) ont montré que l'induction de l'activité PAL chez le cacaoyer lors de l'infection par *P.megakarya* s'accompagne d'une importante synthèse des composés de la voie des phénylpropanoïdes et des composés dérivés de la voie des phénylpropanoïdes. De plus l'activité de la PAL est induite de manière spectaculaire en réponse aux blessures des feuilles ou aux infections par *P.megakarya* chez les hybrides de cacaoyers ( Effa *et al.*, 2016 ; Nana *et al.*, 2016; Ondobo *et al.*, 2017).

### **I.7.3. Polyphénoloxydase (PPO)**

Les polyphénoloxydases (PPO) sont un groupe d'enzymes d'oxydoréduction cuivrées qui catalysent deux réactions à savoir l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols et l'oxydation des o-diphénols en quinones; qui sont toxiques pour les pathogènes (Altunkaya *et al.*, 2007). Ces derniers se polymérisent spontanément pour donner la lignine. L'augmentation de l'activité des PPO peut résulter de l'augmentation du taux de substances phénoliques qui participent aux réactions de défense de l'hôte. Par leur capacité à produire les quinones, les PPO font partir des armes défensives des plantes vis-à-vis des agents pathogènes à l'instar du cacaoyer dans la résistance contre la pourriture brune (Effa *et al.*, 2016; Ondobo *et al.*, 2017). En effet l'activité PPO répond à la production des espèces oxygénées réactives qui sont produit en excès et est souvent soutenue par d'autre peroxydases (Ondobo *et al.*, 2013). L'application foliaire des stimulateurs de défense chez le cacaoyer induit l'accumulation des ROS, l'activité PPO ainsi que les produits de la peroxydation lipidique qui jouent un rôle important dans la

réaction d'hypersensibilité (Zhang *et al.*, 2015). Les PPO sont aussi les tyrosinases et des catéchol oxydases présent chez les végétaux, ils produisent le peroxyde d'hydrogène toxique pour les plantes. Les polyphénoloxydases et les peroxydases présentent des actions synergiques et complémentaires au cours du processus du développement et des réactions de défense chez les plantes. Elles contribuent à la lignification des cellules tout en participant à l'édification des barrières structurales pour empêcher la progression du pathogène (Mbouobda, 2013).

#### **I.7.4. Protéines de défense ( protéines PR)**

L'arsenal défensif des plantes comprend de nombreuses protéines de défense induites après l'infection par des agents pathogènes. Les premières protéines de défense découvertes sont des protéines PR détectées dans des feuilles de tabac à la suite de leur infection par le virus de la mosaïque du tabac . Ces protéines de défense peuvent agir directement sur l'agent pathogène ou indirectement en générant des éliciteurs susceptibles de stimuler la défense de la plante hôte à l'instar des enzymes de détoxification (peroxydases), et des enzymes hydrolytiques (chitinases et glucanases) capables de dégrader directement les parois fongiques. Elles sont susceptibles de s'accumuler localement au niveau du site de pénétration de l'agent pathogène, mais aussi de manière systémique dans les organes éloignés du site d'infection (Ethan *et al.*, 2018).

##### **I.7.4.1. $\beta$ -1,3-glucanases (PR2)**

Les  $\beta$ -1,3-glucanases des plantes sont des protéines liées à la pathogénèse appartenant à la famille des protéines PR-2 et elles jouent un rôle important dans les réponses des plantes contre le pathogène. Largement distribuées chez les levures, actinomycètes, bactéries, champignons et insectes, elles sont capables de catalyser le clivage de la liaison  $\beta$ -1,3-glycosidique des  $\beta$ -1,3-glucanes, composantes structurales majeures de la paroi cellulaire de plusieurs champignons pathogènes tel que *Phytophthora megakarya* agent causal de la pourriture brune chez le cacao (Oliveira *et al.*, 2014 ; Yufan, 2015). Les  $\beta$ -1,3-glucanases sont généralement exprimées à des faibles concentrations chez les plantes, mais lorsque les plantes sont infectées par l'agent pathogène, leur teneur augmente exponentiellement de manière locale ou systémique. Ces enzymes peuvent être induits par d'autres composantes du pathogène ou les composantes issues de sa dégradation (éliciteurs). Ces éliciteurs peuvent être des composantes de la surface cellulaire des pathogènes qui ont été libérées par les enzymes de l'hôte à savoir  $\beta$ -glucane, chitine,

chitosane (Saboki *et al.*, 2011). Après application foliaire des stimulateurs de défense chez le cacaoyer, il a une expression accrue des gènes codant pour la  $\beta$ -1,3-endoglucanase basic (isoforme vacuolaire) (Zhang *et al.*, 2015).

#### **I.7.4.2. Chitinases (PR3)**

Les chitinases sont les enzymes qui catalysent le clivage de la liaison entre C1 et C2 de deux monomères consécutives de N- acétyl -D- glucosamine de la molécule de chitine. Il existe plusieurs types de chitinases à savoir les chitinases de type I, II, IV, V, VI, et VII; présent chez le cacaoyer. Elles sont largement distribuées dans la nature, surtout chez les bactéries, champignons, animaux, et plantes. La chitinase des plantes est généralement une endochitinase capable de dégrader la chitine, composante majeure de la paroi cellulaire de certains champignons et squelettes des arthropodes (Oliveira *et al.*, 2014). Localisée dans les vacuoles (chitinase I) par rapport aux chitinases III (extracellulaire), ces dernières peuvent directement bloquer la croissance des hyphes qui envahissent l'espace intercellulaire et libère les éliciteurs des champignons qui à leur tour induisent la biosynthèse des chitinases et promeuvent la réaction de défense chez l'hôte. Elles sont localisées sur les feuilles et n'interviennent pas dans le métabolisme basal de la plante (Saboki *et al.*, 2011). Lors d'une attaque contre *Phytophthora capsici*, le cacaoyer stimule l'expression du gène TcChiB ainsi que la synthèse accrue des chitinases (PR3) pour dégrader la paroi de ce fongique et inhiber sa propagation (Yufan, 2015). Malgré les mécanismes de défenses naturelles apportés par la plante, elle reste toutefois insuffisante pour contrôler une maladie à haut potentiel fongique tel que la pourriture brune des cabosses de cacaoyer.

#### **I.7.4.3 Peroxydases (PR9)**

Les peroxydases sont des hémoprotéines qui appartiennent à une superfamille subdivisée en trois classes (Penel *et al.*, 2004):

- Classe I : Peroxydases intracellulaires d'origine procaryotique (EC 1.11.1.5/.6/.11);
- Classe II : Peroxydases sécrétées par les champignons (EC 1.11.1.13/.14);
- Classe III: Peroxydases sécrétées par les plantes (EC 1.11.1.7) nommées ci-après peroxydases (POX).

Il existe des analogies de structure entre les 3 classes de POX, ce qui suggère que les POX des champignons (classes II) et des plantes (classe III) pourraient dériver des POX

procaryotiques (classe I) (Penel *et al.*, 2004). Les peroxydases (E.C.1.11.1.7) issue de l'expression du gène Pox; sont des enzymes qui existent chez toutes les espèces végétales parmi lesquels le cacaoyer. Elles sont impliquées dans différents processus physiologiques dues au nombre élevé de leurs isoformes ainsi que la diversité de la régulation de leur expression. Elles font parties des protéines de résistance de classe 9 et utilisent divers types de substrats (auxines, composés phénoliques, ascorbate etc ) (Ghosa *et al.*, 2004). L'implication des peroxydases dans les mécanismes de défense se traduit par une activation des formes préexistantes ainsi que leur utilisation en tant que marqueurs biochimiques de résistance. L'activité peroxydasique chez le cacaoyer a été corrélée à la résistance des plants de cacaoyer aux attaques de *P.megakarya* (Nana *et al.*, 2016; Tene *et al.*, 2017). Lorsqu'elles sont associées aux parois cellulaires, les peroxydases participent à plusieurs processus tels que l'oxydation d'une large gamme de composés généralement phénoliques générés à partir de l'acide cinnamique en produit toxique pour *P.megakarya* (Simo *et al.*, 2018). Il existe également la transformation des acides aminés aromatiques en quinones et en phytoalexines ayant les propriétés bactéricides et antifongiques. De même, elles catalysent le renforcement des parois cellulaires à la suite des stimuli biotiques ou abiotiques créant ainsi des barrières physiques. Elles interviennent aussi dans la synthèse des phytoalexines et des formes actives de l'oxygène, créant ainsi un environnement toxique aux agents pathogènes (Almagro *et al.*, 2009).

*Chapitre II :*  
*Matériel et Méthodes*

## CHAPITRE II : MATERIEL ET MÉTHODES

### II.1. MATERIEL

#### II.1.1. Matériel édaphique

La terre noire utilisée dans ce travail a été collectée et transportée dans une plantation du village NDAMVOUT situé à quelques centaines de mètre de Nkolbisson-Yaoundé (Région du centre) (Photo 9). Le sable utilisée dénommé sable Sanaga provenait d'une carrière de dépôts de sable de la ville de Yaoundé.

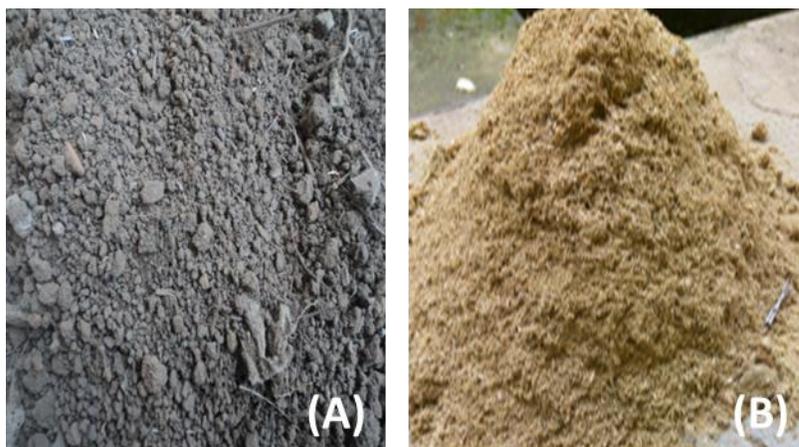


Photo 9: Photos du substrat édaphique (A) Terre noire, (B) Sable sanaga (PhotoTene, 2014)

#### II.1.2. Matériel végétal

Les cabosses hybrides (issus de la pollinisation manuelle) de *Theobroma cacao* (♀ICS40× ♂UPA134 et ♀SNK64 × ♂UPA134)) utilisées dans le cadre de ce travail provenaient du champ expérimental de l'IRAD (Photo 10A, Tableau IV). Les marguerites jaunes (*Tithonia diversifolia*) qui ont été utilisées provenaient des champs paysans situés à Nkolbisson (Photo 10B). Les fleurs de l'oseille de guinée (bissap) ont été achetées auprès d'un commerçant du marché mokolo de Yaoundé (région du centre) (Photo 10C).



Photo 10: Photos du matériel végétal (A) Cabosses de cacao hybride, (B) *Tithonia diversifolia*, (C) Oseille de guinée (Photo Tene, 2014).

Tableau IV: Caractéristiques des hybrides utilisés (Ondobo, 2014)

Génotype	Origine	Groupe	Description du sigle
ICS40	Trinidad	Trinitario	Sélection de l'impérial College de Trinidad
SNK64	Cameroun	Trinitario	Sélection de Nkoemvone
UPA134	Amazonie	Forastero	Upper Amazonia
♀ICS40 × ♂UPA134	Cameroun	Trinitario × Forastero	Hybride
♀SNK64 × ♂UPA134	Cameroun	Trinitario × Forastero	Hybride

### II.1.3. Matériel fongique

La souche de *Phytophthora megakarya* EL provenait de la banque de microorganismes du Laboratoire de Lutte Biologique de l'IRAD.

### II.1.4. Matériel organique

Le matériel organique utilisé pour l'amendement des substrats a été collectée à Mouanko, Région du Littoral (Photo 11). Elle est située sur la rive nord du fleuve Sanaga, à une vingtaine de kilomètres à l'est de son embouchure dans le Golfe de Guinée.



Photo 11: Photos des coquilles (A) et de la poudre de coquilles d’huitres (B) (Photo Tene, 2014)

### II.1.5. Matériel chimique

Le matériel chimique qui a été utilisé dans le cadre de notre étude provenait des boutiques d’agricultures du marché mokolo (ville de Yaoundé) . Il était constitué d’une part d’insecticide chimique ayant comme matière active l’imidaclopride et le lamdhacyhalotrine (Photo 12A). Il était également constitué d’autre part de fongicide chimique de contact ayant comme matière active le mancozeb et l’oxyde cuivreux (Photo 12B).



Photo 12: Photos du matériel chimique (A) : Insecticide, (B) : Fongicide (Photo Tene, 2014)

## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. Analyses physicochimiques du sol**

#### **II.2.1.1. Granulométrie**

La granulométrie a été déterminée par la méthode de la pipette de Robinson qui repose sur la répartition en pourcentage des particules inférieures à 2 mm du sol en trois classes distinctes selon leurs tailles à savoir les sables, argiles et les limons.

Ainsi, 20 g de sol a été mis en solution dans 20 ml d'eau distillée, ensuite 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 33% v/v a été ajouté au mélange puis homogénéisé. Le mélange a été laissé au repos pendant une nuit à température ambiante. Après repos, l'ensemble a été chauffé à 50 °C pendant trois heures. Vingt millilitres d'hexamétaphosphate de sodium a été ajouté au mélange par agitation pendant vingt-quatre heures, ensuite le mélange a été transféré dans une allonge. L'argile (0 à 2 µm) et les limons (2 à 20 µm) fins ont été déterminés dans le mélange par pipetage. Les limons grossiers (20 à 50 µm), les sables fins (50 à 200 µm) et grossiers >200 µm ont été déterminés dans le mélange par tamisage.

#### **II.2.1.2. Détermination du pH**

La détermination du pH du sol s'est faite selon le protocole décrit par Lee et Hwang (2002). Un gramme de sol séché a été mis en solution dans 10 ml d'eau distillée. La suspension obtenue a été vigoureusement agitée et laissée au repos pendant 30 min. Le pH a été mesuré dans le surnageant de la suspension de sol.

#### **II.2.1.3. Détermination de l'azote total**

Le dosage d'azote total (N) a été réalisé par colorimétrie après minéralisation de Kjeldahl avec pour catalyseur le dioxyde de Titane (TiO<sub>2</sub>) suivie de la distillation et du titrage suivant la norme ISO11261 de 1995.

#### ***Mode opératoire***

##### **– Minéralisation**

A 2g de terre contenus dans un tube de minéralisation, ont été ajoutés 7 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5g de thiosulfate de sodium et 2g de catalyseur. La solution résultante a été installée dans une rampe à minéraliser jusqu'à décoloration de l'échantillon. Après refroidissement de la solution, elle a été diluée avec 50 ml d'eau.

### – Distillation

A la sortie du réfrigérant un erlenmeyer de 250 ml contenant 20 ml d'acide borique, un indicateur coloré a été introduit afin de pouvoir piéger l'ammoniac. L'ammoniac ainsi piégé dans l'acide borique fait virer l'indicateur du rouge au vert. Le mélange a été titré avec l'acide sulfurique 0,01N jusqu'au retour à la couleur initiale de l'indicateur La teneur en azote a été déterminée par la formule :  $\text{mg} \frac{\text{N}}{\text{g}} \text{sol} = (\text{V} - \text{Vo}) * 0,07$ .

#### II.2.1.4. Détermination du pourcentage de matières organiques (%MO)

Elle a été faite par détermination du pourcentage du carbone organique. La détermination du pourcentage carbone organique (%C) s'est faite selon la méthode de Walkley et Black (1934).

Cinq grammes de sol introduits dans un mélange constitué de 10 ml de dichromate de potassium (  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ), 1N et 20 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré ont été incubés pendant 30min. Ensuite, 150 ml d'eau distillée, 10 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  et 1 ml d'indicateur coloré (permanganate de potassium) ont été successivement ajoutés puis homogénéiser. Après homogénéisation le mélange a été titré avec le  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1N jusqu'à l'obtention d'une coloration verte brillante. Un blanc constitué d'eau distillée et traité dans les mêmes conditions que l'échantillon a été réalisé. Le pourcentage en carbone et en matière organique a été calculé par les formules :

$$\%C = \frac{4(a - b)}{a * p}$$

Où a = volume de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ajouté au témoin

b = volume de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ajouté à l'échantillon

p = masse de l'échantillon

$$\%MO = 1,723 * \%C$$

Le rapport C/N est obtenu en divisant la teneur en carbone organique par celle de l'azote total.

### II.2.1.5. Détermination du Phosphore assimilable

La détermination du Phosphore assimilable a été faite selon la méthode de Bray 2.

#### Principe

La méthode de Bray 2 combine l'extraction du phosphore en milieu acide à la complexation, par le fluorure d'ammonium, de l'aluminium lié au phosphore. Le dosage du phosphore se fait par spectrophotométrie avec le bleu de molybdène.

#### Mode opératoire

Deux grammes de terre ont été introduite dans un tube à essai contenant 17,5 ml de la solution acidulée ( solution d'extraction), puis agités pendant 45 sec et filtrés. A 10ml de filtrat obtenu, 10ml d'acide borique, 4ml d'acide ascorbique et 2ml de mélange sulfomolybdique ont été ajoutés. Après homogénéisation, le mélange a été ensuite incubé pendant 10 min à 85°C au bain marie. Après refroidissement, les échantillons ont été dosés au spectrophotomètre à 665 nm. Un étalon a été réalisé dans les mêmes conditions que l'essai.

La teneur en phosphore a été calculée par la formule :

$$A = \left( \frac{1}{E1} + \frac{2}{E2} + \frac{3}{E3} + \frac{4}{E4} \right) / 4$$

$$P_i \text{ (mg/g sol)} = C_i * A$$

$C_i$  = concentration de l'échantillon

$E1$  = concentration de l'étalon 1

$E2$  = concentration de l'étalon 2

$E3$  = concentration de l'étalon 3

$E4$  = concentration de l'étalon 4

### II.2.1.6. Dosage du Calcium (Ca) et du Magnésium (Mg)

#### Principe

A pH 10, le Ca et le Mg forment avec l'EDTA les complexes Ca-EDTA et Mg-EDTA par des réactions instantanées aux températures avoisinant 60 °C. Avec l'indicateur noir ériochrome T de couleur bleu pur à l'état libre, des complexes Ca-NET et Mg-NET (rouge vineux) sont formés. Le classement des différents complexes par ordre de stabilité est le suivant : Ca-

NET<Mg-NET<Mg-EDTA<Ca-EDTA. La détermination de la teneur en calcium et magnésium libre dans le mélange se fait dans l'ordre de complexation ci-dessus : Ca-EDTA-Mg-EDTA.

### **Mode opératoire**

Un aliquot 50 ml de l'extrait d'acetate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc) de sol a été introduite dans un erlenmeyer de 250 ml et supplémenter avec 50 ml d'eau distillée. Dans le milieu réactionnel successivement 50 ml de tampon pH 10 et 1 ml de Mg-EDTA ont été ajouté, puis chauffé au bain marie pendant 3 min à 60 °C. Parallèlement un autre milieu réactionnel constitué de 50 ml l'extrait NH<sub>4</sub>OAc de sol et 50 ml de tampon pH 10 a été supplémenté successivement 3g d'acide ascorbique, 1ml de KCN et 1 ml de potassium hexacyanoferrate (II)-3-hydrate à 2%.

Après ajout de 50 mg de l'indicateur NET/KNO<sub>3</sub> et HHSNN/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectivement pour le milieu réactionnel 1 et pour le milieu réactionnel 2, les deux milieux réactionnels ont été titrés lentement avec le Na<sub>2</sub>-EDTA 0,002 M jusqu'au point d'équivalence marqué par le changement de la coloration violette à la coloration bleu pur caractérisant respectivement le Mg et la coloration rouge vineux à la coloration bleu pur caractérisant respectivement les ions calcium. Un témoin constitué d'eau distillée a été réalisé dans les mêmes conditions que l'essai. Le calcul de la teneur en calcium et magnésium s'est fait selon la formule :

$$\text{Meq (Ca + Mg)} = 8(V-V_0)/V_{pe}$$

V= volume de Na<sub>2</sub>-EDTA 0,002 m titré pour l'échantillon

V<sub>0</sub>= volume de Na<sub>2</sub>-EDTA 0,002 m titré pour le témoin

V<sub>pe</sub>= volume de prise d'essai

#### **II.2.1.7. Analyse du potassium (K) et du sodium (Na)**

Le potassium et le sodium ont été déterminés par la méthode de percolation à l'acétate d'ammonium suivant la norme NF X31-108 (AFNOR, 1996). Elle repose sur l'échange entre ces cations (sodium et potassium) du sol les ions ammonium d'une solution aqueuse molaire et neutre d'acétate d'ammonium, d'une part et d'autre part sur l'élimination de l'excès d'ammonium (percolation) au moyen de l'alcool éthylique.

Ainsi 2 g de sol a été introduit dans une solution d'acétate d'ammonium 4N, ensuite le mélange a été homogénéisé. Cinq millilitres d'une solution d'acétate d'ammonium contenant les ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de pH égal à 6 a été ajouté en excès au mélange jusqu'à saturation du milieu

caractérisé par la formation d'un complexe .La lecture des cations échangeables a été faite à l'ICP-OES et la teneur a été exprimé en méq/100g.

#### **II.2.1.8. Capacité d'échange cationique (CEC)**

La CEC est une estimation par mesure chimique conventionnelle réalisée sur un échantillon de terre pour déterminer la charge cationique retenue par la charge négative du complexe absorbant et susceptible d'être échangé de façon inversible.

La détermination de la CEC s'est faite à la suite de celle des bases échangeables (potassium et sodium) au cours d'une même manipulation suivant la norme NF X31-130.

Elle s'est faite en trois phases :

- La phase de saturation du complexe absorbant par l'ion  $\text{NH}_4^+$  et extraction des bases échangeables ;
- La phase de lavage de la terre à l'alcool afin d'éliminer la solution saturante  $\text{NH}_4^+$  remplissant les porosités ;
- La phase de dosage de  $\text{NH}_4^+$  après désorption quantitative au spectromètre UV-VIS de marque JENWAY 6300. La CEC a été exprimé en méq/100g de sol.

#### **II.2.1.9. Acidité échangeable**

Les ions aluminium et hydronium  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{H}^+$  sont ont été déterminé par titration en milieu basique.

Ainsi 2 g de sol a été introduite dans 10 ml d'une solution de KCl 1N, ensuite le mélange a été homogénéisé pendant dix minutes. Le dosage de l'acidité échangeable a été réalisé par titrage avec une solution de NaOH 0,1N. Le dosage de l'aluminium échangeable a été réalisé par complexation avec le fluorure d'aluminium neutralisé par la soude sous forme  $\text{Al}(\text{OH})_3$  et titrage des hydroxyles ( $\text{OH}^-$ ) libérés avec une solution de HCL. La toxicité aluminique a été calculé via le rapport  $[\text{AL} \times 100 / (\text{S} + \text{Al})]$ .

### **II.2.2. Culture du champignon et préparation de la solution sporale.**

#### **II.2.2.1. Culture du champignon**

L'entretien de la souche de *Phytophthora megakarya* s'est fait sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Photo 13). Le milieu a été autoclavé à 121 °C pendant 15 min puis coulé dans des boîtes de pétri stériles. Les disques mycéliens de 5 mm de diamètre prélevés sur le front de

croissance d'une culture de *Phytophthora megakarya* ont été transférés sous une hôte dans les boîtes de pétri contenant le milieu PDA et incubées à  $26 \pm 1$  °C à l'obscurité. Les repiquages ont été effectués tous les trois jours afin de conserver la virulence de la souche.



Photo 13: Souche de *P. megakarya* sur milieu PDA (Photo Tene, 2016).

#### **II.2.2.2 Préparation de la solution sporale**

Les spores de *P. megakarya* ont été obtenues à partir des nécroses formées à la suite de l'inoculation artificielle de la cabosse saine par le mycélium de *P. megakarya* (Photo 14). Ainsi les cabosses saines récoltées ont été lavées abondamment à l'eau de robinet pendant 3 min, ensuite rincées à l'eau distillée. Par la suite, elles ont été stérilisées à l'alcool (95°) pendant 3 min et enfin à l'eau distillée stérile. Après séchage sous la hotte, une blessure a ensuite été réalisée dans le cortex de chaque cabosse à l'aide d'emporte-pièces de 5 mm de diamètre. Les disques mycéliens de 5 mm de diamètre ont été prélevés et déposés de manière aseptique dans la blessure de chaque cabosse. La préparation a été recouverte d'un morceau de coton imbibé d'eau distillée stérile ; puis placée dans les bacs en plastique stérile tapissés du papier essuie-tout préalablement humidifié afin de maintenir une humidité relative (75-100%) dans l'enceinte propice à la germination des spores (Bud Platt, 2008). Les bacs ont été hermétiquement scellés et incubés à l'obscurité afin de créer des conditions favorables au développement de *P. megakarya*. Six jours plus tard, les fructifications constituées de sporocystes ont été récoltées par lavage des cabosses pourries au niveau du front de croissance du champignon et suspension de sporocystes dans de l'eau distillée stérile. Les zoospores ont été libérées des sporocystes par choc thermique, en

soumettant le mélange à une température de 4 °C pendant 5 minutes, puis à température ambiante dans une enceinte noire pendant 30 minutes. Le comptage des zoospores a été réalisé au microscope à l'aide de la cellule de Malassez et le nombre de zoospores a été calibré à  $10^5$  zoospores/mL et utilisé pour l'inoculation du sol et des feuilles.



Photo 14: Souche de *P. megakarya* sur cabosses après 6 jours de croissance (Photo Tene, 2014).

### **II.2.3. Production des poudres de coquilles d'huitres**

#### **II.2.3.1. Poudre non traitée.**

Les coquilles d'huître ont été collectées à l'état frais dans la localité de Mouanko, département de la Sanaga maritime. Elles ont été lavées ensuite séchées au soleil et chauffées à l'étuve à 40° C pendant 3 heures. Après leur refroidissement pendant quelques jours, elles ont été transportées vers une société de provenderie, où elles ont été concassées à l'aide d'une broyeuse mécanique de marque Moulinex. Après concassage, les granules de coquilles obtenues ont été broyées dans un moulin de marque Moulinex, puis tamisées à l'aide d'un tamis de mailles de 0,8 mm de diamètre. La poudre obtenue a une couleur blanchâtre.

#### **II.2.3.2. Poudres traitées**

Les coquilles d'huitres préalablement récoltées à l'état frais ont été incubées à l'obscurité et à température ambiante pendant deux semaines. Elles ont été ensuite prétraitées et transformées en poudre comme décrit au paragraphe. La poudre obtenue a été chauffée à l'étuve à 1000 °C pendant 4 h. Après refroidissement, la poudre a été entreposée dans les emballages plastiques opaques pour une utilisation ultérieure.

#### II.2.4. Production du purin de *Tithonia diversifolia*.

Le purin de *Tithonia diversifolia* a été obtenu par fermentation des feuilles et des portions de branches fraîches dans de l'eau selon le protocole modifié de Kerebba *et al.*(2019).

En effet, les fractions de 500 g de feuilles fraîches et 500 g de branches ont été broyées. Le broyat obtenu a été introduit dans dix litres d'eau et incubé pendant quatorze jours à l'abri de la lumière. Le ferment obtenu a été filtré à l'aide du papier filtre et le jus de purin obtenu a été conservé dans un bidon hermétiquement fermé, à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C pour une utilisation ultérieure (Photo 15).

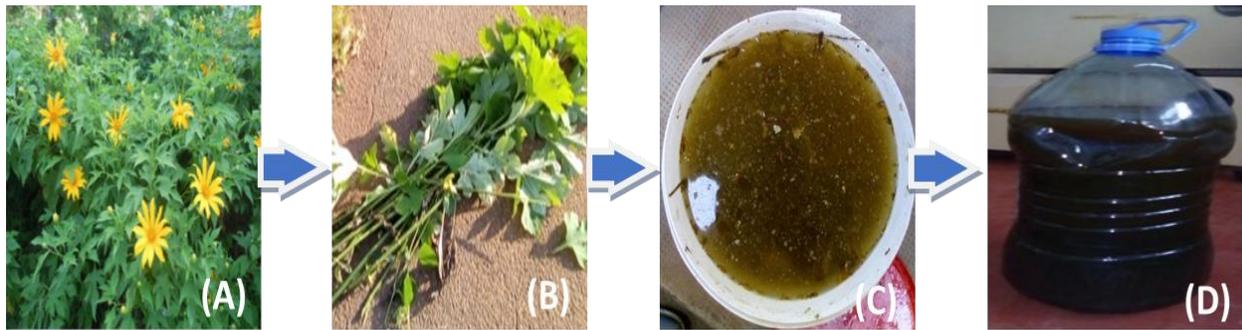


Photo 15: Étapes de production du jus de purin (A) : Plante de marguerite jaune, (B) : Feuilles et Tiges coupées, (C) : Purin de marguerite jaune, (D): Jus de purin) (Photographiées par Tene, 2015)

#### II.2.5. Production de l'extrait aqueux de l'oseille.

Un kilogramme de fleurs sèches d'oseille de guinée a été introduite dans une casserole en aluminium contenant 5 L d'eau. Le mélange a été porté à ébullition sur une plaque chauffante pendant deux heures. Après refroidissement, l'extrait obtenu a été filtré à l'aide du papier filtre et l'extrait aqueux obtenu a été conservé dans un bidon hermétiquement fermé, à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C pour une utilisation ultérieure.

#### II.2.6. Effet des coquilles d'huitre non traités sur la qualité des semences en serre

##### II.2.6.1. Production des plantules

Les jeunes plants ont été obtenus après ensemencement des fèves de cacao dans différents traitements. Après l'écabossage, le mucilage a été enlevé par lavage des graines dans un mélange constitué du sable fin et de l'eau distillée. Ces graines ont été ensemencées dans des sachets de polyéthylène noir contenant 1 Kg de substrat composé de 2/3 de terre et 1/3 de sable stérile.

L'hybride (pollinisation manuelle) ICS40×UPA134 a été utilisée dans le cadre de cette expérimentation.

- 40 sachets de terre stérile + sable (lot 1) ;
- 40 sachets de terre non stérile + sable (lot 2) ;
- 40 sachets de terre stérile + sable + CQ (lot 3) ;
- 40 sachets de terre stérile + sable + CQ + *Phytophthora megakarya* (lot 4) ;
- 40 sachets de terre stérile + sable + *Phytophthora megakarya* (lot 5) ;
- 40 sachets de terre non stérile + sable + CQ (lot 6).

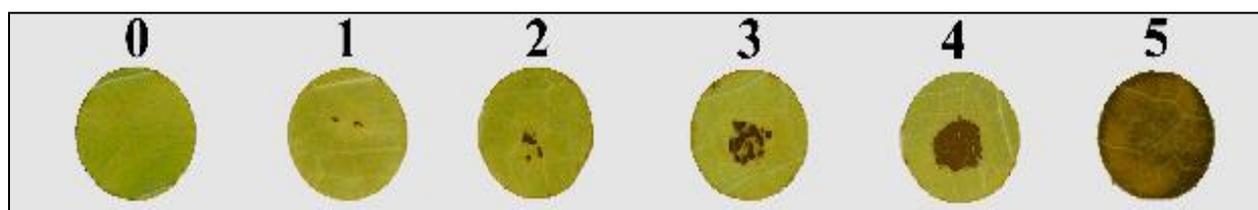
Le sol a été amendé avec les poudres de coquilles non traitées à la concentration 10 % (P/P) et la concentration de  $10^6$  zoospore/ml d'inoculum fongique par Kg de sol a été utilisée pour l'amendement du sol. Le traitement du sol avec l'inoculum fongique a été fait 48h avant les traitements à l'agent de lutte. Les différents traitements ont été entretenus en pépinière par arrosage journalier avec de l'eau du robinet et les paramètres agronomiques de croissances ont été relevés chaque quatre semaine pendant douze semaines (longueurs des tiges, nombre de feuilles, longueurs et largeurs des feuilles). Cette expérimentation a été répétée deux fois de façon indépendante au regard du calendrier agricole de la culture cacaoyer.

#### **II.2.6.2. Test de pathogénicité**

L'induction de la résistance systémique a été faite sur des disques de feuilles et sur des feuilles entières (Photo 17) selon le protocole modifié de Nyasse *et al.* (1995). Ainsi, des feuilles âgées de douze semaines de chaque traitement ont été récoltées et conditionnées dans des sachets en plastiques préalablement étiquetés et transportés au laboratoire. Des disques de feuilles ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce (10 disques par feuilles) et disposés dans des boîtes de pétri de façon randomisés (8 disques par boîte et quatre boîtes par traitement). Parallèlement dix feuilles entières âgées également de douze semaines portées par les tiges ou les branches non détachées des plants ont été sélectionnées et séparées dans un seul plateau puis arrangées selon le protocole décrit par Tahiri *et al.* (2000). Ces feuilles ainsi que les disques de feuilles ont toutes été inoculées simultanément avec 10  $\mu$ l d'une suspension de  $10^6$  zoospores/ml de *Phytophthora megakarya* (Nyasse *et al.*, 1995). Dans chaque cas (feuilles entières et disques de feuilles) ainsi que dans chaque traitement un contrôle composé de dix feuilles et trois boîtes de pétri de disques

de feuilles sont inoculées avec 10 µl d'eau distillée stérile. L'inoculation a été effectuée sur la face arrière de chaque feuille par dépôt de 10 µl de suspension de zoospores et les plateaux incubés à 26 °C à l'obscurité. L'expression de la maladie a été calibrée 6 jours après inoculation à l'aide d'un outil de calibrage (*rating scale*) développé par Nyasse *et al.* (1995) Où :

- 0= pas de symptômes ;
- 1= point de pénétration observé au site d'inoculation ;
- 2= point de connections ;
- 3= aspect nécrotique réticulé ;
- 4= aspect nécrotique en forme de marbre ;
- 5= nécrose extrême.



L'expérience a été répétée deux fois et l'intensité de l'index d'infection a été calculée en effectuant le rapport de la somme de la moyenne de l'expression de la maladie sur le nombre total de disque. L'intensité de l'index d'infection a été évaluée selon l'échelle de Paulin *et al.* (2008) :

- 0 < **Index** ≤ 1 : très résistant
- 1 < **Index** ≤ 2 : résistant
- 2 < **Index** ≤ 2,5 : modérément résistant
- 2,5 < **Index** ≤ 3,5 : susceptible
- Index** ≥ 3,5 : très susceptible

Le prélèvement des échantillons a eu lieu six jours après inoculation sur feuilles entières. Les échantillons ont été prélevés sur 2 cm au niveau de la partie adjacente de la nécrose. Les échantillons ainsi prélevés ont été utilisés pour les analyses biochimiques (Photo 16).

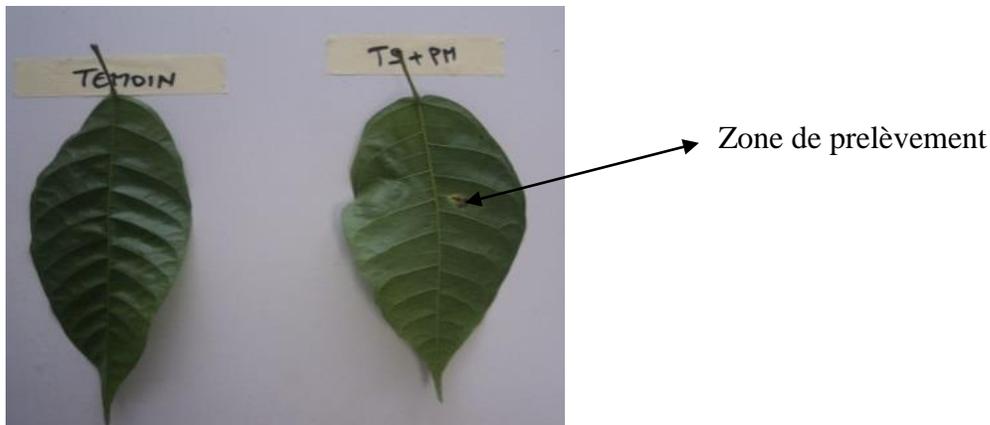


Photo 16: Feuilles entières non inoculées et inoculées avec *P. megakarya* (Photographié par Tene, 2014)

### II.2.6.3. Calcul de l'indice de qualité sanitaire (IQS)

L'indice de qualité sanitaire traduit le taux de protection des plants après un temps de croissance déterminée. Il établit la relation entre le taux moyen des paramètres agronomiques de croissance (TM. PA) et le taux moyen de l'indice de sévérité (TMIS). En effet l'augmentation de l'indice de qualité sanitaire traduit un taux de protection élevé de la plante. Elle est traduite par la formule suivante :

$$\text{IQS} = (1/\text{TMIS}) / (\text{TMPA})$$

$$\text{IQS} = (1/\text{TMIS}) / (\text{TMPA})$$

**IQS** : Indice de qualité sanitaire

**TMIS** : Taux moyen de l'indice de sévérité

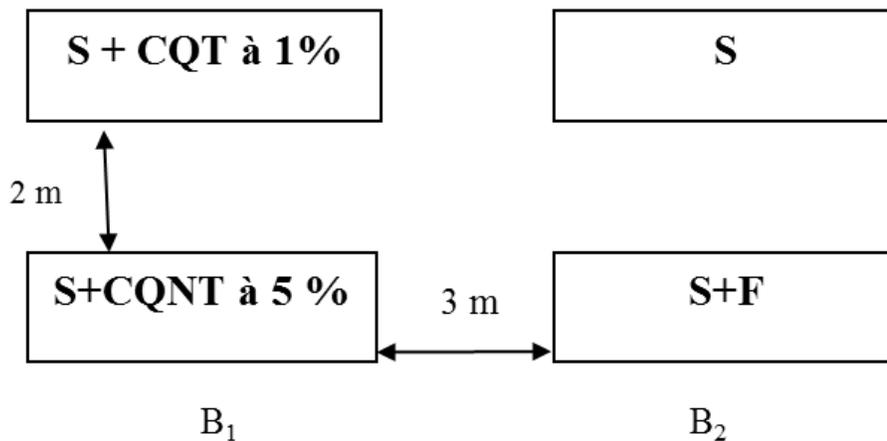
**TMPA** : Taux moyen des paramètres agronomiques

## II.2.7. Effets des formulations à base des coquilles d’huitres sur la production des semences en condition paysanne.

### II.2.7.1. Production des semences en ombrière

Les jeunes plants ont été produits sous ombrière après ensemencement des fèves de cacao de l’hybride ♀SNK64 × ♂UPA134 dans différents unités expérimentales dans les sols non stériles.

L’expérimentation a été faite sur un dispositif en bloc complètement Randomisé avec deux traitements (Poudre de coquilles d’huitre (CQ); et le témoin (UE n’ayant reçu aucun traitement coquillère)) et sur deux blocs (un bloc à substrat traité aux coquilles traitées et non traitée s (B<sub>1</sub>) ; un bloc à substrat non traité aux formulations coquillères (B<sub>2</sub>)) (Figure 7).



**Figure 7:** Schémas du dispositif expérimentale en bloc complètement randomisé.

**CQT :** Pots avec Coquille d’Huître traités ; **CQNT :** Pots avec Coquille d’huitre non traité, **S :** sols, **S+F :** Pots avec fongicides chimiques, **B<sub>1</sub> :** Bloc à Substrat traité aux coquilles d’huitres, **B<sub>2</sub> :** Bloc à Substrat non traité aux coquilles d’huitres.

Chaque unité expérimentale a été constituée de 500 pots. Les pots avec les coquilles d’huitres traités ont été amendé à la concentration 1 % P/P et les pots avec les coquilles non traités ont été amendés à la concentration 5 % P/P. Les pots avec le traitement chimique ont été amendés à la concentration 10 % P/P selon les recommandations du fabricant et la fiche technique de production des semences de cacaoyers publié par la SODECAO. Les pots sous ombrière, ont été arrosés régulièrement à raison d’apport d’un litre d’eau par pot et par semaine.

Le désherbage manuel a été effectué quotidiennement afin de maintenir l'enceinte de l'ombrière propre. Un mois après croissance les jeunes feuilles de cacaoyers des traitements coquille d'huître traités et coquille d'huître non traités ont été vaporisé avec le purin de *Tithonia diversifolia* après chaque deux semaines pendant douze semaines à raison de 200 ml/pot. Parallèlement les feuilles de cacaoyers du traitement chimique ont été vaporisé avec l'insecticide chimique Lamidagold à la concentration 5 g/L soit 200 ml/ pot selon les prescriptions du fabricant et la fiche technique de production des semences de cacaoyers. L'effet des différents traitements sur le rythme de croissance et des plantules a été évalué par la mesure des variables et le calcul des paramètres agronomiques sur 50 plantes cibles d'une UE et sur toutes les UE. Cette expérimentation a été répétée deux fois de manière indépendante au regard du calendrier agricole de la culture du cacaoyer.

## **II.2.7.2. Effets des formulations à base des coquilles d'huitres sur les paramètres de croissance physiologique des plantules de cacaoyers.**

### **II.2.7.2.1. Détermination de la teneur en chlorophylle des feuilles**

L'extraction de la chlorophylle a été faite dans l'acétone (80%) et à basse température (4 °C). Ainsi, 0,5 g de disques de feuilles ont été introduites dans les tubes flacons contenant 3ml d'acétone 80%. Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 24h pour permettre la stabilisation des pigments photosynthétiques. La densité optique (DO) des pigments chlorophylliens a été mesurée à 664 et 647 nm à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV-1605, UV-visible) contre un contrôle (blanc) dans lequel l'extrait a été remplacé par de l'eau distillée. L'expérience a été réalisée en tripliquet. Les teneurs en chlorophylle a et chlorophylle b ont été calculées selon les formules suivantes (Lichtenthaler, 1987) :

$$\text{Teneur Chlorophylle a } (\mu\text{g/ml}) = 11,93 \text{ DO}_{664} - 1,93 \text{ DO}_{647}$$

$$\text{Teneur Chlorophylle b } (\mu\text{g/ml}) = 20,36 \text{ DO}_{647} - 5,5 \text{ DO}_{664}$$

Ces teneurs ont été exprimées en mg/g de matière fraîche.

### **II.2.7.2.2. Analyse de la résistance stomatique des feuilles**

Les obstacles rencontrés par l'eau au cours de sa trajectoire entre la cavité sous stomatique et la sortie de l'ostiole sont assimilés à une résistance stomatique exprimé à l'échelle de l'unité de la surface foliaire en  $\text{s.m}^{-2}$ . La résistance stomatique représente la résistance la plus

importante en phase gazeuse de la plante et permet d'évaluer le degré de satisfaction en eau, par le système racinaire du végétal et de fournir un critère d'appréciation de l'état hydrique de la plante.

Les mesures de la résistance stomatique ont été réalisées selon le protocole décrit par Mbouobda *et al* (2013) à l'aide d'un poromètre portable. Le principe repose sur la mesure du taux de diffusion de la vapeur d'eau à travers les pores foliaires (stomates). Les mesures ont été effectuées sur les plantes âgées de douze semaines pendant une journée ensoleillée (entre 12 h et 13 h) sur face supérieure d'un échantillon de quatre feuilles par plante à l'aide du poromètre de type AP4 (DELTA T DEVICES,UK) qui a été fourni par le Dr Ten Hoopen du Laboratoire de Phytopathologie de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD). Elle a été réalisée sous les conditions suivantes :une intensité lumineuse variant de 250 à 350  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , une humidité relative de de 45 à 50% et une température ambiante de 29 à 32 °C. Les valeurs de résistances stomatiques ont été exprimées en siemens par surface foliaires ( $\text{s.cm}^{-2}$ ).

#### **II.2.7.2.3. Test de pathogénicité**

Le test de test de pathogénicité a été réalisé comme décrit au paragraphe précédent (II.2.6.2).

#### **II.2.7.2.4. Formulation et évaluation du test de stabilité du biofongicide "bio-oyster shell biofongicide"**

##### **❖ Formulation**

Quatre kilogrammes de poudre de coquilles traitées ont été additionnés à 3L de purin de *Tithonia diversifolia* (100g MF/L) issues de deux semaines de fermentations et 1L d'extrait aqueux d'oseille de guinée (50g MS/L). Après homogénéisation, le mélange a été séché à l'étuve à 40 °C pendant 1 h. La poudre obtenue a été tamisé à l'aide d'un tamis de mailles de 0,8 mm de diamètre pour l'obtention d'une poudre fine de couleur beige. La poudre a été entreposé dans un emballage en plastique et étiquetés.

##### **❖ Évaluation de la stabilité du produit**

La stabilité du produit a été évaluée via la capacité de l'oxygène de l'air à modifier la texture physique et le pouvoir hygroscopique du biofongicide "bio-oyster shell biofongicide" après 10 mois d'exposition à température ambiante. Ainsi 500 g du biofongicide "bio-oyster

shell biofungicide’’et 500 g de fongicide chimique Mancozyl ont été exposé à température ambiante et au contact de l’oxygène de l’air pendant 10 mois. Parallèlement 500 g de biofungicide ‘’bio-oyster shell biofungicide a été stocké et entreposé dans un emballage en plastique hermétiquement fermé pendant 10 mois. Après dix mois d’incubation ; la modification de la texture physique du produit a été évaluée par la présence ou l’absence des grumeaux. Le pouvoir hygroscopique qui mesure la capacité de fixation de l’oxygène de l’air pour former les molécules d’eau a été évalué à l’aide de l’hygromètre .Ainsi plus le pouvoir hygroscopique est élevé plus le produit retient difficilement de l’eau. De ce fait, 1g de poudre de chaque échantillon a été introduite dans l’avaromètre de marque OHAUS (Photo 17) et lecture du pouvoir hygroscopique basé sur la mesure du pourcentage du rapport masse sèche sur la masse fraîche a été lus au bout de 10 minutes.



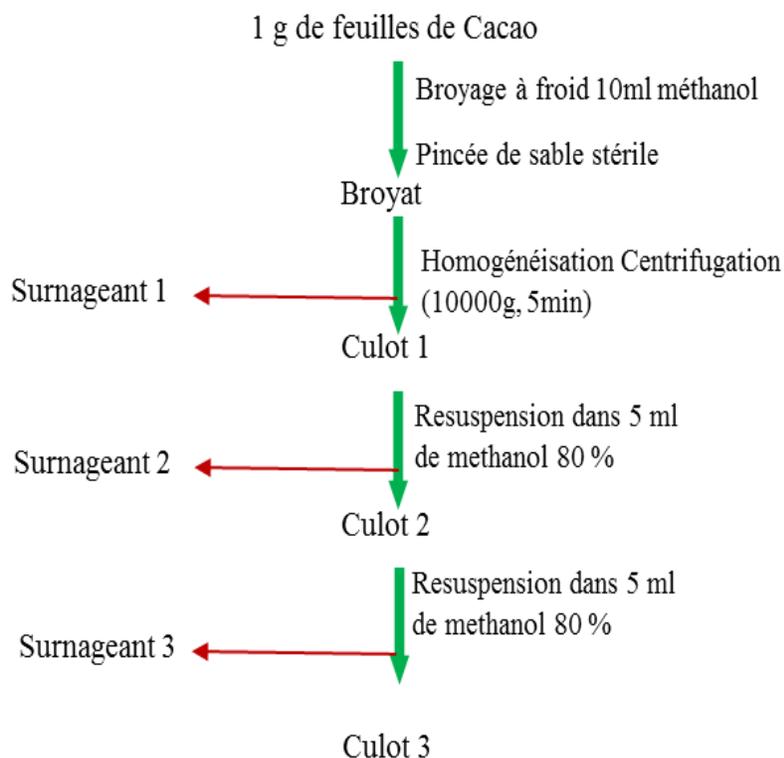
Photo 17: Photo de l’hygromètre (Photographié par Tene, 2018)

## **II.2.8. Analyses biochimiques**

### **II.2.8.1. Extraction et dosages des composés phénoliques totaux**

#### **II.2.8.1.1. Extraction**

L’extraction a été conduite selon le protocole modifié d’El Hadrami *et al.* (1997). Un gramme de feuilles fraîches de cacao a été broyé à froid (4 °C) dans 10 ml de méthanol 80 % (V/V). Après agitation au vortex, le mélange a été centrifugé à 10000 g pendant 5 min. Le surnageant a été conservé et le culot resuspendu dans 5 ml de méthanol 80 % (V/V) puis à nouveau centrifugé dans les conditions précédentes. Les deux surnageants ont été mélangés et constituent l’extrait de phénols totaux (Figure 8 ).



Surnageant 1+ Surnageant 2 +Surnageant 3 = **composés phénoliques totaux**

Figure 8: Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux (EL Hadrami, 1997 modifié).

