

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE 1

FACULTY OF SCIENCES

POST GRADUATE AND TRAINING
SCHOOL OF LIFE SCIENCES-
HEALTH AND ENVIRONMENT

POST GRADUATE AND TRAINING
UNIT OF LIFE SCIENCES-HEALTH



UNIVERSITE DE YAOUNDE 1

FACULTE DE SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE-SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATORY OF PHYTOBIOCHEMISTRY AND MEDICINAL PLANT STUDIES

LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE ET D'ETUDES DES PLANTES MEDICINALES

**Identification des principaux phytopathogènes du
poivre (*Piper nigrum* L.) de Penja et contrôle du
dépérissement lent par *Trichoderma asperellum* et
l'extrait hydroéthanolique de *Chromoleana
odorata***

Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat /PhD en
Biochimie

Spécialité: Biotechnologie/Développement

PETCHAYO TIGANG Sandrine

Matricule : 05W104

CO-DIRECTEURS:

G. M. TEN HOOPEN

Directeur de Recherche

CIRAD

NGUEFACK Julienne

Maitre de Conférences

Université de Yaoundé I

MBACHAM Wilfred

Professeur

Université de Yaoundé I



ANNEE ACADEMIQUE: 2021-2022

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE 1

FACULTY OF SCIENCES

POST GRADUATE AND TRAINING
SCHOOL OF LIFE SCIENCES-
HEALTH AND ENVIRONMENT

POST GRADUATE AND TRAINING
UNIT OF LIFE SCIENCES-HEALTH



UNIVERSITE DE YAOUNDE 1

FACULTE DE SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE-SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

LABORATORY OF PHYTOBIOCHEMISTRY AND MEDICINAL PLANT STUDIES
LABORATOIRE DE PHYTOBIOCHIMIE ET D'ETUDES DES PLANTES MEDICINALES

**Identification des principaux phytopathogènes du
poivre (*Piper nigrum* L.) de Penja et contrôle du
dépérissement lent par *Trichoderma asperellum* et
l'extrait hydroéthanolique de *Chromoleana
odorata***

Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat /PhD en
Biochimie

Spécialité: Biotechnologie/Développement

PETCHAYO TIGANG Sandrine

Matricule : 05W104

CO-DIRECTEURS:

G. M. TEN HOOPEN

Directeur de Recherche

CIRAD

NGUEFACK Julienne

Maitre de Conférences

Université de Yaoundé I

MBACHAM Wilfred

Professeur

Université de Yaoundé I

ANNEE ACADEMIQUE: 2021-2022

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

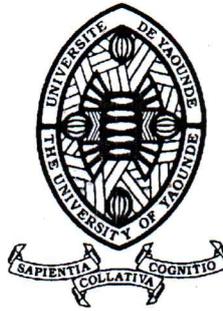
Paix-Travail-Patrie

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 Yaoundé

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE THESE DE DOCTORAT/Ph.D

Nous, membres du Jury de thèse de Doctorat / Ph.D de Madame **PETCHAYO TIGANG Sandrine** (Matricule 05W104) préparée sous la co-direction des Professeurs **MBACHAM FON Wilfred**, **NGUEFACK Julienne** et **TEN HOOPEN G. Martijn** intitulée : « Identification des principaux phytopathogènes du poivre (*Piper nigrum* L.) de Penja et contrôle du dépérissement lent par *Trichoderma asperellum* et l'extrait hydroéthanolique de *Chromoleana odorata*.) soutenue publiquement le **01 Février 2022** en vue de l'obtention du grade de Docteur/Ph.D 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 établie et délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

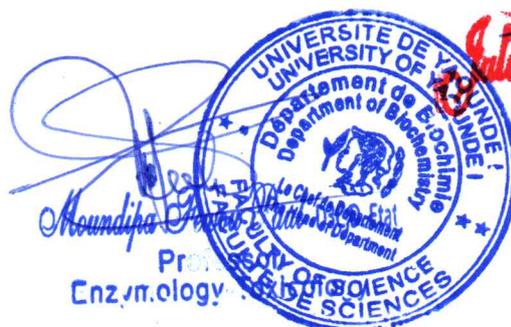
Fait à Yaoundé le **21 MARS 2022**

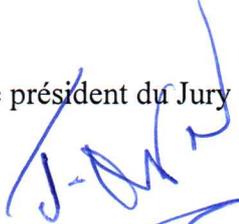
Examineurs


Dr Ngakou

Nicolas NIEMENAK
Professor
Plant Biotechnology

Le président du Jury




Salim E. Oben, Ph.D.
Professor

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

LISTE PROTOCOLAIRE

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

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

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

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

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

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

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR :

AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA 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 NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste

22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

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

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste

21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	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	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste

11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	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	NGOOU 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 BANAHO 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) (33)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	CT MINRESI
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	DOYEN FS UD _s
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancelor/UB</i>
11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>

13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI 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	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	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 DAOUA	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 NDOSIRI 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	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/U/YI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	Directeur/ MINESUP/ Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste
7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
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	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI

19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

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	ABESOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
18	BAYEM Jacques Narcisse	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	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thierry	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	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste
4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	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	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste

18	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOUDA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MEL'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	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	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOLOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI

15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
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	LAMILEN 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	Chargée de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	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	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	38 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	46 (14)
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	33 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	34(7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	40 (5)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42(7)
Total	75 (5)	105 (29)	116 (31)	43 (10)	339 (75)

Soit un total de **339 (75)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **105 (29)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **43 (10)**

() = Nombre de Femmes **75**

DEDICACE

Je dédie ce travail :

Au Seigneur pour sa protection et les œuvres qu'il a accompli dans ma vie

A mon feu papa chéri qui m'a toujours encouragé et soutenu

A ma maman pour son amour inconditionnel et ses aides multiformes pour que je ne manque jamais de rien

A mes frères et sœurs : Serge Nono, Roméo Sotche, Angèle Nanfang, Gladys pour leur amour et leur soutien inconditionnel

A toi ma fille pour toute la joie, la lumière et le soleil que tu as apporté dans ma vie

A vous mes neveux : Yanis, Etan, Uriel, Danielle, Leslie, Anaëlle, Yohanne et Léa je compte sur vous pour faire mieux.

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le résultat de la participation constructive de plusieurs chercheurs et enseignants tant nationaux qu'internationaux, de nombreuses autres personnes à travers différentes voies. Les mots ne suffisent pas à leur exprimer ma gratitude.

Ma reconnaissance va d'abord à l'endroit du Pr. Julienne NGUEFACK, Directeur de ce travail de thèse, pour sa patience, ses conseils tout le long du travail.

Je tiens à remercier particulièrement Dr. Martijn TEN HOOPEN, Co-Directeur de cette thèse, qui par ses conseils, sa rigueur, sa patience, sa motivation, et son soutien, m'ont permis de terminer ce travail de thèse.

Au Pr. Wilfred MBACHAM, Superviseur de cette thèse, qui a accepté me suivre dans cette aventure, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

Je tiens également à manifester ma reconnaissance à l'endroit du Pr. Paul FEWOU MOUNDIPA, chef de Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I et de tous les Enseignants pour la formation dont j'ai bénéficié et tous les conseils prodigués tout au long du cursus.

Je remercie les Membres du jury de cette thèse, pour le travail que vous feriez afin d'améliorer la qualité du document.

Le présent travail a été réalisé avec l'appui des institutions telle que ; l'IRAD (l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement) à travers ses nombreux laboratoires et son personnel toujours disponible ; le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) qui a mis à notre disposition la logistique nécessaire pour conduire ce travail. Durant tout le travail de thèse, ces institutions ont abrité de nombreux projets de recherches à l'instar du Dispositif en partenariat DP Agroforesterie Cameroun, l'AI dont j'ai bénéficié des ressources financières et logistiques.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance aux chercheurs de l'IRAD qui ont donné de leur temps, de leur énergie et des conseils afin que ce travail voie le jour, il s'agit de : Dr. Salomon NYASSE, Dr. Virginie MFEGUE, Dr. Didier BEGOUDE, Dr. Bruno EFOMBAGN, Dr. Michel NDOUMBE. Je pense également aux chercheurs du CIRAD dont j'ai pu bénéficier des conseillers et des encouragements, il s'agit de : Dr. Leila BEILHE, Olivier SOUNIGO.

Ma reconnaissance va également à l'endroit du Pr. Jolanda ROUX, Dr. Michel TCHOTET, Dr. Michael MBENOUN de l'Université de Prétoria qui m'ont apporté leur appui sur le terrain durant la collecte des échantillons, au laboratoire dans les isolements et les analyses moléculaires je vous suis infiniment reconnaissante.

Une pensée particulière pour le Groupement Représentatif I.G Poivre de Penja (IGPP) qui réunit en son sein de nombreux pipériculteurs qui m'ont donné l'accès à leur plantation pour effectuer mes recherches. Au président René METOMO, au secrétaire exécutif Emmanuel ZENEWO qui m'ont facilité l'accès à l'IGPP. J'ai également pu bénéficier à travers l'IGPP du financement sur fond compétitif C2D-PAR dans le cadre des projets de recherche appliquée à la valorisation des produits agricoles.