#### II.2.8.1.2. Dosage quantitatif des composés phénoliques

Le dosage quantitatif des composés phénoliques a été réalisé selon le protocole d'El Hadrami *et al.* (1997) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

##### Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu, acide fort de couleur jaune, formé d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique est réduit en milieu alcalin et à chaud lors de l'oxydation des composés phénoliques en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite dont l'absorption maximum est à 760 nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présente dans l'extrait.

## Mode opératoire

Dans un tube à essai, ont été introduits successivement :

- 50 µl d'extrait;
- 1950 µl d'eau distillée;
- 250 µl de Folin-Ciocalteu;
- 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 20 %.

Le mélange obtenu a été incubé au bain marie à 40°C pendant 30 min. Le réactif de Folin-Ciocalteu vire au bleu en présence des composés phénoliques. L'intensité de la coloration étant proportionnelle à la teneur en composés phénoliques présente dans le milieu réactionnel. La mesure de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre (UV-1605; UV-visible SPECTROPHOTOMETER SHIMADZU) à 760 nm contre un blanc dans lequel l'extrait a été remplacé par l'eau distillée. Pour chaque extrait trois répétitions ont été réalisées. La teneur en composés phénoliques a été exprimée en mg/g de matière fraîche par référence à la courbe étalon établie avec la catéchine (0,1 mg/ml).

### II.2.8.2. Extraction et dosage des protéines totales

#### II.2.8.2.1. Extraction

L'extraction des protéines totales sous condition native a été faite selon le protocole de Tene *et al.* (2017). Ainsi, 1g de feuilles fraîches a été broyé à froid dans 10 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 1 %, pH 7,5). Le broyat a été resuspendu dans 5 mL de tampon d'extraction. Après agitation au vortex pendant 10 min et incubation dans la glace, le mélange a été soumis à la sonication (processeur ultrasonique de marque SONIREP 150) avec une amplitude de 20 µ et trois intervalles de temps d'une durée de 3 sec. Le mélange a été centrifugé à froid à 10000 g pendant 25 min. Le surnageant a été conservé, le culot repris et centrifugé à nouveau dans les conditions précédentes. Les deux surnageant sont mélangés et supplémentés avec 0,4 V (facteur de dilution) de n-butanol ainsi que 1/10 de tampon acétate de sodium 3 M, pH 4,5. Le mélange a ensuite été incubé dans la glace pendant 30 min avec agitation tous les 10 min. Après incubation, le mélange a été centrifugé à 10000 g pendant 15 min. Le surnageant recueilli constitue l'extrait de protéines totales (Figure 9).

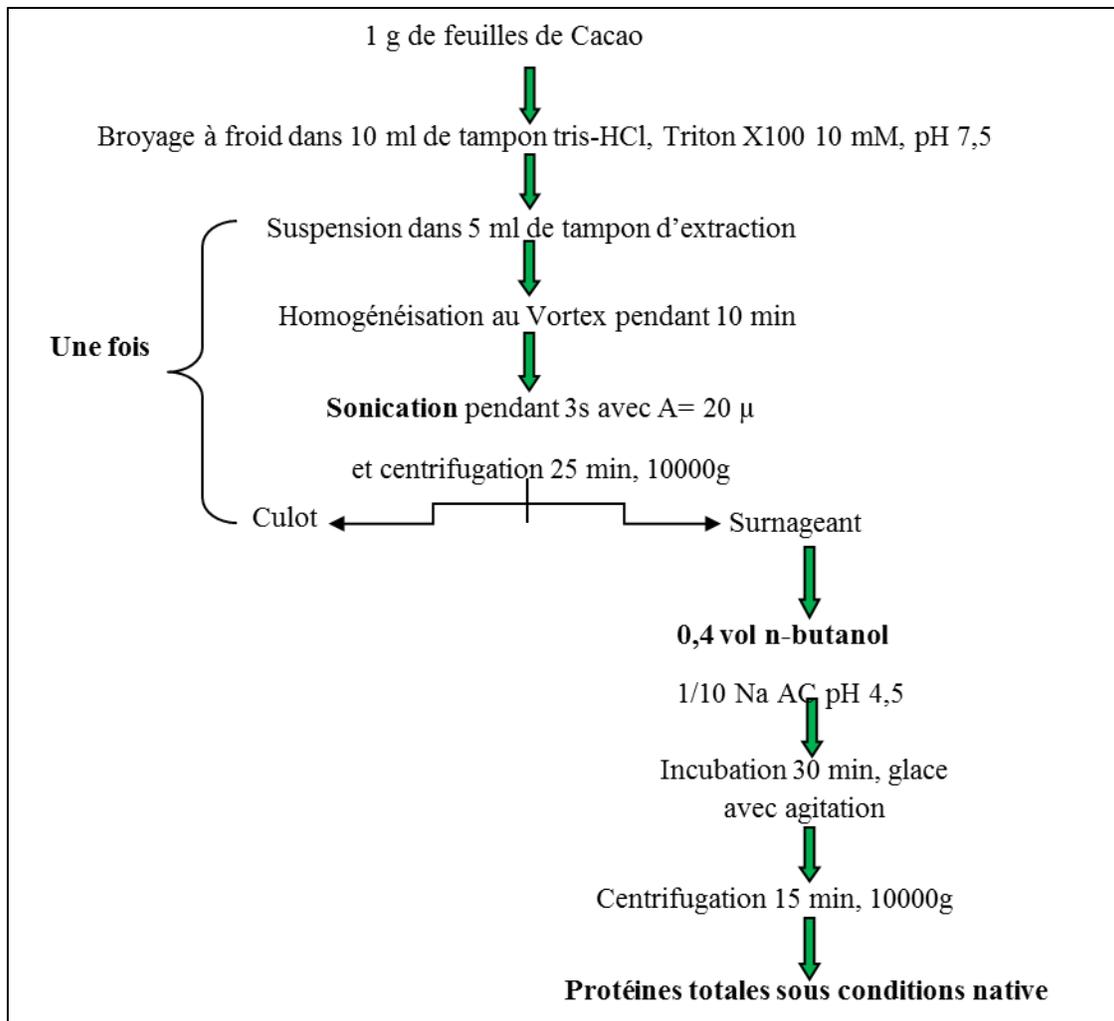


Figure 9: Protocole d'extraction des protéines totales sous condition native (Tene *et al.* 2017).

#### II.2.8.2.2 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976) utilisant le Bleu de Coomassie G250.

#### Principe

En milieu acide, le Bleu Brillant de Coomassie G250 de couleur brun clair se fixe sur les résidus hydrophobes des acides aminés constituant les protéines pour former un complexe de coloration bleu absorbant à un maximum de 595 nm et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans le milieu.

## Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, ont été introduits :

- 450 µl d'eau distillée;
- 50 µl d'extrait;
- 2000 µl de réactif de Bradford.

Après incubation à la température ambiante pendant 2 min, la lecture de la DO à 595 nm s'est faite contre un blanc dans lequel l'extrait a été remplacé par l'eau distillée. Pour chaque extrait, trois répétitions ont été réalisées et les quantités protéiques ont été exprimées en mg/g de matière fraîche par référence à la courbe étalon établie avec le BSA (Bovin Serum Albumin) 0,1 mg/ml.

### II.2.8.3. Mesure de l'activité peroxydasique dans l'extrait protéique

Le dosage de l'activité peroxydasique a été réalisé selon la méthode de Baaziz et El Hadrami (1995).

#### *Principe*

Le substrat utilisé est le gaïacol. En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il est oxydé en tétragaïacol par des peroxydases selon la réaction suivante :



L'apparition du tétragaïacol est suivie par spectrophotométrie à 470 nm, longueur d'onde d'absorption maximale du tétragaïacol.

## Mode opératoire

Le milieu réactionnel pour le dosage des peroxydases est constitué de :

- 1900 µl de tampon Tris-maléate 0,1M pH 7,2 ;
- 50 µl d'extrait;
- 50 µl d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 %.

Dans 1900 µl du milieu réactionnel introduit dans chaque tube, sont ajoutés 50µl d'extrait enzymatique. Après homogénéisation, la réaction a été initiée avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% et incubée à température ambiante pendant 3 min. L'activité a été déterminée en suivant la formation du tétragaïacol à 470 nm. Les activités enzymatiques ont été exprimées en unité enzymatique par gramme de matière fraîche ( $\Delta_{470}/\text{min}$  (UE)/g MF). L'unité enzymatique correspond ici à la quantité d'enzyme qui entraîne une variation de DO égale à 0.1.

Le calcul des activités POX s'est effectué en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité enzymatique} = \frac{\Delta DO \times V_{ext}}{\Delta t \times PE \times g(MF) \times 0,1}$$

$V_{ext}$  = volume d'extraction;  $PE$  = prise d'essai;  $MF$  = matière fraîche;  $\Delta DO$  = variation de la densité optique.

#### II.2.8.4. Mesure de l'activité enzymatique de la $\beta$ -1,3- glucanase dans l'extrait protéique

Le dosage de l'activité enzymatique de la  $\beta$  -1,3- glucanase a été réalisé selon le Protocole modifié de Leelasuphakul *et al.* (2006).

##### ➤ Principe

L'évaluation de la  $\beta$ -1,3-glucanase a été effectuée en utilisant la laminarine (2.5 % m/v), un polymère de  $\beta$ -1,3-glucane. L'activité de cette enzyme libère les résidus de glucoses qui correspondent à la quantité de  $\beta$ -1,3-glucanase présente dans le milieu. Cette activité a été exprimée en mg équivalent de glucose/g de matière fraîche.

##### Mode opératoire:

Dans les tubes à essai, on introduit successivement :

- 90 µl du tampon acétate de sodium contenant la laminarine pH 4, 0,1 M ;
- 10 µl d'extrait protéique ;
- 200 µl de HCl 2 M.

Après ajout de l'extrait protéique, le mélange a été incubé pendant 10 min à 40 °C au bain Marie. La solution de HCl 2 M a été ajoutée pour arrêter la réaction. Le volume a été complété avec 900 µL d'eau distillée. La densité optique a été mesurée à 540 nm.

### **II.2.8.5. Mesure de l'activité enzymatique des polyphénoloxydases (PPO) dans l'extrait protéique**

L'activité des polyphénoloxydases a été déterminée par la méthode modifiée de Kammenn *et al* (1994) en utilisant l'acide gallique comme substrat.

#### **Mode opératoire :**

Dans les tubes à essais, ont été ajoutés successivement :

- 500 µl de tampon phosphate PH7; 0,6M ;
- 150 µl d'acide gallique (10 mM) ;
- 35 µl d'extrait proteique.

Après ajout des trois premières solutions, le mélange a été incubé à 25 °C pendant 30 s, l'absorbance a été mesurée à 330 nm après 5 min utilisant le spectrophotomètre Shimadzu UV-1605. L'activité enzymatique a été exprimée en  $\Delta A_{330\text{nm}}/\text{min/g}$  de poids frais ou  $\Delta A_{330\text{nm}}/\text{min/g}$  de matière fraîche.

### **II.2.8.6. Mesure de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase dans l'extrait protéique**

L'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) a été évaluée dans l'extrait protéique d'après le protocole de Roos *et al.* (1992).

#### **Principe:**

L'activité de la PAL est évaluée par la production de l'acide cinnamique à partir de la phénylalanine.

#### **Mode opératoire:**

Le milieu réactionnel contenait :

- 2 mL de tampon d'extraction des protéines ;
- 0,5 mL de solution de L-phénylalanine 60 mM ;
- 0,5 ml d'extrait enzymatique.

Le mélange a été incubé dans le bain-marie à 30 °C pendant 30 min au bout desquelles, la réaction a été arrêtée en plaçant les tubes dans la glace. L'absorbance de a été déterminée à 290 nm à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV-1605, UV-visible). L'activité enzymatique a été exprimée en  $\text{Abs}_{290}/\text{heure/g}$  de matière fraîche contre le blanc où l'extrait a été remplacé par de l'eau distillée.

### **II.2.8.7. Mesure de l'activité enzymatique des chitinases dans l'extrait protéique**

L'activité des chitinases a été déterminée par la méthode de **Pirovani *et al* (2008)**.

#### **Mode opératoire:**

Dans les tubes à essais, on ajoute successivement :

- 200 µl de carboxymethyl-chitine violet (2 mg/ml);
- 300 µl d'extrait protéique (sous conditions non dénaturantes);
- 300 µl de tampon Tris-HCl 10Mm, PH 7,5, Triton 1%.

Après ajout des trois premières solutions, le mélange a été incubé à 37°C pendant 3 heures et 200 µl de HCl 2 M ont été ajouté pour arrêter la réaction.

Les mélanges ont été ensuite refroidis dans la glace pendant 15 min, puis centrifugés à 15000g pendant 15 min pour enlever les substrats non dégradables. Le surnageant a été collecté et analysé au spectrophotomètre à 550 nm. L'activité enzymatique a été exprimée en unité par gramme de matière fraîche par heure (sachant qu'une unité enzymatique est égale à 0,1 absorbance).

### **II.2.9. Effet du biofongicide "*Bio-oyster shell biofungicide*" sur l'induction du développement précoce des plantes et la production précoce du pool de composé phénolique.**

#### **II.2.9.1. Développement précoce des plants et induction de la résistance**

##### **II.2.9.1.1. Production des plantules**

Les plants ont été obtenus en serre après deux mois de croissance sur substrat stérile comme décrits au paragraphe **II.2.6.1**. Le dispositif a été constitué des plants amendés au biofongicide "*Bio-oyster shell biofungicide*" amendés à la concentration 1% P/P et les plants non amendés (Figure 10). Les cabosses hybrides dénommée ♀SNK64 × ♂UPA134 ont été utilisées dans le cadre de cette expérimentation. Les pots ont été arrosés quotidiennement avec de l'eau distillée stérile pendant deux mois. Cette expérimentation a été répétée deux fois au cours de la même année au regard du calendrier agricole du cacaoyer.

Les feuilles entières âgées d'un mois ont été infectées comme décrit au paragraphe **II.2.6.2**.



Figure 10: Photo du dispositif expérimental en serre (Photo Tene, 2017).

#### **II.2.9.1.2 Effet du biofongicide sur les propriétés chimiques du sol et induction de la résistance.**

L'effet du biofongicide sur les propriétés physicochimiques du sol a été réalisé après deux mois de croissance des plants de cacaoyers en serre. A cet effet, le pH, la teneur en matière organique total, carbone organique total, azote total, cations échangeables, acides échangeables et la granulométrie du sol ont été déterminé comme précédemment décrit au paragraphe **II.2.1**.

La caractérisation de la fertilité a été faite selon les méthodes développées par Boyer *et al* (1982). Elles définissent les normes d'interprétations analytiques et d'équilibres entre les cations à partir des rapports tels que Ca/Mg, Mg/K et K/CEC afin de permettre la mise en évidence des éventuelles carences. Les normes d'interprétations des carences et des limitations ont été consignées dans le tableau V.

Tableau V: Normes de caractérisation de la fertilité des sols (A : norme d'interprétation des résultats analytiques, B : degré de limitation).

A : NORMES D'INTERPRETATION DES RESULTATS ANALYTIQUES (FORESTIER,1960 ; BOYER, 1982)

<b>Normes</b>	<b>Carence</b>	<b>Déficiencia</b>
<b>Ca</b>	-	0,5 meq/g
<b>Mg</b>	0,10-0,15meq/100g	0,30 meq/g
<b>K</b>	0,10meq/100g	0,35 meq/100g
<b>P</b>	0,05 %	0,1 %

B : RAPPORT K/CEC ET DEGRE DE LIMITATION D'APRES BOYER, (1982).

<b>Normes</b>	<b>Limitation forte</b>	<b>Limitation moyenne</b>	<b>Faible à nulle</b>
<b>K/CEC×100</b>	< 1,5 %	1,5 - 3 %	> 3 %

Le seuil de carence pour un élément est une teneur de cet élément en dessous de laquelle les plantes présentent des signes évidents de maladies. Le seuil de déficiencia est une teneur de l'élément dans le sol en dessous de laquelle les plantes ont une réponse évidente à des apports de l'élément considéré. Au-dessus de ce seuil, les plantes ne répondent plus à des apports d'engrais.

### **II.2.9.2. Analyse chromatographique liquide à haute pression couplé à la spectrométrie de masse des composés phénoliques induits à l'état précoce par le biofongicide.**

Les spectres de masse à haute résolution ont été obtenus avec un spectromètre QTOF (Bruker, Allemagne) équipé d'une source HESI. Le spectromètre a été utilisé en mode positif (plage de masse : 100 - 1500, avec une vitesse de balayage de 1,00 Hz) avec un contrôle automatique du gain pour fournir des mesures de masse de haute précision avec un écart de 0,40

ppm en utilisant du formate de sodium comme agent d'étalonnage. Les paramètres suivants ont été utilisés pour les expériences : tension de pulvérisation (4,5 kV), température capillaire (200 °C). L'azote a été utilisé comme gaz de gaine (10 l/min). Le spectromètre a été relié à un système UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher, USA) consistant en une pompe LC, un détecteur à barrette de diodes (DAD) ( $\lambda$ :190-600 nm), un échantillonneur automatique (volume d'injection de 10 µl) et un four à colonne (40 °C). Les séparations ont été réalisées en utilisant un Synergi MAX-RP 100A (50 x 2 mm, taille des particules 2,5 µ) avec un gradient d'eau (+0.1% HCOOH) (A)/acetonitrile (+0.1 % HCOOH) (B) (débit 500 µl/min, volume d'injection 10 µl). Les échantillons ont été analysés à l'aide du programme de gradient décrit ci-contre : 95% A isocratique pendant 1,5 min ; gradient linéaire à 100 % B pendant 6 min; après 100 % B isocratique pendant 2 min. Ensuite le système est revenu à son état initial (90% A) dans 1 min et a été équilibré pendant 1 min.

L'acide caféique et l'épicatéchine ont été utilisés comme molécule de référence. Ces derniers ont été traités dans les mêmes conditions expérimentales similaires aux échantillons test. La structure probable des composés a été déterminée par consultation des bases de données ('Chemistry analysis data base, Science Finder', articles et thèses en ligne).

### **II.2.9.3. Mesure du niveau d'expression des gènes TcChiB, TcGlu-1, TcPer-1, et TcMYBPA par PCR quantitative en temps réel induit à l'état précoce par le biofongicide.**

#### **II.2.9.3.1. Extraction de l'ARN total**

La procédure d'extraction de l'ARN dans les feuilles infectées et non infectées a été menée à froid, pour cela les réactifs et le matériel utilisés étaient maintenus dans la glace pendant le processus d'extraction. L'ARN total a été extrait à l'aide du Kit *RNA MirVana* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Pour cela, 500 µl de tampon de lyse du réactif *RNA MirVana* a été introduits dans les tubes eppendorf contenant 30 mg de matière végétale. Le matériel végétal a été broyé à froid dans le tampon de lyse à l'aide d'un pilon en plastique; le mélange obtenu a été vortexé vigoureusement pendant 3min puis 30 µl de miRNA ont été ajoutés et incubé pendant 10 min à froid selon les recommandation du fabricant. Après incubation, 300 µl du mélange phénol:chloroforme ont été ajoutés et le mélange a été homogénéisé pendant 1 min au vortex puis centrifugé à froid (4 °C) à 10000 g pendant 5 min. Après centrifugation, la couche

aqueuse supérieure a été prélevée à l'aide de la micropipette et transférée dans les nouveaux tubes coniques de 1,5 ml où le volume de chaque phase aqueuse a été noté. Un volume de 300 µl d'éthanol a été ajouté dans chaque tube et l'ensemble a été délicatement homogénéisé au vortex pendant 60 secondes. Les échantillons ont ensuite été transférés dans les tubes coniques avec cartouche filtrante. Ainsi 700 µl de solution de tampon de lavage ont été ajoutés dans les tubes coniques avec cartouche filtrante selon les recommandations du fabricant; le mélange a été homogénéisé puis centrifugé à froid à 10000 g pendant 15 secondes afin d'éluer le substrat. Le surnageant recueilli après centrifugation a été versé ; une succession de deux lavages a été réalisée avec 500 µl de solution de tampon lavage comme précédemment (centrifugation à froid, 10000g pendant 15 secondes, rejet du surnageant). Après le dernier lavage, la cartouche filtrante a été transférée dans un nouveau tube collecteur ( fourni par le kit) et 100 µl d'eau exempte de nucléases ont été ajoutés au centre du filtre de chaque tube. Chaque tube a été ensuite fermé à l'aide d'un bouchon selon les recommandations du fabricant. L'ensemble a été vortexé à vitesse maximale pendant 30 secondes afin de récupérer les ARN. Enfin, l'ARN a été prélevé et aliquoté dans les tubes de PCR et stockés à -80 °C .

L'ARN obtenu a été quantifié au Nanodrop, puis la pureté a été évaluée par le calcul du ratio Absorbance 260 nm/ Absorbance 280 nm. Les solutions d'ARN obtenues des feuilles issues des plants traitée et non traités au biofongicide, étaient considérées pures car le ratio était compris entre 2 et 2,2.

#### **II.2.9.3.2 Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) par RT-PCR**

La *RT-PCR* (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) est une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc).

##### **Principe**

La synthèse d'un brin d'ADN complémentaire est catalysée par des ADN polymérase ARN dépendantes (Reverse Transcriptase) et utilise une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre. Lorsque les ARN à amplifier sont polyadénylés en 3' (ARNm des eucaryotes), l'amorce choisie peut être une séquence polyT constituée d'une succession de désoxythimidines. Dans ce cas, tous les ARNm sont à priori copiés en ADNc. L'amplification est effectuée par la réplification de

cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation qui assurent une multiplication exponentielle de la molécule hybride d'ADNc issue de la transcription inverse.

### **Protocole**

La synthèse des molécules d'ADNc à partir des échantillons d'ARN a été effectuée suivant le protocole décrit par le fabricant du Kit *Verso cDNA Synthesis (Thermo scientific)* utilisé. Brièvement, 20 µL de mélange réactionnel contenant 4 µL du tampon *cDNA synthesis 5x*, 2 µL du mélange dNTP, 1 µL d'amorces d'ARN « random RNA primer », 1 µL de la RTE (Reverse Transcriptase Enhancer), 1 µL de 300 ng/µL d'échantillon d'ARN, 0,5 µL de *Verso enzyme mix* (incluant la transcriptase reverse) et ajusté au volume final avec de l'eau DEPC. Le mélange réactionnel a été soumis à un programme du cycle de transcription reverse réglé avant ajout de l'enzyme à la température de 45 °C en 1 cycle de 30 min. Puis, après ajout de l'enzyme, la température a été réglée à 95 °C pendant 2 min pour terminer la réaction en utilisant le PTC 100™ Programmable Thermal Controller Cycler (MJ Research, Inc. USA.).

#### **II.2.9.3.3 Analyse de la transcription des gènes de TcChiB, TcGlu-1, TcPer-1 et TcMYBPA**

La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) est une technologie fusionnant la chimie de la PCR avec l'utilisation des molécules reporteurs fluorescentes afin de surveiller la production de produits d'amplification au cours de chaque cycle de la réaction de PCR. Le niveau d'expression relative des gènes TcChiB, TcGlu-1, TcPer-1 et TcMYBPA a été évalué en utilisant l'appareil Quantstudio LightCycler *Real Time System*. La qPCR a été réalisée selon les instructions du fabricant du Master KiCqStart SYBR Green qPCR ReadyMix 2X (Sigma Aldrich) contenant le SYBR Green, un colorant fluorescent permettant la détection en temps réel des produits de PCR.

#### **Principe**

La technologie qPCR basée sur le SYBR Green repose sur la fixation du colorant fluorescent SYBR Green sur l'ADN double brin (ADNdb). Le SYBR Green, s'intercale au niveau des chaînes double brin d'ADN et devient fluorescent. Pendant la phase d'hybridation (A) du cycle de qPCR, les amorces de PCR s'hybrident à la cible et forment de petites régions d'ADNdb ou le

SYBR green s'intercale et le signal fluorescent faible est observé. Dans la phase d'élongation (B), plus de ADNdb sont formés et plus de colorants SYBR Green, peuvent s'intercaler et le signal fluorescent est plus élevé. A la fin de la phase d'élongation, toutes les molécules d'ADN deviennent double brin et la quantité maximale de SYBR green, s'est intercalée (C) (Figure 11). Le SYBR green a un maximum d'excitation et d'émission respectivement à 491 nm et 521 nm. La fluorescence est ainsi mesurée à la fin de chaque phase d'élongation. La fluorescence est utilisée pour mesurer l'accumulation des produits de la réaction de polymérisation en chaîne après chacun de ses cycles. Les mesures de fluorescence permettent d'extrapoler la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon avant l'amplification.

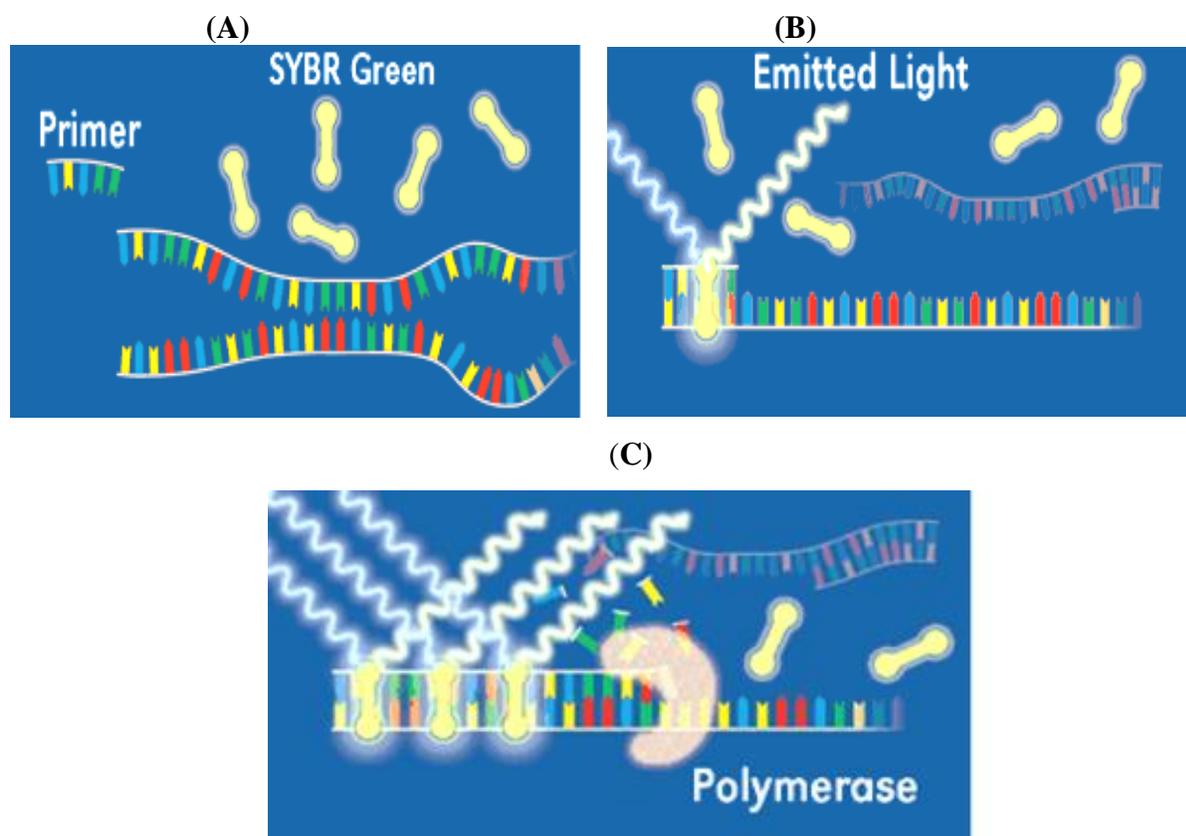


Figure 11: Principe de la PCR quantitative utilisant le colorant SYBR Green.

### Protocole

La procédure de qPCR a été réalisée à froid, pour cela les réactifs utilisés étaient maintenus dans de la glace pendant la préparation du cocktail réactionnel. Ainsi, dans des tubes coniques de PCR, le cocktail de réaction contenait 1  $\mu\text{L}$  d'amorce sens, 1  $\mu\text{L}$  d'amorce anti sens, 1  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADNc précédemment synthétisé et 5  $\mu\text{L}$  du Master KiCqStart SYBR Green qPCR

ReadyMix 2X (Sigma Aldrich). Pour chaque échantillon d'ADNc, un mélange réactionnel contenant l'amorce sens et anti sens de chaque gène test a été constitué. Les tubes ont ensuite été couverts, puis centrifugés brièvement et le programme de la réaction de PCR quantitative (Quantstudio LightCycler Real Time System) exécuté. Pour cela, les cycles d'amplification de la PCR quantitative ont consisté en une dénaturation à 95 °C pendant 25 s, à la fixation des amorces aux températures comprises entre 50 et 60 °C pendant 30 min et une étape d'extension à 72 °C pendant 1 min pour un total de 37 cycles suivi d'une extension finale à 72 °C pendant 10 min. Les séquences des amorces des différents gènes utilisés sont consignés dans le Tableau VII. La quantification relative du degré d'expression des gènes cibles dans les échantillons a été effectuée par la méthode comparative Ct utilisant l'actine comme gène de référence. La  $\Delta Ct$  a été calculée en soustrayant la Ct moyenne de chaque étape de traitement de la Ct moyenne de l'actine ( $\Delta Ct$  du gène cible et  $\Delta Ct$  du calibre interne). La  $\Delta\Delta Ct$  a été calculée en soustrayant la  $\Delta Ct$  de chaque étape de traitement de ( $\Delta Ct_{\text{gène cible}} - \Delta Ct_{\text{calibreur interne}}$ ). La formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  a été utilisé pour calculer le changement de pli relatif entre les étapes de traitement correspondant au ratio normalisé du degré d'expression relative du gène cible (Livak et Schittgen, 2001). Tous les échantillons ont été réalisés en tripliquets et les expériences ont également été réalisées en tripliquets.

Tableau VI: Séquence des amorces utilisées pour évaluer le degré d'expression relative des gènes TcChiB, TcGlu-1, TcPer-1 et TcMYBPA.

<b>Gène</b>	<b>Amorce sens</b>	<b>Amorce anti-sens</b>
<b>référence</b> <b>(actine)</b>	<b>5'.....3'</b>	<b>5'.....3'</b>
<b>TCM</b>	GGCTCCACCTGAAAGGAAATA	TCATACTCTGCCTTAGCAATCC
<b>Gènes cibles</b>		
<b>TcChiB</b>	GTGGCTTTGCTTGTGAATCTC	CACTGCTTCTCACCCCTTATGT
<b>TcGlu-1</b>	GCTATGATTCCCTTCCCTCTTC	CAGGCCAAGTGCTAGGATAAG
<b>TcPer-1</b>	TGCGCTGATATTCTCGCTATT	CTGTGAACCCATCCCTTCTT
<b>TcMYBPA</b>	GATGGGAAGGGCTCCTTGTTG	ATCTCGTTATCGGTTGGACCAG

### **II.2.10. Analyses statistiques**

Les données obtenues dans cette étude ont été exprimées en termes de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne et en pourcentage pour les variables quantitatives. Les analyses statistiques ont été effectués par le logiciel statistics version 9.01 pour windows. Le test ANOVA a été utilisé pour la comparaison des moyennes suivi du test de comparaison multiples Turkey pour la comparaison des traitements non-traité ou traité avec différente formulation coquillère. Les tests de corrélations entre les différents paramètres physiologiques et moléculaires (Pearson ou Speaman) ont été effectué par le logiciel SPAD version 4.1 pour windows. L'analyse en composantes principales (ACP) permet de présenter sur un plan à deux dimensions, la disposition des composés évalués en fonction des traitements a été effectué par le logiciel SPAD version 4.1 pour windows. Le tracé des graphes a été effectué par le logiciel GraphPad Prism version 6.01 et le logiciel Excel version 2016 pour windows.

*Chapitre III :*  
*Résultats et Discussion*

## CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

### III.1. Effets bénéfiques de l'amendement des sols sur la qualité des semences en condition contrôlée.

#### III.1.1. Composition chimique du sol

Au regard des paramètres physico-chimiques du sol, il en ressort que la valeur du pH initial est de 6,1. Le sol de la localité de Ndamvout présente un pH faiblement acide . Le pourcentage d'azote total et de matière organique cet échantillon de sol est compris entre 1,23 et 3,396 % . La concentration en cations échangeables est de 13,40 cmol/ kg et le rapport carbone / azote est de 1,357. Les teneurs en calcium, magnésium et potassium sont de l'ordre de 0,0648 méq/g sol, 0,0232 méq/g sol et 0,20 méq/g sol respectivement. La teneur en phosphore totale est 3,54 mg /g sol et le sol a une texture limono-argilo-sableuse (Tableau VII).

Tableau VII: Analyse physico-chimique du sol de "Ndamvout".

Paramètres	Sol
<b>pH (eau)</b>	6,1
<b>Carbone organique (%)</b>	1,67
<b>Matière organique (%)</b>	3,396
<b>Azote total (%)</b>	1,23
<b>Potassium (méq / 100 g sol)</b>	0,20
<b>Carbone/azote</b>	1,357
<b>Cations échangeables (cmol/kg)</b>	13,40
<b>Calcium (méq / g sol)</b>	0,04
<b>Magnésium (méq / g sol)</b>	3,70
<b>Phosphore assimilable (mg / g sol)</b>	3,54
<b>Argile (%)</b>	20
<b>Limon (%)</b>	10
<b>Sable (%)</b>	10,26
<b>Sodium (méq / 100 g sol)</b>	0,04
<b>Soufre (méq / 100 g sol)</b>	3,70
<b>Aluminium (méq / 100 g sol)</b>	0,1

### III.1.2. Effet des poudres de coquilles d’huîtres sur le taux de levée des fèves

L’amendement du sol aux poudres de coquilles d’huîtres favorise l’augmentation du taux de levée de chaque lot en fonction du temps (Figure 12). Les lots amendés aux poudres de coquilles d’huîtres présentent un taux de levée des fèves supérieur aux lots non traités. En effet, on enregistre un taux de levée de l’ordre de 33,33%, 11,12 % et 16,61 % respectivement pour les traitements terre stérile + coquille (TS+CQ), terre stérile + *P. megakarya* +coquille (TS+PM+CQ) et terre non stérile +coquille (TNS+CQ) au sixième jour comparativement à un taux négatif pour les lots non traités (terre non stérile (TNS), terre stérile + *P. megakarya* (TS+PM) et Terre stérile (TS). Le taux de levée des fèves est plus prononcé au cours du temps avec un taux moyen de levée de l’ordre 94,44 % au dix-huitième jour dans les traités aux coquilles d’huîtres. Cependant la présence de *P. megakarya* dans le sol inhibe le taux de levée des fèves de l’ordre de 34,1 % au cours du temps (Figure 12).

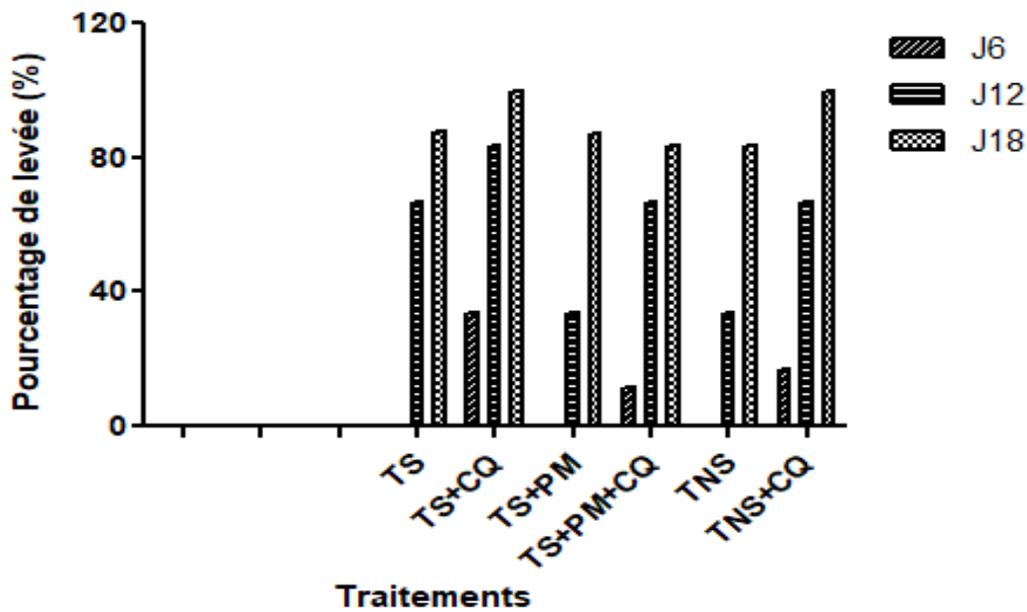


Figure 12: Variation du taux de levées des graines en fonction des traitements.

TNS : terre non stérile ; TS : terre stérile ; PM : *Phytophthora megakarya* ; CQ : poudre de coquilles d’huîtres.

### III.1.3. Effet des poudres de coquilles d’huitres sur les paramètres de croissance des plants de cacaoyers en serre.

Les paramètres de croissance notamment l’évaluation de la longueur des tiges, du nombre de feuille, de la longueur des feuilles, de la largeur des feuilles, de la surface foliaire, du poids frais de la partie aérienne et du poids frais des racines sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) (Photo 18 , Figure 13,14 et 15). Le traitement des sols aux coquilles d’huitres augmente significativement la taille des plantes après douze semaines de croissance. Cette augmentation est de  $39,5 \pm 0,25$  ;  $33,25 \pm 0,42$ ; et  $36 \pm 0,57$  cm pour les traitements TS+CQ, TS+PM+CQ, et TNS+CQ, tandis qu’elle est de  $26 \pm 0,51$  ;  $23 \pm 0,37$  ;  $25,25 \pm 0,54$  cm pour les traitements TS, TS+PM et TNS (Figure 13). En effet, la presence de *P. megakarya* dans le sol inhibe la croissance des plantes de l’ordre de 20 % ( $26 \pm 0,51$  cm pour TS et  $23 \pm 0,37$  cm pour TS+PM) par rapport aux témoins terre stérile (Figure 13).

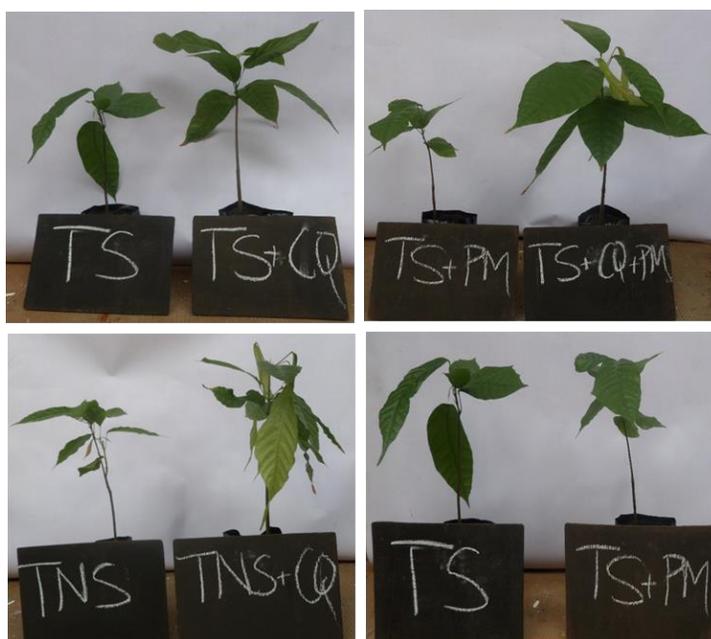


Photo 18: Photos des jeunes plants de cacaoyers après douze semaines de croissance .

TNS: Terre non stérile; TS: Terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres.

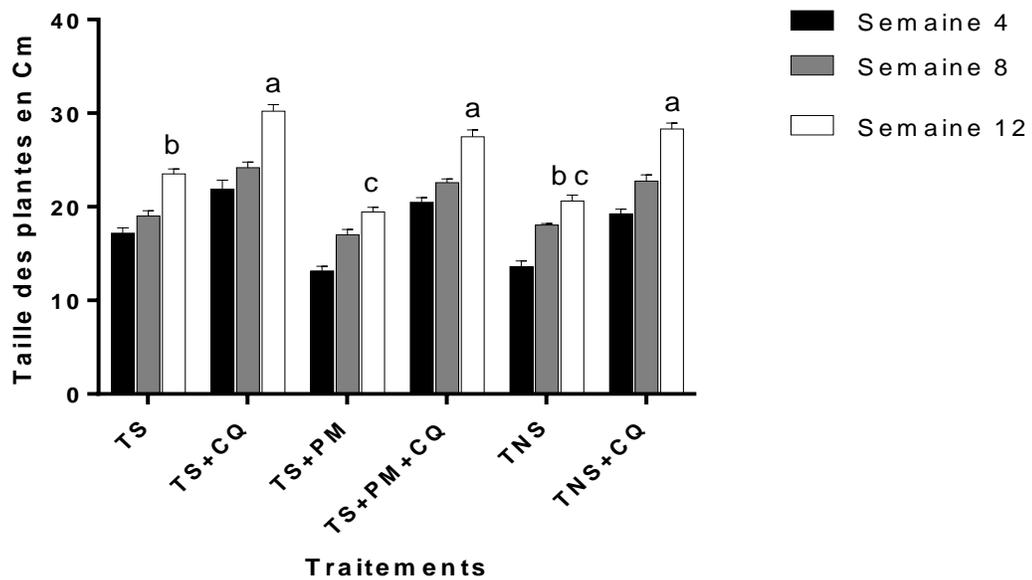


Figure 13: Taille des plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P.megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

Par ailleurs, le traitement aux coquilles d’huitre augmente significativement le nombre de feuille à tous les stades de développement de la plante. Cette différence est plus marquée à la douzième semaine, nous avons respectivement 12,5 feuilles/plante pour le traitement TS+CQ, 12 feuilles/plante pour le traitement TS+PM+CQ et 12 feuilles /plante pour le traitement TNS+CQ (Figure 14).

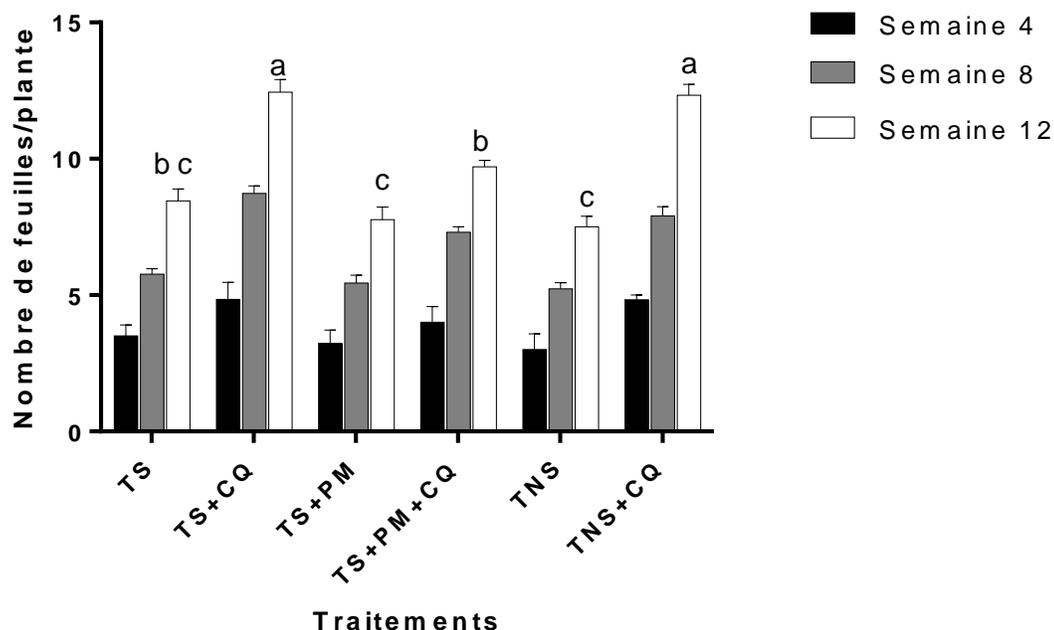


Figure 14: Nombres de feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

L’amendement du substrat de culture en poudre de coquilles d’huitres augmente significativement ( $p < 0,05$ ) la surface foliaire photosynthétique des plantules (Figure 15). En effet les surfaces foliaires moyennes à la douzième semaines de croissance sont de l’ordre 86 cm<sup>2</sup>, 71 cm<sup>2</sup> et 72,15 cm<sup>2</sup> respectivement pour les traitements TS+CQ, TS+CQ+PM et TNS+CQ. Le taux moyen d’augmentation de la surface foliaire est de l’ordre de 25 % chez plantules traitées comparé aux plantules témoins. Par ailleurs, on enregistre des faibles valeurs moyennes de surfaces foliaires chez les plantules issues des sols inoculés uniquement avec *P.megakarya* (Figure 15).

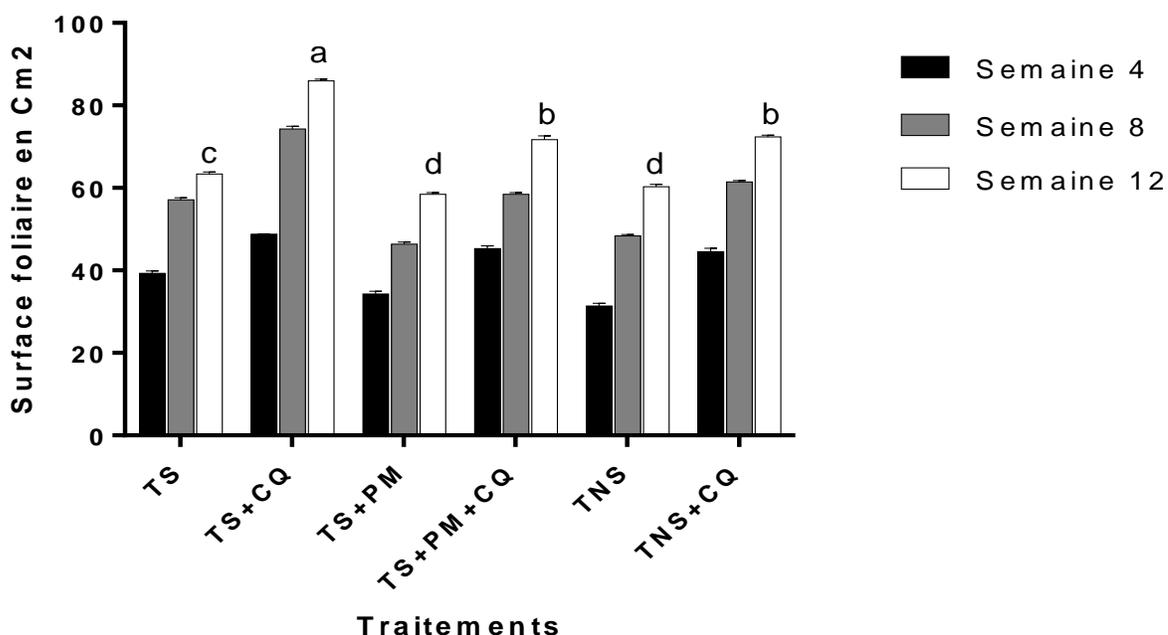


Figure 15: Surface foliaire des plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P.megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

De même le traitement des sols aux coquilles d’huitres augmente significativement le poids frais des racines et de la partie aérienne (Figure 16). En effet , le poids frais des racines est de l’ordre de 2,9 g/ plante, 2,41 g/ plante et 3,3 g/ plante respectivement pour les traitements TS+CQ ,TS+PM+CQ et TNS+CQ ( Photo 19 , Figure 16). Par ailleurs, on enregistre les valeurs de poids frais moyens de la partie la aérienne de l’ordre 8,2 g/ plante, 6,9 g/ plante et 7,8 g/ plante respectivement pour les traitements TS+CQ ,TS+PM+CQ et TNS+CQ . Toutefois,on note une diminution de l’ordre de 29 et 22 % des valeurs moyennes du poids frais des racines et de la partie aérienne chez les plantules issues des sols inoculés uniquement avec *P.megakarya* (Photo 19 ; Figure 16).



Photo 19 : Photos des racines des plants âgés de douze semaines

a: Terre stérile (TS) , b:Terre stérile + coquille (TS + CQ); c: Terre stérile + *P. megakarya* (TS + P.M) , d: Terre stérile + *P. megakarya* +coquille (TS + P.M + CQ) ; e: Terre non stérile (TNS) , f: Terre non stérile +coquille (TNS + CQ):

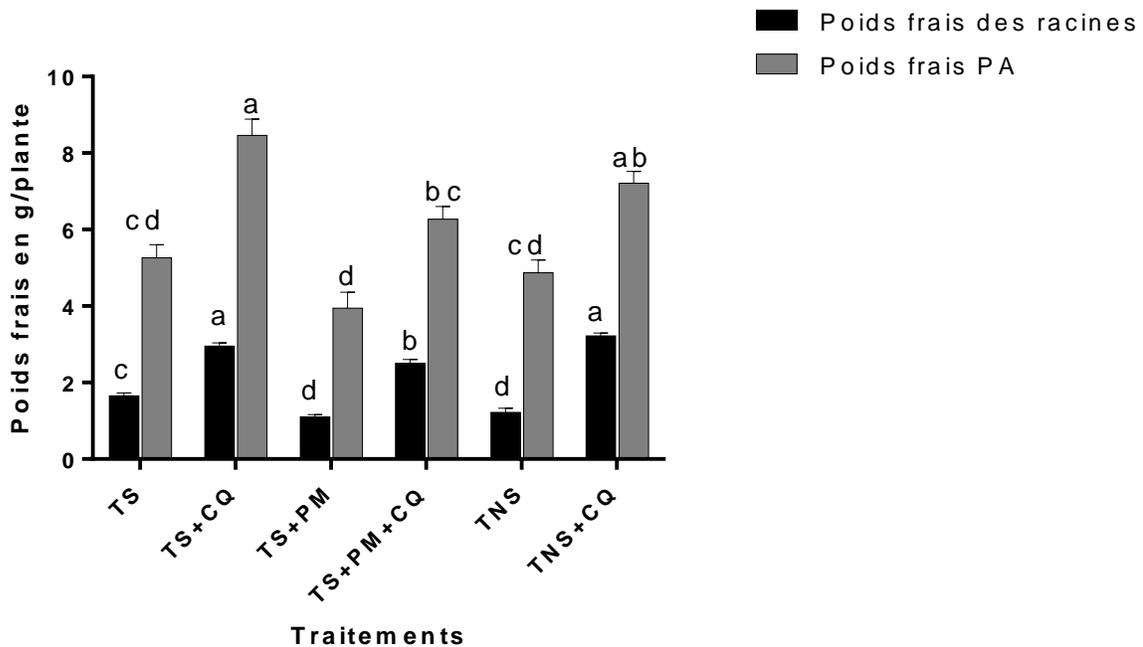


Figure 16: Variation du poids frais des racines et de la partie aérienne en fonction des traitements.

TNS: Terre non stérile; TS: Terre stérile; PM: *Phytophthora megakarya*; CQ: Poudre de coquilles d’huîtres. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

#### III.1.4. Variation de la charge fongique de *P. megakarya* dans le sol et du pH du sol

Le pH initial du sol avant traitement et semis est de 6,1. Après trois mois de croissance on note une variation de pH avec une augmentation significative dans les lots traités aux coquilles d’huîtres (Tableau VIII). Ainsi, on enregistre un pH de l’ordre de  $7,92 \pm 0,14$ ;  $7,82 \pm 0,11$ ;  $7,82 \pm 0,11$  respectivement pour les traitements terre non stérile +coquille, terre stérile +coquille et terre stérile + coquille + *P. megakarya* comparativement aux traitements control (Tableau VIII). Cependant la valeur du pH est plus prononcée dans le traitement terre non stérile +coquille.

Tableau VIII: Le pH des sols traités et non traités aux coquilles d’huitres après les semis

Traitements	Contrôle	Coquille d’huitre
TNS	6,1 ± 0,13a	7,92 ± 0,14b
TS+PM	6,1 ± 0,08a	7,82 ± 0,11b
TS	6,1 ± 0,11a	7,82 ± 0,11b

Chacun des traitements est représenté en moyenne ± écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

Les résultats de la Figure 17 montrent un faible développement de la nécrose sur les cabosses inoculées avec les sols traités aux coquilles d’huitres. Les cabosses inoculées avec les sols non traités présentent des longueurs de la nécrose élevées (Figure 17) . Ainsi les cabosses inoculées avec les suspensions de sols traitées aux coquilles d’huitres présentent des longueurs de nécrose variant de 1,6 à 3 cm tandis que les cabosses inoculées avec les suspensions de sols non traitées aux coquilles présentent des longueurs de nécroses variant de 6,8 à 7,5 cm après douze jours inoculation . Par ailleurs, l’amendement du sol aux coquilles d’huitres réduit la charge de *P.megakarya* dans le sol de l’ordre moyen de 67,3 % . De même on enregistre des faibles longueurs de la nécrose sur les cabosses inoculées avec les suspensions de sols non traités quatre jours après inoculation et une absence de nécrose sur les cabosses inoculées avec les suspensions de sols traités aux coquilles d’huitres durant cette période (Figure 17).

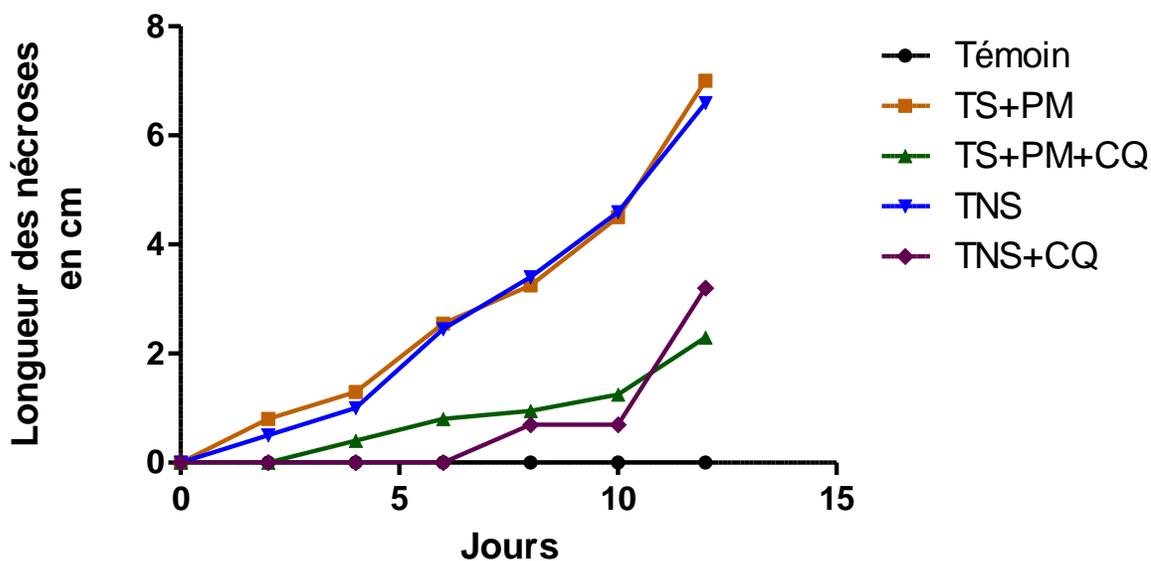


Figure 17: Longueur de nécrose issue de cabosses infectées avec les sols traités et non traités aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres.

### III.1.5. Inoculation des feuilles et index de sévérité de la maladie

L’index de sévérité de la pourriture brune obtenu après infection des feuilles détachées est significativement réduit chez les plants issus des sols traités aux coquilles d’huitres (Figure 18). Ainsi on enregistre les index de sévérités de l’ordre de 1 (résistant), 1,4 (résistant) et 1,7 (résistant) respectivement pour les traitements TS+CQ ,TS+PM+CQ et TNS+CQ comparé aux traitements témoins ( 2,3 (modérément résistant)) . Par ailleurs l’amendement des sols aux coquilles d’huitres diminue l’index de sévérité de la pourriture brune chez les plants avec un taux de diminution moyen de l’ordre de 55,49 %.

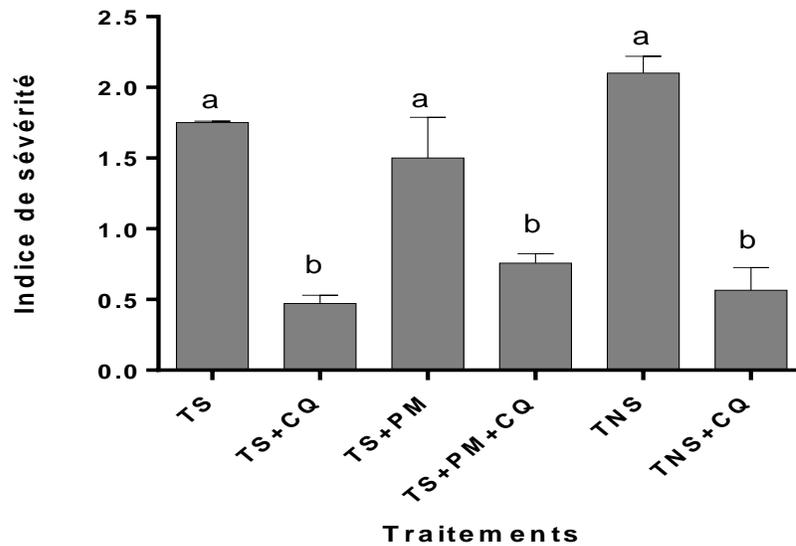


Figure 18: Index de sévérité des feuilles issues des plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.6. Variation de la teneur en composés phénoliques totales

Les teneurs en composés phénoliques totaux sont significativement plus élevées ( $P \leq 0,05$ ) dans les feuilles des plantules issues des substrats amendés en coquilles d’huitre avant et après infection des feuilles (Figure 19). L’infection des feuilles par *P. megakarya* se caractérise par une augmentation significative de la teneur en composé phénolique dans tous les traitements (Figure 19). Ainsi, le traitement des sols aux coquilles d’huitres entraîne une augmentation de la teneur en composé phénolique dans les feuilles des plantules de l’ordre moyen de 33%. En effet, la teneur en composés phénoliques moyenne varie de l’ordre de 1,09 à 1,47 mg/g de MF ; 0,92 à 1,28 mg/g de MF et de 0,92 à 1,17 mg/g de MF respectivement dans les traitements TS + CQ, TS+ PM +CQ et TNS +CQ contre 0,69 à 0,98 mg/g de MF ; 0,45 à 0,63 mg/g de MF et 0,50 à 0,78 mg/g de MF respectivement pour les traitements TS ; TS+PM et TNS avant et après infection. La présence de *P.megakranya* dans le sol entraîne une diminution significative de la teneur en composé phénolique de l’ordre moyen de 36,7%.

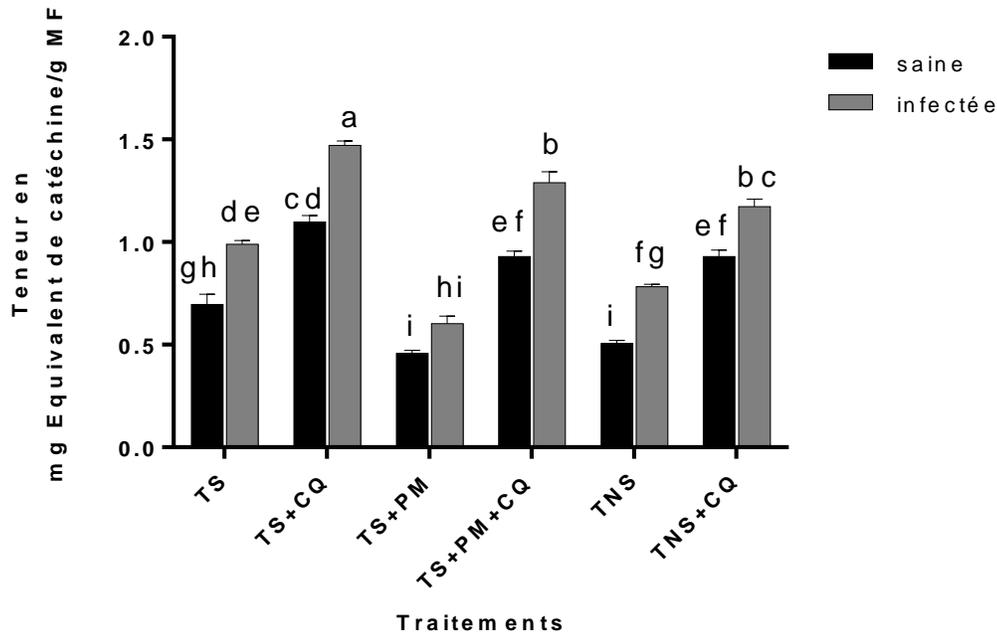


Figure 19: Variation de la teneur en composés phénoliques totaux avant et après infection dans les feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: Terre non stérile; TS: Terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.7. Variation de la teneur en protéines totales

La teneur en protéines totales est significativement plus élevée ( $P \leq 0,05$ ) dans les feuilles des plantules issues des substrats amendés en coquilles d’huitre avant et après infection des feuilles (Figure 20). L’infection des feuilles se caractérise par une augmentation significative de la teneur en protéines totales dans tous les traitements. Cependant, le traitement des sols aux coquilles d’huitres entraîne une augmentation de la teneur en protéines totales dans les feuilles des plantules de l’ordre moyen de 37 %. Cette augmentation est plus élevée chez les plants issus des sols traités aux coquilles d’huitres (Figure 20). En effet, la teneur en protéine total varie de l’ordre de 3,15 à 4,23 mg/g de MF ; 2,75 à 3,68 mg/g de MF et 2,30 à 3,29 mg/g de MF respectivement pour les traitements TS+CQ, TS+PM+CQ et TNS+CQ avant et après infection. Par ailleurs, la présence de *P. megakarya* dans le sol entraîne une diminution de la teneur en protéine totale en condition saine et infecté de l’ordre moyen de 21,47 %.

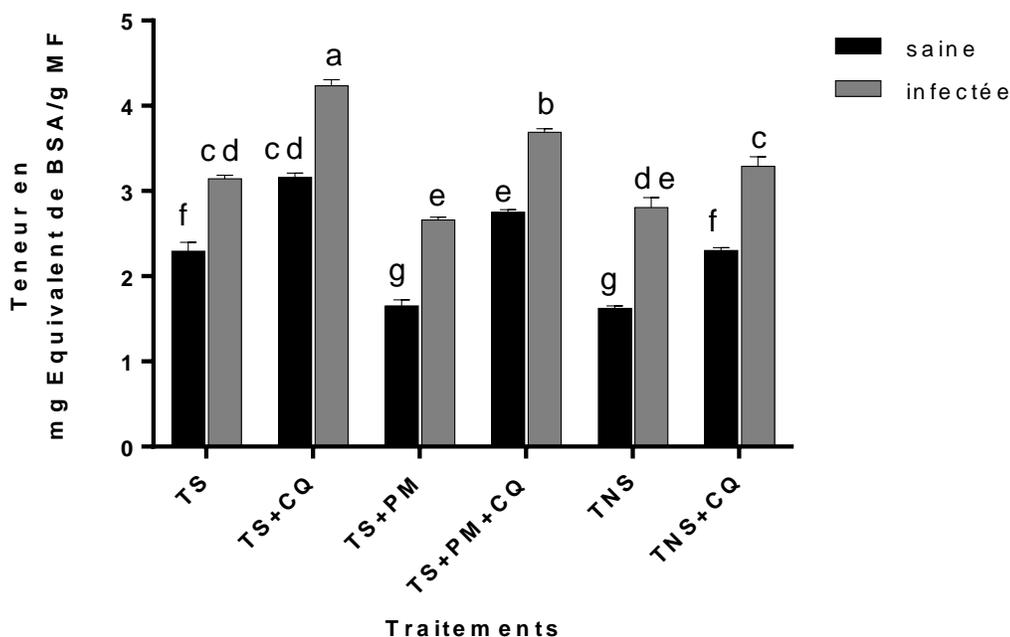


Figure 20: Variation de la teneur en protéines totales avant et après infection dans les feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P.megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.8. Variation de l’activité des polyphénoloxydases

L’activité enzymatique des polyphénoloxydases (PPO) dans l’extrait protéique total varie en fonction de l’état sanitaire de la plante et des traitements . L’activité polyphénoloxydasique avant infection est significativement plus élevée dans les feuilles des plants traités aux coquilles comparée aux témoins (Figure 21). L’infection se caractérise par une augmentation significative de l’activité enzymatique dans tous les traitements avec un taux plus élevé chez les plants issus des sols traités aux coquilles (Figure 21). Ainsi ,on note un taux d’augmentation moyen de l’ordre de 86,11 % chez les plants issus des traités aux coquilles. En effet, l’activité polyphénoloxydase varie de l’ordre de 1,56 à 2,48 Abs à 330 /min /g de MF ; 0,98 à 2 Abs à 330 /min /g de MF et de 1 à 1,97 Abs à 330 /min /g de MF respectivement pour les traitements TS+CQ, TS+PM+CQ et TNS+CQ avant et après infection . La présence de *P.megakarya* dans le sol entraîne la baisse de l’activité polyphénoloxydasique avant et après infection de l’ordre moyen de 51,17%. (Figure 21).

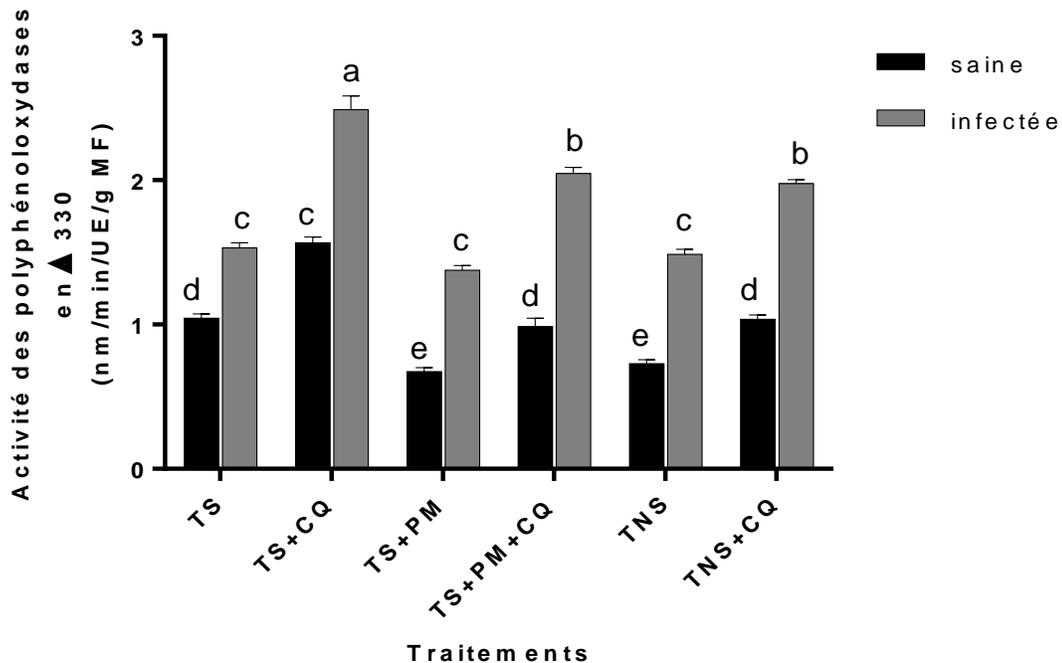
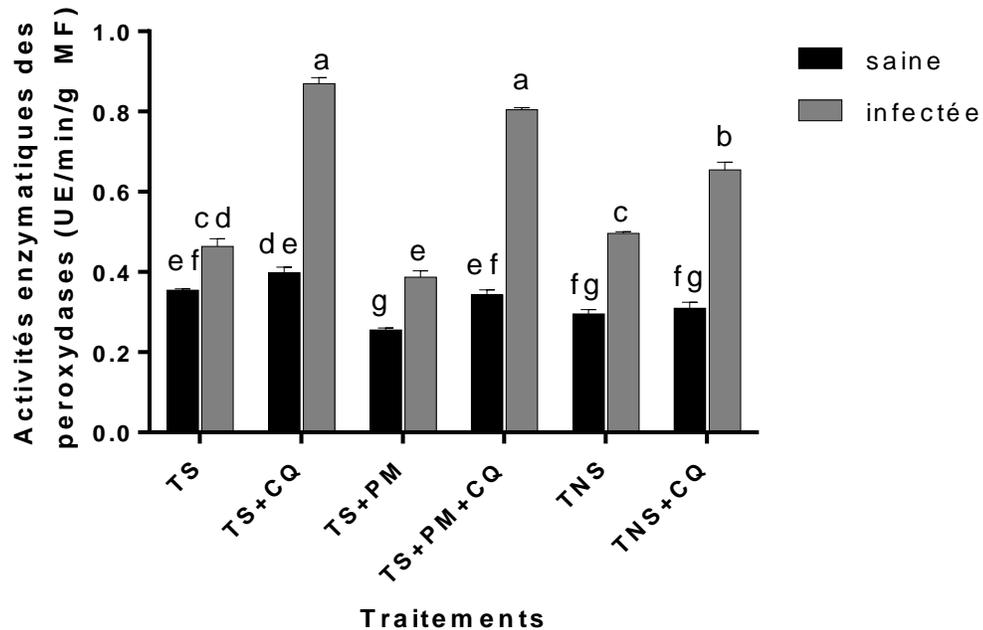


Figure 21: Variation de l'activité polyphénoloxydase avant et après infection dans les feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d'huitres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.9. Variation de l'activité des Peroxydase

Les activités peroxydases dans l'extrait protéique total varient en fonction de l'état sanitaire de la plante. L'activité peroxydase est élevée dans les feuilles de tous les plants issus des sols traités aux coquilles d'huitres (Figure 22). L'infection par *P. megakarya* se caractérise par une augmentation significative de l'activité peroxydasiques dans les feuilles des plants issus des sols traités et non traités aux coquilles avec une activité plus prononcé dans les lots traités aux coquilles d'huitres (Figure 22). Ainsi, on enregistre un pourcentage d'augmentation de 120,51 % (0,39 à 0,86 UE/min/g de MF) ; 135,29 % (0,34 à 0,8 UE/min/g de MF) ; 116,15 % (0,3 à 0,65 UE/min/g de MF) respectivement pour les traitements TS+CQ, TS+PM+CQ et TNS+CQ. Par ailleurs, la présence de *P. megakarya* dans le sol entraîne une diminution de l'activité peroxydase de l'ordre moyen de 37,51 % (Figure 22).



**Figure 22:** Variation de l'activité peroxydase avant et après infection dans les feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huîtres.

TNS : terre non stérile ; TS : terre stérile ; PM : *P. megakarya* ; CQ : poudre de coquilles d'huîtres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.10. Variation de l'activité des chitinases

L'activité des chitinases varie en fonction des traitements et de l'état sanitaire de la plante (Figure 23). L'activité des chitinases est élevée dans les feuilles de tous les plants issus des sols traités aux coquilles d'huîtres. L'infection par *P. megakarya* se caractérise par une augmentation de l'activité des chitinases dans tous les traitements avec une activité plus élevée dans les feuilles des plants issus des sols traités aux coquilles d'huîtres (Figure 23). Ainsi on enregistre un pourcentage d'augmentation de 25 % (4,76 à 5,99 UE/H/g MF), 24,53 % (4,32 à 5,38 UE/H/ g MF) ; 34,55 % (4 à 5,49 UE/H/ g MF) respectivement pour les traitements TS+CQ, TS+CQ+PM et TNS+CQ. La présence de *P. megakarya* dans le sol réduit l'activité des chitinases de l'ordre moyen de 22,92 % (Figure 23).

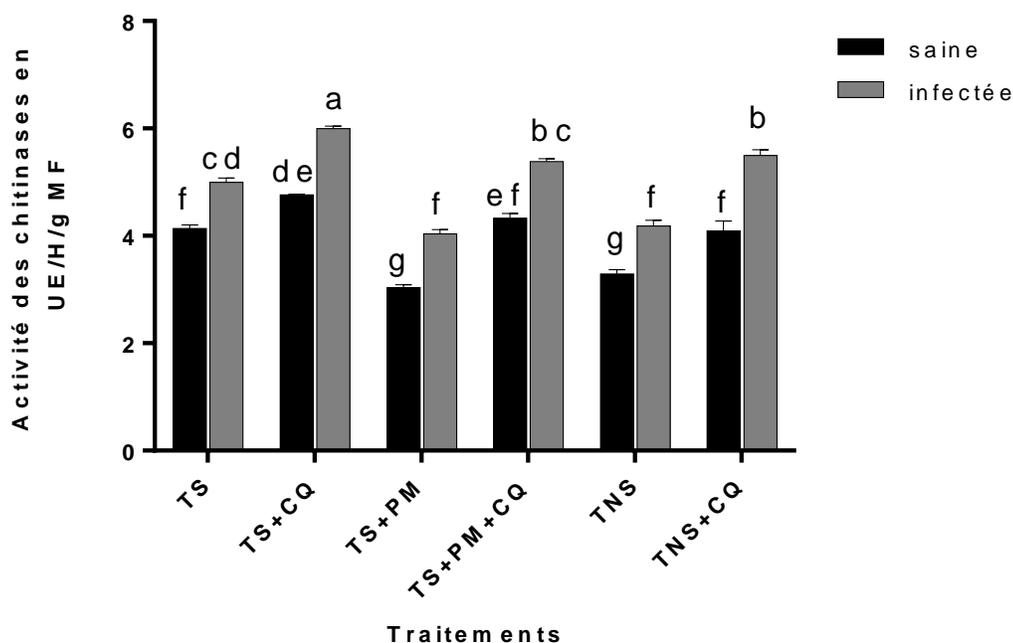


Figure 23: Variation de l'activité des chitinases avant et après infection dans les feuilles des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P.megakarya*; CQ: poudre de coquilles d'huitres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.11. Variation de l'activité des $\beta$ -1,3 glucanases

L'activité des beta-1,3-glucanases varie en fonction des traitements et de l'état sanitaire de la plante. D'une manière générale, l'activité enzymatique beta-1,3-glucanases est plus élevée dans les feuilles de tous les plants issus des sols traités aux coquilles d'huitres comparée aux lots non traités (Figure 24). Après infection, on note une augmentation significative de l'activité enzymatique beta-1,3-glucanases chez tous les plants de chaque traitement avec une activité plus prononcée chez les plants issus des sols traités aux coquilles d'huitres (Figure 24). Ainsi on enregistre un pourcentage d'augmentation de 183,3 % (0,18 à 0,51  $\mu$ mole de glucose libéré /min /g de MF), 104,76 % (0,21 à 0,43  $\mu$ mole de glucose libéré /min /g de MF), 60 % (0,25 à 0,40  $\mu$ mole de glucose libéré /min /g de MF) respectivement pour les traitements TS+CQ, TS+PM+CQ et TNS+CQ. Cependant, la présence de *P. megakarya* dans le sol entraîne

une diminution de l'activité enzymatique beta-1,3-gluconases de l'ordre moyen de 61,5 % (Figure 24).

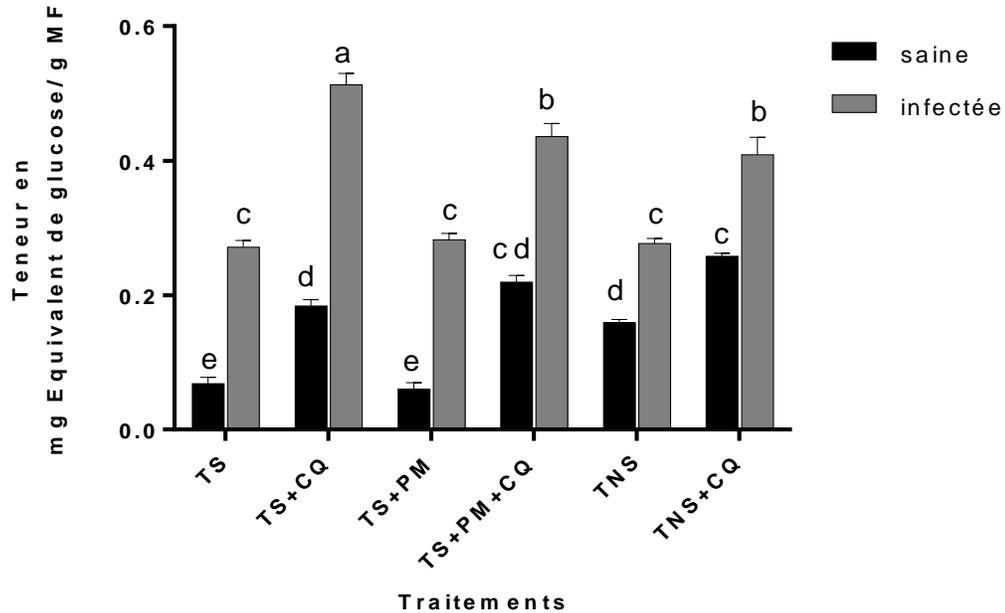


Figure 24: Variation de l'activité des  $\beta$ -1,3 gluconases avant et après infection dans les feuilles des plantes traitées aux coquilles d'huitres.

TNS: Terre non stérile; TS: Terre stérile; PM: *P. megakarya*; CQ: poudre de coquilles d'huitres. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### III.1.12. Indice de qualité sanitaire

L'indice de qualité sanitaire représente le taux moyen de protection des plants en pépinière. Le taux de protection des plants varie en fonction des traitements avec une valeur plus élevée chez les plants issus des sols traités aux coquilles d'huitres (Figure 25). L'amendement des sols aux coquilles d'huitre entraîne une augmentation du taux de protection des plants de l'ordre moyen de 70 % (Figure 25). Cependant les plantes issues des sols non traité aux poudres de coquilles d'huitres ont un taux de protection moyen faible de l'ordre de 10 %. Les plants issus des sols non stériles traités aux coquilles d'huitres présente un taux de protection le plus élevés de l'ordre de 40 % comparativement aux autres traitements (Figure 25).

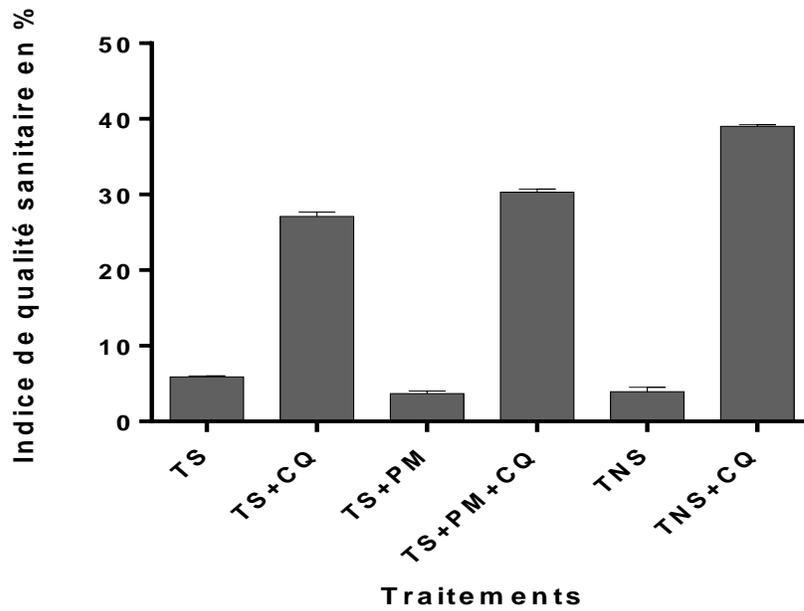


Figure 25: Indice de qualité sanitaire dans les plantes traitées et non traitées aux coquilles d’huitres.

TNS: terre non stérile; TS: terre stérile; PM: *P.megakarya*; CQ: poudre de coquilles d’huitres.

### III.1.13. Discussion Partielle I

Cette partie avait pour but d'évaluer l'impact de l'amendement des sols aux poudres de coquilles sur la qualité des semences en serre. Au regard des résultats, le traitement des sols aux poudres de coquilles d'huitres à la concentration 10% P/P a entraîné une augmentation de la vitesse de germination des graines au cours du temps avec un taux moyen de levé des fèves de l'ordre de 94,44 % au dix-huitième jour. Cependant, la présence de *P.megakarya* dans le sol a inhibé la vitesse de germination des graines caractérisée par une diminution du taux de levé moyen de l'ordre de 34,4 % au cours du temps. L'augmentation de la vitesse de germination des graines de cacao pourrait s'expliquer par la capacité de la chitine présente dans les poudres de coquilles d'huitres à former d'excellents films semi-perméables à la surface de la graine qui maintient l'humidité de la graine et l'absorption de l'humidité du sol. Ce mécanisme concourt ainsi à l'accélération de la germination (Defang *et al.*, 2012). L'augmentation du taux de levée des fèves de cacao dans les traitements coquillères en présence de *P.megakarya* pourrait s'expliquer par la capacité antifongique du calcium et de la chitine (issue de la dégradation des coquilles) vis-à-vis de *P. megakarya* dans le sol. Cette action pourrait être corrélée à la capacité des coquilles grâce au carbonate de calcium à créer les conditions défavorable pour le développement du pathogène via la modification du pH et la flore microbienne du sol (Chang *et al.*, 2010). Ces résultats sont similaires à ceux de Shen *et al* (2017) qui ont montré que l'amendement des sols aux poudres de coquilles d'huitres accélère la germination des graines de tabac et stimule l'activité des microorganismes bénéfique pour une croissance ultérieure propices des jeunes plants.

Après amendement du sol avec les coquilles d'huitres, il en ressort une augmentation de la longueur des tiges, la surface foliaire, le nombre de feuilles, le poids frais des racines et le poids frais de la partie aérienne comparé aux témoins. Les paramètres agronomiques ainsi enregistrés traduisent le bon état sanitaire de la plante. L'effet des coquilles d'huitres sur la croissance obtenue dans le présent travail corrobore avec les travaux de Hilal *et al.* (2006), Chan (2010) et Tene *et al* (2017) qui ont montré que la chitine et les sources de chitines ont la capacité d'induire la croissance de plusieurs plantes. Cet effet stimulateur des poudres de coquilles d'huitres sur la croissance peut être dû à sa richesse en éléments minéraux importants pour la croissance de la plante à l'instar du calcium, et des composés azotés (Arfaoui *et al.*, 2015). En effet, le poids frais

des racines et de la partie aérienne de la plante sont des bons indicateurs de stress chez la plante. Dans nos conditions expérimentales le traitement du sol par les matières organiques augmente le poids frais de la partie aérienne ainsi que le poids frais des racines. Cette augmentation pourrait être due à la disponibilité en élément nutritif dans le sol.

Le degré de lésion nécrotique enregistrée sur les cabosses inoculées respectivement avec les sols traités aux matières organiques pourrait être dû à la diminution de la charge *P.megakarya* dans le sol. Cette diminution pourrait être traduite par le bon état sanitaire de la plante dans les traitements des sols aux matières organiques contrairement aux sols non traités. Ce résultat est en accord avec les travaux de Shen *et al.* (2017) qui ont démontré que l'amendement de sol avec la poudre des coquilles d'huîtres réduisait l'incidence du flétrissement bactérien du tabac de 43,33 % et modifiait la flore bactérienne du sol. Young *et al.* (2010) ont également montré que le traitement des plantations de chou avec la poudre de coquille d'huître augmente la teneur en nutriments du sol et la charge bactériennes dans le sol à l'instar des actinobactéries et les pseudomonas, qui contribuent à l'amélioration de la qualité du sol. En outre, un pH et une concentration en calcium plus élevé sont également importants pour lutter contre les maladies telluriques des plantes (Young *et al.*, 2010). Nos résultats ont montré que le pH des échantillons de sol traités avec des coquilles d'huîtres a augmenté de l'ordre de 32%. Ces résultats corroborent les travaux de Gauvin (2014) qui a montré que l'ajout de coquilles d'huîtres dans le sol augmentait le pH d'un facteur de 0,4 à 0,5. Dans le même élan, il a également montré que la plupart des mycéliums fongiques se développent à un pH compris entre 5 et 6,5; de ce fait une augmentation du pH à la suite d'un amendement coquillière suggère donc une réduction de l'activité des champignons et une augmentation de la synthèse des substances de défense des plantes qui pourraient être dues à l'activité alcaline du carbonate de calcium provenant de la coquille d'huître.

Dans nos essais, le prétraitement du sol avec les poudres de coquilles d'huîtres réduit significativement l'index de sévérité de la maladie. Cet effet est plus prononcé dans le traitement sol stérile additionné aux poudres de coquilles d'huîtres. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Benhamou *et al* (2000) et Arfaoui *et al* (2018) qui ont montré que l'induction de la résistance chez la plante se traduit par l'acquisition d'une résistance par suite d'un traitement de la plante par les agents de luttés biologiques variés. Cela pourrait s'expliquer par une activation des

systèmes de défenses naturelles de la plante et une synthèse accrue des métabolites de défenses tels que les composés phénoliques et les protéines reliés à la pathogénèse. Ainsi, le phénomène de résistance induite a été confirmé dans notre étude par l'augmentation significative de la teneur en composés phénoliques totaux et des protéines reliées à la pathogénèse dans les sols traités aux poudres de coquilles d'huitres avant et après infection des feuilles. En effet la présence de la chitine et du calcium entraîne la synthèse de novo des composés phénoliques qui agissent comme barrière première ou défensive en inhibant la croissance en induisant la mobilisation des  $\beta$ -1,3 glucanes qui agissent comme seconde barrière pour bloquer l'invasion par les cellules du champignon et protéger ainsi les tissus de l'hôte contre les substances phytotoxiques ( Benhamou *et al.*, 2012).

Les activités des enzymes peroxydases et polyphénoloxydases sont plus importantes chez les plantes issus des sols traitées aux poudres de coquilles d'huitres comparativement aux plantes issus des sols non traitées. Ceci serait lié au stress oxydatif avec implication de l'activité des peroxydases comme réponse antioxydant contre l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). De plus, la forte activité observée peut servir de biomarqueur chez le cacaoyer (Effa *et al.*, 2016, Ondobo *et al.*, 2017). D'après Ethan *et al.* (2018), la première étape du mécanisme de défense des plantes contre les attaques parasitaires implique une accumulation rapide des composés phénoliques au niveau des sites d'infection. Ceci entraîne un arrêt ou un ralentissement de la progression de l'agent pathogène. Au cours de ce processus, les composés phénoliques peuvent jouer un rôle de phytoalexines.

Par ailleurs, l'augmentation de la teneur en protéine PR (beta-1,3-glucanase, chitinase) avant et après infection expliqueraient leur implication dans la résistance des plants de cacaoyers vis-à-vis de *P.megakarya*. En effet après infection, la réaction d'hyper sensibilité de la plante intervient rapidement favorisant ainsi la mort des cellules adjacente au site d'infection afin de limiter l'expansion du pathogène. Ainsi, les protéines PR et les phytoalexines prennent le relai pour restreindre la menace via les enzymes hydrolytique à l'instar des beta-1,3-glucanase, chitinase, ainsi que les enzymes oxydatives et petites molécules antimicrobienne (Oliveira *et al.*, 2007).

En prenant en compte l'action des poudres de coquilles d'huitres sur les paramètres agronomiques de croissance des plants de cacaoyers et l'indice de sévérité de la maladie à

différentes conditions de traitement, nos résultats montrent l'échelle d'indice de qualité sanitaire protection décroissante suivante : (TS+CQ) – (TS+CQ+PM) – (TNS+CQ). L'indice de qualité sanitaire peut donc être considéré comme des marqueurs de qualité susceptible d'être utilisé dans les processus d'évaluation de la protection des plantes en pépinière.

### III.1.14. Conclusion partielle I

La présente étude avait pour but d'élucider l'effet de l'amendement des sols aux coquilles d'huitres sur la qualité des semences en condition contrôlé. Il peut être conclu que le traitement du sol avec les poudres des coquilles d'huitres à la concentration 10% P/P augmente la vitesse de germination des graines au cours du temps avec un taux moyen de levé des graines de l'ordre de 94,44%. La présence de *Phytophthora megakarya* dans le sol inhibe la vitesse de germination des graines au cours du temps avec un taux de levé des graines de l'ordre de 34,4%. Le traitement du sol aux coquilles d'huitres à la concentration 10% P/P augmente la taille des plantes (34 à 39,5cm), le nombre de feuilles (11 à 13 feuilles/plante), la longueur des feuilles, la largeur des feuilles, la surface foliaire (88 à 130 cm<sup>2</sup> par plante), le poids frais des racines et de la partie aériennes (25 à 44 g/plante) comparé aux plantes témoin. Le traitement du sol aux coquilles d'huitres augmente le pH de l'ordre de 32%. L'inoculation des cabosses avec la suspension de sol montre une faible nécrose pour les sols traités aux coquilles d'huitres, traduisant ainsi la diminution de la charge de *P. megakarya* dans le sol. Les tests sur disques de feuilles montrent un faible index de sévérité de la maladie (0,47 à 0,75) chez les plantes traitées avec les coquilles d'huitres. Ce degré de résistance est corrélé à la synthèse accrue des composés phénoliques, des protéines totales et l'augmentation des activités peroxydases, chitinase, polyphénoloxydase,  $\beta$  1,3-glucanase chez ces plantes avant et après infection, mettant ainsi en exergue l'implication de ces métabolites dans la résistance des plantes aux maladies. L'indice de qualité sanitaire varie de 40 à 80%. Nos résultats montrent l'échelle d'indice de protection croissante suivante : TS+CQ-TS+CQ-PM-TNS+CQ.

## III.2. Effet des formulations à base des coquilles traités et non traités sur le développement des plantules en condition paysanne.

### III.2.1. Développement agro-morphologique

L'amendement du sol avec les formulations à base de poudre de coquilles traitées et non traitées augmente significativement les paramètres agro-morphologiques des plants de cacaoyers à tous les stades phénologiques de croissance comparé aux traitements témoins (traitement chimique, terre non stérile) (Figure 26, 27, 28 et 29). Le traitement du sol avec la formulation à base de poudre de coquilles traitées augmente significativement la taille des plantes, le nombre de feuilles, surface foliaire, le poids secs des racines et de la partie aérienne comparé aux autres traitements (Figure 26, 27, 28 et 29).

Les tailles moyennes des plants de cacaoyers après quatre mois de croissance sont respectivement de l'ordre de  $42,18 \pm 1,67$  cm,  $33,9 \pm 0,89$  cm pour les plants issus des sols traités avec les formulations coquillères (CQT et CQNT). Ces valeurs sont significativement élevées comparées à celles des plantules issus des sols non traités avec les formulations coquillères dont les valeurs moyennes sont de l'ordre de  $28,9 \pm 0,19$  cm,  $29,4 \pm 1,51$  cm respectivement pour le traitement chimique (F) et témoins (T) (Photo 20, Figure 26). Ainsi, l'amendement des sols avec la formulation à base de poudre de coquilles d'huitres traitées entraîne une augmentation significative la taille des plantes comparé au traitement chimique (Figure 26).

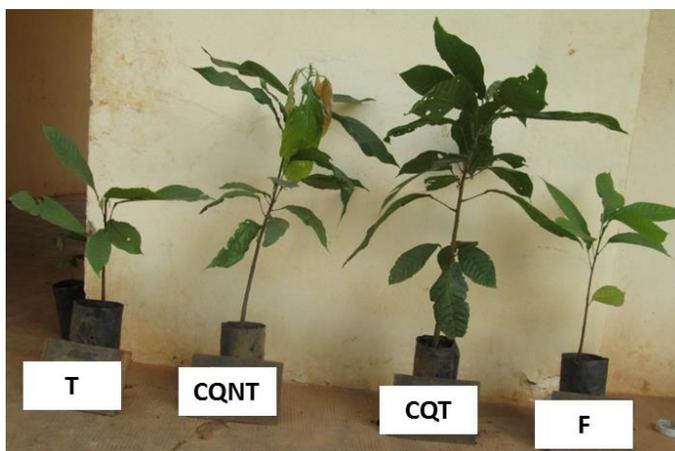


Photo 20: Photo des plantes traitées et non traitées aux formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée

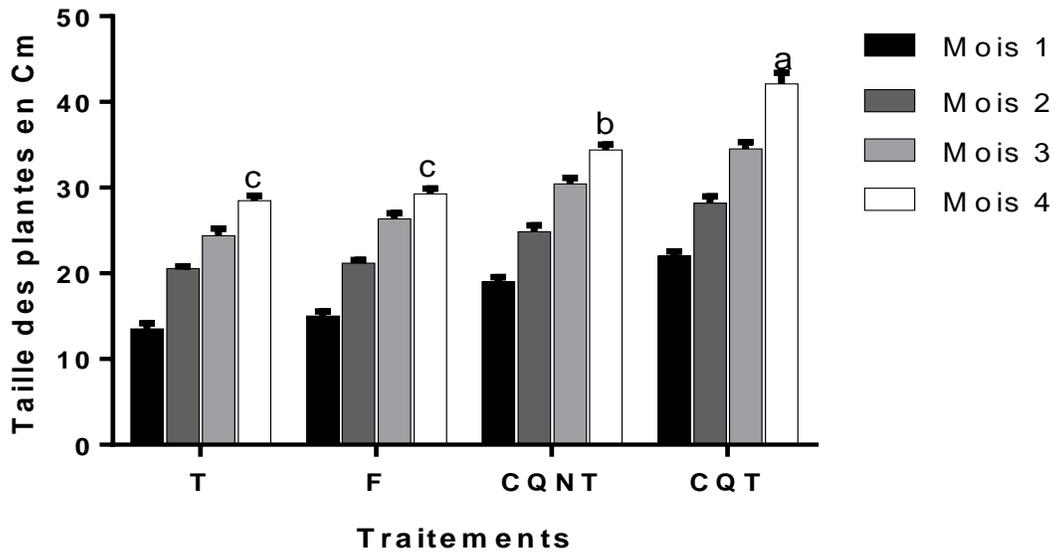


Figure 26: Taille des plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

Le nombre de feuilles par plant augmente dans tous les traitements au cours du temps (Figure 27). Au bout de quatre mois de croissance on note une différence significative du nombre de feuilles par plant dans les traitements avec un nombre élevé chez les plants issus des sols traités avec la formulation à base des poudres de coquilles d’huitres traitées (CQT). En effet, on enregistre un nombre de feuille moyen de l’ordre de  $17 \pm 1,14$ ;  $15,34 \pm 0,71$  feuilles/plante respectivement pour les traitements coquille traitée (CQT) et coquille non traitée (CQNT). Ces valeurs sont significativement élevées comparés à celle des plantules issus des sols non traités avec les formulations coquillères dont les valeurs moyennes sont de l’ordre de  $11,8 \pm 1,3$ ;  $9,4 \pm 0,841$  feuilles/plante respectivement pour le traitement chimique (F) et témoins (T).

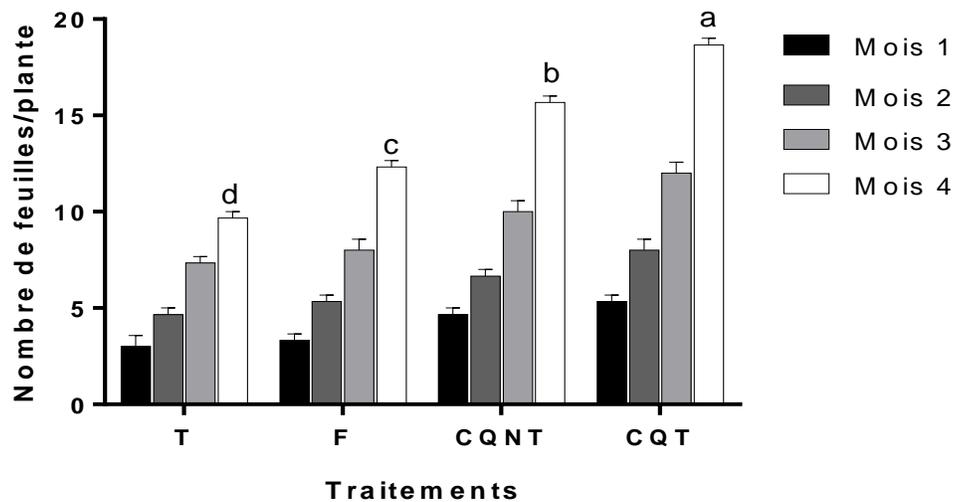


Figure 27: Variation du nombre de feuilles des plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

La surface foliaire des jeunes plants de cacao augmente significativement chez les plants issus des sols traités avec les formulations à base de poudre de coquilles d’huitres traitées et non traitées avec une surface plus prononcée dans le lot traité avec la formulation à base des poudres de coquilles traitées (CQT) (Figure 28). En effet, la surface foliaire moyenne varie de  $469,454 \pm 7,645 \text{ cm}^2$  et  $1378$  respectivement pour les traitements coquille traitée (CQT) et coquille non traitée (CQNT) comparativement à  $407,232 \pm 9,998 \text{ cm}^2$  et  $402,060 \pm 6,136 \text{ cm}^2$  respectivement pour les traitements témoins (T) et chimique (F).