Je n'oublie pas mes partenaires de terrain et observateurs avec qui j'ai bravé les routes rocailleuses du Moungo sur les motos à la recherche des plantations de poivre, il s'agit de Ferdinand NJONKAM, Landry TEWEME. Les camarades du Laboratoire de Phytopathologie de l'IRAD de Nkolbisson M. Romuald, M. Thaddée, Leblanc, Yvan, Marie josephe, Miraine, Dorothée pour les bons moments que nous avons passés ensemble.

Mes remerciements vont également à l'endroit des membres du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Végétales il s'agit de : Dr. Blaise DONGMO LEKAGNE, Dr. François FOUELEFACK, Dr. Charles DAKOLE, Dr. Joseph Galani, Dr. Pascal Noël MEKAM, Dr. Ghislaine NDONKEU, Dr. Albert DONGMO, Jean-Claude NGUEPSI, René AZAH UDOM, et Métis Molière DJOUFACK.

Je n'oublie pas mon amie, ma sœur avec qui j'ai commencé ce travail, à toi Mireille NDOUNGUE, tu sais par quoi nous sommes passés, toutes les étapes que nous avons traversées mais nous avons tenu bon jusqu'à la fin, merci d'avoir été là et d'être toujours là.

Un grand merci à toute la famille Medjighouo, vous avez été présent depuis le début.

SOMMAIRE

LISTE PROTOCOLAIRE.....	i
DEDICACE.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
SOMMAIRE.....	xv
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	xix
LISTE DES TABLEAUX.....	xxi
LISTE DES FIGURES.....	xxiv
RESUME.....	xxvi
Abstract.....	xxvii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	7
I.1 Généralités sur le poivrier (<i>Piper nigrum</i> Leonian).....	7
I.1.1 Origine, histoire et utilisation du poivre.....	7
I.1.2 Description botanique du poivrier.....	8
I.1.3 Les différents types de poivres.....	10
I.1.4 Ecologie du poivrier.....	12
I.1.5 Culture du poivre.....	12
I.2 Importance économique, production actuelle du poivre et répartition géographique.....	15
I.2.1 Sur le plan mondial.....	16
I.2.2 La production du poivre au Cameroun.....	17
I.2.3 « Le poivre de penja » : Un poivre d'exception.....	18
I.2.4 Importance du poivre.....	19
I.3 Les ennemis du poivrier.....	20
I.3.1 Les ravageurs du poivrier.....	20
I.3.2 Les maladies du poivrier.....	21
I.4 Moyens de lutte utilisés dans les plantations de poivriers.....	25
I.4.1 Lutte Culturelle.....	25

I.4.2 Lutte Chimique	26
I.4.3 Lutte Génétique.....	26
I.4.4 Lutte Biologique	27
I.5 Microorganisme antagoniste : <i>Trichoderma</i> spp	28
I.5.1 Taxonomie, écologie et biologie.....	28
I.5.2 Mode d'action et mécanismes de défense des <i>Trichoderma</i> spp.....	30
I.5.3 <i>Trichoderma asperellum</i>	31
I.6 Extraits végétaux et plantes utilisées au cours de l'étude	32
I.6.1 Extraits végétaux.....	32
I.6.2 Généralités sur les plantes utilisées dans cette étude.....	33
I.6.3 Les métabolites secondaires	35
I.6.4 Métabolites primaires.....	41
I.7 Les mécanismes de défense des plantes.....	41
I.7.1 Mécanismes de défenses passives.....	41
I.7.2 Mécanismes de défenses actives ou induites.....	43
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	47
II.1 Matériel.....	47
II.1.1 Matériel végétal : plantes sélectionnées et utilisées	47
II.1.2 Pathogènes potentiels.....	47
II.1.3 Agents de lutte biologique	47
II.1.4 Pesticides de synthèse	48
II.2 Méthodes.....	48
II.2.1 Choix de la zone d'étude.....	48
II.2.2 Présentation de la zone d'étude	49
II.2.3 Identifier les principales maladies du <i>P. nigrum</i> dans la zone IG poivre de Penja : Etat des lieux de la culture du poivre de Penja par la collecte des données d'enquêtes	50
II.2.4. Identification des potentiels agents pathogènes associés aux principales maladies	56