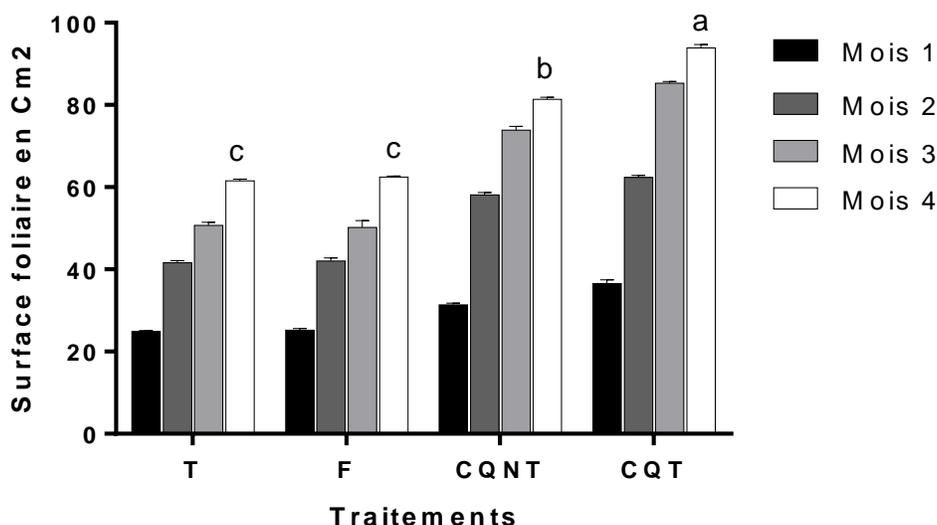


Figure 28: Variation de la surface foliaire des plantes issues des sols traités et non traités aux avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

De même, le traitement des sols avec les formulations à base des poudres de coquilles d’huitres traitées et non traitées entraîne l’augmentation significative du poids secs racinaire et de la partie aeriene. En effet, on enregistre les poids secs racinaires de  $2,89 \pm 0,03$  g pour la formulation poudre de coquilles d’huitres traitées (CQT) comparativement à  $1,33 \pm 0,02$  g et  $1,80 \pm 0,01$  g pour le traitement témoins (T) et chimique (F) respectivement (Figure 29). Par ailleurs ,le traitement des sols avec la formulation à base des poudres de coquilles d’huitres traitées (CQT) augmente significativement le poids secs de la partie aérienne comparativement aux traitements témoins (Figure 29). Ainsi, le poids sec moyen de la partie aérienne varie de  $9 \pm 0,04$  à  $7 \pm 0,06$  g/plante respectivement pour les traitements coquille traitée (CQT) et coquille non traitée (CQNT) comparativement à  $6 \pm 0,1$  et  $5 \pm 0,02$  g/plante respectivement pour les traitements chimique (F) et témoins (T).

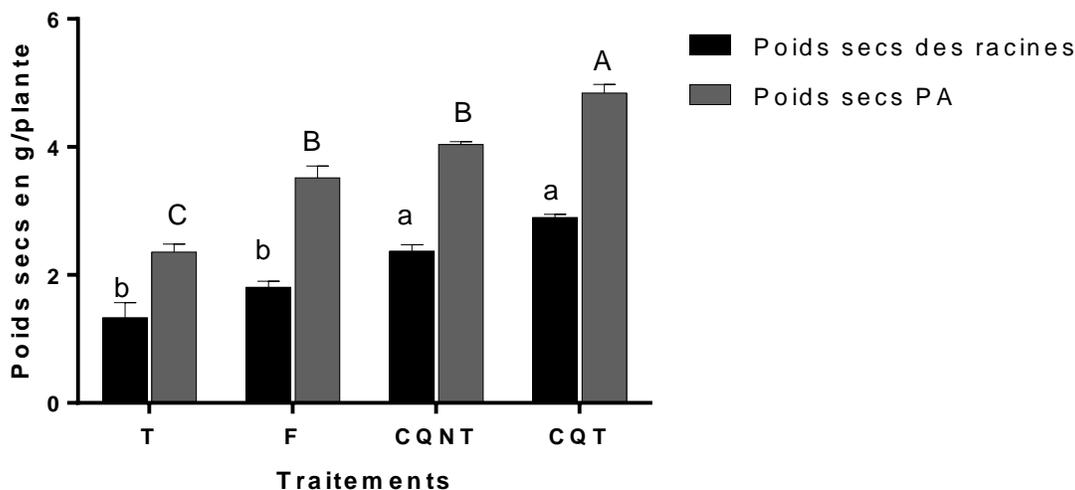


Figure 29: Variation du poids secs des racines et de la partie aérienne des plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III.2.2. Développement physiologique

#### III.2.2.1. Teneur en chlorophylle

Il en ressort de la Figure 30 que la teneur en chlorophylle (Chl a et Chl b) varie en fonction des traitements. La teneur en chlorophylle a (Chl a) et chlorophylle b (Chl b) sont plus élevées chez les plants issus des sols traités avec les formulations à base des poudres de coquilles d’huitres traitées et non traitées (Figure 30). Cependant on enregistre une teneur élevée en chlorophylle a et b chez les plants issus des sols traités avec la formulation à base des coquilles traitées (CQT) comparé aux autres traitements (Figure 30). En effet, les teneurs en Chl a et Chl b varient de  $25 \pm 1,2$  à  $15,83 \pm 0,81$  g/g MF;  $22,78 \pm 2,34$  à  $12,57 \pm 2,12$  g/g MF respectivement pour les traitements coquille traitée (CQT) et coquille non traitée (CQNT). Ces valeurs sont significativement élevées comparés à celle des plantules issus des sols non traités avec les formulations coquillères dont les valeurs moyennes sont de l’ordre de  $14,69 \pm 3,1$  à  $8,44 \pm 3,56$  g/g MF et de  $7,25 \pm 0,56$  à  $4,83 \pm 0,72$  g/g MF) respectivement pour les traitements chimiques (F) et témoins (T) .

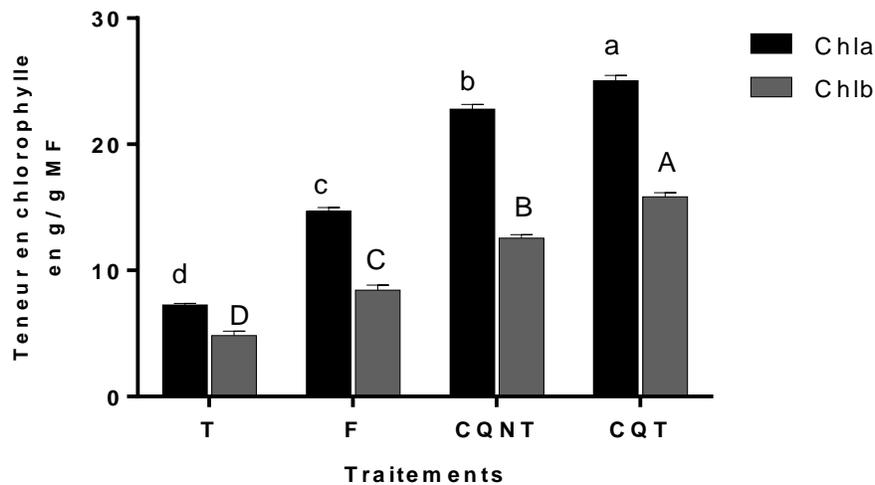


Figure 30: Teneur en chlorophylle dans les feuilles des plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III 2.2.2 Résistance stomatique

La résistance stomatique correspond aux obstacles liés à l'entrée du  $\text{CO}_2$  au niveau des pores stomatiques des feuilles. En absence de tout traitement (témoin), la résistance stomatique est de  $23,56 \pm 1,02$  d/m. Le traitement des sols entraîne une augmentation significative de la résistance stomatique avec une teneur accru chez les plants issus des sols traités avec les formulations coquillères (Figure 31). Elle augmente significativement chez les plants issus des sols traités avec la formulation à base des poudres de d'huitres coquilles traitées comparativement aux autres traitements. Ainsi la résistance stomatique varie de  $39,52 \pm 0,35$  d/m;  $36,65 \pm 0,61$  d/m ;  $27,12 \pm 1,58$  d/m respectivement pour les traitements coquille traitée (CQT), coquille non traitée (CQNT) et témoins (T).

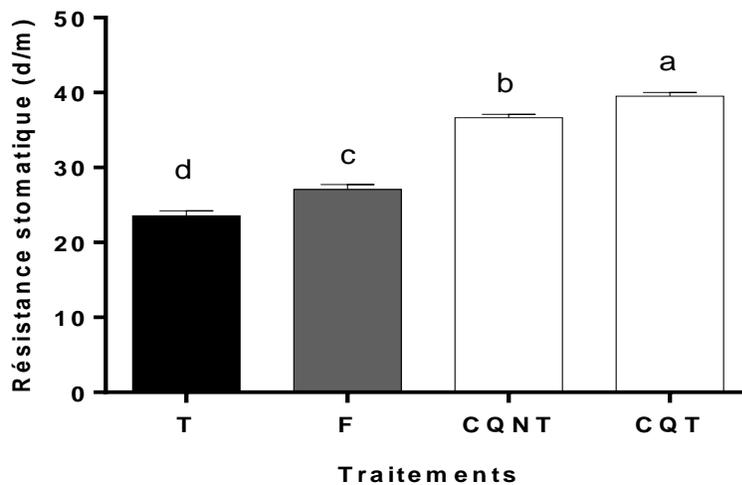


Figure 31: Résistance stomatique chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III.2.3. Sévérité et paramètres biochimiques

#### III.2.3.1. Sévérité

La sévérité de la maladie six jours après inoculations des feuilles est significativement réduit dans les traitements aux formulations à base des coquilles d’huitres traitées et non traitées (CQT et CQNT) comparativement au traitement sans coquilles d’huitres (traitements témoins (T) et chimique (F)) (Figure 32). Ainsi, chez les plants issus de différents types d’amendement ; l’indice de sévérité de la maladie varie de l’ordre de 1 (résistant) et 1,33 (résistant) respectivement pour les plants issus des sols traités avec la formulation à base des poudres de coquilles d’huitres traitées et non traitées. Par ailleurs chez les plantes issues des traitements chimique et témoins; l’indice de sévérité de la maladie est de 2,33 (moyennement résistant) et 4,66 (très susceptible) respectivement. (Figure 32). De même le traitement des sols avec différentes formulations réduit significativement l’indice de sévérité de la maladie de l’ordre de 77,25% ; 71,45%; 50% respectivement pour les traitements coquille traitée (CQT), coquille non traitée (CQNT) et chimique (F).

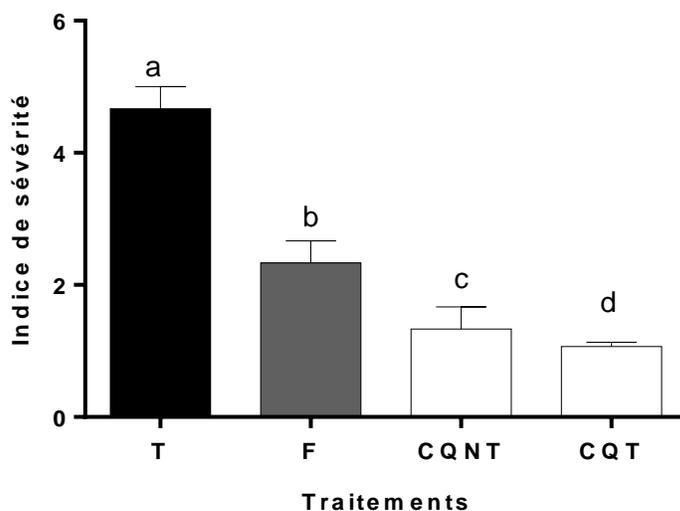


Figure 32: Variation de l'indice de sévérité de la pourriture brune en fonction des traitements.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III.2.3.2. Paramètres biochimiques

#### III.2.3.2.1. Composés phénolique et protéines

Les teneurs en protéines et composés phénoliques augmentent significativement avec les traitements avant et après infection (Figure 33 et 34). L'infection par *P. megakarya* entraîne une accumulation plus marquée des teneurs en protéines totales (32,19%) et composés phénoliques totaux (27,16 %) dans les feuilles des plants issus des sols traités avec la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées par rapport aux autres traitements (CQNT, F et T) (Figure 33 et 34).

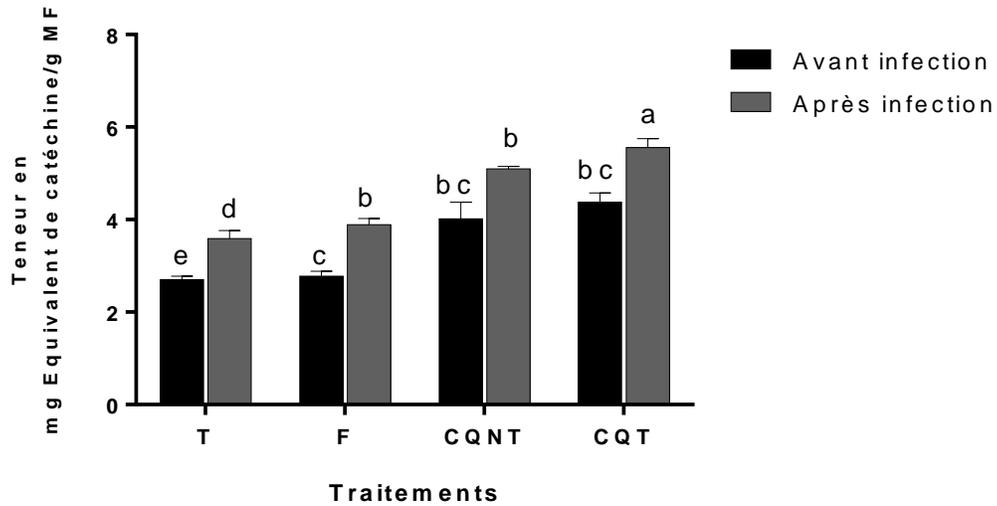


Figure 33: Variation de la teneur en composés phénoliques avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

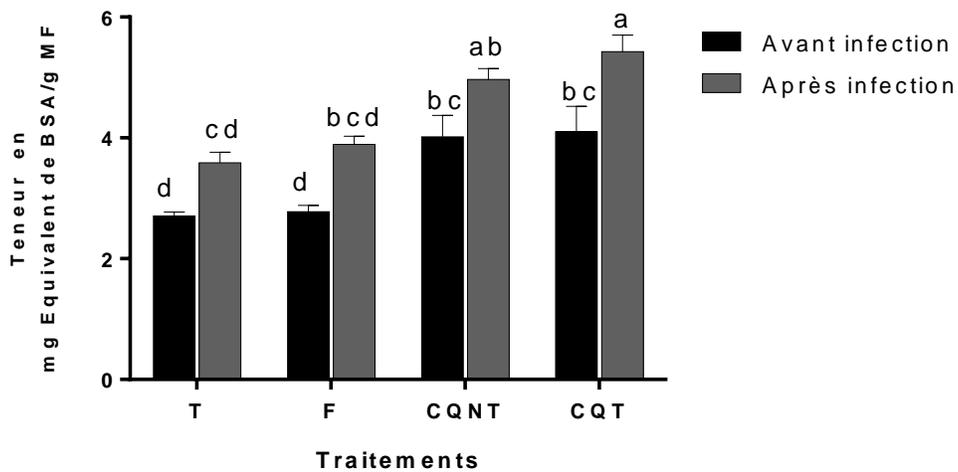


Figure 34: Variation de la teneur en protéines avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III.2.3.2.2 Enzymes oxydatives et hydrolytiques

#### ❖ Enzymes hydrolytiques

Les activités enzymatiques (chitinases et  $\beta$  1,3 glucanases ) augmentent significativement en fonction des traitements et de l'état sanitaire de la plante (Figure 35 et 36). Le stress biotique se manifeste par une augmentation des activités chitinasiques et glucanasiques dans les feuilles des plants issus de tous les traitements (Figure 35 et 36). L'infection par *P.megakarya* entraîne une augmentation significative de l'activité chitinase (71,55 %) et glucanase (51,54 %) dans les feuilles des plants issus des sols traités avec la formulation poudre de coquilles d'huitres traitées comparativement aux autres traitements (CQNT, F,T ) (Figure 35 et 36). De plus l'activité enzymatique demeure élevée dans les feuilles de tous les plants issus des sols traités avec les formulations coquillères comparativement aux traitements chimiques.

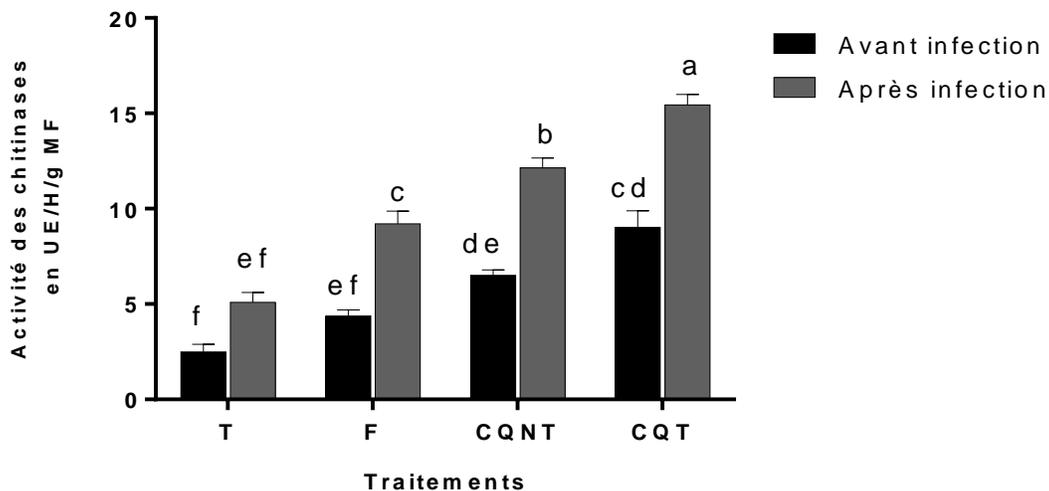


Figure 35: Variation de l'activité des chitinases avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

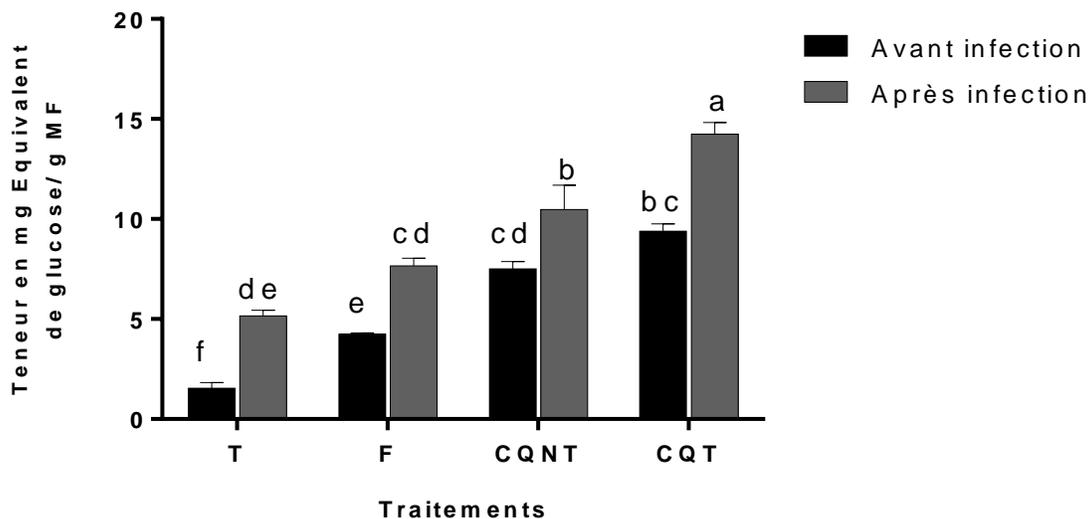


Figure 36: Variation de l'activité des  $\beta$  1,3 glucanases avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnés des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

#### ❖ Enzymes oxydatives

Les activités enzymatiques (peroxydase et polyphénoloxydase) montrent une fluctuation d'un traitement à l'autre (Figure 37 et 38). Ces activités sont de loin importante dans les feuilles des plants issus des sols traités la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées après infection. Dans l'ensemble l'infection par *P.megakarya* se caractérise par une augmentation significative de l'activité peroxydase (24,28 %) et polyphénoloxydase (76,71 %) dans les feuilles des plants issus des sols traités avec la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées comparativement aux autres traitements (CQNT, F, T). Par ailleurs l'activité polyphénoloxydase n'est pas significativement différent dans quasiment tous les plant issus de chaque traitement avant infection à l'exception des plants issus du traitement témoins (Figure 37). Par contre, l'activité peroxydase est significativement différente dans tous les plants de chaque traitements avant infection (Figure 38)

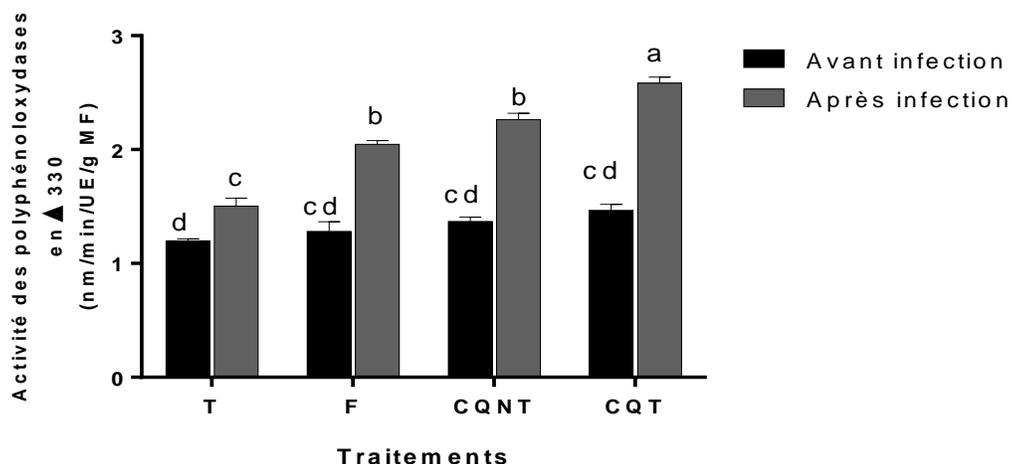


Figure 37: Variation de l'activité des polyphénoloxydases avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

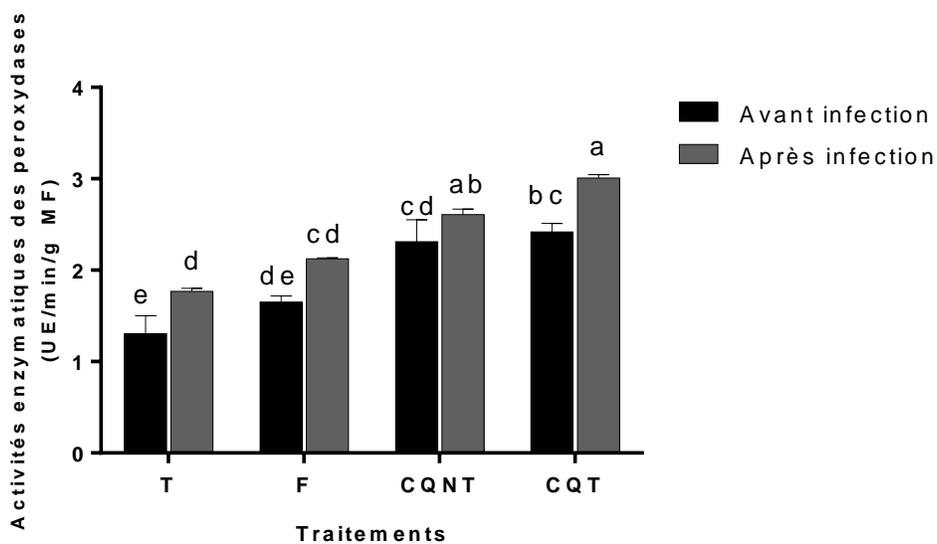


Figure 38: Variation de l'activité des peroxydases avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

#### ❖ **Activité de la phenylalaine ammoniolyase (PAL)**

Les plants issus des sols traités avec les formulations à base de poudre de coquilles d’huitres traitées (CQT) et non traitées (CQNT) présentent de fortes activités phenylamonyllyase (PAL) quelques soit leur état sanitaire (Figure 39). L’infection par *P. megakarya* s’accompagne d’une augmentation de l’activité PAL dans les feuilles des plants issus de tous les traitements avec une activité plus prononcée dans les feuilles des plants issus des sols traités avec la formulation à base de poudre de coquilles d’huitres traitées. Ainsi ,on enregistre un taux d’augmentation de l’activité PAL de l’ordre de 39,33 % après infection chez les plants issus des sols traités avec la formulation à base de poudre de coquilles d’huitres traitées. De plus l’activité enzymatique PAL demeure élevée chez tous les plants issus des sols traités avec les formulations coquillères comparé au traitement chimique.

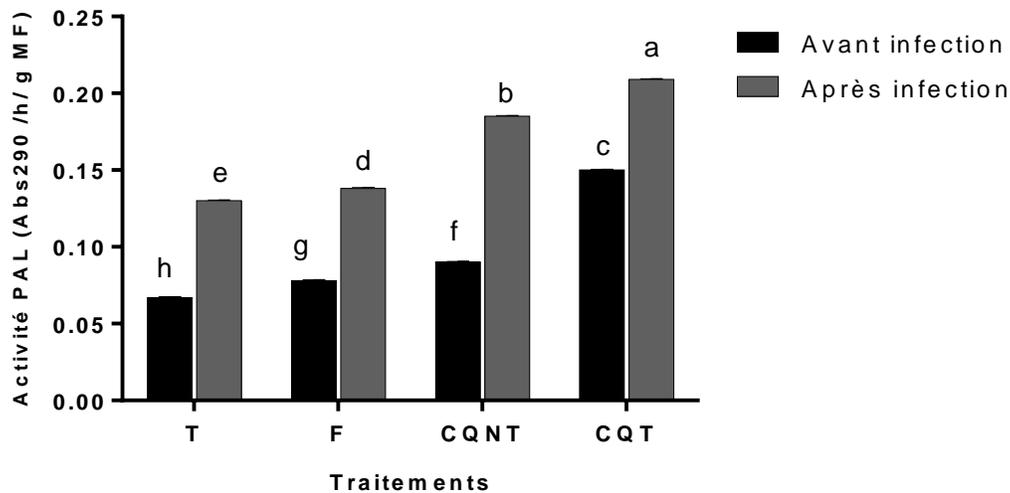


Figure 39: Variation de l’activité des phenylamonyllyases avant et après infection chez les plantes issues des sols traités et non traités avec les formulations coquillères.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée. Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

#### **III.2.4 .Analyses des corrélations entre les différents paramètres biochimiques mesurés**

L'analyse des matrices de corrélation montre des différentes corrélations positives ou négatives entre les paramètres biochimiques évalués (Tableau IX, X, XI et XII).

Au niveau du traitement témoin, on note les corrélations positives et significatives entre l'activité des enzymes hydrolytiques et oxydatives avant et après infection. (Tableau IX). Ainsi on enregistre une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase avant infection (PPO av) et l'activité polyphénoloxydase après infection (PPO ap) (0,830 \*\*), l'activité phenylamonyllyase avant infection (PAL av) (0,635\*), l'activité phenylamonyllyase après infection (PAL ap ) (0,998\*). De même on note une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase après infection (PPO ap) et l'activité peroxydase après infection (POX ap) (0,699\*), l'activité glucanase avant infection (Glu av) (0,809\*). On enregistre une série de corrélations positive et significative entre l'activité peroxydase avant infection (POX av) et l'activité phenylamonyllyase avant infection (PAL l av) (0,730\*) ; l'activité peroxydase après infection (POX ap) et l'activité phenylamonyllyase avant (0,998\*) et après infection (0,880\*); l'activité chitinase avant infection (Chit av) et phenylamonyllyase avant infection (0,999\*). Dans le même sillage, on enregistre d' une part une corrélation positive et significative entre l'activité glucanase avant infection et l'activité phenylamonyllyase avant infection (0,998\*), l'activité phenylamonyllyase après infection (0,660\*), la teneur en protéine avant infection (0,910\*) et d'autre part une corrélation positive entre la teneur en protéines avant infection (Pro av) et l'activité phenylamonyllyase avant infection (0,998\*), l'activité phenylamonyllyase après infection (0,840).

<b>Témoins</b>														
	PPO av	PPO ap	Pox av	Pox ap	Chit av	Chit ap	Glu av	Glu ap	CP av	CP ap	Pro av	Pro ap	Pal av	Pal ap
<b>PPO av</b>	1													
<b>PPO ap</b>	0,997	1												
<b>Pox av</b>	<b>0,830*</b>	0,997	1											
	*													
<b>Pox ap</b>	0,997	<b>0,699</b>	0,997	1										
		**												
<b>Chit av</b>	<b>0,897*</b>	0,995	<b>0,811*</b>	0,995	1									
<b>Chit ap</b>	-0,984	-0,995	-0,984	-0,995	-0,980	1								
<b>Glu av</b>	0,997	<b>0,809</b>	0,997	<b>0,744</b>	0,995	-0,995	1							
		**		**										
<b>Glu ap</b>	-	-0,977	-0,957	-0,977	-0,950	0,993	-0,977	1						
	0,957													

<b>CP av</b>	0,907	0,869	0,907	0,869	0,916	-0,818	0,869	-0,745	1					
<b>CP ap</b>	0,963	0,982	0,963	0,982	0,957	-0,996	0,982	-0,947	0,760	1				
<b>Pro av</b>	0,997	<b>0,690</b> **	0,997	<b>0,901</b> **	0,995	-0,995	<b>0,910</b> **	-0,977	0,869	0,98	1			
<b>Pro ap</b>	-0,569	-0,500	-0,569	-0,500	-0,588	0,415	-0,500	0,305	-0,863	-	-0,500	1		
										0,32				
										7				
<b>Pal av</b>	<b>0,635*</b>	<b>0,998</b> *	<b>0,730*</b>	<b>0,998*</b>	<b>0,999</b> *	-0,987	<b>0,998</b> *	-0,962	0,899	0,96	<b>0,998</b> *	-	1	
										8		0,55		
												4		
<b>Pal ap</b>	0,994	<b>0,790</b> *	0,994	<b>0,880</b> *	0,991	-	<b>0,660*</b>	-0,983	0,854	0,98	<b>0,840</b> *	-	0,99	1
						<b>0,998</b> *				7		0,47	6	
												3		

Tableau IX: Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement témoins.

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05. \*\*. La corrélation est significative au niveau 0.01

Lorsque les sols sont traités aux pesticides chimiques on observe une grande variation de corrélation positive et significative entre les paramètres biochimiques étudiés (Tableau X). Ainsi, on note une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase avant infection (PPO av) et l'activité phenylamonyllayse après infection (0,950\*\*). De même, on enregistre une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase après infection (PPO ap) et l'activité glucanase avant infection (Glu av) (0,777\*\*), la teneur en composé phénolique après infection (CP ap) (0,690\*). Ainsi, on enregistre une série de corrélations positives et significative entre l'activité peroxydase après infection et l'activité chitinase avant infection (Chit av) (0,889\*), l'activité chitinase après infection (Chit ap) (0,999\*), la teneur en composé phénolique avant infection (CP av) (0,782\*), la teneur en protéine après infection (Pro ap) (0,767\*). De plus on note une corrélation positive et significative entre l'activité peroxydase avant infection (POX av) et l'activité chitinase après infection. Dans le même élan, on note d'une part une corrélation positive entre l'activité chitinase avant infection et l'activité chitinase après infection (0,999\*), la teneur en composé phénolique avant infection (0,900\*) et d'autre part entre l'activité chitinase avant infection et la teneur en protéine après infection (0,844\*), la teneur en composé phénolique avant infection (0,999\*), la teneur en protéine après infection (0,999\*).

---

<b>Pestici des</b>	PPO av	PPO ap	Pox av	Pox ap	Chit av	Chit ap	Glu av	Glu ap	CP av	CP ap	Pro av	Pro ap	Pal av	Pal ap
<b>PPO av</b>	1													
<b>PPO ap</b>	0,811	1												
<b>Pox av</b>	0,944	0,959	1											
<b>Pox ap</b>	0,906	0,982	0,995	1										
<b>Chit av</b>	0,901	0,984	0,994	<b>0,889</b>	1									
				**										
<b>Chit ap</b>	0,920	0,975	<b>0,998</b>	<b>0,999</b>	<b>0,999</b>	1								
			*	*	*									
<b>Glu av</b>	0,810	<b>0,777</b>	0,959	0,982	0,984	0,975	1							
		**												
<b>Glu ap</b>	0,625	0,964	0,848	0,896	0,901	0,881	0,964	1						

---

<b>CP av</b>	0,901	0,984	0,994	<b>0,782</b> **	<b>0,900</b> **	<b>0,999</b> *	0,984	0,901	1					
<b>CP ap</b>	0,792	<b>0,690</b> *	0,949	0,976	0,978	0,968	<b>0,879</b> *	0,972	0,978	1				
<b>Pro av</b>	0,990	0,884	0,980	0,956	0,953	0,965	0,884	0,727	0,953	0,86	1			
										9				
<b>Pro ap</b>	0,897	0,986	0,993	<b>0,767</b> *	<b>0,844</b> **	<b>0,999</b> *	0,986	0,905	<b>0,809</b> **	0,98	0,95	1		
										0	0			
<b>Pal av</b>	0,732	0,992	0,916	0,951	0,955	0,941	0,992	0,989	0,955	0,99	0,82	0,95	1	
										6	0	8		
<b>Pal ap</b>	<b>0,950</b> **	0,804	0,940	0,902	0,897	0,916	0,804	0,616	0,897	0,78	0,98	0,89	0,72	1
										5	9	3	5	

Tableau X: Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement au fongicide chimique

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05. \*\*. La corrélation est significative au niveau 0.01.

Lorsque les sols sont traités aux poudres de coquilles, le nombre de corrélation entre les paramètres biochimiques étudiés décroît (Tableau XI et XII). Ainsi au niveau des plantes issues des sols traités aux poudres de coquilles traitées, on note une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase avant infection (PPO av) et l'activité polyphénoloxydase après infection (PPO ap) (0,867\*), l'activité chitinase après infection (Chit ap) (0,999\*), l'activité phenylamonyllyase avant infection (PAL av) (0,999\*) (Tableau XI). De même, on enregistre une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase après infection et l'activité chitinase après infection (0,751), l'activité phenylamonyllyase avant infection (0,638\*). Ainsi on note une série de corrélations positives entre l'activité peroxydase avant infection (POX av) et la teneur en composé phénolique après infection (0,999\*); une corrélation positive et significative entre l'activité peroxydase après infection (POX ap) et la teneur en protéines après infection (Pro ap) (0,999\*). De plus on enregistre une corrélation positive et significative entre l'activité chitinase avant infection (Chit av) et la teneur en protéines infection (Pro av) (0,999\*);) et l'activité phenylamonyllyase après infection (PAL ap) (0,881), une corrélation significative et positive entre l'activité chitinase après infection et l'activité phenylamonyllyase avant infection (0,836\*\*). Dans le même élan, on note d'une part une corrélation positive et significative entre l'activité glucanase avant infection (Glu av) et la teneur en protéine avant infection (Pro av) (0,998\*) et d'autre part entre la teneur en protéine avant infection et l'activité phenylamonyllyase après infection (0,998\*).

---

**Coquilles  
traitées**

---

	PPO av	PPO ap	Pox av	Pox ap	Chit av	Chit ap	Glu av	Glu ap	CP av	CP ap	Pro av	Pro ap	Pal av	Pal ap
<b>PPO av</b>	1													
<b>PPO ap</b>	<b>0,867*</b>	1												
<b>Pox av</b>	0,935	0,923	1											
<b>Pox ap</b>	0,900	0,913	0,686	1										
<b>Chit av</b>	0,977	0,970	0,989	0,787	1									
<b>Chit ap</b>	<b>0,999*</b>	<b>0,751</b> **	0,919	0,918	0,967	1								
<b>Glu av</b>	0,993	0,989	0,969	0,843	0,995	0,987	1							
<b>Glu ap</b>	-0,709	-0,687	-0,913	-0,330	-0,842	-0,678	-0,785	1						

<b>CP av</b>	0,886	0,871	0,993	0,594	0,964	0,865	0,933	-0,955	1					
<b>CP ap</b>	0,922	0,909	<b>0,999</b> *	0,660	0,983	0,904	0,960	-0,927	0,99	1				
									6					
<b>Pro av</b>	0,986	0,980	0,982	0,813	<b>0,999</b> *	0,977	<b>0,998</b> *	-0,818	0,95	0,97	1			
									1	4				
<b>Pro ap</b>	0,882	0,896	0,657	<b>0,999</b> *	0,762	0,901	0,822	-0,292	0,56	0,63	0,789	1		
									1	0				
<b>Pal av</b>	<b>0,999</b> *	<b>0,638</b> **	0,919	0,918	0,967	<b>0,836</b> **	0,987	-0,678	0,86	0,90	0,977	0,90	1	
									5	4		1		
<b>Pal ap</b>	0,972	0,964	0,992	0,772	<b>0,881</b> *	0,961	0,993	-0,855	0,97	0,98	<b>0,998</b> *	0,74	0,961	1
									0	7	*	6		

Tableau XI: Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement aux coquilles traitées.

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05 . \*\*. La corrélation est significative au niveau 0.01

Par ailleurs, le traitement des sols aux poudres de coquilles non traitées, on enregistre très peu de corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés (Tableau XII). Ainsi, on note une corrélation positive et significative entre l'activité polyphénoloxydase avant infection (PPO av) et l'activité polyphénoloxydase après infection (PPO ap) (0,997\*). De même, on enregistre une corrélation positive et significative entre l'activité peroxydase avant infection (POX av) et l'activité chitinase après infection (Chit ap) (0,999\*); puis entre l'activité peroxydase après infection et l'activité phenylamonyllyase après infection (0,896\*). Parallèlement, on note une série de corrélation positive et significative entre l'activité chitinase avant infection (Chit av) et la teneur en composé phénolique après infection (CP ap) (0,999\*), la teneur en protéines après infection (Pro ap) (0,999\*), l'activité phenylamonyllyase avant infection (PAL av) (0,658\*). Dans le même élan, on note d'une part une corrélation entre l'activité glucanase après infection (Glu ap) et la teneur en composé phénolique après infection (0,998\*) et d'autre part entre la teneur en composé phénolique avant infection (CP av) et la teneur en protéine après infection (Pro ap) (Tableau X). De plus, on enregistre également une corrélation positive et significative entre la teneur en composé phénolique avant infection et l'activité phenylamonyllyase (0,720\*), puis entre la teneur en protéine après infection et l'activité phenylamonyllyase (0,998\*).



<b>Glu av</b>	<b>0,820*</b>	0,994	0,949	0,978	0,995	0,935	0,90	1						
							2							
<b>CP av</b>	0,973	0,952	0,993	0,916	0,995	0,987	0,79	0,980	1					
							7							
<b>CP ap</b>	0,996	0,986	0,966	0,964	<b>0,999*</b>	0,954	0,87	<b>0,998*</b>	0,990	1				
					*		5	*						
<b>Pro av</b>	0,536	0,599	0,212	0,677	0,423	0,170	0,83	0,510	0,326	0,458	1			
							1							
<b>Pro ap</b>	0,984	0,968	0,985	0,937	<b>0,999*</b>	0,977	0,82	0,989	<b>0,998*</b>	0,996	0,37	1		
					*		9				7			
<b>Pal av</b>	0,993	0,982	0,972	0,957	<b>0,658**</b>	0,961	0,86	0,997	0,993	<b>0,720*</b>	0,43	<b>0,998*</b>	1	
					**		3			*	6	*		
<b>Pal ap</b>	0,982	0,994	0,857	<b>0,896**</b>	0,950	0,834	0,97	0,976	0,912	0,961	0,68	0,993	0,95	1
				**			5				5		4	

Tableau XII: Analyse des corrélations entre les différents paramètres biochimiques étudiés avant et après infections des feuilles dans le traitement aux coquilles non traitées.

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05. \*\*. La corrélation est significative au niveau 0.01

### **III.2.5. Analyse en composante principale**

L'analyse en composante principale montre les liens entre les différents paramètres physiologiques, moléculaires et enzymatiques étudiés. Ainsi l'axe 1 (CP1) met en exergue 94,72 % des variations totales des paramètres étudié au sein des différents traitements. Par contre l'axe 2 (CP2) exprime 3,65 % (Figure 40). Les paramètres physiologiques, moléculaires et enzymatiques étudiés sont plus actives pour les formulations coquillères (Figure 40). Ainsi les teneurs en composés phénoliques (avant et après infection), chlorophylle a et les activités polyphenoloxydase après infection, chitinase après infection, glucanase avant infection sont actives pour le traitement coquille d'huitre non traitée tandis que les teneurs en chlorophylle b, en protéines (avant et après infection), résistance stomatique ainsi que les activités peroxydases (avant et après infection), polyphenoloxydase avant infection, chitinase avant infection sont plus prononcées pour le traitement au coquille d'huitre traitée (Figure 40). En outre, tous les paramètres sont orientés du côté positif de l'axe caractérisé par les traitements aux formulations coquillères (Figure 40).

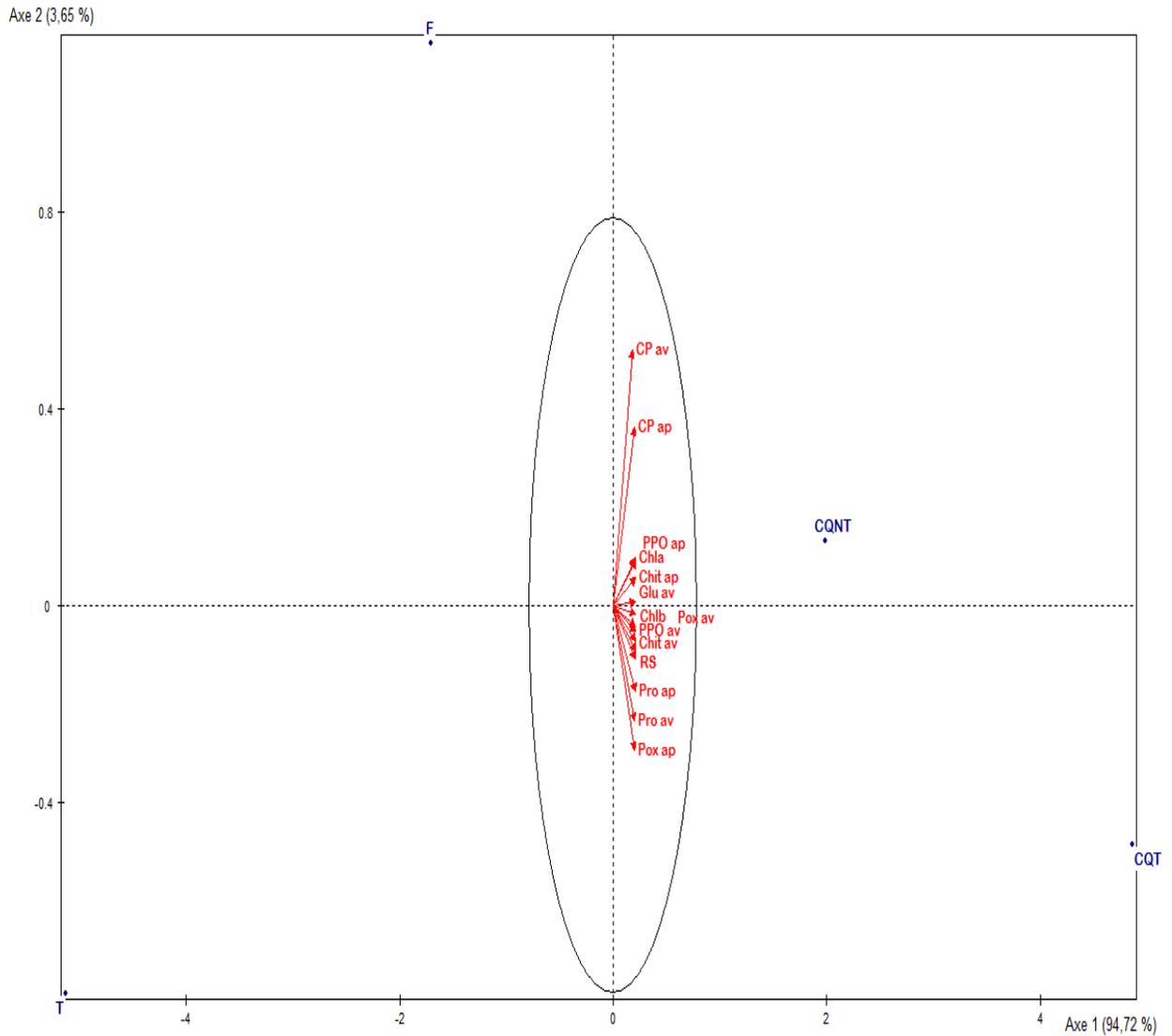


Figure 40: Analyse en Composantes Principales (ACP) des données à la protection des plants de cacao par les amendements aux formulations coquillères et chimiques.

T: terre non stérile; F: traitement chimique; CQNT: coquille non traitée; CQT: coquille traitée.

### III.2.6. Caractéristiques du biofongicide formulé

L'addition des différents ingrédients donne une formulation solide de nature poudreuse ayant une coloration beige-pourpre. Il se dénomme " bio-oyster shell biofongicide " et se conditionne sous plusieurs formats (Photo 21 ). L'observation de la formulation révèle l'absence des grumeaux après dix mois d'exposition à température ambiante (au contact de l'air) et la présence des grumeaux dans le fongicide chimique (Photo 22 ). Le pouvoir hygroscopique est la capacité d'une substance à absorber l'humidité de l'air qui correspond au degré de stabilité du produit. A cet effet, le pouvoir hygroscopique moyen de notre formulation est de 81,13 % contre 32,58 % chez le fongicide chimique après dix mois d'exposition de la formulation à température ambiante (Figure 41).



Photo 21: Formulation poudreuse du biofongicide "bio-oyster shell biofungicide" conditionné (A) et non conditionné (B).



Photo 22 : Photos montrant la présence ou l'absence des grumeaux dans différents formulations après dix mois d'exposition à température ambiante.

F: fongicide chimique, BOS I et BOS II: biofongicide I et II

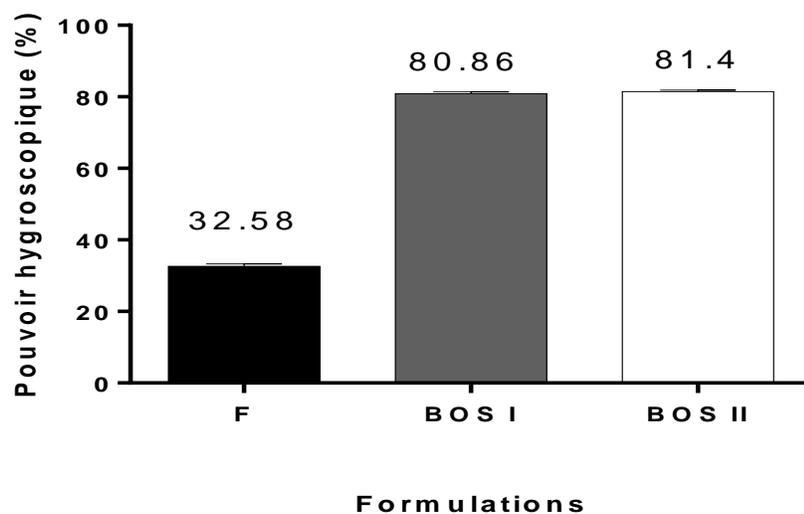


Figure 41: Pouvoir hygroscopique du biofongicide et du fongicide chimique.  
F: fongicide chimique, BOS I et BOS II: biofongicide.

### III.2.7. Discussion Partielle II

Cette partie du travail a permis d'évaluer les effets des formulations à base des coquilles d'huitres sur la production des semences de cacaoyers en condition paysanne. Les résultats obtenus montrent que le traitement des sols avec la formulation à base des coquilles traitées à la concentration 1 % P/P stimule significativement les paramètres agro-morphologiques de croissance et les mécanismes de défenses des plants de cacaoyer comparativement au traitement chimique.

Lorsque les sols sont traités avec la formulation à base des coquilles traitées, on note une augmentation significative de la surface foliaire, hauteur de la tige, du nombre de feuille, du poids secs des racines et du caulaire. Cette hausse des paramètres agro morphologiques pourrait être due à la composition de la formulation en oxyde de calcium et en purin de *T. diversifolia* qui est un extrait fermenté riche en macroéléments particulièrement en azote et potassium (Kerebba *et al.*, 2019). L'effet sur la croissance peut s'expliquer par la richesse de la formulation en quelques éléments importants pour la croissance de la plante à l'instar du calcium, le potassium, des composés azotés et soufrés (Arfaoui *et al.*, 2015, Ewane *et al.*, 2020). Par ailleurs la présence de ces nutriments a entraîné une augmentation de la surface foliaire qui pourrait permettre une bonne activité photosynthétique. Ainsi, on note une augmentation de la teneur en chlorophylle a et b dans les feuilles issues des plants traités avec la formulation à base des coquilles traitées. Cette augmentation se justifierait par l'effet stimulateur du calcium présent dans les coquilles sur l'activité enzymatique de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase. En effet, la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase est l'enzyme clé de la photosynthèse impliqué dans la fixation du dioxyde de carbone dans la biomasse végétale. De plus, l'augmentation de la teneur en chlorophylle pourrait être également due à la capacité des poudres des coquilles d'huitres traitées à améliorer l'absorption des nutriments dans le sol par la plante entraînant ainsi l'augmentation de la concentration de la chlorophylle chez la plante (Saad *et al.*, 2011; Piotr *et al.*, 2017).

L'évaluation de la résistance stomatique correspond à la fermeture des stomates qui tend à limiter la pénétration d'agents pathogènes, conférant ainsi une résistance aux plantes (Iriti *et al.*, 2009; Mbouobda, 2013). L'ouverture des stomates donne l'accès aux tissus internes de la feuille à de nombreux agents pathogènes des plantes; par conséquent, le rétrécissement des ouvertures stomatiques peut être avantageux pour la défense des plantes (Olbert *et al.*, 2018). Nos résultats

ont montré que les formulations à base des coquilles d'huîtres non traitées et traitées induisaient plus la fermeture des stomates comparativement au traitement chimique en augmentant le niveau de résistance stomatique. Ces résultats vont dans le même ordre d'idée que ceux de Iriti *et al* (2009) qui a montré que le traitement des sols avec la chitine et les composés dérivés de la chitine induisait la fermeture des stomates chez les plantules d'haricot en activant la voie de signalisation médiée par l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) et en altérant mécaniquement les échanges gazeux. En effet, la chitine a la capacité de stimuler la voie de signalisation de l'acide abscissique au niveau du site racinaire de la plante conduisant ainsi à la synthèse de l'acide abscissique, l'hormone végétale qui régule le comportement des stomates et l'état de l'eau des plantes.

En outre, le traitement du sol avec la formulation à base de coquilles traitées entraîne une réduction significative de l'indice de sévérité de l'ordre de 77,25 % qualifiant le traitement de très résistant. Cet effet protecteur s'expliquerait par la capacité des différents constituants de la formulation à l'instar du calcium, de la chitine (présent dans les coquilles d'huîtres), des sesquiterpène lactones et des flavonoïdes (présent dans le purin de *Tithonia diversifolia*) à stimuler les systèmes de défenses des plants de cacaoyers. Ce résultat corrobore avec les travaux de Shen *et al* (2017) , Arfoui *et al* (2018), Kerebba *et al* (2019) , Ewane *et al* (2020) qui ont montré l'implication des sources de chitines, de calcium et les composés terpéniques issues de *Tithonia diversifolia* dans la stimulation des mécanismes de défenses lors des interactions plante/pathogènes.

L'analyse des résultats relatifs à l'effet stimulateur de défense des différentes formulations a montré que la formulation à base des coquilles d'huîtres traitées induit significativement la protection en favorisant la production des composés phénoliques totaux avant et après infection dans les feuilles des plants de cacao. Cette accumulation des composés phénoliques dans l'interaction *T.cacao/P.megakarya* a été associée à la maladie par Effa *et al* (2016); Djocgoue *et al* (2011); Boudjeko *et al* (2007). Cette accumulation s'expliquerait par des différences physiologiques entre les plantes associées au traitement et entraînerait la synthèse de nouvelles formes phénoliques.

L'activité PAL est plus importante dans les feuilles des plantes issues des traitements aux formulations coquillères. L'augmentation de l'activité PAL dans ces traitements témoigne de l'activation de cette enzyme carrefour qui déclencherait les différents mécanismes de défenses

chez la plante. Ce phénomène de mécanisme induit mis en exergue dans notre travail corrobore avec les travaux obtenus par Arfaoui *et al.* (2018) qui avaient montré que le pré traitement du soja avec les formulations à base du calcium, stimule la production des flavonoïdes et augmente l'activité des enzymes permettant leurs synthèses à partir de la phénylalanine à l'instar de la PAL. Ce mécanisme d'induction s'expliquerait par l'absorption des ions calcium à travers les cuticules et stomates qui favoriseraient des flux d'ions entre le cytosol et les organelles, perçus en gros par les cellules comme messagers de défense. Ceci entraîne la synthèse accrue des composés phénoliques de défense structurale et chimique via la voie des phénylpropanoïdes dont l'enzyme clef est la PAL. Le produit de cette enzyme est l'acide cinnamique qui est précurseur de l'acide salicylique et ce dernier est médiateur de la défense systémique induite.

Dans les études antérieures, les polyphénoloxydases, les peroxydases, les chitinases et les  $\beta$ -1,3 glucanases des plantes ont été rapportés comme s'accumulant dans la plante suite à une induction par les agents biologiques (Bananomi *et al.*, 2018). Les résultats obtenus dans nos travaux montrent que les activités polyphénoloxydasiques, peroxydases, chitinases et  $\beta$ -1,3 glucanases sont significativement élevées dans les feuilles issues des traitements aux formulations coquillères avant et après infection. L'activité de ces enzymes est en étroite relation avec la résistance des plantes face aux interactions plantes-pathogènes.

Nos travaux montrent clairement une corrélation positive et significative ( $P < 0,05$  et  $P < 0,01$ ) entre les paramètres moléculaires et tous les métabolites étudiés. Ces corrélations reflètent l'importance des enzymes dans l'expression de la résistance. Ces résultats concordent avec ceux de Ngadze *et al.* (2012), Nyadanu *et al.* (2013) et Effa *et al.* (2016). Ces observations ont démontré l'accumulation en quantité élevée de substances biochimiques et l'augmentation du degré de protection des plantes lors des interactions plante/pathogène.

Le biofongicide "bio-oyster shell biofungicide" obtenu est de nature solide sous forme poudreuse ayant un pouvoir hygroscopique moyen de l'ordre de 81%. L'état poudreux et le taux d'hygroscopie élevé du biofongicide auraient été d'un grand atout pour la réduction de la charge de *P. megakarya* dans le sol. En effet la présence des poudres de coquilles au niveau du sol diminue l'humidité de l'environnement édaphite par absorption de l'humidité de l'air ce qui engendre la réduction de la disponibilité de l'eau et la création des conditions défavorable à la croissance de *P. megakarya* au niveau du sol.

### III.2.8. Conclusion partielle II

La présente partie avait pour but d'évaluer l'effet des différentes formulations à base des coquilles d'huitres sur la production des semences en condition paysanne. Il en résulte que la formulation à base des poudres de coquille traitées à la concentration 1 % P/P augmente la taille des plantes, le nombre de feuille, la surface foliaires et les poids secs des racines et du caulaire comparativement au traitement chimique et au témoin. La teneur en chlorophylle (a et b) et le degré de résistance stomatique augmente chez les plantes traitées à la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées. L'indice de sévérité de la maladie sur les feuilles entière est de 1,066 dans les traitements à la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées ; qualifiant le traitement de résistant. Les teneurs en protéine, composés phénolique, phenylamonyllyase, polyphenoloxydase, peroxydase, chitinase,  $\beta$ -1,3 glucanase avant et après infection augmentent dans les traitements à la formulation à base des poudres de coquilles traitées comparativement au traitement chimique et au témoin. Il existe des corrélations positives et significatives entre les paramètres biochimiques étudiés dans les traitements à la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées. L'analyse en composante principale montre les liens entre les différents paramètres physiologiques, moléculaires et enzymatiques étudiés avec une orientation de tous les paramètres du côté positif de l'axe caractérisé par les traitements aux formulations coquillères. Le biofongicide dénomé '' bio-oyster shell biofungicide'' obtenu est de nature solide sous forme poudreuse ayant un pouvoir hygroscopique moyen de l'ordre de 81 % et possède une durée de conservation approximative de 12 mois au contact de l'oxygène de l'air.

### III.3. Effet du biofongicide ‘*bio-oyster shell biofungicide*’ sur l’induction de la résistance précoce.

#### III.3.1. Développement précoce des plantules et sévérité de la maladie

Le traitement du sol au biofongicide augmente significativement les paramètres agronomiques de croissance des jeunes plants de cacaoyers comparé au traitement témoins (Tableau XIII). Ainsi, on enregistre un taux d’augmentation des paramètres agronomiques de croissance de l’ordre de 23,88%, 69,56% , 66,5%, 64,32%, 57,79% respectivement pour la taille des plantes, le nombre de feuille, la surface foliaire, le poids frais de la partie aerienn e et des racines chez les plants issus des sols traités au biofongicide (Tableau XIII). Par ailleurs on note un faible index de sévérité pourriture brune chez les plants issus du sol traité au biofongicide avec un score de l’ordre de 0,85 qualifiant le traitement de très résistant (Figure 42).

Tableau XIII: Effet du biofongicide « bio-oyster shell biofongicide » sur les paramètres morphologiques de croissance des jeunes plantules de cacaoyers après deux mois de croissance.

Traitement	Nombre de feuille/plante	Surface foliaire (cm <sup>2</sup> )	Taille des plantes (cm)	Poids frais du caulaire (g/plante)	Poids frais des racines (g/plante)
TS	4,6 ± 0.52 <sup>b</sup>	40,72.81 ± 0.28 <sup>b</sup>	20,1 ± 0.11 <sup>b</sup>	3.42 ± 0.50 <sup>b</sup>	2.18 ± 0.66 <sup>b</sup>
TS+BOS	7.8 ± 0.51 <sup>a</sup>	67.80 ± 0.56 <sup>a</sup>	24.9 ± 0.93 <sup>a</sup>	5.62 ± 0.67 <sup>a</sup>	3.44 ± 0.45 <sup>a</sup>

TS : terre stérile, BOS : biofongicide. Chacun des lots est représenté en moyenne ± écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes dans une même colonne valeurs sont significativement différentes (P≤0,05).

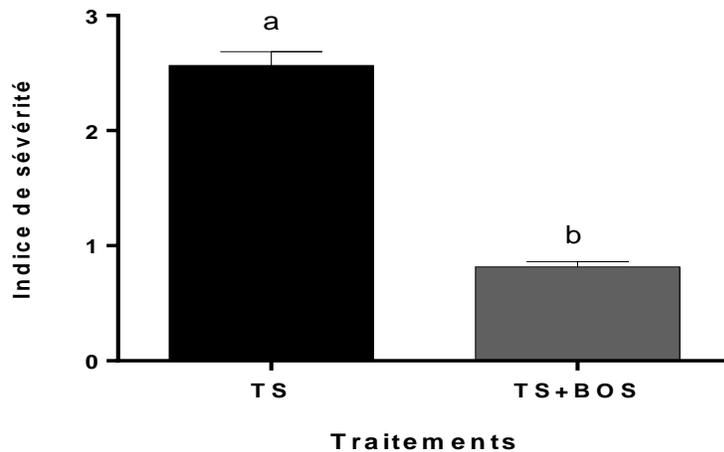


Figure 42: Variation de l'index de sévérité de la maladie en fonction des traitements.

TS: terre stérile, BOS: biofongicide .Chacun des lots est représenté en moyenne  $\pm$  écart-type. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III.3.2 Effets du biofongicide “*bio-oyster shell biofongicide*” sur les propriétés physicochimiques du sol et le statut nutritionnel du sol.

#### III.3.2.1. Effets du biofongicide sur les propriétés physicochimiques du sol

Le sol présente initialement (traitement témoin) une déficience en calcium, magnésium et potassium caractérisé par les valeurs situés en dessous des valeurs seuil moyenne soit  $0,0648 \pm 0,25$  (0,5 méq / g sol);  $0,0232 \pm 0,14$  (inférieure à 0,3 meq /g sol) et  $0,20 \pm 0,5$  (inférieure à 0,35 méq /100 g sol) respectivement pour le calcium, magnésium et potassium. L'amendement du sol au biofongicide “*bio-oyster shell biofongicide*” modifie significativement les propriétés chimiques du sol (Tableau XIV). En effet la présence du biofongicide dans le sol augmente le pH et le taux de matière organique de l'ordre de 27 et 139 %. De même, on enregistre un taux élevé de calcium ( $3,049 \pm 0,26$  méq /g sol); d'azote total ( $3,26 \pm 0,31$  %); de phosphore assimilable ( $5,86 \pm 0,12$  mg /g sol), magnésium ( $1,03 \pm 0,31$  méq / g sol) et cation échangeable ( $15,13 \pm 0,61$  cmol/kg) dans le traitement au biofongicide comparativement au traitement témoin (Tableau XIV). Par ailleurs l'amendement du sol au biofongicide entraîne la diminution du taux d'aluminium dans le sol et maintient la stabilité des paramètres physiques du sol (Tableau XIV).

Tableau XIV: Composition physicochimique des sols traités et non traités au biofongicide

Paramètres	Témoins	BOS
Argile (%)	20 ± 0,11 <sup>a</sup>	20 ± 0,11 <sup>a</sup>
Limon (%)	10 ± 0,42 <sup>a</sup>	10 ± 0,42 <sup>a</sup>
Sable (%)	10,2 ± 0,18 <sup>a</sup>	10,2 ± 0,18 <sup>a</sup>
pH (eau)	6,1 ± 0,12 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,16 <sup>b</sup>
Ca (méq / g sol)	0,0648 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,049 ± 0,26 <sup>b</sup>
Mg (méq / g sol)	0,0232 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,31 <sup>b</sup>
K (méq / 100 g sol)	0,20 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,41 <sup>b</sup>
P assimilable (mg / g sol)	3,54 ± 0,61 <sup>a</sup>	5,86 ± 0,12 <sup>b</sup>
Na (méq / 100 g sol)	0,04 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,25 <sup>a</sup>
S (méq / 100 g sol)	3,70 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,32 <sup>a</sup>
Al (méq / 100 g sol)	0,1 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,21 <sup>b</sup>
Carbone Organique (%)	1,67 ± 0,46 <sup>a</sup>	5,76 ± 0,65 <sup>b</sup>
MO (%)	3,396 ± 0,34 <sup>a</sup>	8,12 ± 0,48 <sup>b</sup>
N Total (%)	1,23 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,31 <sup>b</sup>
C/N	1,357 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,767 ± 0,72 <sup>b</sup>
CEC (cmol/kg)	13,40 ± 0,52 <sup>a</sup>	15,13 ± 0,61 <sup>b</sup>

TS : terre stérile, BOS : biofongicide. Les moyennes accompagnées des lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

### III.3.2.2. Effets du biofongicide sur le statut nutritionnel du sol

Le tableau XV présente les équilibres chimiques et le taux de saturation en élément chimique du sol en fonction des traitements. Il en résulte une augmentation significative du rapport Mg/K (95%) et K/CEC (72%) dans les sols traités au biofongicide comparativement au traitement témoin (tableau XV). Le traitement témoins présente une déficience en potassium

avec un rapport Mg/K inférieur à la valeur seuil moyenne (soit un rapport = 0,116 ; une valeur seuil moyenne compris entre 3 et 5 ). On note également un taux de saturation moyen en potassium inférieure à la gamme de fourchette optimale ( K/CEC = 1,49%, une valeur seuil moyenne compris entre 2 et 5%) dans le traitement témoins (Tableau XV). Cependant, on note une limitation moyenne dans le traitement au biofongicide et une limitation forte dans le traitement témoin nécessitant un apport en fertilisant.

Tableau XV: Variation des équilibres de fertilisation

<b>Rapport</b>	<b>Témoins</b>	<b>Biofongicide</b>
<b>Ca /Mg</b>	2,793	2,96
<b>Mg /K</b>	0,116	2,641
<b>K / CEC (%)</b>	1,49	2,577

### III.3.3 Analyse qualitative des composés phénoliques

L'analyse des composés phénoliques par DAD-HPLC haute résolution montre une variation des composés phénoliques en fonction des traitements et de l'état sanitaire de la plante (Figure 43 et 44). Le traitement du sol avec le biofongicide entraîne l'accumulation spécifique des nouveaux composés dans les feuilles des jeunes plants avant et après infection. (Figure 43 et 44). Ainsi le taux d'accumulation spécifique des nouveaux composés avant et après infection dans les feuilles des plants issus des sols traités avec le biofongicide est de l'ordre de 3,7 %. Par ailleurs on note une augmentation de la teneur de cinq composés dans les feuilles des plants issus des sols traités au biofongicide avant et après infection caractérisé par la présence des pics de surface épaisse et de temps de rétention  $t=2,9$  min,  $t = 3,3$  min ,  $t = 5$  min,  $t=5,2$  min et  $t= 5,5$ min (Figure 43 et 44).

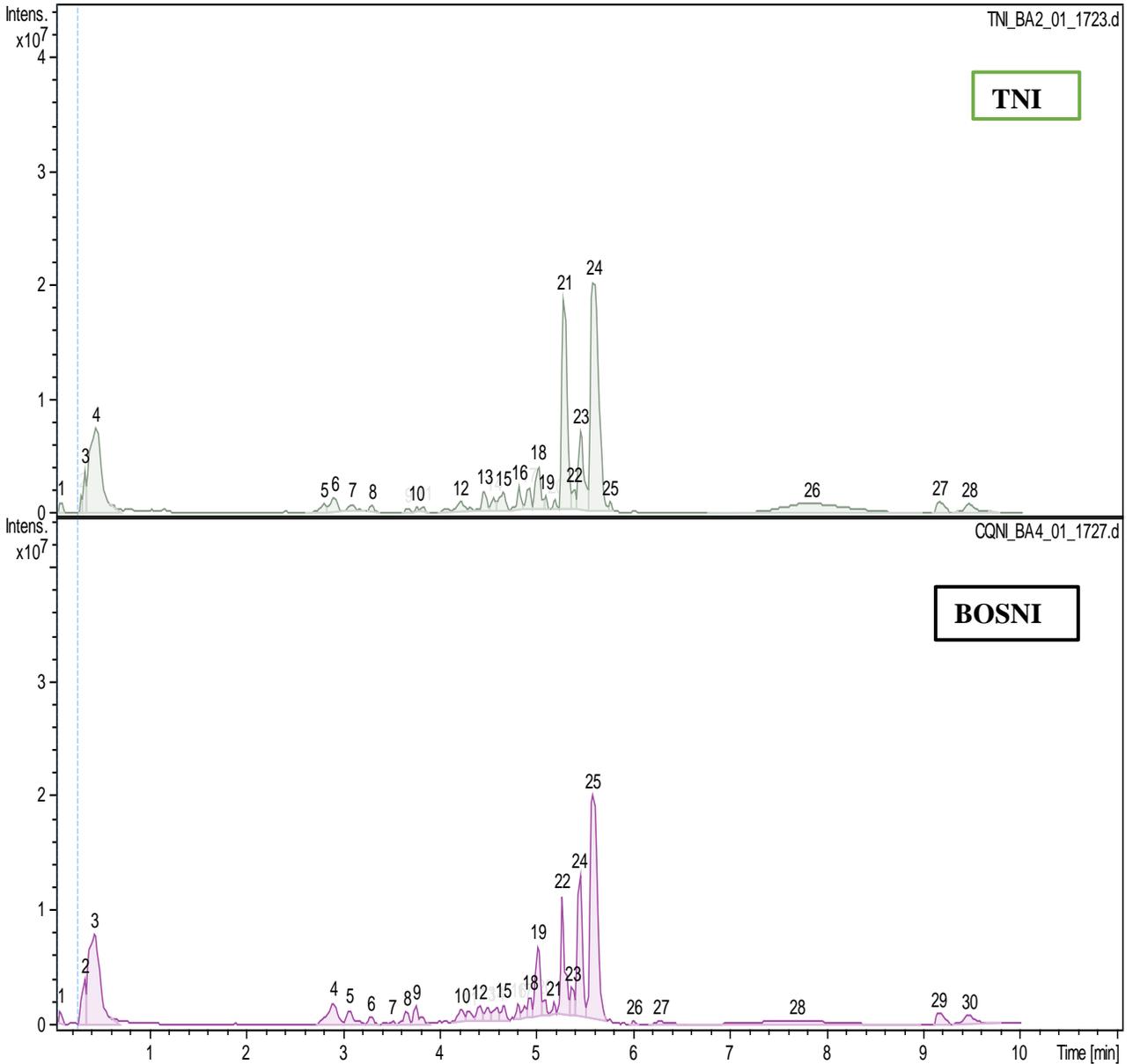


Figure 43: Chromatogramme issu de l'analyse par chromatographie liquide de haute pression des composés phénoliques dans les feuilles de cacaoyers avant infection.

TNI: traitement témoins avant infection, BOSNI: traitement au biofongicide avant infection.

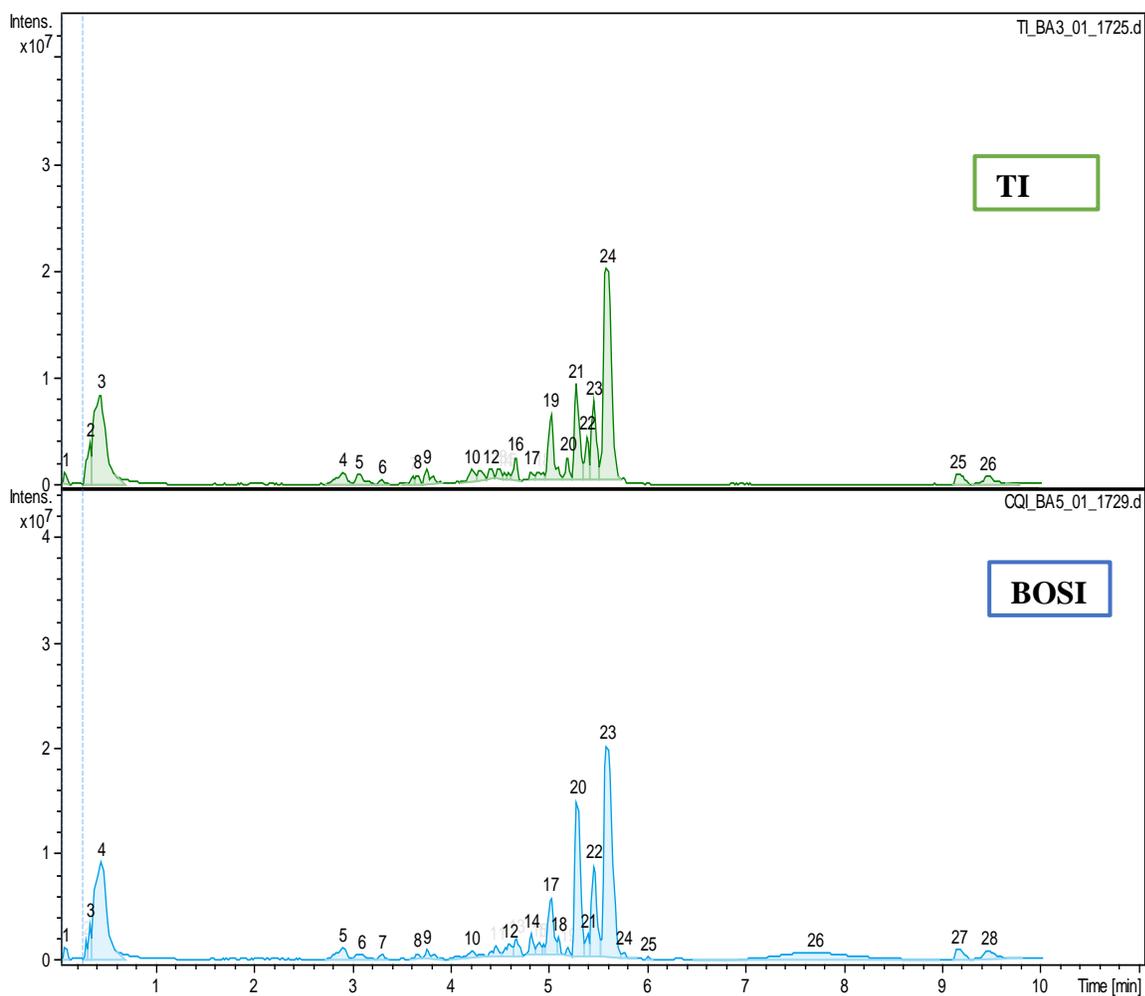


Figure 44: Chromatogramme issue de l'analyse par chromatographie liquide de haute pression des composés phénoliques dans les feuilles de cacaoyers après infection.

TI: traitement témoins après infection, BOSI: traitement au biofongicide après infection.

### III.3.4. Identification des composés par HPLC-DAD-MS<sup>+</sup>

L'analyse du couplage DAD-HPLC-MS<sup>+</sup> montre une diversité des familles de composés phénoliques en fonction des différents traitements et de l'état sanitaire des jeunes plants (Tableau XVI et XVII). Ainsi, l'analyse DAD-HPLC-MS<sup>+</sup> révèle la présence de neuf composés identifiables avant et après infection dans les feuilles des plants issus des sols traités et non traités au biofongicide (Tableau XVI et XVII). Parmi les neuf composés identifiés, six sont spécifiques aux biofongicides '' *bio-oyster shell biofungicide* '' . De ces composés, on note la

présence des flavonols ( myrecetine, gallocatchine et rhamnazine) et les dérivés des acides phénoliques à l'instar de la brevifoline (Tableau XVI et XVII)

Tableau XVI: Composés phénoliques identifiés dans les feuilles de cacaoyers par DAD-HPLC-MS<sup>+</sup> avant infection

Traitements	Tr (minutés)	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Detecteur UV	Composés probables	Formule brute	Famille
<b>Témoins</b>	3,3	579,17	198-270-331	Proantocyanidine B1	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	flavonoïde
	2,9	565,15	198-286-323	Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylated	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	isoflavone
	5,5	623,28	218-411	Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	flavonol
<b>BOS</b>	3,3	579,17	202-339	Proantocyanidine B1	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	flavonoïde
	3,1	293,24	411	Brevifolique	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Dérivé des acides phénoliques
	2,9	565,15	198-270-335	Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylated	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	isoflavone
	4,8	331,22	423	Rhamnazine	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	flavonol
	4,9	307,22	218-423	Gallocatéchine	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	flavonol
	5,5	623,28	218-411	Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	flavonol

Tableau XVII: Composés phénoliques identifiés dans les feuilles de cacaoyers par DAD-HPLC-MS<sup>+</sup> après infection

Traitements	Tr (min)	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Decteur UV	Composés probables	Formule brute	Famille
<b>Témoins</b>	3,3	579,171	198-270-331	Proantocyanidine B1	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	flavonoïde
	5	309,207	218-423	Sinapoylcholine dimer Isomer 1	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>05</sub>	flavonoïde
	5,2	609,269	218-415	Quercetine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	isoflavone
<b>BOS</b>	0,3	319,069	210	myricetine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	flavonol
	3,1	249,145	198-274	Brevifoline	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Derivé d'acide phénolique
	3,3	579,17	202-235	Proantocyanidine B1		flavonoïde
	4,8	331,22	218-423	Rhamnazine	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	flavonol
	5	309,242	218-423	Sinapoylcholine dimer Isomer 1	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>05</sub>	flavonoïde
	5,2	609,269	218-415	Quercetine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	isoflavone

### III.3.5. Variation de la teneur en métabolites identifiés

#### III.3.5.1. Métabolites communs aux différents traitements

Les Figures 45 et 47 présentent les teneurs relatives en métabolites identifiés par DAD - HPLC-MS+ en fonction des traitements et de l'état sanitaire des plants. En effet, les plants issus des sols traités au biofongicide présentent des teneurs élevées en flavonoïde (sinapoylcholine dimère isomère I), isoflavone (Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylate, Quercetine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside,) et flavonol (Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside) comparé aux témoins (Figure 45 et 47). Cependant, en condition saine on enregistre respectivement la synthèse d'un flavonol glycosylé ( Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside ) qui présente un ion  $m/z$  623 ( $[M+H]^+$ ) et d'un isoflavone (Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylate) ayant une masse ionique  $m/z$  565 ( $[M+H]^+$ ) (Figure 46) dans tous les traitements. De plus on enregistre des teneurs relatives élevées en métabolites dans les feuilles des plants issus des sols traités au biofongicide comparé au témoins. Ces teneurs varient de l'ordre de 3,13 à 10,77% respectivement pour la genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylate et l'isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside comparé au témoins (Figure 45).

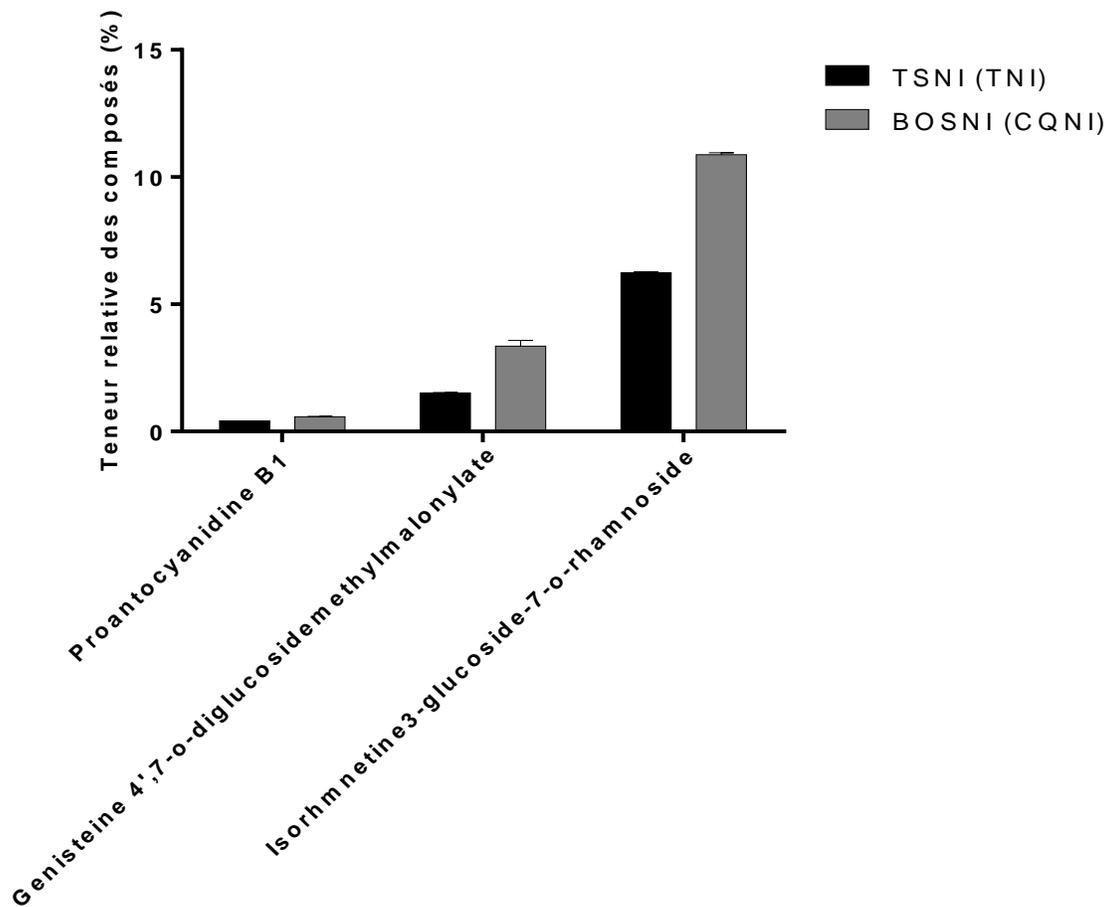
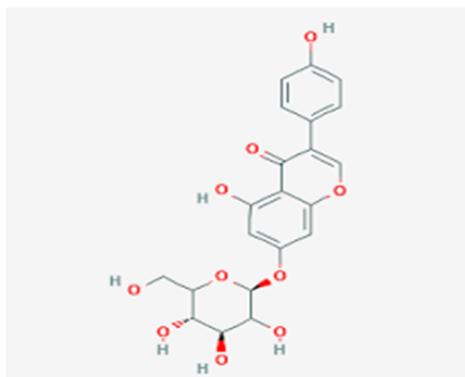
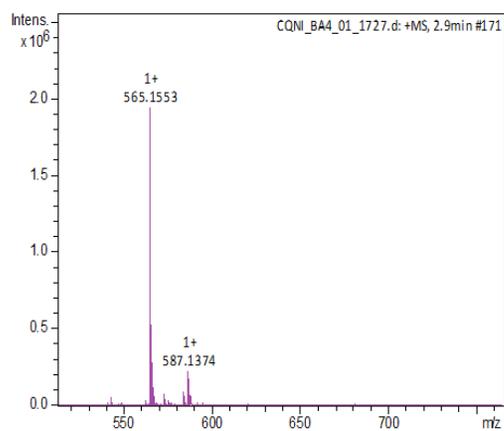
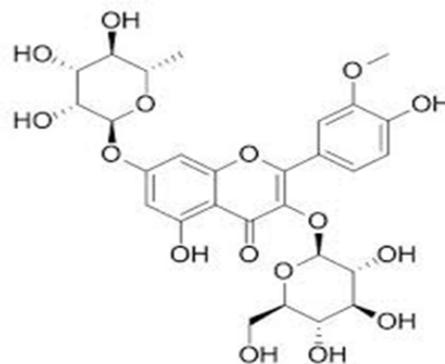
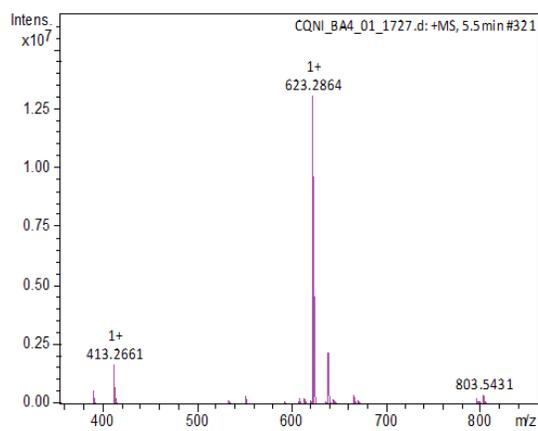


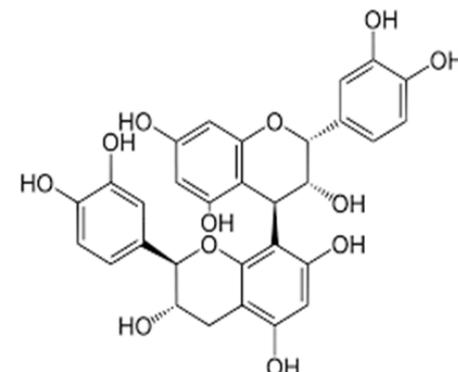
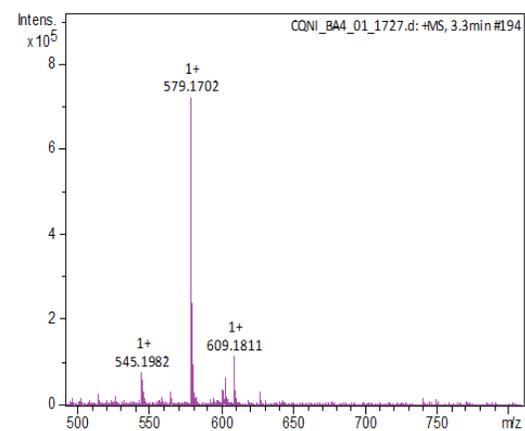
Figure 45: Variation de la teneur des composés identifiés dans les feuilles de cacaoyers avant infection



**Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylated**



**Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside**



**Proantocyanidine B1**

Figure 46: Spectre de masse et structure hypothétique des composés identifiés dans les feuilles de cacaoyers avant infection.

L'infection par *P.megakraya* se caractérise par la synthèse accru d'un flavonoïde (sinapoylcholine dimère isomère I) qui présente un ion  $m/z$  309 ( $[M+H]^+$ ) et d'un isoflavone (Quercétine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside) ayant une masse ionique  $m/z$  609 ( $[M+H]^+$ ) dans les feuilles des plants des différents traitements (Figure 48). De plus on enregistre des teneurs relatives élevés en métabolites dans les feuilles des plants issus des sols traités au biofongicide comparés aux témoins. Ces teneurs varient de l'ordre de 1,87 à 4,88 % respectivement pour la Quercétine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside et la sinapoylcholine dimère isomère I comparé au témoins (Figure 47).

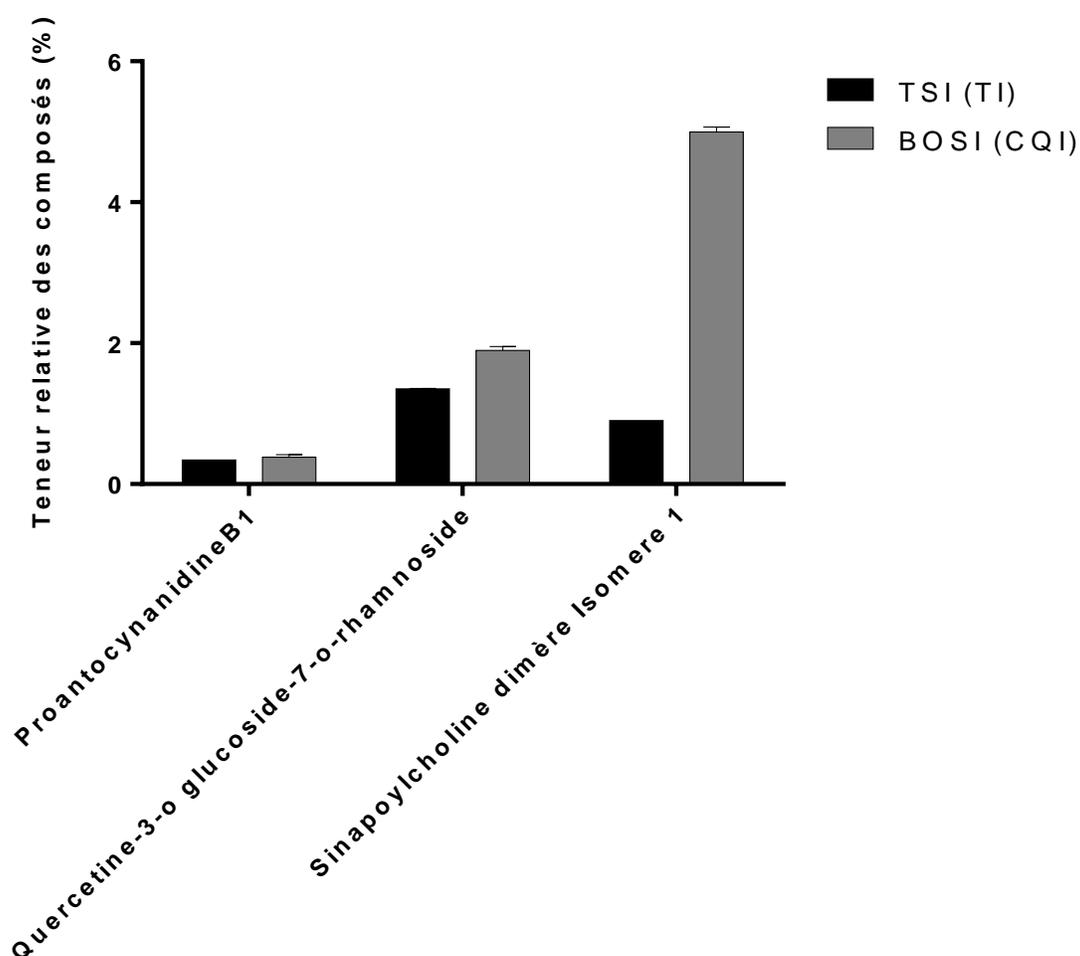


Figure 47: Variation de la teneur des composés identifiés dans les feuilles de cacaoyers après infection

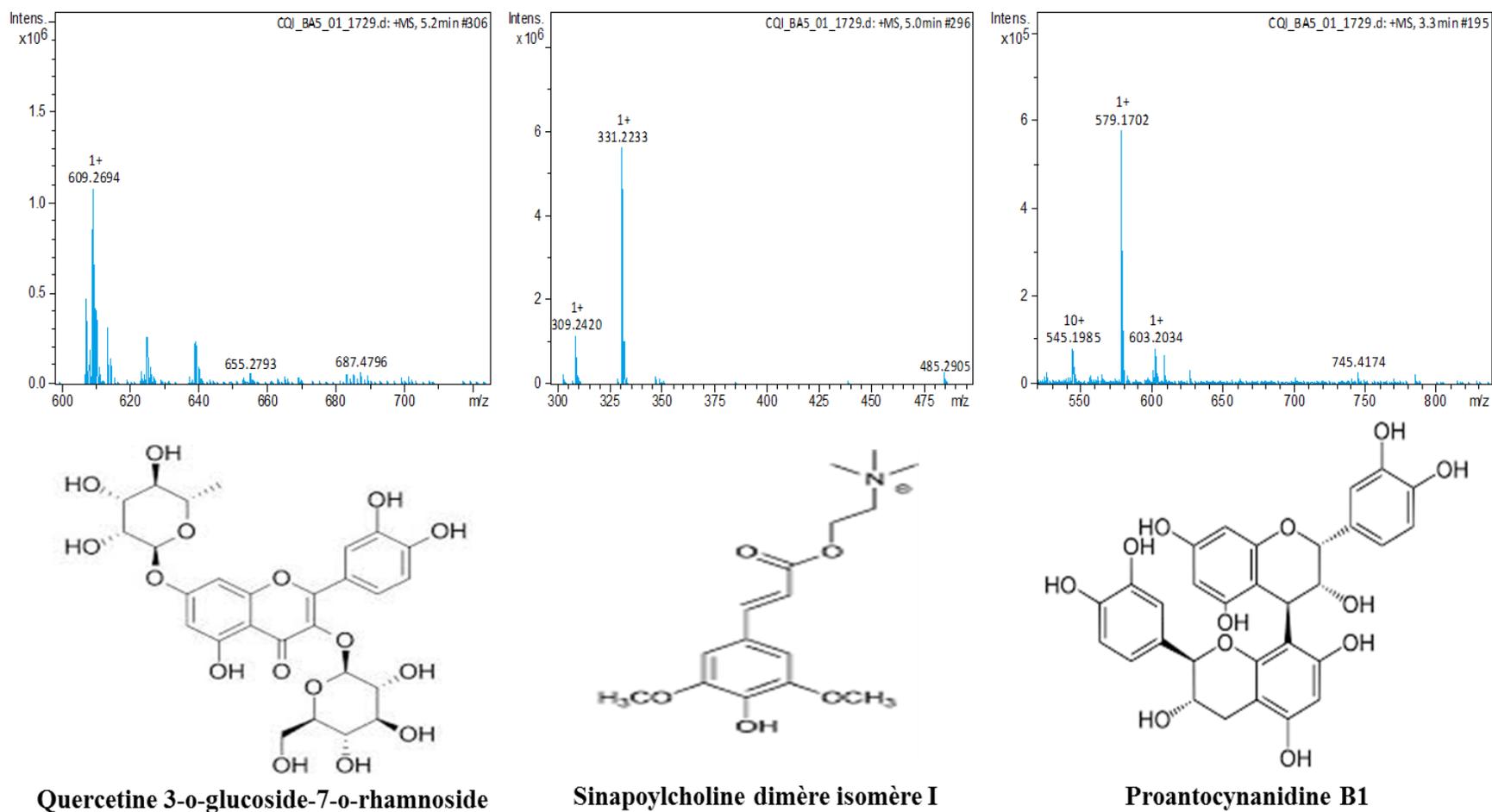


Figure 48: Spectre de masse et structure hypothétique des composés identifiés dans les feuilles de cacaoyers après infection

Par ailleurs les longueurs d'ondes absorptions en UV de chaque métabolite varient en fonction des traitements et de l'état sanitaire des plantes (Figure 49).

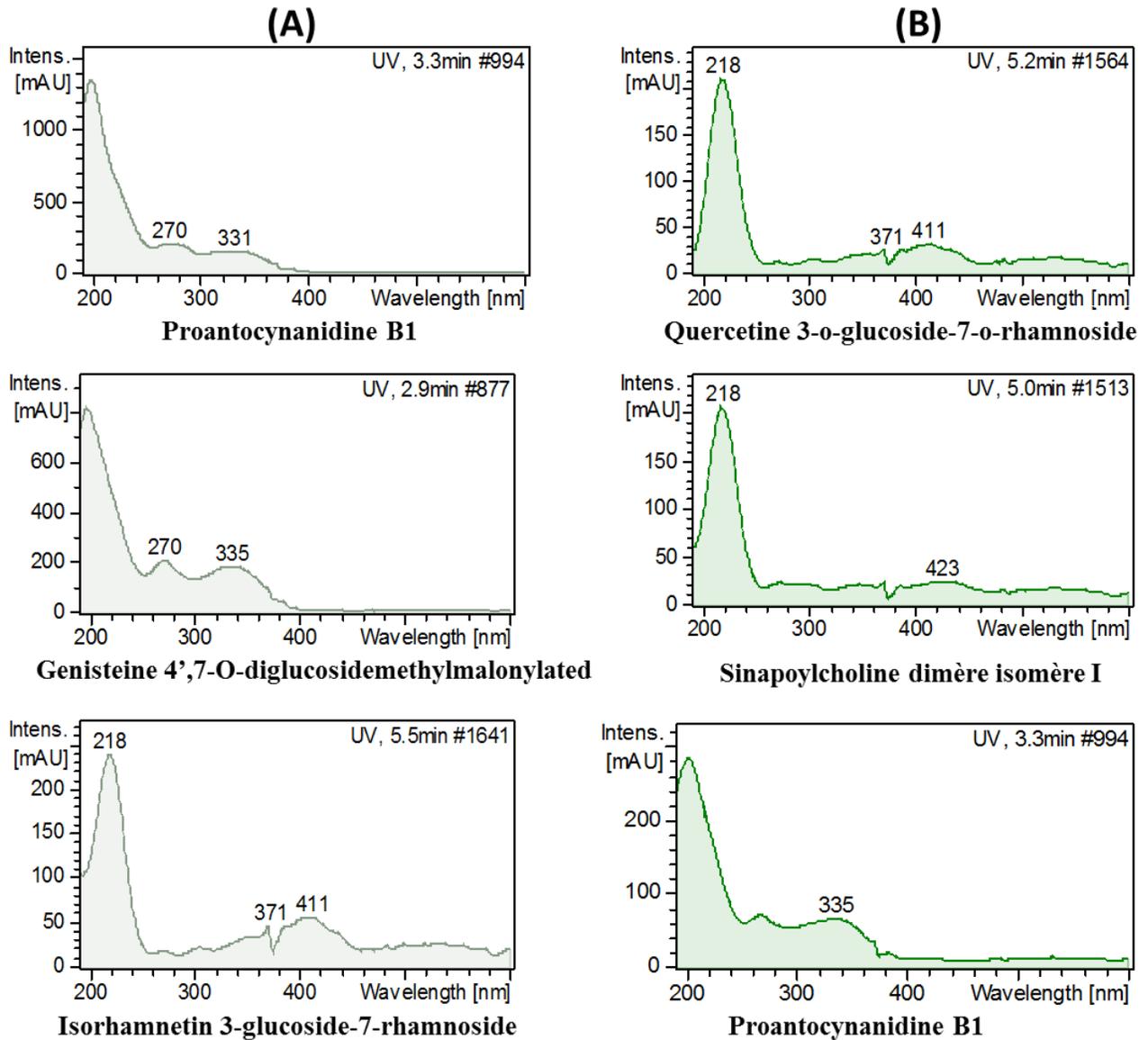


Figure 49: Spectre d'absorption UV des métabolites identifiés dans les feuilles de cacoyers avant infection (A) et après infection (B).

### III.3.5.2. Métabolites spécifique au biofongicide ‘*bio-oyster shells biofongicide*’

Le traitement du sol avec le biofongicide ‘*bio-oyster shells biofongicide*’ entraîne l’accumulation spécifique des flavonols (gallocatéchine, rhamnazine et myrecetine) et du dérivé d’acide phénolique (brevifoline) dans les feuilles des jeunes plants de cacaoyers avant et après infection (Figure 50 , 51 et 52). Ainsi, en condition saine, on note la synthèse des flavonols à l’instar de la rhamnazine qui présente un ion  $m/z$  331 ( $[M+H]^+$ ) , la gallocatéchine qui présente un ion  $m/z$  307 ( $[M+H]^+$ ) et un dérivé d’acide phénolique (brevifoline) qui présente un ion  $m/z$  249 ( $[M+H]^+$ ) (Figure 51). Par ailleurs, les teneurs relatives en métabolites varient de l’ordre de 0,81 % ; 0,87 % et 1,49 % respectivement pour la rhamnazine, la gallocatéchine et la brevifoline (Figure 50). L’infection par *P.megakrya* se caractérise par la synthèse des flavonols tels que la myrecetine qui présente un ion  $m/z$  319 ( $[M+H]^+$ ) , rhamnazine qui présente un ion  $m/z$  331 ( $[M+H]^+$ ) et un dérivé d’acide phénolique (brevifoline) qui présente un ion  $m/z$  249 ( $[M+H]^+$ ) (Figure 52). Dans le même élan, les teneurs relatives en métabolites varient de l’ordre de 0,77 % , 1,12 % et 1,32 % ,0,77 % respectivement pour la brevifoline, myrecetine et la rhamnazine (Figure 50 ).

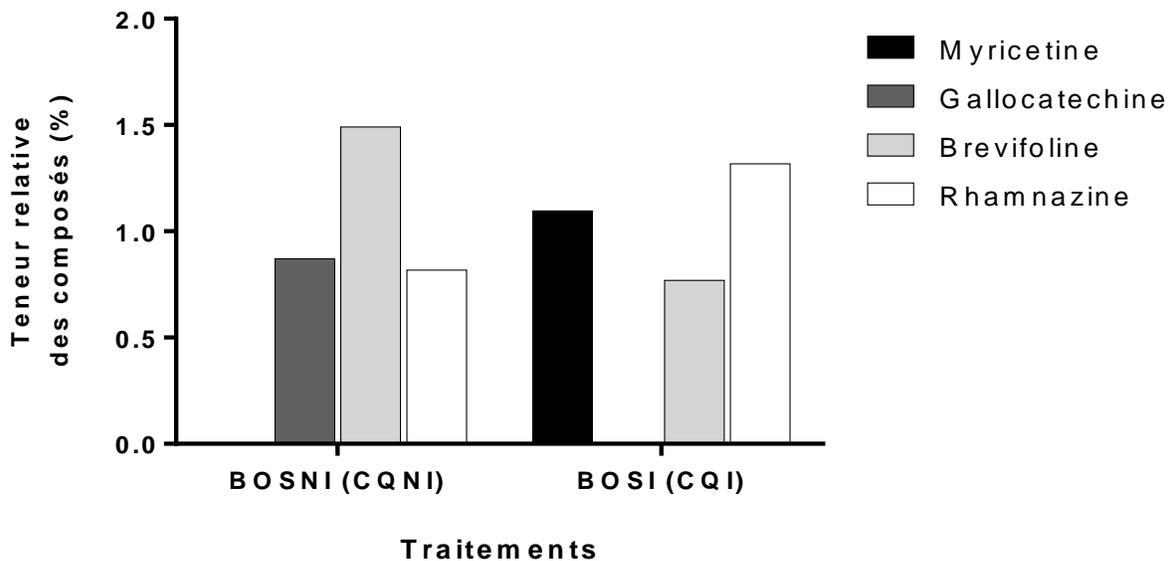


Figure 50: Variation de la teneur des composés induit spécifiquement par le biofongicide dans les feuilles de cacaoyers avant et après infection. BOSNI : traitement au biofongicide avant infection, BOSI : traitement au biofongicide après infection

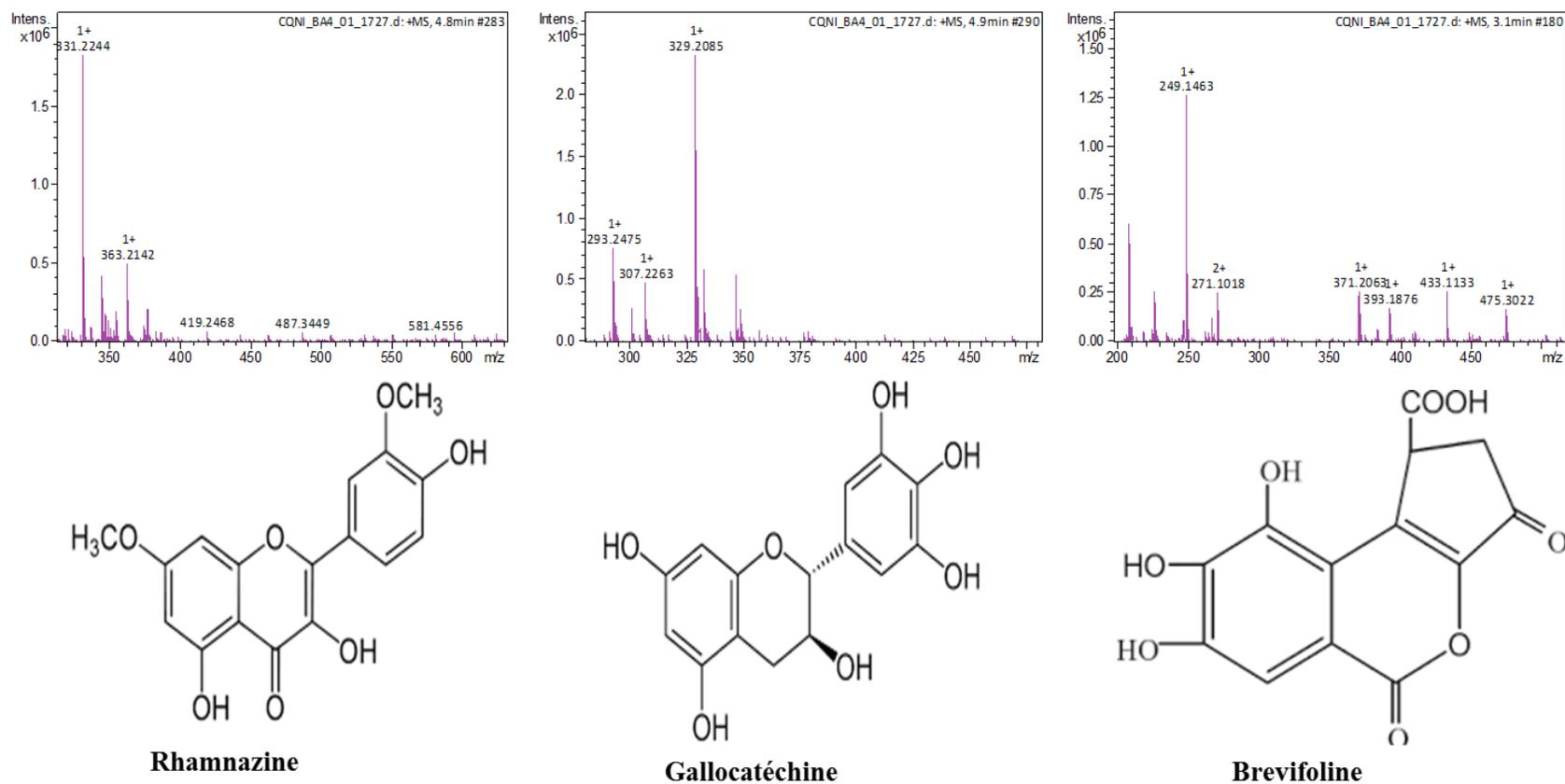


Figure 51: Spectre de masse et structures hypothétique des composés spécifique au biofongicide identifiés dans les feuilles de cacaoyers avant infection.

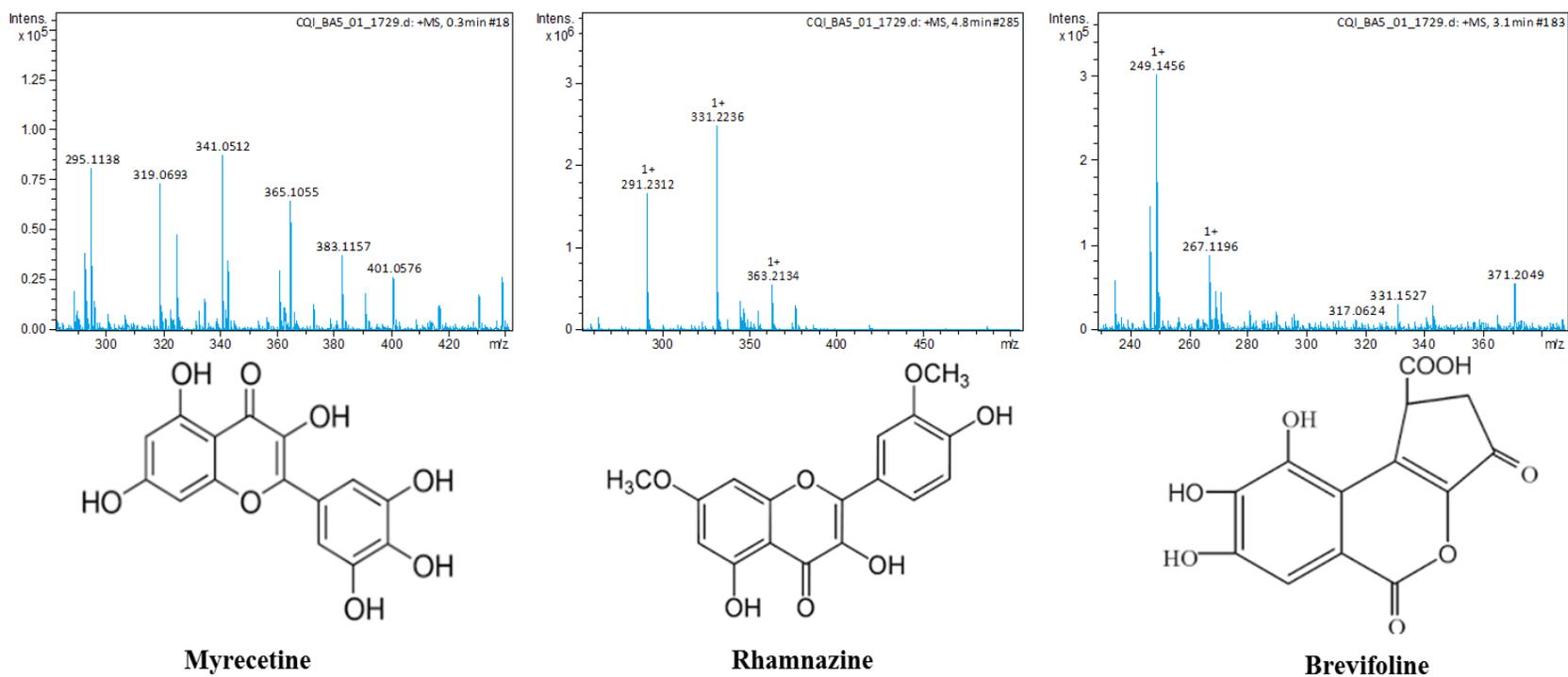


Figure 52: Spectre de masse et structures hypothétique des composés spécifique au biofongicide identifiés dans les feuilles de cacaoyers après infection.

Par ailleurs les longueurs d'ondes absorptions en UV de chaque métabolite varient en fonction des traitements et de l'état sanitaire des plantes à l'exempt de la rhamnazine (Figure 53).

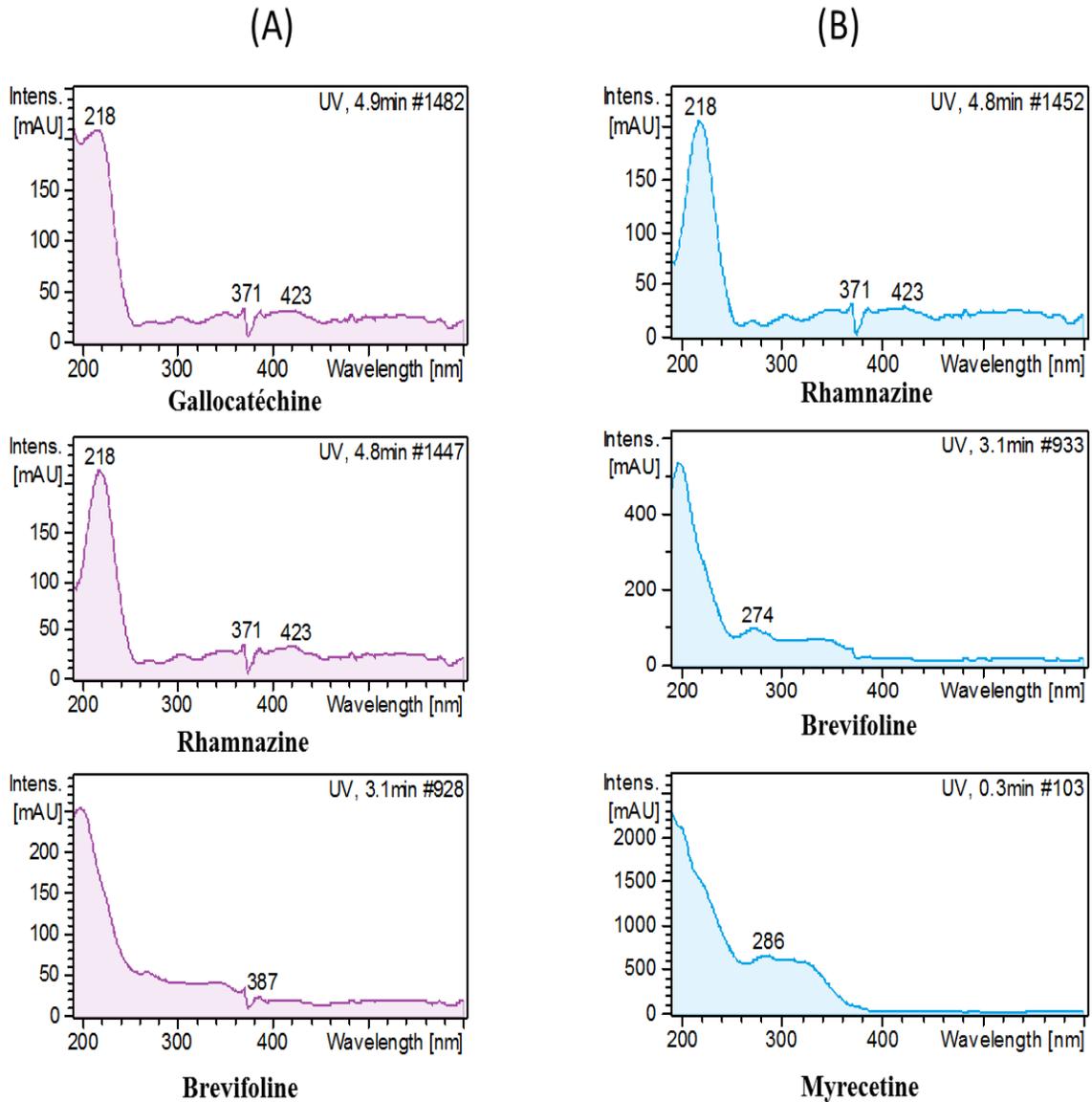


Figure 53: Spectre d'absorption UV des composés spécifique au biofungicide identifiés avant infection (A) et après infection (B).

### III.3.6. Variation du degré d'expression de certains gènes de defenses ( TcChiB ,Tc Per-1, Tc Glu-1 et TcMYBPA ).

Le traitement du sol au biofongicide ‘*bio-oyster shell biofungicide*’ à la concentration 1% P/P induit de façon significative l’augmentation du degré d’expression relative des gènes Tc ChiB, Tc Per-1, TcGlu-1 et TcMYBPA chez les plants de cacaoyers avant et après infection des feuilles (Figure 54). L’infection par *P.megakarya* se caractérise par une augmentation du degré d’expression des gènes chez les plants issus des différents traitements. On enregistre une expression significative du gène TcPer-1 chez les plants issus des sols traités au biofongicide après infection des feuilles ( Figure 54A). Par ailleurs, on note une expression significative et plus prononcée des gènes TcMYBPA, TcGlu-1 et TcChiB les plants issus des sols traités au biofongicide avant et après infection des feuilles par *P.megakarya* comparé aux témoins ( Figure 54 B,C et D).

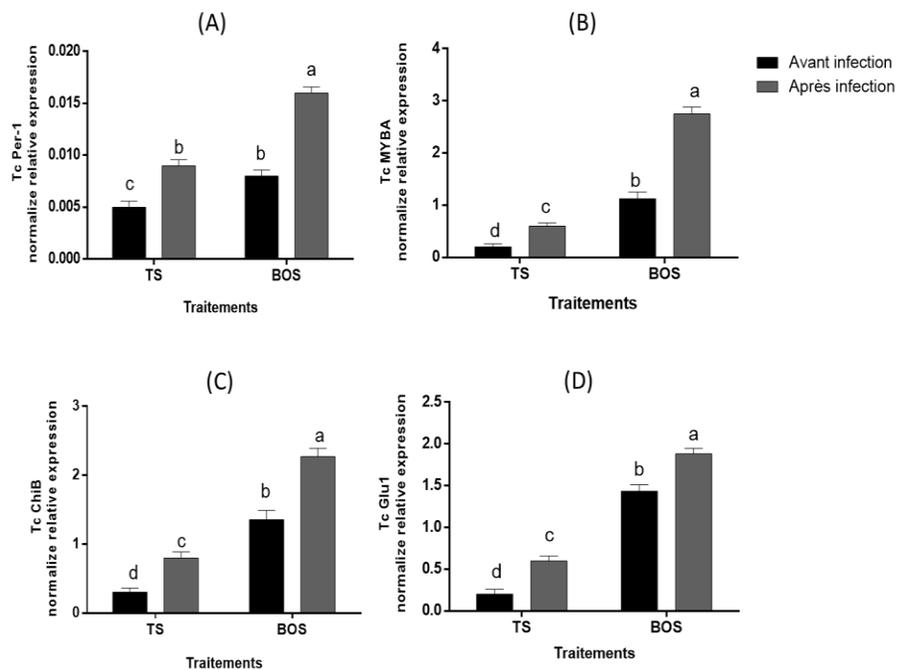


Figure 54: Variation du degré d’expression relative de certains gènes de defense à l’état précoce chez les plants de cacaoyers avant et après infection.

(A): Gène Tc Per-1 , (B): Gène Tc MYBA, (C): Gène Tc ChiB , (D): Gène Tc Glu1, (TS): terre stérile, BOS : biofongicide .Chaque donnée est représenté en moyenne ± écart-type de trois échantillons d’ARN provenant de trois expériences indépendantes. Les moyennes accompagnées des lettres différentes valeurs sont significativement différentes (P≤0,05).

### III.3.7. Discussion Partielle III

L'étude de cette partie nous a permis d'évaluer l'effet du traitement du sol avec le biofongicide '*Bio-oyster shell biofungicide*' sur l'induction précoce des phytoalexines et du degré d'expression de certains gènes de défenses chez les plants de cacaoyers. Il en découle que l'application du biofongicide à la concentration 1 % P/P augmente les paramètres morphologiques de croissance de l'ordre de 56,41% et diminue l'indice de sévérité de l'ordre de 70,27 % qualifiant le traitement de très résistant. Ce résultat s'expliquerait par la capacité du biofongicide à stimuler précocement d'une part l'activité des microorganismes du sol bénéfiques pour la croissance et d'autre part à modifier les propriétés physicochimiques du sol d'autres part. L'amélioration du statut nutritionnel du sol a été confirmé dans cette étude par l'augmentation de l'ordre moyen de 90% des paramètres chimiques du sol nécessaire pour la croissance des plants de cacaoyer à l'instar du pH, des teneurs en matières organiques, azote total et cations échangeables. Les cations échangeables sont des indicateurs de fertilité du sol et constituent un réservoir de stockage de manière réversibles des éléments fertilisants cationiques impliqués dans la croissance et la résistance des plantes vis-à-vis des pathogènes à l'instar du calcium, potassium et magnésium (N'goran *et al* 2018). A cet effet, les travaux d'Olbert *et al* (2019) mettent en exergue les capacités du calcium et du magnésium présent dans le sol à réduire l'incidence de la maladie de la tache bactérienne chez la laitue et induire les mécanismes de défenses de cette dernière. Ce phénomène d'induction de la résistance a été confirmé dans notre étude via la capacité du biofongicide '*Bio-oyster shell biofungicide*' à induire précocement les systèmes de défenses des jeunes plants de cacaoyers à travers le phénomène de'' priming'' ou pré-immunisation qui se traduit par une sensibilisation rapide des voies de signalisations par les stimuli ; entraînant ainsi les changements de l'état physiologique, transcriptionnel et métabolique de la plante. Ces résultats rejoignent les travaux d'Oumar *et al* (2018) qui a montré que le traitement des sols avec une formulation organique à base des coques de cacao induisait la résistance précoce des plants de cacaoyers en réduisant l'incidence de la sévérité et stimulant l'activité signalétique des systèmes de défenses des plantes via l'intermédiaire de l'activité des bactéries du sol à l'instar des actinobactéries. En effet le phénomène de ''priming'' se caractérise par deux évènements majeurs à savoir la phase précoce et la phase post précoce caractérisée par

la réaction de défense rapide de la plante vis-à-vis du pathogène et l'augmentation du degré de résistance via une production pléthore des molécules de défenses (Mauch-maní *et al.*, 2017).

Cette phase post précoce a été mise en exergue dans notre travail par l'induction de l'accumulation de plusieurs phytoalexines à l'instar des flavonoides (sinapoylcholine dimère isomère I, proanthocyanidine), des isoflavones (Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylated, Quercétine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside,) et flavonol (Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside) comparativement aux témoins. Ce résultat s'expliquerait par les capacités synergiques du calcium, de la chitine, des sesquiterpènes lactones et flavonoides (présents dans le biofongicide) à stimuler les gènes de défenses liés à la voie des phénylpropanoïdes chez le cacaoyer. Plusieurs études ont également démontré la capacité des biofongicides à base de calcium et de la chitine à induire l'expression des gènes impliqués dans l'accumulation des isoflavones (Genisteines et dérivés glycosylés) et des flavonoides (proanthocyanidine) dans les feuilles des plants de soja lors de l'interaction Soja / *Sclerotinia Sclerotiorum* (Arfoui *et al.*, 2015, Fouad *et al.*, 2012). Par ailleurs plusieurs familles de composés phénoliques impliqués dans l'interaction *T cacao* / *P. megakarya* ont été rapportés par plusieurs auteurs notamment les procyanidine B2 et procyanidine B5 (Manga *et al.*, 2018); apigénines et les dérivés de l'apigénine (Minayaka *et al.*, 2017); les dérivés d'apigénines et de lutéoline (Boudjeko *et al.*, 2007). Les résultats similaires ont été obtenus par Mbouobda (2013) qui a montré que le traitement des plants du macabo avec les composés dérivés de la chitine lors de l'interaction *Xanthosoma sagittifolium* / *Pythium myriotylum* entraînait l'accumulation des dérivés des acides caféoyloxyshikimiques.

Les résultats de l'analyse DAD-HPLC-MS<sup>+</sup> de cette étude ont révélé que le traitement du sol au biofongicide "*Bio-oyster shell biofungicide*" induit spécifiquement la synthèse des flavonols (gallocatéchine, rhamnazine et myrecétine) et un dérivé d'acide phénolique (brevifoline) avant et après infection. L'expression de ces composés spécifiques s'expliquerait par la capacité du calcium, des sesquiterpènes lactones et la chitine présent dans le biofongicide à induire au niveau du noyau la reprogrammation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. En effet la phase précoce du mécanisme de "priming" ou d'induction précoce est caractérisé par un changement transcriptomique massif dû à l'action concertée de l'acide salicylique sur la suractivation de la voie de signalisation des MAPKinase (Mitogen Activated Protein kinase) qui entraînerait l'induction coordonnée de

plusieurs enzymes-clés dont la phénylalanine ammonia-lyase et la chalcone synthase . À l'issue de ce sentier métabolique seront produits une pléthore de composés phénoliques que l'on désigne sous le terme générique de phytoalexines (Siciliano *et al.*, 2015). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chang Ha *et al* (2019) qui ont montré que le traitement du sol avec le chitosane ; un composé dérivé de la chitine induit spécifiquement la production des flavonols et des acides phénoliques dans les feuilles de blé lors de l'interaction *Triticum aestivum L / Puccinia striiformis f. sp. tritici*. Plusieurs travaux démontrent l'implication des flavonols dans la résistance des plants de cacaoyers vis-à-vis de *P.megakarya* ( Manga *et al.*, 2018, Minyaka *et al.*, 2017) grâce à leurs propriétés antimicrobiennes. La brevifoline et l'acide caféique sont les acides phénoliques reconnus pour leurs activités antifongiques vis-à-vis de plusieurs champignons et oomycètes ainsi que leurs capacités protectrices des plantes contre les invasions des pathogènes (Ngadze *et al.*, 2014).

Par ailleurs, en réponse aux stress, les systèmes de défenses des plantes sont activés à travers plusieurs voies signalitiques couplés à une modification du degré d'expression de plusieurs gènes. Dans la présente étude, les analyses qRT-PCR révèle que l'amendement des sols au biofongicide “ *Bio-oyster shell biofungicide*” augmente significativement le degré d'expression relative des gènes TcPer-1, TcGlu-1, TcChiB et TcMYBPA chez les jeunes plants de cacaoyers avant et après infection. Cette sensibilisation générale des systèmes de défenses des jeunes plants de cacaoyers par le biofongicide “ *Bio-oyster shell biofungicide*” pourrait être dû à la capacité de la chitine et du calcium présent dans le biofongicide à déclencher simultanément les voies signaliques des MAPKINases et des Calmoduline kinase pour l'établissement d'une réponse cellulaire précoce comme signal d'alarme au niveau physiologique, transcriptionnel et épigénétique chez la plante. La mise en place de ce phénomène entraîne une résistance accrue et durable de la plante tout au long de son cycle de vie face aux attaques ultérieures ainsi que l'installation d'une mémoire immunologique de la plante (Mauch-mani *et al.*, 2017). En effet, la fixation de la chitine sur les récepteurs présents à la surface de la membrane plasmique (récepteurs de facteur de croissance EFR et LYM1) entraîne une dépolarisation membranaire et une phosphorylation directe des facteurs de transcriptions MYB, PER-1, ChiB et Glu-1 au niveau du noyau . Cette fixation va également induire une cascade de réactions de phosphorylations et dephosphorylation impliquant plusieurs protéines relais de la dite voie. La phosphorylation finale

de la protéine relais ERF 6 par les protéines relais MPK3/MPK6 conduit à la stabilisation de la protéine ERF6, qui active l'expression de multiples gènes liés à la défense parmi lesquels les gènes TcPer-1, TcGlu-1, TcChiB et TcMYBPA (Xianzong *et al.*, 2013). Par ailleurs plusieurs travaux mettent en exergue l'accumulation des gènes TcPer-1, TcGlu-1, TcChiB dans les feuilles de cacaoyers après traitement des plants avec l'acide salicyclique, jasmonique, la protéine NEP1, le glycérol et *Trichoderma* lors de l'interaction *Theobroma cacao* / *P.megakarya* (Bailey *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2006, Fister *et al.*, 2016). Ce sont les gènes reliés aux protéines liés à la pathogénèse de classe 9,2 et 3 impliqués dans le processus de lignification de la parois de la cellule végétale et la dégradation de la parois des pathogènes (Zi *et al.*, 2010, Fister *et al.*, 2016). De plus une somme des travaux décrivent ces gènes comme étant des marqueurs moléculaires de résistance dans les interactions plantes / pathogènes (Bailey *et al.*, 2005, Verica *et al.*, 2004, Xianzong *et al.*, 2013, Fister *et al.*, 2016, Yaping *et al.*, 2017). Le gène TcMYBPA est un gène impliqué dans la biosynthèse des flavonoides via le facteur de transcription R2R3-MYB. Il est impliqué dans la régulation des enzymes clés impliqués dans la biosynthèse des flavonoides à l'instar de l'anthocyanidine réductase, l'anthocyanidine synthase, la dihydroflavanol reductase, la leucoanthocyanidine reductase (Yi *et al.*, 2015). Par ailleurs, le facteur de transcription MYB est un élément central dans la régulation de l'induction de la résistance systémique via la régulation de la transcription des gènes impliqué dans la biosynthèse des flavonoides et les proanthocyanidines en particulier (Yi *et al.*, 2015; Fister *et al.*, 2016). A cet effet il a été démontré que la surexpression du gène TcMYBPA lors de l'interaction *T.cacao* / *P.megakarya* entraîne une expression accrue de plusieurs gènes clés codant pour les principales enzymes structurelles de la voie de biosynthèse des flavonoides et de l'anthocyanidine, notamment la dihydroflavanol réductase, la leucoanthocyanidine dioxygénase et l'anthocyanidine réductase (Yi, 2010). Cette implication du gène TcMYBPA pourrait corroborer avec l'induction de la surexpression des flavonoides par le biofongicide obtenu précédemment via les analyses DAD-HPLC-MS<sup>+</sup>.

### III.3.7. Conclusion partielle III

Le biofongicide “ *bio-oyster shell biofungicide* ” à la concentration 1 % P/P affecte la morphologie chez les jeunes plants de *Theobroma cacao*. Il améliore le statut nutritionnel du sol en pépinière par l’augmentation des teneurs en matières organiques, cations échangeables et l’azote total de l’ordre moyen de 90 %. Le biofongicide diminue l’indice de sévérité de la maladie de l’ordre de 70,27 % chez les jeunes plants de cacaoyers et stimule de manière précoce les mécanismes de défenses des jeunes plants de cacaoyers. La stimulation se caractérise par une accumulation rapide des flavonoides (sinapoylcholine dimère isomère I, proanthocyanidine), des isoflavones (Genisteine 4’,7-O-diglucosidemethylmalonylated, Quercetine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside,) et flavonol (Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside) avant et après infection. L’analyse DAD-HPLC-MS+ permet de mettre en évidence la présence spécifique des flavonols (gallocatéchine, rhmnazine et myrecetine) et un dérivé d’acide phénolique (brevifoline) avant et après infection dans les traitements au biofongicide qui emprunteraient les voies différentes pour être synthétisés. Il induit également l’augmentation du degré d’expression des gènes TcPer-1, TcGlu-1, TcChiB et TcMYBA avant et après infection.

# *Conclusion et Perspectives*

## CONCLUSION GENERALE

Nos travaux décrits avaient pour ambition de contribuer à l'amélioration de la cacaoculture via la mise sur pied d'un itinéraire technique permettant la production des semences de cacaoyers saines et "vaccinés" vis-à-vis des attaques de *P. megakarya* via l'amendement des substrats de culture avec les coquilles d'huitres. Il s'est agi d'évaluer d'une part l'effet de l'amendement coquillière sur les paramètres agromorphologiques des jeunes plantules, les propriétés physicochimiques du sol, la charge de *P. megakarya* et d'autre part sur la stimulation des mécanismes de défense du cacaoyer.

Au terme de nos travaux il en résulte que:

- Le traitement des sols aux coquilles d'huitres à la concentration 10 % P/P améliore la qualité sanitaire des semences en stimulant l'augmentation des paramètres agronomiques de croissance, la réduction de la charge de *P. megakarya* dans le sol et l'augmentation du pH du sol de l'ordre de 32 %. L'amendement coquillière réduit l'indice de sévérité de la pourriture et induit la synthèse accrue des marqueurs biochimiques de résistance à l'instar des composés phénoliques, des protéines totales et l'augmentation des activités des peroxydases, chitinases, polyphénoloxydases,  $\beta$  1,3-glucanases. Elle confère un indice de qualité sanitaire moyen de l'ordre 33 % selon l'échelle de protection croissante suivant:  $(TS+CQ) - (TS+CQ+PM) - (TNS+CQ)$ .
- La formulation à base des poudres de coquilles traitées à la concentration 1 % P/P induit la croissance des paramètres agronomiques de croissance, l'augmentation de la teneur en chlorophylle et de la résistance stomatique comparativement au traitement chimique. Cette formulation induit la résistance chez les plants de cacaoyers en pépinière en réduisant l'indice de sévérité de la maladie et en stimulant la synthèse accrue des marqueurs enzymatiques et moléculaires de la résistance à l'instar des protéines, composés phénoliques, PAL, PPO, POX, chitinases et  $\beta$ -1,3 glucanases. Il existe des corrélations positives et significatives entre les paramètres biochimiques étudiés dans les traitements à la formulation à base des poudres de coquilles d'huitres traitées. L'analyse en composante principale montre les liens entre les différents paramètres physiologiques, moléculaires et enzymatiques étudiés avec une orientation de tous les paramètres du côté positif de l'axe caractérisé par les traitements aux formulations coquillières Le

biofongicide dénommé ‘‘ Bio-oyster shell biofongicide’’ obtenu est de nature solide sous forme poudreuse ayant un pouvoir hygroscopique moyen de l’ordre de 81 % et possède une durée de conservation de 12 mois au contact de l’oxygène de l’air.

- Le biofongicide ‘‘ Bio-oyster shell biofongicide’’ à la concentration 1 % P/P induit la croissance précoce des plants de cacaoyers et améliore le statut nutritionnel des sols en pépinière de l’ordre moyen de 90 %. Il réduit le degré de sévérité de la pourriture brune et induit l’accumulation rapide des flavonoïdes (sinapoylcholine dimère isomère I, proanthocyanidine), des isoflavones (Genisteine 4’,7-O-diglucosidemethylmalonylated, Quercétine 3-o-glucoside-7-o-rhamnoside,) et flavonol (Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside) avant et après infection. Il induit spécifiquement la synthèse des flavonols (gallocatéchine, rhamnazine et myrecetine) et un dérivé d’acide phénolique (brevifoline) avant et après infection. Il induit également la surexpression des gènes TcPer-1, TcGlu-1, TcChiB et TcMYBPA avant et après infection.

### **Perspectives**

Dans l’optique de parfaire ce travail, il sera important de:

- Réaliser une protéomique différentielle afin d’identifier les protéines induites par le traitement au biofongicide ‘‘Bio-oyster shell biofongicide’’;
- D’étudier les voies de signalisation impliquées dans la surexpression des gènes à travers la caractérisation des miRNA;
- Évaluer l’effet du biofongicide ‘‘Bio-Oyster Shell biofongicide’’ en champ et sur les propriétés nutritionnelles du cacao marchand obtenu.

### **Recommandations**

Au regard des propriétés promotrices de croissance des plantes et stimulatrices des mécanismes de défense des plantes corrélées à son effet significatif sur l’assainissement des sols des pépinières et sur l’obtention des plantes saines et vaccinées de cacaoyers en condition paysanne, le biofongicide ‘‘Bio-Oyster Shell biofongicide’’ est vivement recommandé pour la production à grande échelle des semences à graines et à plant au Cameroun. Ceci permettra de contribuer significativement à la réduction des pertes qui s’opèrent quotidiennement en milieu

semencier au Cameroun. Cette technologie permettra également de réduire l'usage intensif des fertilisants et fongicides chimiques dans certaines strates de l'univers semencier au Cameroun.

# *References*

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdur R., Muhammad S., Naveed A., Khalid N., Syed G.A. (2017). Foliar Calcium Application Ameliorates Salinity-Induced Changes of Tomato Crop Grown in Saline Conditions. *Sarhad Journal of Agriculture*, 33: 540-548.
- Acebo-Guerrero Y., Hernandez-Rodriguez A., Hwyrich-Perez M., Ej-Jaziri M., Hernandez-lauzardo A.N. (2011). Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.) . *A review Fruits*, 67: 41-48.
- AFNOR. (1996). Qualité des sols. Recueil des normes françaises, 3<sup>e</sup> édition, Paris. La défense, 534p.
- Agence bio. (2017). La bio dans le monde. *Les carnets de l'Agence BIO*, Edition 2017.
- Almagro L., Gómez L., Belchi N., Bru R., Ros B., Pedrenô A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botanic*, 60: 377-390.
- Almeida A.F., Valle R.R. (2007). Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 9: 425-448.
- Altunkaya A., Gokmen V. (2007). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total content of fresh lettuce ( *Lactuca sativa*). *Food Chemistry*, 107: 1173-1179.
- Anonyme. (2017). A la découverte du marché des huîtres de Mouanko dans le littoral camerounais. *Journal la voix du paysan*, Edition 2017.
- Arfaoui A., El Hadrami A., Lorne R.A., Fouad D. (2015). Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91: 12-21.

Arfaoui A., El Hadrami A., Fouad D. (2018). Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Physiology Biochemistry*, 122:121-128.

Argout X. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetic*, 42: 101-108.

Attard A., Gourgues M., Galiana E., Panabieres F., Ponchet M. and Keller H. (2008). Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda de Haan). *Plant Physiology*, 165: 83-94.

Baaziz M., EL Hadrami I. (1995). Somatic embryogenesis and analysis of peroxydase in *Phoenix dactylifera*. *Biologia plantarum*, 37:197-203.

Babacauh K.D. (1980). Structure et dynamique des populations de *Phytophthora sp.* parasite du cacaoyer. *Thèse de doctorat d'Etat*. Université de Paris Sud Centre d'Orsay, France. 153 p.

Babin R., Gerben M., Cilas C., Enjalric F., Gendre P., Lumaret J. (2010). Impact of shade on the spatial distribution of *Sahlbergella singularis* in traditional cocoa agroforests. *Agricultural and forest entomology*, 10: 66- 79.

Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Antunezde Mayolo G., Guittinan M.J., Venica J.A., Maximova S.N. and Bowers J.H. (2005). Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. *Plant physiology. Biochemistry*, 43: 611-622.

Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Roberts D.P., Thomas S.E., Crozier J., Samuels I.Y., Choi., Holmes. K.A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cocoa seedling by endophytic isolates of four *Trichoderma species*. *Planta*, 224: 1149-1164.

Benhamou N., Picard. K. (2000). La résistance induite : Une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80: 137-168.

- Benhamou N. (2009). La résistance chez les plantes. Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. *Éditions TEC & DOC - Lavoisier, Paris*. 376 p.
- Benhamou N., Rey P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection*, 92: 24-35.
- Bonanomi G., Lorito M., Vinale F., Woo S. (2018). Organic amendments, beneficial microbes, and soil microbiota: Toward a unified framework for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology*, 56:1-20.
- Boudjeko T., Djocgoue P.F., Nankeu J.D., Mbouobda H.D., Omokolo D.N. et EL Hadrami I. (2007). Luteolin derivatives and heritability of resistance in the *Theobroma cacao* L. (Cacao)/*Phytophthora megakarya* Bra and Griff interaction. *Australian Plant Pathology*, 36: 56-61.
- Boudjeko T., Mouafo T. R. A., Zitouni M., Tchatchou N. J.V., Lerat S. and Beaulieu C. (2017). *Streptomyces cameroonensis* sp. nov., a geldanamycin producer that promotes *Theobroma cacao* growth. *Microbes and Environments*, 23 : 24-31.
- Boyer J. (1982). Les sols ferrallitiques, tome X: Facteurs de fertilité et utilisation des sols. *Initiation et documentation technique n° 35, ORSTOM, Paris*, 384p.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, 72 : 248-254.
- Bud Platt. (2008). Maladies de la pomme de terre causées par des oomycètes. *Cahiers Agricultures juillet-août*, 17:161-167.
- Chang H.L., Do K.L., Muhammad A., Pil J.K. (2008). Effects of oyster shell on soil chemical and biological properties and cabbage productivity as a liming material. *Waste Management*, 28:2702-2708.

- Chang Ha P., Hyeon J.Y., Ye E.P., Se W.C., Young S.C., Sook Y.L., Sang U.P. (2019). Influence of chitosan, salicylic acid and jasmonic acid on phenylpropanoid accumulation in germinated buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*). *Foods Journal*, 8 : 153-163.
- Chang Hoon L., Do K.L, Muhammad A., Pil J. K. (2008). Effects of oyster shell on soil chemical and biological properties and cabbage productivity as a liming material. *Waste Management*, 28: 2702-2708.
- Chang O. H., Sang Y.K., Jessie G., Vance,N.O., Pil J. K. (2010). Comparison of oyster shell and calcium hydroxide as liming materials for immobilizing cadmium in upland soil. *Biology and Fertilization Soils*, 46: 491-498.
- Cuatrecasas J. (1964). Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *From United States Nacional Herbarium in. Smithsonian Institution Press, Washington*, 35: 375-614.
- Dae Sung K., Byung K.H. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 65: 2295-2306.
- Defang Z., Xinrong L., Renjie T. (2012). Application of Bioactive Coatings Based on Chitosan for Soybean Seed Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*.
- Dicko H.M., Gruppen H., Traoré A.S., Voragen A.G.J., Van Berkel W.J.H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology .Molecular. Biology Reviews* , 1: 21-38.
- Djiekpor E.K., Partist M., Lucas P. (1982). La pourriture brune des cabosses du cacaoyer due à *Phytophthora spp.* au Togo: détermination des espèces responsables. *Café Cacao Thé*, 26: 97-108.
- Djocgoué P.F., Mbouobda H.D., Boudjeko T., Effa O.P., Omokolo N.D. (2011). Amino acids, carbohydrates and heritability of resistance in the *Theobroma cacao/Phytophthora megakarya* interaction. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: 370-383.

- DOMORI. (2012). La cacaoculture et l'âme du chocolat. *DOMORI Labo*. 09p.
- Dreher K., Callis J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Annual. of Botany*, 99:787-822.
- Effa O.P., Akoa S.P., Ondobo M.L., Djocgoue P.F. (2016). Assessment of tolerance level to *Phytophthora megakarya* in four hybrid populations of *Theobroma cacao L.* *International Journal of Biosciences*, 9: 53-64.
- Efombang I.B.M., Motomayor J.C., Sounigo O., Eskes A.B., Nyassé S., Cilas C., Schnell R., Manzanares-Dauleux M.J., Kolesnikovaallen M. (2008). Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao L.*) in Cameroon revealed by microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*, 4: 821-831.
- El Hadrami I., Ramos T., El Ballaj M., El Idriss-Tourane A., Macheix J.J. (1997). A sinapic derivative as induced defense compound of date palm against *Fusarium f.sp abledinis*, the causing bayoud disease. *Journal of Phytopathology*, 145:329-333.
- El Mnouchi S. (2015). Le rôle des microRNAs dans la mise en place de la maladie chez les plantes. *Thèse de doctorat*. Université de Sherbrooke, Canada.176p.
- EL Oirdi M., Abd E.R., Rigano T., El Hadrami L., Rodriguez A. (2011). *Botrytis cinerea* manipulates the antagonist effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *The Plant Cell*, 23: 2405-2421.
- Essian J. (2019).La filière cacao se porte mal au Cameroun : Un plan stratégique de la société de développement du cacao veut redynamiser la filière. *Journal Le Jour*. No 2897 du 22 mars 2019.pp 6-7.
- Ethan A., Shaukat A., Emmanuel B., Yang Y., and Madhav N. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes Journal*, 9:339-350.

- Eulgem T., Somssich I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Plant Biology*, 10:366-371.
- Ewane C.A., Chimbe M.A., Ndong E.F., Boudjeko T. (2020). Influence of clam shells and *Tithonia diversifolia* powder on growth of plantain PIF seedlings (Var.French) and their sensitivity to *Mycosphaerella fijiensis*. *African Journal of Agricultural Research*, 15: 393-411
- Faulkner C., Robatzek S. (2012). Plants and pathogens: Putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current. Plant Biology*, 15: 699-707.
- Fister A.S. (2016). Genetics of *Theobroma cacao* L defense response. *Thèse de doctorat*. à Université de Pennsylvanie, USA. 196 p
- Forestier J. (1960). Fertilité des sols de caféiers en République Centrafricaine. III : Etude des sols des caféiers de la Labaye. *Agronomie Tropicale XV*, 1: 9-37.
- Fouad D., Abdelbasset E., Ahmed F., El-Bebany M., Henriquez A., Zhen Y., Holly D., Ismail E., Lorne R.A. ( 2012). Phenolic compounds in plant defense and pathogen counter-defense mechanism. *Chapitre 8 du livre "Recent advances in polyphenol Research, Volume 3, First Edition"*.18p. ‘
- Gauvin P. (2014). Les avantages de l’usage des sous-produits coquilliers comme amendement calcique agricole. *Journal Bord hors-série* , 4:2-8.
- Ghosal T.K., Dutta S., Senapati S.K., Dep D.C. (2004). Role of phenol contents in legume seeds and its effect on the biology of *Collosbrchus chinensis*. . *Annual Plant Protection Science*, 12: 442-444.
- Gidoïn C. (2013). Relations entre structure du peuplement végétal et bioagresseurs dans les agroforêts à cacaoyers. Application à trois bioagresseurs du cacaoyer : la moniliose au Costa Rica, la pourriture brune et les mirides au Cameroun. *Thèse de doctorat*. Université de Montpellier, France .212p.
- Gohre V., Robatzek S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual. Reviews of. Phytopathology*, 46:189-215.

- Harutyunyan S.R., Zhao Z., den Hartog T., Bouwmeester K., Minnaard A.J., Feringa B.L., Govers F. (2008). Biologically active *Phytophthora* mating hormone prepared by catalytic asymmetric total synthesis. *PNAS*, 105: 8507-8512.
- Hilal A.A., Nada M.G.A., Wafaa H.Z. (2006). Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* disease in some umbelliferous medicinal plants as a possible and effective control mean. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 34: 85-101.
- Holly D., Mohamed B., Maria A.H., Zhen Y., Ahmed F.E., Fouad D. (2013). Differential expression of potato defence genes associated with salicylic acid defence signaling pathway in response to weakly and highly aggressive isolates of *Verticillium dahlia*. *Journal of Phytopathology*, 161:142-153.
- Hütz-Adams F.H., Knoke I., Morazán P., Mürlebach M. (2016). Renforcer la compétitivité de la production de cacao et augmenter le revenu des producteurs de cacao en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. *Südwind Journal*, 201: 12-17.
- ICCO. (2013). International cocoa organization. *About-cocoa/growing-cocoa*.
- ICCO. (2013). International cocoa organization. *About-cocoa/growing-cocoa*.
- ICCO. (2016). International Cocoa Organization. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. *Vol. XLII, No. 3, cocoa year 2015/ 16 Published: 31-08-2016*.
- ICCO. (2017). International cocoa organization. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Cocoa year 2016/17*.
- IFOAM. (2017). Les productions Bio dans le monde. *Carnet de l'agence de production biologique., Edition 2017*. 48 p.
- Iriti M., Picchi V., Rossoni M., Gomasasca S., Ludwig N., Gargano M., Faoroa F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, 66:493-500.

- Iwaro A.D., Sreenivasan T.N., Umahara P. (1997). *Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao*): Influence of pod morphological characteristics. *Plant Pathology*, 46: 557-565.
- Jagoret P. (2011). Analyse et évaluation de systèmes agroforestiers complexes sur long terme : Application aux systèmes de culture à base de cacaoyer au centre Cameroun. *Thèse de doctorat PhD*, Université de Montpellier-Supérieure Agronomique, France. 235p.
- Jespers B.K., Davidse L.C., Waard M.A. (1994). Interference of the phenylfungicide fenpiclonil with membranes and membranes functions. *Journal of Pesticide Science*, 40: 133-140.
- Kerebba N., Oyedeji A., Byamukama R., Kuria S., Oyedeji O. (2019). Pesticidal activity of *Tithonia diversifolia* (hemsl) A Gray and *Tephrosia Vogellii* ( Hook.f), Phytochemical isolation and characterization : A review. *South African Journal of Botany*, 121: 366-376.
- Krauss,U. (1994). Spore movement of *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of groundnut in natural field conditions. In T. Martin (Ed.), *Poster and published paper: Seed Treatment - Progress and Prospects* (pp. 339–344). Farnham, UK: British Crop Protection Council.
- Langrand S. (2013). Influence de l'agro-industrie sur la production de cacao au Cameroun. *Bordeaux Science Agriculture*, 3317 p.
- Lee J.Y., Hwang B.K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 407- 417.
- Leelasuphakul. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of beta-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic bacillus subtilis against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 990-997.
- Legavre T., Ducamp M., Sabau X., Argout.X., Fouet O., Dedieu F., Surujdeo-Maharaj S. (2015). Identification of *Theobroma cacao* genes differentially expressed during *Phytophthora megakarya* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 92:1-13.

- Legrand G. (2015). Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée: approche biochimique et moléculaire. *Thèse de doctorat*. Université de Lille 1, France. 348p.
- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and crotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology Journal*, 148: 350-382.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDct method. *Methods*, 25:402-408.
- Luna E., Ton J. (2012). The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signaling Behav*, 7:615–618.
- Manga N.J., Ondobo M. L., Effa P.O., Djoko J.C. K., Djocgoue P.F. (2018). Heterosis, heterobeltiosis, narrow-sense and broadsense heritabilities for *Phytophthora megakarya* tolerance in two populations of *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology*, 17: 495-504
- Marigo G. (1973). On one fractioning methods and estimations of phenolic compounds in the vegetables. *Analyses* , 2:106-110.
- Martin D. (1979). Fertilité chimique des sols d'une ferme du Congo. *Cahier ORSTOM, Science. Pédologique*, 17: 47-64
- Matta C. (2010). Spontaneous Generation and Disease Causation: Anton de Bary's Experiments with *Phytophthora infestans* and Late Blight of Potato. *Journal of the History of Biology*, 43: 459-491.
- Mauch-Mani B., Baccelli I., Luna E., Flors V. (2017). Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68:485-512.
- Mbouobda H.D. (2013). Stimulation des mécanismes de défense par le chitosane et l'acide benzo (1, 2,3) thiadiazole-7-carbothionic-S-methyl ester dans l'interaction *Xanthosoma sagittifolium* (macabo)/*Pythium myriotylum*. *Thèse de doctorat*. Université de Yaoundé I, Cameroun. 140p.

Meteignier L.V. (2015). Investigation sur la régulation traditionnelle pendant la réponse immunitaire végétale par les protéines NB-LRR. *Thèse de doctorat*. Université de Sherbrooke, Canada. 277p.

Mfegue, C.V. (2012). Origine et mécanismes de dispersion des populations de *Phytophthora megakarya*, pathogène du cacaoyer au Cameroun. PhD thesis. SupAgro, Montpellier, France. 185 p.

Minyaka E., Simo C., Kusznierevicz B., Madina B. C .V., Mouen P. J C., Niemenak N., Omokolo N.D.(2017). Flavones in Cocoa Defence against *Phytophthora megakarya*. *Research and Review Journal of Botanical Sciences*, 6: 2320-2347.

Mishra N.S., Tuteja R., and Tuteja N. (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452: 55-68.

Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16: 300-309.

N'goran K.E. (2018). Diagnostic de l'état de fertilité des sols sous culture cotonnière dans les principaux bassins de production de Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 14:221-238.

N'goran K.D., Koné T., Yao K.B., Adou B.Y.C. (2019). Variation des composés phénoliques suite à l'élicitation du cotonnier suivie d'inoculation à *Fusarium Oxysporum* F.sp. *Vasinfestum*. *European Scientific Journal*, 15: 336-353.

Nana L.W., Ekounda V., Mkounga P., Eke P., Nkengfack A.E., Nwaga D. (2016). Potentialisation of the biocontrol efficacy of arbuscular mycorrhizas fungi against cocoa black pod rot causing *Phytophthora megakarya* with natural flavonoid. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 9: 165-181.

Ndombè-Nkeng M. (2002). Incidence des facteurs agroécologiques sur l'épidémiologie de lapourriture brune des fruits du cacaoyer au Cameroun: Contribution à la mise en place d'un modèle d'avertissement agricole. *Thèse de Doctorat*. Institut National agronomique, France.151p.

Ndoumbe-Nkeng M., Cilas C., Nyemb E., Nyasse S., Bieysse D., Flori A., Sache I. (2004). Impact of removing diseased pods on cacao black pod caused by *Phytophthora megakarya* and on cacao production in Cameroon. *Crop Protection*, 23: 415-424.

Ndombé-Nkeng M., Bateman R.P., Fontem D. and Hebbar N.P. (2007). Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cocoa in Cameroon. *Biological control*, 43: 202-212.

Ngadze E., Coutinho T.A., Icishahayo D., Van der waals J. (2014). Effect of calcium soil amendment on phenolic compound and soft rot resistance in potato tuber. *Crop Protection*, 62: 40-45.

Ngadze E., Icishahayo D., Coutinho T.A., Van der Waals J.E. (2012). Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease*, 96: 186-192.

Nicholson R.L., Hammerschmidt R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Resources of Phytopathology*, 30: 369-389.

Nyadanu D., Akromah R., Adomako B., Kwoseh C., Lowor S.T., Dzahini-Obiatey H., Akrofi A.Y., Owusu Ansah F., Opoku A.Y. and Assuah M.K. (2013). Biochemical Mechanisms of Resistance to Black Pod Disease in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3: 20-37.

Nyami B.L., Kachaka S.C., Lejoly J. (2015). Effet du biochar et des feuilles de *Tithonia diversifolia* combine à l'engrais mineral sur la culture du maïs (*Zea mays*) et les propriétés

d'un sol ferrallitique à Kinshasa (RDC)" *Biotechnology-Agronomic and Environmental Journal*, 20: 57-67.

Nyassé S. (1992). Structure d'une population de *Phytophthora* spp. des cacaoyères camerounaises atteintes de la pourriture brune. *DRU de l'Institut National de Polytechnique de Toulouse*.

Nyasse S., Cilas C., Herail C., Blaha G. (1995). Leaf inoculations as an early screening test for cacao (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* Black Pod Disease. *Crop Protection*, 14: 657-663.

Nyassé S. (1997). Étude de la diversité de *Phytophthora megakarya* et caractérisation de la résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à cet agent pathogène. *Thèse de doctorat*. Institut National de Polytechnique de Toulouse, France. 133p.

Olbert N., Charles M.T., Jenny S., Toussaint V., Beaulieu C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* pv *vitians* population sizes stomatal density and lettuce resistance to bacterial leaf spot. *Canadian Journal of Phytopathology*, 4 : 231.

Olbert N., Charles M.T., Jenny S., Toussaint V., Parent S.E., Beaulieu C. (2019). The ionomics of lettuces infected by *Xanthomonas campestris* pv *vitians*. *Frontier in Plant Science* , 10 :351.

Oliveira J., Barreto A., Vasconcelos I., Eloy Y., Gondim D., Fernandes C., Freire-F. (2014). Role of antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and PR proteins in the compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) Genotypes with the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Plant Physiology Pathology*, 2: 3.

ONCC. (2017). National Cocoa and Coffee Board. NCCB Bulletin of Cocoa Statistics, cocoa year 2016/2017 Published: 25-08-2017.

ONCC. (2019.) .National Cocoa and Coffee Board. *NCCB Bulletin of Cocoa Statistics*, cocoa year 2018/2019 Published: 26-08-2019.

Ondobo M.L., Effa O.P., Djocgoué P.F., Boudjeko T., Manga N.J., Djoko K.J.C., Omokolo N.D. (2013). Influence of *Phytophthora megakarya* inoculation on necrosis length, phenolic content, peroxidase and polyphenoloxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L.) plants. *Syllabus Review, Science Series*, 4: 8-18.

Ondobo M.L. (2014). Héritabilité de la résistance à *Phytophthora megakarya* et des composés bioactifs de quelques clones de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Thèse de Doctorat PhD*. Université de Yaoundé I, Cameroun. 158p.

Ondobo M.L., Effa O.P., Djocgoué P.F., Manga N.J., Djoko K.J.C., Omokolo N.D. (2017). Estimation of necrosis length, phenolic content, peroxidase and polyphenoloxidase activity in cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) after *Phytophthora megakarya* inoculation. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 10: 26-36.

Oumar D., Minyaka E., Essoua A.M.L., Njukeng J.N. (2018). Potentials of cocoa pod husk-based compost on *Phytophthora* pod rot disease suppression, soil fertility and *Theobroma cacao* growth. *Environnemental and Science Pollution Research*, 3 : 312.

Pastor V., Luna E., Mauch-Mani B., Ton J., Flors V. (2012). Primed plants do not forget. *Environnemental Experimental Botany Journal*, 94:46-56.

Pastor V., Luna E., Ton J., Cerezo M., Garcia-Agustin P., Flors V. (2013). Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 26:1334–1344.

Paulin D., Ducamp M., Lachenaud P. (2008). New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana. *Crop Protection*, 27: 1143-1147.

Penel C., Valério L., Passardi F., Dobias J., Perez M., Dunand C. (2004). Aspects moléculaire, biochimiques et physiologiques des peroxydases des plantes. *Congrès International de Biochimie Marrakech, Maroc*, 166-169 pp.

- Piotr S., Monika G., Marcin S. (2017). Effects of Chitoooligosaccharide Coating Combined with Selected Ionic Polymers on the Stimulation of *Ornithogalum saundersiae* Growth. *Molecules*, 22:1903-1914.
- Pirovani C.P., Carvalho H.A., Machado R.C., Gomes D.S. (2008). Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, 29: 2391 - 2401.
- Ploetz R.C. (2007). Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*, 97: 1634-1639.
- Poueymiro M. (2009). Caractérisation fonctionnelle des effecteurs de type III de *Ralstonia solanacearum* : AvrA et PopPA délimitant le spectre d'hôte et RipTPS syntétisant une molécule signal chez les plantes. Thèse de doctorat. *Université de Toulouse III Paul Sabatier*, France. 200p.
- Renukaradhya K.M.A.T.H., Jae-Young H.E.O., Hoon K., Han-Dae Y. (2010). Composted oyster shell as lime fertilizer is more effective than fresh oyster shell. *Bioscience and Biotechnology Journal*, 74: 1517-1521.
- Ristaino J.B., Gumpertz M.L. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, 38:541-576.
- Ross W.W., Sederoff R.R. (1992). Phenylalanine ammonia lyase from loblolly pine; Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiology*, 98: 380-386.
- Roy J., Lafontaine P., Chabot R., Beaulieu C. (2010). Dehydrated pork manure by-product: Effects of a chitosan amendment on bacterial community and common scab incidence. *Phytoprotection*, 90:107-115

- Royaert S., Phillips-mora W., Arciniegas L.A.M., Carriage K., Brown J.S., Kuhn D.N., Schnell R.J., Motamayor J.C. ( 2011). Identification of marker- trait associations for self-compatibility in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. *Crop protection*, 5: 1159-1168.
- Rusconi M., Conti A. (2010). *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacology. Ressource Journal*, 6: 5-13.
- Saad A., Kareem S. (2011). Growth and Chlorophyll Responses of Bean Plants to the Chitosan Applications. *European Journal of Scientific Research*, 50: 124-134.
- Saboki E., Usha K., Bhupinder S. (2011). Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. Méndez-Vilas*, 12p.
- Sansregret R. (2015). Étude des réponses de défenses mise en place chez la plante en réaction à la suppression de l'ARN d'interférence. *Thèse de doctorat*. Université de Sherbrooke, Canada.200p
- Santos R.M.F., Lopes U.V., Silva S.D.V.M., Micheli F., Clement D., Gramocho K. (2012). Identification of QTLs linked to Ceratocystis wilt resistance in cacao. *Molecular Breeding Journal*, 3: 342.
- Sarmadi B., Aminuddin F., Hamid M., Saari N., Abdul-Hamid A., Ismail A. (2012).Hypoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. *Food Chemistry*, 134: 905-911.
- Shahin S.A., Jonathan S., Lary D., Strem M., Meinhardt L., Bailey B. (2017). *Phytophthora megakarya* and *P.palmivora*, causal agent of black pod rot, induce similar plant defense responses late during infection of susceptible cacao pods. *Frontière Plant Science*, 8 : 169.

Shen G., Liu X., Zhang S., Jiang Q., Ding W. (2017). Effects of oyster shell powder on metabolic diversity of microorganism in tobacco rhizosphere soil and incidence of bacterial wilt. *Journal of Tobacco Science & Technology*, 50: 22-28.

Siciliano I., Amaral G.C., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. (2015). Jasmonic acid, Abscisic acid and Salicylic acid are involved in phytoalexin responses of rice to *Fusarium fujikuroi*, a high gibberellin producer pathogen. *Journal of Agricultural and Foods chemistry*. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03018.

Simo C., Djocgoue P.F., Mbouobda H.D., Effa, O.P., Boudjeko T., Ndiang Z., Omokolo N.D. (2014). Assessing relationship between phenolic compounds and resistance to *Phytophthora megakarya* using two cocoa (*Theobroma cacao*) families. *African Journal of Biotechnology*, 13: 2956-2965

Simo C., Djocgoue P.F., Minyaka E., Omokolo N.D. (2018). Guaiacol peroxidase heritability in tolerance of cocoa (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora megakarya* agent of cocoa black pod disease. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, .6: 7-20.

Tahi M., Keke I., Eskes A.B., Ouattara S., Sangaré A., Mondeil F. (2000). Dépistage rapides génotypes de cacao pour la résistance à *Phytophthora palmivora* en champ en utilisant des brindilles de feuilles et de racines. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 87-94.

Taiwo M.A., Adekiya A.O. (2016). Effects of Sole and Combined application of maize cob ash and poultry manure on soil properties and cocoyam growth and yield. *International Journal of Agriculture and Economic Development*, 4: 1-20. Tchameni S., Ngonkeu M., Begoude B., Nana L., Fokom R., Owona A., Mbarga J., Tchana T., Tondje P., Etoa F., Kuate J. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop Protection*, 30: 1321-1327.

Tchameni N.S., Sameza M.L., Anthonia O., Ngonkeu M.E., Nana W.L., Fokom R., Etoa, F.X., Nwaga D. (2017). Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora*

*megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. *Mycology*, <http://dx.doi.org/10.1080/21501203.2017.1300199>.

Ten hoopen G.M., Krauss U. (2016). Biological control of cocoa disease. In: Cocoa diseases: a history of old enemies and new encounters. *Bailey BA (ed), Meinhardt LW (ed). Springer Chapter 17,511-566.*

Tene T.P.M., Ewane C.A., Effa O.P., Boudjeko T. (2017). Effects of chitosan and snail shell powder on cocoa (*Theobroma cacao L.*) growth and resistance against black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *African Journal of Plant Science*, 11: 331-340.

Tondje P.R., Hebbar K.P., Samuels G., Bowers J.H., Weise S., Nyemb E., Begoude D., Foko J., Fontem D. (2006). Bioassay of geniculosporium species for *Phytophthora megakarya* biological control on cacao pod husk pieces. *African Journal of Biotechnology*, 5: 648-652.

Ung-Kyu C., Ok-Hwan L., Young-Chan K. (2011). Effect of calcinated oyster shell powder on growth, yield, spawn run and primordial formation of king oyster mushroom. *Molecules*, 16: 2313-2322.

Van Kammenn A., Broumer D. (1964). Increase of polyphenoloxidase activity by a local virus infection in uninoculated of leaves. *Virulogy*, 22: 9-14.

Verica J.A., Maximova N.S., Strem D., Carison E.J., Bailey A.B., Gultinan M.J. (2004). Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao L.*) leaves treated with inducers of defense response. *Plant Cell*, 23: 404-413.

Vos janny G.M., Barbara J., Ritchie., Flood J. (2003). A la découverte du cacao. *Un guide pour la formation des facilitateurs, CABI-Bioscience .115p*

Whitlock B.A., Bayer C., Baum D.A. (2001). Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae ("Sterculiaceae" or Malvaceae.) based on sequences of the chloroplast gene. *Systematic Botany*, 26: 420-437.

- Xiangzong M. and Shuqun Z. (2013). MAPK Cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 12.1-12.22.
- Xing R., Qin Y., Guan X., Liu. S., Yu H., Li P. (2013). Comparison of antifungal activities of scallop shell, oyster shell and their pyrolyzed products. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39:83-90.
- Yaping C., Feingjiao L., Lu T., Mingchao H., Rufang D., Xuelui L., Wei C., Pingzhi W., Meiru L., Huawu J., Guojiang W. ( 2017). The phenylalanine Ammonialyase gene LJPAL1 is involved in plant defense responses to pathogenes and plays diverse role in *Lotus japonicus*-Rhizobium symbioses. *Molecular Plant-Microbes Interaction Journal*, 30:739-753.
- Yi L. (2010). Molecular analysis of gene involved in the synthesis of proantocyanidins in *Theobroma cacao*. *Thèse de doctorat*. Université de Pennsylvanie, USA. 146 p.
- Yi L., Zi S., Maximova S.N., Payne J.M., Gultinan J.M. (2015). Tc-MYBPA is an arabidopsis TT2-Like transcription factor and function in the regulation of proantocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*. *BMC Plant Biology*, 15: 160.
- Young H L., Shah M.D., Asraful I., Sun J., Kye M.C., Renukaradhya K.M., Jae Y.H, Hoon K., Han D.Y . (2010). Composted oyster shell as lime fertilizer is more effective than fresh oyster shell. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry Journal*, 74:1517-1521.
- Yufan Z. (2015). Application of glycerol as a foliar spray activates the defense response and enhances disease résistance of *Theobroma cocoa*. *Journal of molecular plant*, 16: 27-37.
- Zhang Y., Smith P., Maximova S.N., Gultinan M.J. (2015). Application of glycerol as a foliar sprays activates the defense response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. *Molecular plant pathology*, 16: 27-37.
- Zi S., Maximova S.N., Yi L., Verica J., Gultinan J.M. (2010). Funtional analysis of the *Theobromoa Cacao* analysis NPR1 Genes in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 10: 248.

# *Annexes*

## **Annexe 1: Préparation des solutions**

### Solution de BSA (Bovin serum albumin)

La solution de BSA a été préparée par dissolution de 2 mg de poudre de BSA dans 2 ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue était titrée à 1 mg/ml.

### Réactif de Bradford

Le réactif de Bradford a été préparé en dissolvant 50 mg de Bleu de Coomassie dans 25 ml d'éthanol 95 %. Après 30 min d'agitation, 50 ml d'acide orthophosphorique 85 % a été ajouté au mélange suivit d'une agitation supplémentaire de 10 min. Le volume de la solution a été complété à 500 ml avec de l'eau distillée, puis filtré et conservé à 4 °C.

### Solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 %

Elle a été préparée par dissolution de 4 g de poudre de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 20 ml d'eau distillée.

### Solution de Triton X100 1 % V=100mL

Mesurer 2,5 ml de Triton X-100

Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée

Conserver à température ambiante

### Tampon tris-HCL, Triton X-100 C=10mM, pH 7,5, V= 1000mL

Peser -1,58 g de tris-HCl et dissoudre dans de l'eau distillée

Ajouter 100mL de Triton X-100

Ajuster le pH à 7,5

### Solution de catéchine 0,1 mg/ml

Peser 1mg de catéchine et dissoudre dans 10 ml d'eau distillée

### Solution de méthanol 80 %, V= 100 ml

Prélever 80 ml de méthanol pur et introduire dans 20 ml d'eau distillée

Tampon Acétate C= 3M, pH = 4,5, V= 100 ml

Peser 24,6 g d'acétate de sodium et dissoudre dans de l'eau distillée

Ajuster le pH à 4,5 avec de l'acide acétique pur

Tampon tris-maléate C=0,1M, pH=7,2, V=500ml

- 6g de tris base
- 6,7 g d'acide malique
- 277 mg de CaCl<sub>2</sub>
- 1g de guaiacol

Tampon Acétate C= 3M, pH = 4,5, V= 100 ml

Peser 24,6 g d'acétate de sodium et dissoudre dans 100 ml d'eau distillée; ajuster le pH à 4,5 avec de l'acide acétique pur.

Tampon Tris-maléate C=0,1M; pH=7,2; V=500 ml

Peser 6 g de Tris base; 6,7 g d'acide malique; 277 mg de CaCl<sub>2</sub> et les dissoudre successivement dans 500 ml d'eau distillée.

**Annexe 2: Préparation du milieu de culture**

Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar)

400 mL de jus de pomme de terre (obtenue de 200 g de pomme de terre) ; 20 g Glucose; 15 g d'Agar sont dissous dans 600 ml H<sub>2</sub>O pH final 5,6 ± 0,2. Le mélange est cuit et autoclavé à 121°C, pendant 15 min.

**Annexe 3: Traitement du sol**

Prétraitement du sol

Séchage à température ambiante pendant 72 h

Tamassage afin d'éliminer les cailloux et les racines d'arbres

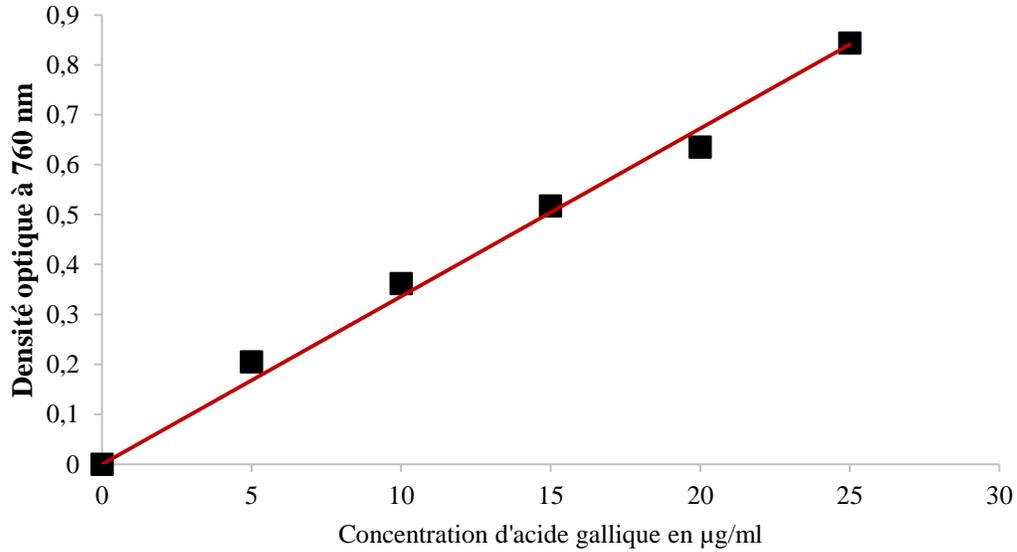
Stérilisation du sol

Le sol a été stérilisé à l'étuve à 121°C pendant 4 h à trois reprises

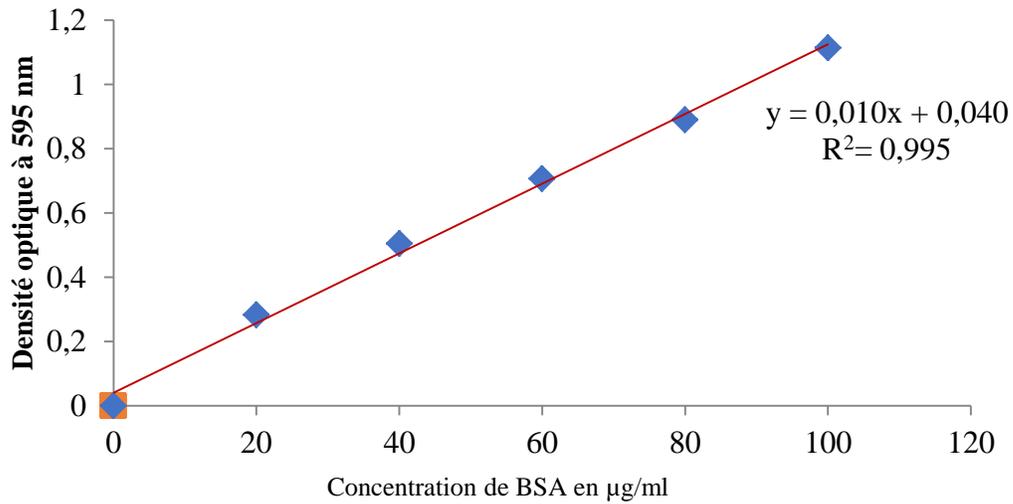
#### Annexe 4: Courbes d'étalonnages

Courbe d'étalonnage des composés phénoliques

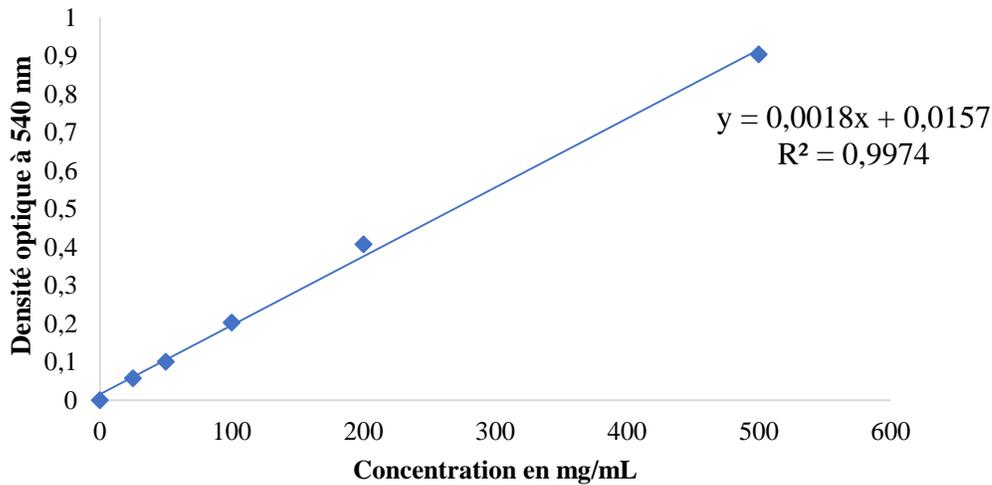
$$y = 0,0336x$$
$$R^2 = 0,9921$$



Courbe d'étalonnage des protéines totales



Courbe d'étalonnage du glucose



Annexe 5: Etiquette du biofongicide "Bio-oyster shells biofungicide"






**BIO-OYSTER SHELL**  
*Biostimulant/Biostimulant*  
*Biofertilisant/Biofertilisant*  
*Biofongicide/Biofongicide*  
**100% Naturel/Natural**  
*The Best Natural source of Chitin and Calcium Carbonate*



Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales (LPVRV)  
 Centre de Biotechnologies, Nkolbisson, UY1  
 et  
 Société Coopérative Agricole Stone  
 BP: 8048 Yaoundé  
 Tel : +237 6 75 34 17 54/ 6 99 08 67 03

**INDICATION**

Les coquilles d'huîtres constituent une source naturelle de chitine et de calcium. Ces biomolécules stimulent la croissance des plantes et boostent la résistance vis-à-vis des phytopathogènes. Les coquilles d'huîtres améliorent la texture du sol en favorisant son aération ainsi que le pH.

*Oyster shell is a natural source of high quality chitin and calcium that provides immediate and sustainable release of nutrients. Oyster shell boost up the plants immunity, improves soil texture, aeration and increases the pH*

**USAGE / APPLICATION**

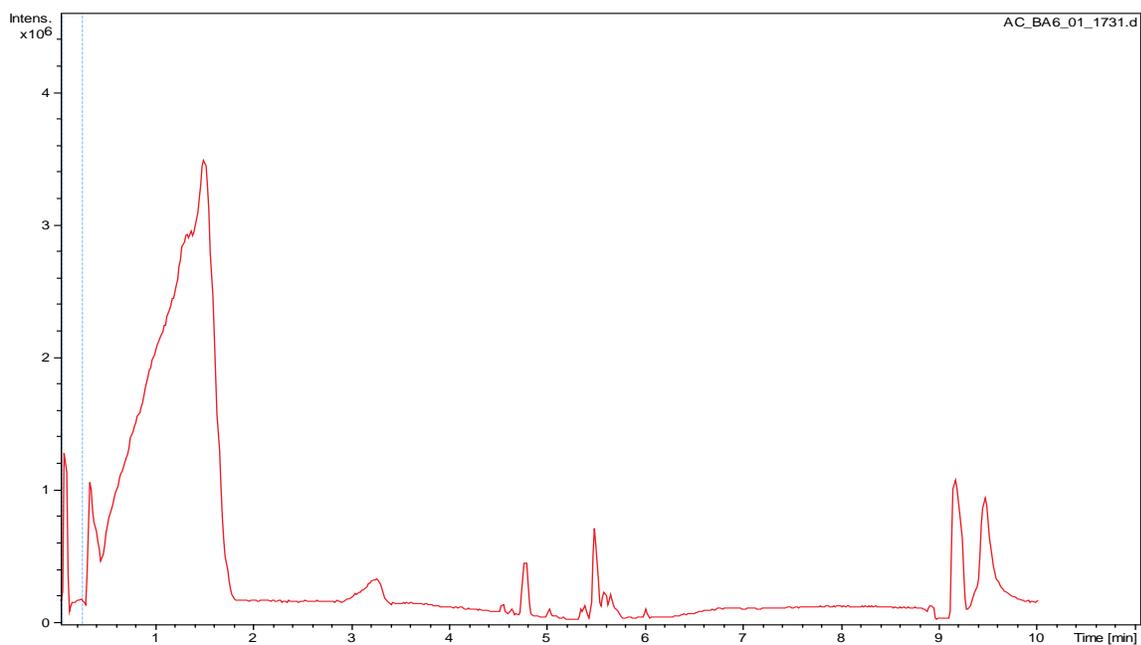
Appliquez deux cuillères à soupe de poudre de coquille pour 1 Kg de sol. Remuer le mélange et introduisez les graines, les explants.

*Apply two tea spoon full of oyster shell powder to 1kg of soil extract, mix thoroughly to ensure total distribution and then introduce the grains or the explants*

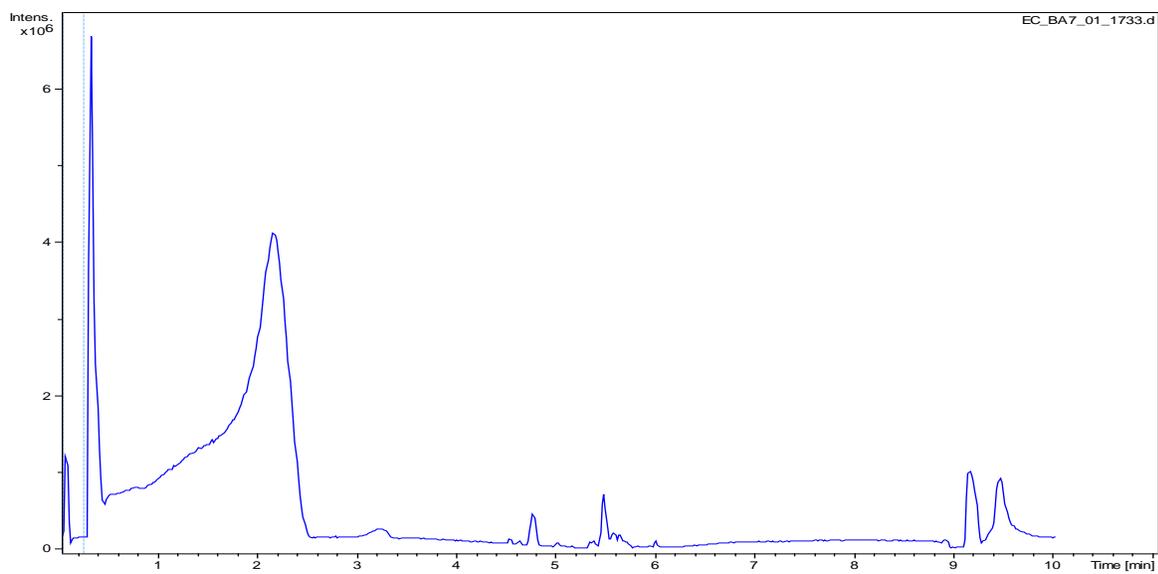
**COMPOSITION**

- Chitine/Chitin - 6-40%, CaCO<sub>3</sub> - 60-90%
- Azote/Nitrogen (N), Phosphore/Phosphorus (P), Potassium (K), Silice/Silicon(Si) - 01-15%
- Extrait acqueux du Bissap/Bissap extract
- Extrait fermenté de *Tithonia diversifolia* / Fermented extract of *Tithonia diversifolia*

## 1. Chromatogramme de l'acide Caféique



## 2. Chromatogramme de l'épicatéchine



## **Annexe 7: Liste des Publications issues de la thèse**

**Tene Tayo Paul Martial**, Dzelamonyuy Aristide, Omokolo Ndoumou Denis, Boudjeko Thaddée. (2019). Enhancement of *Theobroma cacao* seedling growth and tolerance to *Phytophthora megakarya* (causal agent of black pod disease) by heat-treated oyster shell powder nursery soil amendment. *American Journal of Plant Science*. **10: 578-594.**

**Tene Tayo Paul Martial**, Ewane Cecile Annie' Mouafo Tchinda Romaric A, Boudjeko Thaddée. (2017). Decrease of the *Phytophthora megakarya* symptom on cocoa (*Theobroma cacao*) seedling after dried oyster shell nursery soil amendment. *Articles books of Francophone University Agency in Plant biotechnology and Food production*. **63-67.**

# *Publications*

# Enhancement of *Theobroma cacao* Seedling Growth and Tolerance to *Phytophthora megakarya* by Heat-Treated Oyster Shell Powder

Tene Tayo Paul Martial<sup>1,2</sup>, Dzelamonyuy Aristide<sup>1,2</sup>, Omokolo Ndoumou Denis<sup>3</sup>, Boudjeko Thaddée<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Phytoprotection and Plant Valorization, Biotechnology Center, University of Yaoundé I, Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, Yaounde, Cameroon

<sup>3</sup>Department of Biological Science, Laboratory of Plant Physiology, Higher Teacher's Training College, Yaounde, Cameroon

Email: \*boudjeko@yahoo.com

**How to cite this paper:** Martial, T.T.P., Aristide, D., Denis, O.N. and Thaddée, B. (2019) Enhancement of *Theobroma cacao* Seedling Growth and Tolerance to *Phytophthora megakarya* by Heat-Treated Oyster Shell Powder. *American Journal of Plant Sciences*, 10, 578-594.

<https://doi.org/10.4236/ajps.2019.104042>

**Received:** January 2, 2019

**Accepted:** April 20, 2019

**Published:** April 23, 2019

Copyright © 2019 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the ability of oyster shell powder soil amendment to enhance cocoa seedling growth and induce resistance against *Phytophthora megakarya* in nurseries. The results showed that heat-treated oyster shells powder at 1% (w/w) soil amendment significantly increased plant height, leaf number, leaf area, dry shoot and root weight more than chemical fungicide and control treatment after twelve weeks of growth. The results showed that heat-treated oyster shell powder raised soil pH significantly and reduced *P. megakarya* load of the soil suspension by 82%. Assessment of resistance stimulation by leaf inoculation showed the highest level of resistance recorded in plants treated either with heat-treated or non-treated oyster shell powder. Furthermore, total phenolic compounds contents, total soluble proteins contents, polyphenoloxidase, chitinase, peroxidase and  $\beta$ -1,3-glucanases activities increased in both healthy or infected leaves from cacao plants treated with oyster shell powder more than those treated with chemical fungicide. These findings demonstrated that heat-treated oyster shell powder could be used as biofertilizer and biofungicide to improve the quality of cocoa seedling production and protect the plant against *P. megakarya*.

## Keywords

Cocoa, Seedling, *Phytophthora megakarya*, Oyster Shell, Biofungicide

## 1. Introduction

Cacao (*Theobroma cacao* L.), is an important economic crop in numerous developing countries. Cameroon is the fifth largest world cacao producer and its production represents about 30% of non-oil exports and generates revenue of over €152 million per year to more than 600,000 producers [1]. In Cameroon, cacao seedling and beans constitute an important source of revenue for many people. However, its cultivation is faced with numerous problems such as unavailability or insufficient healthy seedlings and parasitic constraints principally black pod disease. In Cameroon Black Pod Disease (BPD) is caused by *P. megakarya* [2].

Many *Phytophthora* species such as *P. megakarya* have a soil-borne phase in their natural life cycles even though disease expression often occurs on aerial plant parts such as cocoa seedling black pod disease [3]. Cocoa seedling production is a key step in the establishment of new cocoa plantations and generally requires forest soil as the production substrate. This soil used to produce the cocoa seedling is usually taken from areas already contaminated by *P. megakarya* [4]. In addition, the Cameroon forest soil generally has a pH of 5 to 6.5 favourable to fungal mycelia growth [5]. Primary inoculum of *P. megakarya* is the soil through which they act as vectors of infection of pods and young cocoa seedlings in nursery [3] [4]. In order to prevent this situation different strategies have been developed. The use of chemical products such as mancozeb or metalaxyl fungicides through soil applications has been reported to provide 50% of cocoa plant protection in some cases [5] [6]. However, soil porosity can influence water transport and thus fungicide movement [7]. Furthermore, the use of synthetic fungicide may be harmful to the environment and its repeated use could result in resistance in the pathogen population and its toxic residue could be accumulated in the plants. Biological control of soil, possible vector of fungal pathogens, is poorly investigated [5].

In this context, biological control using organic substances such as composts, snail shells and oyster shells constitute an alternative method with high efficiency and eco-friendly. Oyster shell is the waste oyster product and its main constituent are calcium carbonate and chitin [8] [9] [10]. Fresh or meal oysters shell is a very good liming material through increasing the soil pH and the modification of the biological properties of soil [11]. The sodium chloride concentration in oyster shell can be decreased by heating and composting. Xing *et al.*, 2013 [12] have reported the capacity of heat-treated oyster shell at 500 ppm to exhibit antifungal activities against plant pathogen more than non-treated oyster shell at 25,000 ppm. Moreover, heat-treated oyster shell has been widely used as liming material, growth stimulator and yield enhancer in many crops such as in soybean [13] and cabbage [14]. Recent studies have reported that oyster shell powder soil amendment reduces the occurrence of tobacco bacterial wilt in fields [15].

This investigation was carried out to assess the effects of the suppressive potential of oyster shell powder amendment and the capacity of this product to

enhance cocoa seedling growth by evaluation of plant agro-morphological characteristics, total phenolic compounds and peroxidase, chitinase, polyphenol oxidases, and  $\beta$ -1,3-glucanase activities.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Soil

The soil used in this experiment was collected from Yaounde (Centre region, Cameroon) and is often used by farmers to sow young cocoa seedlings. The soil was air-dried and passed through a 4 mm sieve before mixing (3:1; v/v) with river sand. Chemical analysis (organic matter, nitrogen, calcium, magnesium, phosphorus contents and pH) of dry soil samples was carried out before the cultivation period. The contents of available nutrients in the soil were: organic matter, 3.40%; nitrogen, 1.23%; calcium,  $6.48 \times 10^{-3}$  meq·g<sup>-1</sup> of soil; magnesium,  $23.20 \times 10^{-3}$  meq·g<sup>-1</sup> of soil; phosphorus, 3.54 meq·g<sup>-1</sup> of soil; and pH was 5.89.

### 2.2. Fungal Strains and Oysters Shell Powder Production

*P. megakarya* (strain PM5) used in this study was obtained from infected cacao pod from Yaounde (Central Region, Cameroon). Zoospore suspensions of *P. megakarya* isolate PM5 were obtained according to [16]. Oyster shell powder was obtained following the method of Xing *et al.*, 2013 [12]. The oyster shells from Mouanko (Littoral Region, Cameroon) were thoroughly washed using tap water and air-dried. They were then heated at 400°C for 5 hours to facilitate the grinding. After this, they were ground in a grinding machine (MS 20B grinding machine), and then sieved using a 0.8 mm sieve to obtain the finest powder. The powder was separated in two parts, and then one part was heated in an oven at 1000°C for 1h according to Xing *et al.*, 2013 [12]. Mancoxyl Plus 720 wp (with active compound mancozeb and metalaxyl) fungicide was purchased at the local market in Yaounde.

### 2.3. Evaluation of Agro-Morphological and Physiological Characters

The agro-morphological characters that were assessed include the dried weight of the plant root and shoot weight, height, leaf number, length, width and area of the leaf. These parameters were assessed every 4 weeks for a period of 12 weeks. To produce the plants, a single cocoa seed from mature cocoa pods (♀ SNK64 × ♂ UPA134) hybrids produced by manual pollination were collected from the SODECAO (“*Société de Développement du Cacao*”) gene banks of Mengang Station (South Region, Cameroon). Cocoa seeds were extracted from the pods, washed with tap water. Seeds of similar weight and size were grouped and sown into each plastic pot, which contained treated and untreated soil. Each treatment was in duplicates of two hundred pots. All the pots were kept in the shade house (farmer condition seedling production) and watered with distilled water every two days for a period of 12 weeks. During assessment at the 4<sup>th</sup> week interval,

roots of harvested plants were washed to remove soil particles and plant height measured with a Vernier caliper. Length and width of leaves measured with a graduated ruler and the weight of shoots and roots of freshly harvested plants then measured separately. The experiment was a completely randomized design with four treatments of non-treated oyster shell powder at 5% w/w (S+OS), heat-treated oyster shell powder at 1% w/w (S+hOS) [12], chemical treatments (S+F) according to the SODECAO cocoa seedling production standard operation procedure and the control (C) (treatments without oyster shell formulation and chemical fungicide). Each treatment consisting of three replicates were repeated twice.

#### 2.4. Induced Resistance Assessment

The tolerance of young cocoa plant seedling was performed as described by [17] with modification. Briefly, leaves from two-month-old cocoa plant were washed thoroughly with distilled water and sterilized with ethanol (70%) for 30 s. The leaf test was performed by deposition on abaxial surface of leaf, a 6 mm mycelium disc from pure culture of *P. megakarya* obtained after 7 days pure culture grown in PDA medium. The inoculated leaves were incubated in humid chamber at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in total darkness. Control leaves were inoculated with sterile agar disc in the same conditions. The experimental design consisted of three replications of ten leaves per seedling. Disease expression was rated six days after, using the rating scale developed by [18]. This experiment was repeated twice, and the disease severity was determined for each treatment by calculating the ratio of the sum of individual scores to the total number of leaves used. The disease severity index used to express the resistance level [19] was as follows: Highly Resistant (HR:  $0 < \text{index} \leq 1$ ); Resistant (R:  $1 < \text{index} \leq 2$ ); Moderately Resistant (MR:  $2 < \text{index} \leq 2.5$ ); Susceptible (S:  $2.5 < \text{index} \leq 3.5$ ); and Highly Susceptible (HS:  $3.5 < \text{index} \leq 5$ ).

#### 2.5. Biochemical Analyses

Biochemical analyses were carried out following the assessment of infection on the whole leaves. The samples involved were cut at 1 cm beyond the necrosis point or beyond the marked scar. Samples from the same treatments were combined. The parts of the leaves from each treatment were combined. For biochemical analyses, each treatment was repeated twice.

#### 2.6. Determination of the Content of Total Phenolic Compounds

The extraction and quantitative measurement of the content of total phenolic compounds were performed as described by [20] with modification. Total phenolic compounds were extracted twice using 80% methanol. One gram of fresh leaves was ground in 10 ml of 80% methanol at  $4^{\circ}\text{C}$ . After 5 min of agitation, the ground material was centrifuged at 10,000 g for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was collected, and the pellet was re-suspended in 5 ml of 80% methanol followed

by agitation for 5 min. After the second centrifugation at 4°C, the supernatant was collected and mixed with the previously collected supernatant to constitute the phenolic extract. The concentration of phenolic compounds was determined spectrophotometrically at 725 nm according to the method of [21], using the Folin-Ciocalteu reagent. Total phenolic compound contents were expressed in mg equivalent of catechin per g of fresh weight.

### **2.7. Determination of the Content of Total Protein**

For the determination of total native protein content, extraction was performed as described by [22]. One g of fresh tissue of inoculated and healthy leaves was ground separately in 10 ml of extraction buffer (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, Triton X-100 1%) at 4°C, stirred for 10 min and kept on ice. The samples were sonicated (8 pulses of 3 s each with 10 s intervals) with the setting at 70% output on an Ultrasonic processor (Gex 130, 130 W), and then centrifuged at 10,000 g for 25 min at 4°C. The pellet was submitted to a second extraction. Both supernatants were mixed with 0.4 volume of n-butanol and 1/10 of 3 M NaAc pH 4.5. The samples were kept on ice for 30 min with agitation every 10 min, and then centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant containing total proteins was stored at 4°C. The proteins were quantified using the [23] method. One ml of Bradford reagent was added to each ml of extract. The absorbance was measured at 595 nm using a UV-VIS 1605 Shimadzu spectrophotometer. BSA was used as the standard.

### **2.8. Determination of Enzymes Activities**

Peroxidase activity was determined in the total native protein extracts according to the method of [24]. The enzyme activity was expressed in enzyme unit per g of fresh weight using spectrophotometry at 470 nm ( $A_{470}/\text{min (EU)}/\text{g fresh weight}$ ). Polyphenoloxidase (PPO) activity was quantified in the total native protein extract as described by [15], using catechol as a substrate. The enzyme activity was expressed as " $A_{330} \text{ nm}/\text{min (EU)}/\text{g fresh weight}$ ".  $\beta$ -1,3-glucanases activity was determined according to the protocol of [25] using laminarin as substrate. The amount of reducing sugars released was calculated from a standard curve prepared with glucose and the glucanase activity was expressed in  $\mu\text{mol glucose equivalent}/\text{min (EU)}/\text{g fresh weight}$ . The chitinase activity was determined by colorimetric assay according to the method of [26] using colloidal chitin as substrate. Chitinase activity is described by unit/g fresh matter/h. One-unit chitinase activity corresponds to an increased absorbance of 0.1 at 500 nm.

### **2.9. Evaluation of the Level of *P. megakarya* Inoculum Load in the Soil**

The evaluation of the suppressive effect of heat-treated and non-treated oyster shell powder in the soil *P. megakarya* load after 12 weeks was done by infecting healthy cocoa pods with some suspension of the soil as described by [22] with

modification. 3-month-old healthy pods (SNK10, susceptible clone) were harvested, washed with tap water, sterilized with 70% ethanol (for 1 min), 10% (v/v) commercial sodium hypochlorite (for 5 min) and rinsed 3 times with sterilized distilled water. The inoculation was carried out by the deposition of 500  $\mu$ l suspensions of untreated and treated soils collected after 12 weeks of experiment on the scar obtained with hand utensils. The scars are then closed with cotton that has been immersed in sterilized water. The soil suspension was obtained by mixing soil with sterilized distilled water. That is, 2 g of soil sample was mixed with 10 ml of sterilized distilled water, shaken and allowed to stand for 10 min. A control constituted of pods inoculated with only sterilized distilled water was realized. The entire inoculated pods were incubated in a dark room at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in a humid chamber. The level of necrosis was quantitatively evaluated every two days for 12 days by measuring the necrosis length.

### 2.10. Statistical Analysis

Data analysis was performed using the Statistics software version 9.0. All results were expressed as means  $\pm$  standard deviation and subjected to Analysis of Variance (ANOVA). Where significant differences were found, pairs of samples were compared by Tukey's test at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Agro-Morphological Characteristics

Twelve weeks after planting, plant height, leaf number, leaf area, root and shoot dry matter were variably affected (**Table 1**). Heat-treated (S+hOS) and non-treated oyster shell (S+OS) powder soil amendment significantly increased leaf number and plant height, compared to the chemical (S+F) and control (C) treatments (**Table 1**). The plant height was high in heat-treated oyster shell treatment compared to non-treated oyster shell powder treatment with  $28 \pm 1.1$  and  $24.96 \pm 0.84$  cm respectively. The difference in the mean of leaves of cocoa seedlings grown in soil treated with oyster shell powder was statistically significant between that of chemical and control (non-sterilized soil treatment). The leaf area was significantly different from non-treated treatment compared to treated treatment (**Table 1**). Plant dry matter increased in the presence of oyster shell powder (S+hOS and S+OS). The shoot dry matter was  $9.44 \pm 0.43$  g/plant,  $7.67 \pm 1.03$  g/plant, respectively for heat-treated oyster shell (S+hOS) and non-treated oyster shell (S+OS) treatment. This organic matter also increased root dry matter by  $6.89 \pm 0.41$  and  $4.15 \pm 0.64$  g/plant respectively for heat-treated oyster shell (S+hOS) and non-treated oyster shell (S+OS) treatment. Moreover, smaller changes in the agro-morphological characters were recorded for non-treated cocoa seedling.

### 3.2. Leaf Inoculation and Infection Intensity Indexing

Six days after leaf inoculation, necrotic lesions were observed on all the leaves inoculated with mycelium disc from pure culture of *P. megakarya* whilst no

**Table 1.** Effect of non-treated and heat-treated oyster shell powder on agro-morphological characteristics of cocoa seedling after twelve weeks of growth.

Treatment	Number of leaf/plant	Leaf area (cm <sup>2</sup> )	Plant height (cm)	Dry shoot weight (g/plant)	Dry root weight (g/plant)
Control	5 ± 0.52 <sup>c</sup>	31.81 ± 0.28 <sup>b</sup>	15 ± 0.11 <sup>d</sup>	2.42 ± 0.50 <sup>b</sup>	1.18 ± 0.66 <sup>c</sup>
S+F	7 ± 0.52 <sup>b</sup>	36.96 ± 0.56 <sup>b</sup>	19.4 ± 0.93 <sup>c</sup>	4.12 ± 0.67 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.45 <sup>c</sup>
S+OS	9 ± 0.51 <sup>a</sup>	42 ± 0.58 <sup>ab</sup>	24.96 ± 0.84 <sup>b</sup>	7.67 ± 1.03 <sup>a</sup>	4.15 ± 0.64 <sup>b</sup>
S+hOS	10 ± 0.51 <sup>a</sup>	64.81 ± 5.1 <sup>a</sup>	28 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.44 ± 0.43 <sup>a</sup>	6.89 ± 0.41 <sup>a</sup>

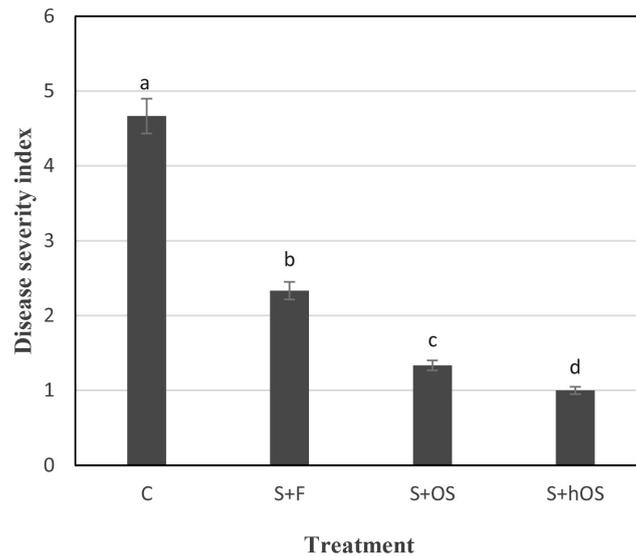
Each treatment consisting of two hundred replicates was repeated twice. Means with the same letter within a column are not significantly different at  $p < 0.05$ . Control: none-sterilize Soil, S+F: Soil + fungicide, S+OS: non-sterilize Soil + non-treated oyster, S+hOS: shell non-sterilize Soil + heat-treated oyster shell.

symptom was seen on leaves inoculated with sterile agar disc. Analyses of variance showed that disease expression was significantly different among treatments ( $p < 0.05$ ) (Figure 1). The highest level of disease severity index (lowest level of resistance) was observed with treatments without oyster shell powder and chemical treatment; these plants were therefore classified as highly susceptible (Figure 1). The lowest disease symptom was recorded in plants treated with both non-treated oyster shell powder and heat-treated oyster shell powder, showing a disease severity index of 1.0 for heat-treated oyster shell powder treatment and 1.4 for non-treated oyster shell powder. These plants were classified as resistant ( $1 < \text{index} < 2$ ) (Figure 1). As far as, the chemical treatment showed the lowest disease severity index with 2.33, then these plants were classified as moderately resistant ( $2 < \text{index} < 2.5$ ).

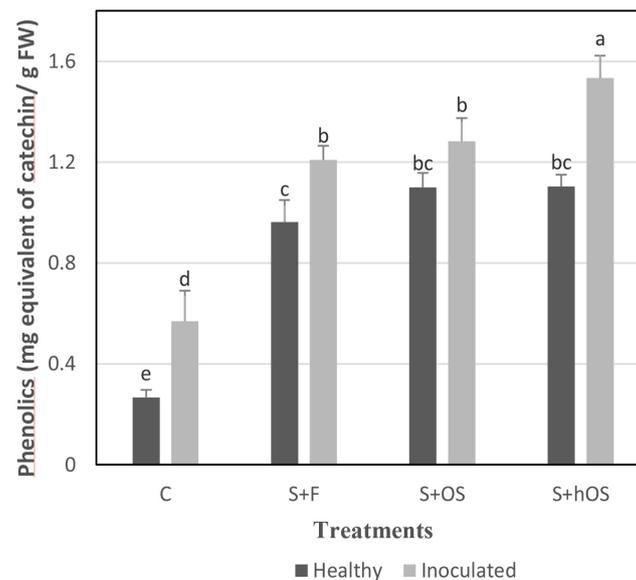
### 3.3. Phenols and Proteins Contents

The total phenolic compounds content in non-inoculated plants was lower than the inoculated ones. The inoculations of leaves had a significant effect on total phenolic contents in all the treatments. The treatment of plants with heat-treated and non-treated oyster shell powder before and after inoculation showed higher level of phenolic compounds than in the control plants (non-sterilized soil and chemical treatment). Heat-treated oyster shell powder treatment had a more significant effect as compared to chemical treatment (Figure 2). Heat-treated oyster shell powder showed an increase of phenolic compound after inoculation, with an increase of 53.43% compared to 25.57% of chemical treatment.

The amount of proteins was lower in the plants grown in chemical and non-sterilize soil treatments before and after inoculation. The treatment with heat-treated and non-treated oyster shell powder increased the protein level in healthy and inoculated plants (Figure 3). The inoculation induced a significant accumulation of proteins in the cocoa plants treated with oyster shell powder with an average of 7.9 mg Equivalent of BSA/g fresh weight, and this amount significantly rose to 28% in all the plant leaves after inoculation. The protein accumulation after inoculation was higher in plants treated with heat-treated oyster shell than those treated with chemical fungicide (Figure 3).



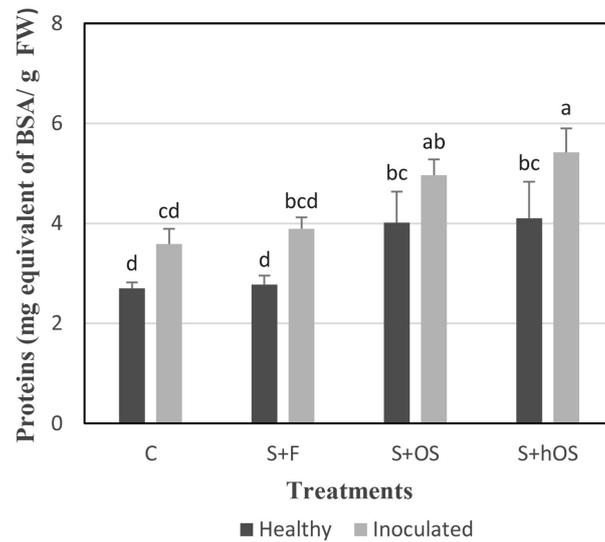
**Figure 1.** Disease severity of plants treated and non-treated with oyster shell powder six days after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.



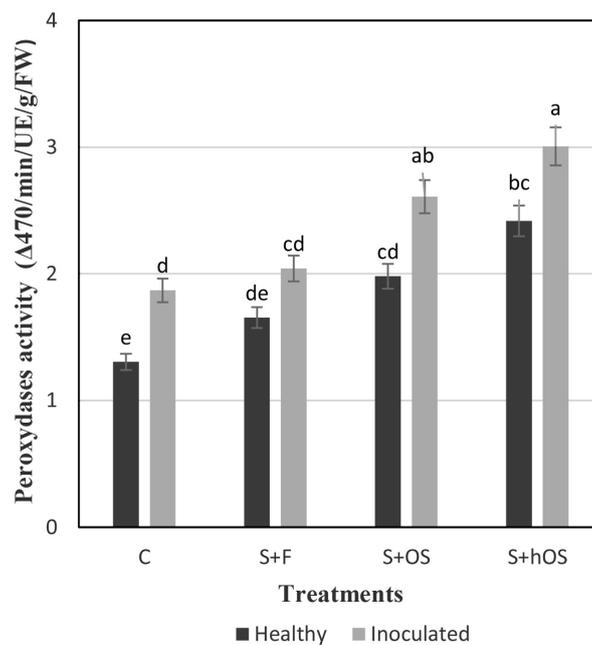
**Figure 2.** Variation of total phenolic content in plant treated and non-treated with oyster shell powder before and after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.

### 3.4. Enzymatic Activities

The peroxidase (POX) and polyphenoloxidase (PPO) activities in the protein extract varies in function of the health status of the plant (**Figure 4** and **Figure 5**). The peroxidase accumulation was higher in the plant treated with oyster shell

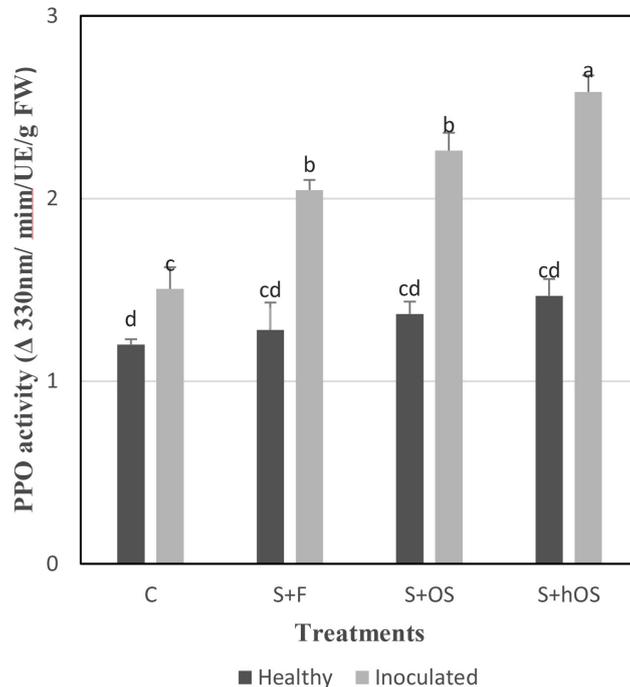


**Figure 3.** Variation of total proteins content in plant treated and untreated with oyster shell powder before and after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.



**Figure 4.** Variation of total peroxidases activities in plant treated and untreated with oyster shell powder before and after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.

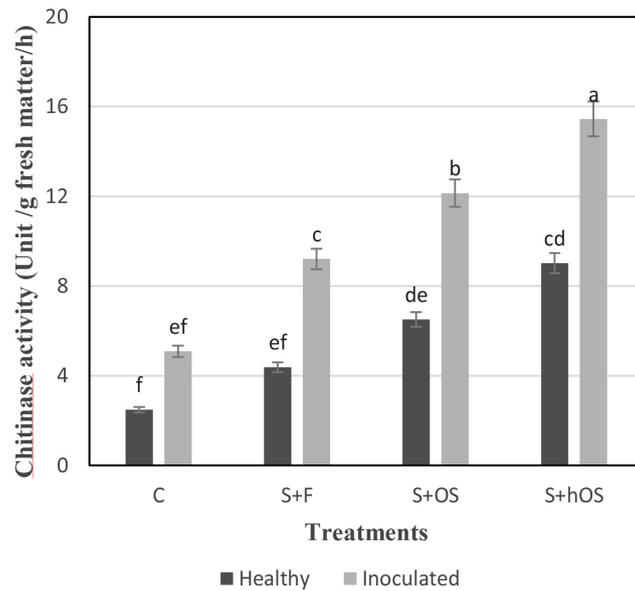
powder with average of 2.81 UE/g of fresh weight compare to the chemical treatment, and this amount significantly rose to 40 % in all oyster shell treatment after inoculation (S+OS and S+hOS). Furthermore, there was a significant



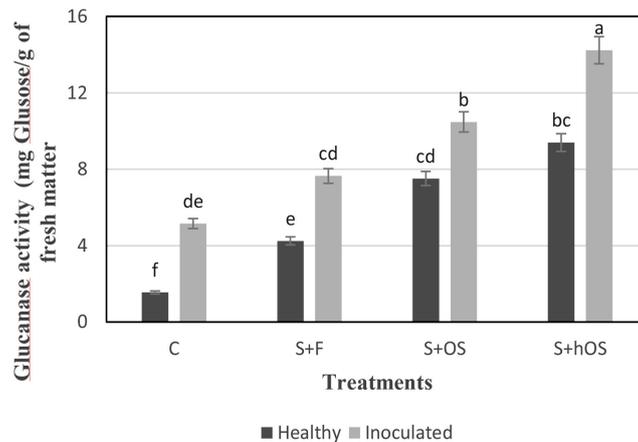
**Figure 5.** Variation of total polyphenoloxidases activities in plant treated and untreated with oyster shell powder before and after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: Control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.

difference in peroxidase accumulation between the leaves of plant treated with chemical fungicide and those without any treatment (Figure 4). The activity of polyphenoloxidase was much higher in plant grown in soil treated with heat-treated oyster shell powder after infection compare to the other treatments (Figure 5). The polyphenoloxidase accumulation level was increased in leaves from plant treated with heat-treated oyster shell powder to 74% after inoculation compared to the chemical treatment which increased to 59%. There was no significant difference in the polyphenoloxidase level between the non-treated oyster shell powder and heat-treated oyster shell powder treatment before infection (Figure 5).

The  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activity of plant leaves grown in heated oyster shell powder soil treatment before and after inoculation was significantly different from that of the treatments C and S+F respectively (Figure 6 and Figure 7). In plants treated with oyster shell powder, the chitinase was higher in the non-inoculated plants with an average of 7.76 UE/g of fresh weight, and this amount significantly increases by 80% in all plant leaves after inoculation (S+OS and S+hOS). Therefore, there was a significant difference in chitinase accumulation after inoculation between the leaves of plants treated with chemical fungicide and those without any treatment (Figure 6). The  $\beta$ -1,3-glucanase accumulation level is highest in leaves from plant treated with heat-treated oyster shell



**Figure 6.** Variation of total chitinases activities in plant treated and untreated with oyster shell powder before and after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.



**Figure 7.** Variation of total  $\beta$ -1,3-glucanases activities in plant treated and untreated with oyster shell powder before and after inoculation. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.

powder treatment before and after inoculation as compare to non-treated oyster shell powder and chemical treatment. In effect, the inoculation enhances the  $\beta$ -1,3-glucanase accumulation level to 51 % in S+hOS treatment and 39 % in S+OS treatment. Furthermore, there was a significant difference in  $\beta$ -1,3-glucanase accumulation between the leaves from plants treated with chemical fungicide and those without any treatment (Figure 7).

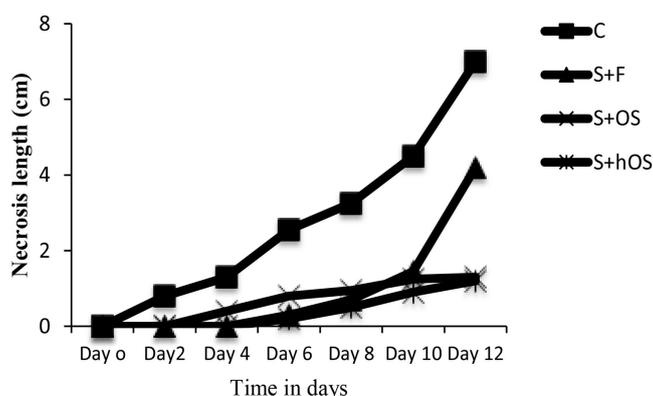
### 3.5. Evaluation of *P. megakarya* Soil Inoculum Load and Soil pH

The results obtained after 12 days of inoculation of cacao pods with soil suspension from various batches showed a weak degree of necrosis on pods inoculated with soil suspension treated with heat-treated and non-treated oyster shell powder. The cocoa pods inoculated with non-treated soil suspension presented greater levels of necrosis (Figure 8). There was absence of necrosis in treatments with heat-treated and non-treated oyster shell powder for the first four days, whereas by the second day, the control (C) had developed necrotic lengths of 0.8 cm. By the 12<sup>th</sup> day, necrotic lengths had been developed in all treatments at different levels (Figure 8). Necrotic levels in sample treated with chemical fungicide were a bit higher than with a sample treated with both heat-treated oyster shell and non-treated oyster shell powder by a difference factor of 2.8. Generally, adding oyster shell powder in soil reduced the fungal load averagely by 82 % as compared to non-sterilize soil treatment while addition of chemical fungicide reduced fungal load by 40% on average.

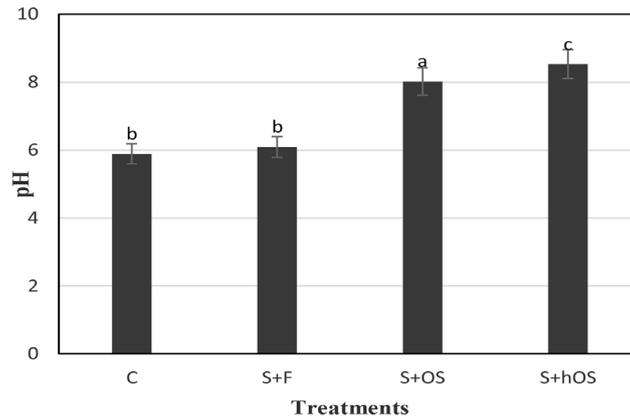
The original pH of the soil determined before treatment and planting of the plant was gotten as 5.89; close to the acidic pH. After the substrate was treated with oyster shell and the plant grown for 12 weeks, the pH increased in every treatment at different rates (Figure 9). The pH of substrate treated with oyster shell increased more significantly than in the rest of the treatments with an average percentage of 32%.

## 4. Discussion

The results from nursery pot experiments showed that the heat-treated oyster shell powder significantly increased the growth parameters of cocoa seedling more than non-treated oyster shell powder and chemical fungicide treatment. This finding agrees with [13] report, who found that heat-treated oyster shell



**Figure 8.** Variation of necrosis length on cocoa pod inoculated with soil treated and untreated with oyster shell powder after twelve weeks of growth. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.



**Figure 9.** Variation of soil pH in soil after twelve weeks of growth. Each treatment consisting in three replicates were repeated twice. Means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ . C: control, S+F: chemical treatments with fungicides, S+OS: non-treated oyster shell, S+hOS: heat-treated oyster shell.

powder increased root and shoot fresh weight in soybean and cabbage respectively more than non-treated oyster shell powder. The plant growth promoting effects of heat-treated oyster shell powder observed in this study can be due to their chemical composition. In effect, many reports have shown that the heat-treated oyster shell powder is mainly composed of calcium oxide and chitin which have the properties to stimulate plant growth [12] [27]. However, [4] showed that the addition of heat-treated oyster shell powder in soil increased the organic matter available, exchange cation concentrations and soil pH. Recent study has shown that the increased of the morphophysiological parameters translates an improvement in the health status of the plant and the healthier sanitary condition of nursery soil [22] [28].

The low level of necrosis observed in pods inoculated with soil samples treated with non-treated and heat-treated oyster shell powder after twelve days of inoculations could be related to the reduction of the *P. megakarya* load in soil. This decrease could be due to modification of soil microbial flora and nutrients which lead to the healthier condition observed in plant treated with heat-treated oyster shell powder compared to the control plants. This result agrees with [29] who found that oyster shell powder soil amendment of tobacco field decrease tobacco bacterial wilt incidence by 43.33% and modify soil bacteria flora such as actinobacteria. Furthermore, higher pH and higher calcium concentration are important for plant disease control [13]. Our result showed that soil samples treated with oyster shell increased in pH by 32%. These results corroborate with the finding of [30] who showed that addition of oyster shell in soil increased the pH by a factor of 0.4 to 0.5. The application of oyster shell powder can raise soil pH, promote the metabolic diversity of soil microorganisms and the stability of soil micro-ecology environment, and further achieve better control efficiency on tobacco bacterial wilt [29].

Pathogenicity tests showed that leaf disease symptoms were significantly re-

duced in plants treated with oyster shell powder. This decrease of leaf disease symptoms could be correlated to the higher levels of resistance which might be due to the stimulation of cocoa seedling defense mechanisms by heat-treated oyster shell powder component such as chitin and calcium. [12] and [31] argued that organic chitinous amendment exhibited antifungal activities and stimulated plant defense mechanisms. Results from these studies suggested that the mechanism of disease suppression could be the induction of systemic resistance since there was no direct contact between *P. megakarya* and oyster shell powder within the plant. This occurrence was established in our study by the significant higher accumulation of a phenolic compounds, total soluble protein content and higher polyphenoloxidases, peroxidases, chitinases and glucanase activity in the leaves of cacao seedlings following oyster shell powder treatment in comparison to the control plants. These enzymes are well known as molecules involved in numerous plant functions, among which the defense mechanism of plant against pathogenic agents.

## 5. Conclusion

The present study clearly demonstrated that the nursery soil treatment with heat-treated oyster shell powder increases cocoa seedling growth parameters. This came along with the reduction of *P. megakarya* soil load and enhancement of soil pH. Moreover, this treatment induced disease tolerance in cocoa (*T. cacao*) seedlings against infection with *P. megakarya*. Therefore, further study is needed to evaluate their effect on plant defense related gene and apoplastic proteins expression. The heat-treated oyster shell powder treatment could be an environmentally safe approach in controlling *P. megakarya* damage in nursery. As a result, the heated-treated oyster shell powder used in this study can be formulated and used by farmers as biofertilizers as well as biofungicide in the production of organic cocoa seedling and several economically important crops in the country.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the institutional and material support from the Biotechnology Centre of the University of Yaounde I. The study was partially supported by the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). The authors are also grateful to M. Sipping Kemegne Maruis Tresor for his excellent technical assistance.

## Conflicts of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

## References

- [1] The International Cocoa Organization (2016) World Cocoa Bean Production, Grindings and Stocks. *ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, **42**. <https://www.icco.org/about-us/icco-news/317-may-2016-quarterly-bulletin-of-coco>

[a-statistics](#)

- [2] Ndoumbe-Nkeng, M., Cilas, C., Nyemb, E., Nyasse, S., Bieysse, D., Flori, A. and Sache, I. (2004) Impact of Removing Diseased Pods on Cacao Black Pod Caused by *Phytophthora megakarya* and on Cacao Production in Cameroon. *Crop Protection*, **23**, 415-424. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.09.010>
- [3] Ristaino, J.B. and Gumpertz, M.L. (2000) New Frontiers in the Study of Dispersal and Spatial Analysis of Epidemics Caused by Species in the Genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, **38**, 541-576. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.541>
- [4] Mfegue, C.V., Herail, C., Adreit, H., Mbenoun, M., Techou, Z., Ten Hoopen, M., Tharreau, D. and Ducamp, M. (2012) Microsatellite Markers for Population Studies of *Phytophthora megakarya* (Pythiaceae), a Cacao Pathogen in Africa. *American Journal of Botany*, **99**, 353-356. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200053>
- [5] Ten Hoopen, G.M. and Krauss, U. (2016) Biological Control of Cocoa Disease. In: Bailey, B.A. and Meinhardt, L.W., Eds., *Cocoa Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*, Springer, Cham, 511-566.
- [6] Sonwa, D.J., Coulibaly, O., Weise, S.F., Adesina, A.A. and Janssens, M.J.J. (2008) Management of Cacao: Constraints during Acquisition and Application of Pesticides in the Humid Forest Zones of Southern Cameroon. *Crop Protection*, **27**, 1159-1164. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.02.004>
- [7] Krauss, U. (1994) Spore Movement of *Mucor hiemalis* in the Rhizosphere of Groundnut in Natural Field Conditions. In: Martin, T., Ed., *Seed Treatment-Progress and Prospects Farnham*, British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK, 339-344.
- [8] Seo, D.C., Cho, J.S., Lee, H.J. and Heo, J.S. (2005) Phosphorus Retention Capacity of Filter Media for Estimating the Longevity of Constructed Wetland. *Water Research*, **39**, 2445-2447. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.032>
- [9] Chang, O.H., Sang, Y.K., Jessie, G., Vance, N.O. and Pil, J.K. (2010) Comparison of Oyster Shell and Calcium Hydroxide as Liming Materials for Immobilizing Cadmium in Upland Soil. *Biology and Fertilization Soils*, **46**, 491-498. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0458-8>
- [10] Maia, B., Arcaro, S., Souza, M., Novaes, D.O. and Neto, J. (2015) Characterization of Sand Casting and Oyster Shells as Potential Sources of Raw Material to Produce Soda-Lime Glasses. *Chemical Engineering and Transformation Journal*, **43**, 1795-1800.
- [11] Onwuka, M.I., Osodeke, V.E. and Ano, A.O. (2009) Use of Liming Materials to Reduce Soil Acidity and Affect Maize (*Zea mays* L.) Growth Parameters in Umudike, Southeast Nigeria. *Plant Technology Journal*, **5**, 386-396.
- [12] Xing, R., Qin, Y., Guan, X., Liu, S., Yu, H. and Li, P. (2013) Comparison of Anti-fungal Activities of Scallop Shell, Oyster Shell and Their Pyrolyzed Products. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **39**, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.07.003>
- [13] Young, H.L., Shah, M.D., Asraful, I., Sun, J., Kye, M.C., Renukaradhya, K.M., Jae, Y.H., Hoon, K. and Han, D.Y. (2010) Composted Oyster Shell as Lime Fertilizer Is More Effective than Fresh Oyster Shell. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry Journal*, **74**, 1517-1521. <https://doi.org/10.1271/bbb.90642>
- [14] Chang, H.L., Do, K.L., Muhammad, A. and Pil, J.K. (2008) Effects of Oyster Shell on Soil Chemical and Biological Properties and Cabbage Productivity as a Liming Material. *Waste Management*, **28**, 2702-2708.

- <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.12.005>
- [15] Van Kammenn, A. and Broumer, D. (1964) Increase of Polyphenoloxidase Activity by a Local Virus Infection in Uninoculated Parts of Leaves. *Virology*, **22**, 9-14. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(64\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(64)90042-X)
- [16] Tondje, P.R., Hebbbar, K.P., Samuels, G., Bowers, J.H., Weise, S., Nyemb, E., Begoude, D., Foko, J. and Fontem, D. (2006) Bioassay of *Geniculosporium* Species for *Phytophthora megakarya* Biological Control on Cacao Pod Husk Pieces. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 648-652
- [17] Djougoue, P.F., Boudjeko, T., Mbouobda, H.D., Nankeu, D.J., El Hadrami, I. and Omokolo, N.D. (2007) Heritability of Phenols in the Resistance of *Theobroma cacao* against *Phytophthora megakarya*, The Causal Agent of Black Pod Disease. *Journal of Phytopathology*, **155**, 519-525. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01268.x>
- [18] Nyasse, S., Cilas, C., Herail, C. and Blaha, G. (1995) Leaf Inoculations as an Early Screening Test for Cacao (*Theobroma cacao* L.) Resistance to *Phytophthora* Black Pod Disease. *Crop Protection*, **14**, 657-663. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00054-2](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00054-2)
- [19] Paulin, D., Ducamp, M. and Lachenaud, P. (2008) New Sources of Resistance to *Phytophthora megakarya* Identified in Wild Cacao Tree Populations of French Guiana. *Crop Protection*, **27**, 1143-1147. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.01.004>
- [20] Boudjeko, T., Djougoue, P.F., Nankeu, D.J., Mbouobda, H.D., Omokolo, N.D. and El Hadrami, I. (2007) Luteolin Derivatives and Heritability of Resistance to *Phytophthora megakarya* in *Theobroma cacao*. *Australian Plant Pathology*, **36**, 56-61. <https://doi.org/10.1071/AP06083>
- [21] Marigo, G. (1973) Méthode de Fractionnement et d'Estimation des Composés Phénoliques Chez les Végétaux. *Analysis*, **2**, 106-110.
- [22] Tene, T.P.M., Ewane, C.A., Effa, O.P. and Boudjeko, T. (2017) Effects of Chitosan and Snail Shell Powder on Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Growth and Resistance against Black Pod Disease Caused by *Phytophthora megakarya*. *African Journal of Plant Science*, **11**, 331-340. <https://doi.org/10.5897/AJPS2016.1487>
- [23] Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [24] Boudjeko, T., Omokolo, N.D., Driouich, A. and Balangé, A.P. (2005) Peroxidase and Pectin Methylsterase Activities in Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) Roots upon *Pythium myriotylum* Inoculation. *Journal of Phytopathology*, **153**, 409-416. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00993.x>
- [25] Leelasuphaku, W., Sivanunsaku, P. and Phongpaichit, S. (2006) Purification, Characterization and Synergistic Activity of  $\beta$ -1,3-Glucanase and Antibiotic Extract from an Antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against Rice Blast and Sheath Blight. *Enzyme and Microbe Technology Journal*, **38**, 990-997. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.030>
- [26] Priminho, P.C., Heliana, A.S.C., Regina, C.R.M., Dayane, S.G., Fatima, C.A. and Fabienne, M. (2008) Protein Extraction for Proteome Analysis from Cacao Leaves and Meristems, Organs Infected by *Moniliophthora perniciosa*, the Causal Agent for the Witches' Broom Disease. *Electrophoresis*, **29**, 2391-2401. <https://doi.org/10.1002/elps.200700743>

- [27] Lefan, L., Zongqiang, Z., Zhifen, W., Zheng, P., Xiaodong, S., Sidong, L. and Jieping, Z. (2017) Effect of Oyster Shell Powder Loading on the Mechanical and Thermal Properties of Natural Rubber/Oyster Shell Composites. *Polymer Composition*, **25**, 1-22.
- [28] Tchameni, N.S., Sameza, M.L., Anthonia, O., Ngonkeu, M.E., Nana, W.L., Fokom, R., Etoa, F.X. and Nwaga, D. (2017) Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and Its Potential to Promote Cacao Growth and Induce Biochemical Defence. *Mycology*, **8**, 1-9.  
<https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1300199>
- [29] Shen, G., Liu, X., Zhang, S., Jiang, Q. and Ding, W. (2017) Effects of Oyster Shell Powder on Metabolic Diversity of Microorganism in Tobacco Rhizosphere Soil and Incidence of Bacterial Wilt. *Journal of Tobacco Science and Technology*, **50**, 22-28.
- [30] Gauvin, P. (2014) Les Avantages de L'Usage des Sous-Produits Coquilliers Comme Amendement Calcique Agricole. *Journal de Bord Hors-Série*, **4**, 2-8.
- [31] Roy, J., Lafontaine, P., Chabot, R. and Beaulieu, C. (2010) Dehydrated Pork Manure By-Product: Effects of a Chitosan Amendment on Bacterial Community and Common Scab Incidence. *Phytoprotection*, **90**, 107-115.  
<https://doi.org/10.7202/045779ar>

## Diminution des symptômes de *Phytophthora megakarya* sur les plantules de cacaoyers (*Theobroma cacao*) après addition des coquilles d'huitres au milieu de culture.

Martial Paul **Tene Tayo**<sup>1, 2</sup>, R. A. Mouafo Tchinda<sup>1, 2</sup>, C. A. Ewane<sup>1, 2</sup> et T. Boudjeko<sup>1, 2</sup>

1. Département de Biochimie, Université de Yaoundé I, Cameroun.
2. Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales, Centre de Biotechnologie Nkolbisson, BP 3851 Messa, Cameroun.

**Courriel :** boudjeko@yahoo.com

### Résumé

*Phytophthora megakarya* est l'oomycète responsable de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer au Cameroun. Le sol étant le foyer d'infection primaire, elle inflige des pertes sévères en pépinières ainsi qu'en champ. La recherche des meilleures combinaisons parentales couplées à l'application des fongicides chimiques constitue les stratégies de lutte contre la pourriture brune. Toutefois l'utilisation des fongicides représente un danger pour la santé publique et pour l'environnement. Le recours aux substances organiques biodégradables et non phytotoxiques constitue une alternative<sup>(2)</sup>. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des coquilles d'huitres sur la croissance de *Theobroma cacao* et la résistance à *Phytophthora megakarya*. Après seize semaines de croissance, une série de changements morphologiques et sanitaires chez les plantes traitées respectivement aux coquilles d'huitres ont été notées. Les tests sur disques de feuilles montrent un faible index de sévérité de la maladie (1 à 1,4) chez les plantes traitées avec les coquilles d'huitres. Ces résultats ont montré que les coquilles d'huitres pourraient servir de bio-fongicides dans le contrôle de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en pépinière. Ainsi une analyse protéomique comparative permettra d'identifier les protéines induites par l'amendement coquillière.

**Mots clés :** *Phytophthora megakarya*, *Theobroma cacao*, coquilles d'huitres, biofongicide.

### Introduction

Le cacaoyer constitue l'une des principales cultures de rente pour le Cameroun et d'autres pays d'Afrique centrale et de l'ouest. Au Cameroun, la culture du cacao représente près de 30% des exportations directes non pétrolières et génère environ 250 millions de dollars US de revenus par an à plus de 600000 producteurs.

Malgré la relance de sa culture, la culture cacaoyère au Cameroun est confrontée à plusieurs problèmes parmi lesquels la pourriture brune des cabosses causée par *Phytophthora megakarya*<sup>(1)</sup> et l'indisponibilité des semences en constituent majeures. *Phytophthora megakarya* en champs ainsi qu'en pépinières peut causer des pertes de rendements variant de 30 à 90% de la production totale<sup>(1, 2)</sup>. Les effets néfastes de *Phytophthora megakarya* au niveau des pépinières font des semences de cacaoyers une denrée rare et une mine d'or pour les cultivateurs. Au niveau des unités de production de semences de cacaoyers les terres de remplissage sont non stériles ou pas assainies. Ces terres sont très souvent prélevées dans les zones déjà contaminées par *P. megakarya* constituent ainsi le vecteur de dissémination de ces oomycètes chez les plants de cacaoyers. La méthode d'éradication la plus utilisée par les cultivateurs fait est l'usage des fongicides chimiques. Toutefois cette méthode reste difficile à être vulgariser à cause des prix onéreux des fongicides<sup>(2)</sup> et les effets néfastes des fongicides sur l'environnement et sur la santé des cultivateurs<sup>(3)</sup>. Ainsi l'approche de lutte biologique apparait comme une alternative plausible dans l'éradication de ce pathogène au niveau des pépinières tout en protégeant l'environnement. Le chitosane et les sources de

chitines (coquilles d'escargots, d'huitres, les déchets de crevettes) sont les macromolécules biologiques ayant des propriétés pléiotropiques vis-à-vis des phytopathogènes. Les travaux récents mettent en exergue les propriétés antifongiques des coquilles d'escargots vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* chez le cacao au niveau des pépinières<sup>(4)</sup>. De même les travaux de Ronje et al.<sup>(5)</sup> mettent en exergue les propriétés antifongiques des coquilles d'huitres vis-à-vis des phytopathogènes *in vitro*. Du fait de leur teneur en forte teneur en chitine (39 %) et du carbonate de calcium (67%), les coquilles d'huitres apparaissent comme un outil de lutte biologique efficace pour le contrôle de la pourriture brune des cabosses de cacao au niveau des pépinières.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de l'amendement du substrat culture sur la croissance et la résistance de *Theobroma cacao* à *Phytophthora megakarya*. Les études récentes mettent en exergue le potentiel stimulateur de croissance et la résistance des plantes de chou à l'acidité du sol<sup>(5)</sup>.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les cabosses hybrides (issues de la pollinisation manuelle) de *Theobroma cacao* (MA12×PA150) utilisées dans le cadre de ce travail provenaient du champ expérimental de l'IRAD.

### Traitement des sols

Le sol utilisé dans le cadre de cette expérimentation provenait des champs de cacao du village Ndamvout situé dans les environs de Yaoundé. Ces sols sont généralement utilisés par les pépiniéristes pour la production des semences de cacao. Une analyse préliminaire de la composition chimique du sol montre qu'il renferme 3,396% de matière organique ; 1,23% N 0,00648 méq/g sol de Ca 0,0232 méq/g sol de Mg ; 3,54 mg/g sol de P et a un pH de 6,1. Afin de favoriser la germination et la croissance, le sol a été mélangé avec le sable (provenant du fleuve Sanaga, région du littoral Cameroun) dans les proportions 3 :1. Le sol et le sable ont été stérilisés à 121°C pendant 30 min à trois reprises avant les semis.

La souche de *Phytophthora megakarya* EL utilisé dans ce travail provenait de la banque des souches (Numéros : ZTH0143) du Laboratoire de lutte biologique de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement. Les spores de *P. megakarya* ont été obtenues à partir des nécroses formées à la suite de l'inoculation artificielle de la cabosse saine par le mycélium de *P. megakarya* selon le protocole décrit par Tondje et al. (6). Les sols stériles et non stériles ont été inoculés avec les zoospores de *P. megakarya* à la concentration 10<sup>(6)</sup> zoospore/Kg de sol 48h avant traitement aux coquilles d'huitres à la concentration 10% P/P.

### Production des poudres de coquilles d'huitres

Les coquilles d'huitres (*Crassostrea gigas*) utilisés dans ce travail provenaient de Mouanko (région du littoral Cameroun situé sur la rive nord du fleuve Sanaga). Les poudres de coquilles d'huitres ont été obtenues par broyage de coquilles préchauffées selon le protocole décrit par Ronje et al. (5).

### Evaluation de l'amendement du sol sur les paramètres agronomiques

Les cabosses de cacao ont été décabossés et les fèves de cacao obtenus ont été prétraitée par lavage à l'eau distillée. Les jeunes plants ont été obtenus par semage des fèves fraîches de cacao dans les sols traités et non traités selon le protocole décrit par Tene et al. (4). Tous les traitements ont été randomisé et la taille de l'échantillon a été de 15 pots par traitement en tripliquet. Les différents traitements ont été entretenus en serre par arrosage journalier avec de l'eau du robinet et les paramètres physiologiques de croissances ont été relevés chaque quatre semaine pendant seize semaines (longueurs des tiges, nombre de feuilles, longueurs et largeurs des feuilles).

## Induction de la résistance systémique et évaluation de l'index de sévérité de la pourriture brune

L'induction de la résistance systémique a été faite sur des disques de feuilles et sur des feuilles entières âgées de seize semaines selon le protocole modifié de Nyasse et al.<sup>(7)</sup>. Des disques de feuilles ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce et disposés dans des boîtes de pétri de façon randomisés (8 disques par boîte et quatre boîtes par traitement). Parallèlement dix feuilles entières âgées également de seize semaines portées par les tiges ou les branches non détachées des plants ont été sélectionnées et séparées dans un seul plateau puis arrangées selon le protocole décrit par Tchameni et al. (2). Ces feuilles ainsi que les disques de feuilles ont toutes été inoculées simultanément avec 10 µl d'une suspension de 10<sup>6</sup> zoospores/ml de *Phytophthora megakarya* (7). L'expression de la maladie a été calibrée 6 jours après inoculation à l'aide d'un outil de calibrage (*rating scale*) développé par Nyasse et al. (7). L'intensité de l'index de sévérité a été évalué grâce à 'échelle de Paulin et al. (8).

## Résultats

### Effet sur la croissance

Les paramètres de croissance notamment l'évaluation de la longueur des tiges, du nombre de feuilles, de la longueur des feuilles, de la largeur des feuilles, de la surface foliaire, du poids frais de la partie aérienne et du poids frais des racines relevées sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) selon les traitements.

Le traitement des sols aux coquilles d'huitres augmente significativement la taille des plantes après seize semaines de croissance (Tableau 1). Cette augmentation est accentuée dans tous les traitements avec les coquilles soit  $38 \pm 0,57$  ;  $33,25 \pm 0,57$  et  $36 \pm 0,57$  cm pour les traitements TS + CQ, TS+PM + CQ et TNS + CQ, tandis qu'elle est de  $26 \pm 0,57$  ;  $23 \pm 0,57$  et  $25, 25 \pm 0,57$  cm pour les traitements TS, TS + PM et TNS (Tableau I). En effet, on note un effet significatif de *Phytophthora megakarya* sur la taille des plantes avec un pourcentage de baisse de l'ordre de 20% ( $26 \pm 0,57$  cm pour TS et  $23 \pm 0,57$ cm pour TS + PM) par rapport aux témoins terre stérile (Tableau I).

Par ailleurs, le traitement aux coquilles d'huitre augmente significativement le nombre de feuilles à tous les stades de développement de la plante. Cette différence est plus remarquable à la seizième semaine, nous avons respectivement 12,5 feuilles/plante pour le traitement TS+CQ, 12 feuilles/plante pour le traitement TS+PM+CQ et 12 feuilles /plante pour le traitement TNS+CQ (Tableau I).

La surface foliaire varie respectivement dans les traitements aux coquilles d'huitres au bout de seize semaines de croissance soit de 104 cm<sup>2</sup> pour le lot TS+CQ, 88,41 cm<sup>2</sup> pour le lot TS+CQ+PM et 95,15 cm<sup>2</sup> le lot TNS+CQ (Tableau I).

**Tableau 1 :** Effet des coquilles d'huitres sur les paramètres agronomiques des plants de cacaoyers après seize semaines de croissance.

Traitement	Nombre de feuilles	Surface foliaire	Taille des plantes	Poids frais de la partie aérienne	Poids frais de la partie racinaire
TNS	$7.33 \pm 0.57a$	$44.16 \pm 1.4a$	$24 \pm 0.57c$	$13.77 \pm 0.05e$	$3.6 \pm 0.25a$
TS	$7.33 \pm 0.57a$	$55.96 \pm 2.7a$	$28.5 \pm 0.57a$	$12.57 \pm 0.05a$	$3.3 \pm 0.05a$
TNS+CQ	$12 \pm 0.57ac$	$95.15 \pm 1b$	$36.25 \pm 0.57b$	$23.33 \pm 0.57b$	$10.2 \pm 0.05f$
TS+CQ	$12.5 \pm 0.57ac$	$104.89 \pm 5.1b$	$38 \pm 0.57b$	$27.33 \pm 0.88b$	$11.63 \pm 0.01b$
TS+PM	$7 \pm 0.57a$	$37.87 \pm 6.4a$	$25 \pm 0.57c$	$16.7 \pm 0.57c$	$4.2 \pm 0.05c$
TS+PM+CQ	$12.5 \pm 0.57ac$	$88.41 \pm 1.1b$	$33.25 \pm 0.57d$	$25.33 \pm 0.88bd$	$8.8 \pm 0.05d$

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

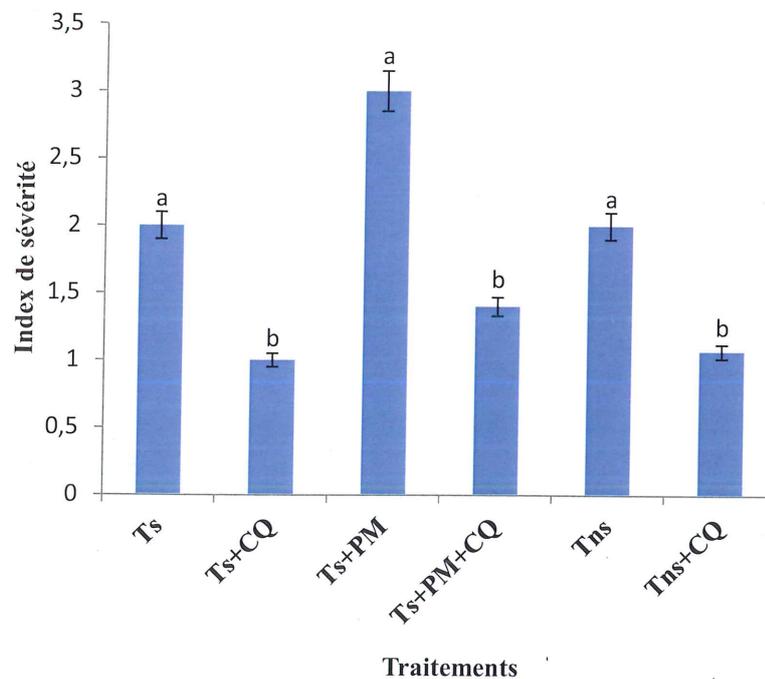
TS : terre stérile, TNS : terre non stérile, TS+CQ : terre stérile coquille, TS+PM : terre stérile+phytophthora megakarya, TS+PM+CQ : terre stérile+phytophthora megakarya+coquille.

De même le traitement des sols aux coquilles d'huitres augmente significativement le poids frais des racines comparé au control (terre stérile). En présence des coquilles d'huitres, le poids frais des racines est plus élevé dans le lot TS+CQ, soit respectivement 11,63 g. Par contre, le poids frais de la partie arienne est identique dans le lot TS+CQ et TNS+CQ, soit respectivement 27,33 g/plante (Tableau I).

### Inoculation des feuilles et de l'index de sévérité de la maladie

Six jours après l'inoculation des feuilles, on observe un développement différentiel de la nécrose sur tous les feuilles et disques de feuilles inoculées avec les zoospores de *P. megakarya*. (Figure 1), tandis qu'aucun symptôme n'est observable dans les feuilles et disque de feuilles inoculées avec l'eau distillée (Figure 1). L'analyse des variances montrent que l'expression de la maladie a été significativement différente pour les différents traitements ( $p = 0,05$ ). Le traitement aux coquilles d'huitres diminue considérablement le degré de lésion nécrotique des feuilles inoculées avec *P. megakarya* (Figure 1). En effet, la présence des coquilles d'huitres dans la terre stérile diminue l'index d'infection de 1 (résistant) correspondant à un taux de baisse de 66,66%. De même la présence des coquilles d'escargots dans le mélange terre stérile et *P. mega karya* baisse de 1,4 (résistant), soit un taux de diminution de 53,33%. Par ailleurs, le traitement des coquilles d'huitres à la terre non stérile entraîne une baisse de 1,07 (résistant) avec un taux de diminution de 46,5%.

Figure 1 : Index de sévérité des plantes traitées et non traitées aux coquilles d'huitres.



Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

TS : terre stérile, TNS : terre non stérile, TS+CQ : terre stérile coquille, TS+PM : terre stérile +phytophthora megakarya, TS+PM+CQ : terre stérile +phytophthora megakarya+coquille.

### Discussion

L'amendement du sol par les coquilles d'huitres a augmenté la longueur des tiges, la surface foliaire, le nombre de feuilles, le poids frais des racines et de la partie aérienne. Les paramètres physiologiques ainsi enregistrés traduisent le bon état sanitaire de la plante. L'effet des coquilles d'huitres sur la croissance obtenue dans le présent travail corrobore avec ceux d'Ohata et al. (9) et Tene et al. (4) qui ont montré que les chitines et les sources de chitines ont la capacité d'induire la croissance de plusieurs plantes. Cette capacité d'induction de la croissance par les coquilles d'huitres pourrait être due à son effet sur les processus physiologiques de la plante tels que la fixation de l'azote, l'élongation cellulaire, la division cellulaire, l'activation enzymatique et la synthèse des protéines. De plus, l'ajout des matières organiques (coquilles d'escargots ou déchets de crevettes) au sol favorise la croissance des cultures

végétales grâce à l'augmentation des nutriments ou par la modification des propriétés physicochimiques et microbiologiques du sol. En effet, le poids frais des racines et de la partie aérienne de la plante sont des bons indicateurs de stress chez la plante. Dans nos conditions expérimentales le traitement du sol par les matières organiques augmente le poids frais de la partie aérienne ainsi que le poids frais des racines. Cette augmentation pourrait être due à la disponibilité en élément nutritif dans le sol. En effet, la présence des éléments nutritifs dans le sol permet une meilleure croissance de la plante sous conditions de stress.

Dans nos essais, le prétraitement du sol avec les coquilles d'huitres réduit significativement l'index de sévérité de la maladie. Cet effet est plus prononcé dans les traitements substrat non stérile avec les coquilles. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Benhamou et al. (10) qui ont montré que l'induction de la résistance chez la plante se traduit par l'acquisition d'une résistance suite à un traitement de la plante par les agents de luttés biologiques variés. Cela s'explique par une activation des systèmes de défenses naturelles de la plante et une synthèse accrue des métabolites de défenses tels que les composés phénoliques et les protéines reliés à la pathogénèse.

## Conclusion

Le traitement du substrat de culture aux poudres de coquilles d'huitres augmente les paramètres agronomiques de croissance (longueur de la tige, nombre de feuilles, surface foliaire et le poids sec des racines). Les plantes issues des sols traités aux agents de lutte présentent un faible index de sévérité respectivement de l'ordre 0.83 (résistant) comparé au control avec la sévérité de 2.1 (susceptible).

## Références

1. Ndoumbe`-Nkeng M, Cilas C, Nyemb E, Nyasse´ S, Bieysse D, Flori A ; Sache I. (2004). Impact of removing diseased pods on cocoa black pod caused by *Phytophthora megakarya* and on cocoa production in Cameroon. *Crop Prot.* 23: 415-424.
2. Tchameni S.N., Ngonkeu M.E.L., Begoude B.A.D., L. Wakam Nana., R. Fokom., A.D. Owona, J.B. Mbarga, T. Tchana, P.R. Tondje, F.X. Etoa, J. Kuate. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop Protection* 30:1321-1327
3. Fontem D.; Olanya O.M; Isopenben G.B; Owana M.A.P. (2005). Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato in Cameroon. *Crop protection* 24 :449-456
4. Tene Tayo. P.M. (2013). Effets du chitosane et des coquilles d'escargots sur la croissance de *Theobroma cacao* et la résistance contre *phytophthora megakarya*". Mémoire de master soutenu à l'Université de Yaoundé I, Cameroun. pp 23-30
5. Rong Xing, Yukun Qin, Xiaohong Guan, Song Liu, Huahua Yu, Pengcheng Li. (2013). Comparison of antifungal activities of scallop shell, oyster shell and their pyrolyzed products. *Egyptian journal* 39:83-90
6. Tondje P.R.; Hebbar K.P.; Samuels G.; Bowers J.H.; Weise S.; Nyemb E.; Begoude D.; Foko J.; Fontem D. (2006). Bioassay of geniculosporium species for *Phytophthora megakarya* biological control on cacao pod husk pieces. *Afr. J. Biotec.* 5 :648-652.
7. Nyassé S. (1997). Etude de la diversité de *Phytophthora megakarya* et caractérisation de la résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à cet agent pathogène. Ph. D Thesis. INPT Toulouse, France.
8. Paulin D; Ducamp M; Lachenaud. P. (2008). New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana. *Crop Prot.* 27: 1143-1147.
9. Ohta K A; Taniguchi N.; Koushia; Hosoki T. (1999). Chitosan Treatment Affects Plant Growth and Flower Quality in *Eustoma grandiflorum*. *Hortscience* 34 : 233-234.
10. Benhamou N, Rey P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection* 92 : 24-35