II.2.5 Evaluation de l'efficacité des produits chimiques utilisés par les producteurs, de <i>Trichoderma asperellum</i> et des extraits de trois plantes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> contre le dépérissement lent.....	68
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	93
III.1 Etats des lieux de la production du « poivre de Penja » dans l'aire géographique	93
III.1.1. Caractéristiques sociodémographiques des producteurs de poivre de Penja	93
III.1.2 Caractéristiques des plantations poivrières.....	94
III.1.3 Matériel végétal et mise en place de plantations poivrière.....	96
III.1.4 les opérations culturales de la plantation et rendement	96
III.1.5 Principales contraintes de production liées aux Bioagresseurs.....	98
III.1.6 Gestion des principales maladies par les producteurs.....	99
III.1.7 Analyse en composantes principales (ACP) des données de l'enquête.....	101
III.1.8. Sévérité et incidence des principales maladies	103
III.2 Isolement et Identification des différents microorganismes associés aux maladies	119
III.2.1 Isolement des microorganismes phytopathogènes associés à la maladie du jaunissement sur poivrier.....	119
III.2.2 Isolement des Champignons phytopathogènes associés à la maladie de la pourriture racinaire blanche.....	121
III.2.3 Test de pathogénicité	122
III.2.4 Description morphoculturale des Oomycètes associés au dépérissement lent chez <i>P. nigrum</i>	124
III.2.5 Identification moléculaire des deux pathogènes associés au dépérissement lent et à la pourriture racinaire blanche	125
III.2.6 Discussion	129
III.3 Evaluation du potentiel antifongique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des produits chimiques utilisés par les planteurs, <i>Trichoderma asperellum</i> et les extraits de plantes contre <i>Phytophytium</i> sp.....	134
III.3.1 Efficacité <i>in vitro</i> des différents produits chimiques, <i>T. asperellum</i> et extraits de plantes.....	134

III.3.2 Evaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité des produits chimiques biologiques et extrait de plante sur la maladie de dépérissement lent (jaunissement).....	148
III.3.3 Discussion	163
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	180
ANNEXES.....	A

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN	:	Acide désoxyribonuléique
<i>C. benghalensis</i>	:	<i>Commelina benghalensis</i>
<i>C. odorata</i>	:	<i>Chromoleana odorata</i>
CDC	:	<i>Cameroon Development Corporation</i>
Chla	:	Chlorophylle a
Chlb	:	Chlorophylle b
CMA	:	Corn Meal Agar
CO₂	:	Dioxyde de Carbone
EA	:	Extraits aqueux
EC	:	Emulsion concentrée
EE	:	Extrait hydro-éthanolique
FAO	:	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
Fig.	:	Figure
GPS	:	Système mondial de positionnement
GPX	:	Gaïacol peroxydase
IG	:	Indication Géographique
IGP	:	Indication Géographique Protégée
IGPP	:	Groupement Représentatif IG poivre de Penja
IIRS	:	<i>Indian Institute of Remote Sensing</i>
INS	::	Institut National de Statistique
IPC	:	Communauté Internationale de Poivre
IRAD	:	Institut de Recherche Agricole pour le Développement
ITS	:	Espaceurs transcrits internes
l'acétyl CoA	::	L'acétyl coenzyme A
MEA	:	<i>Malt Extract Agar</i>
MiA	:	<i>Mil Agar</i>
ML	:	Maximum de vraisemblance
<i>P. amarus</i>	:	<i>Phylanthus amarus</i>
<i>P. nigrum</i>	:	<i>Piper nigrum</i>

PAL	:	Phénylalamine Amonia Lyase
PARPH	:	Pimaricine Ampicilline Rifampicine Pentachloronitrobenzène Hymexazol
PCR	:	<i>Polymerase chain Reactions</i>
PDA	:	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PHP	:	Plantation des Hauts de Penja
PPO	:	Polyphénol oxydase
<i>S. mombin</i>	:	<i>Spondias mombin</i>
WG	:	Granulés
WP	:	Poudre mouillable
pH	:	Potentiel hydrométrique
°C	:	Degré Celsius
M	:	Molaire
nm	:	Nanomètre
µm	:	Micromètre
Blast	:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quelques fonctions de phénylpropanoïdes (Heldt, 2005)	38
Tableau II : Liste des fongicides utilisés.....	48
Tableau IV : Liste des parcelles sélectionnées	55
Tableau IV : Nombre de plantations et types d'éléments échantillonnés	56
Tableau VI : Isolats utilisés dans l'analyse phylogénétique de <i>Armillaria</i>	62
Tableau VII : Isolats utilisés dans l'analyse phylogénétique de <i>Phytopythium</i> sp.	63
Tableau VIII : Différents traitements effectués	82
Tableau IX : Appréciation de l'acidité du sol	84
Tableau X : Appréciation du taux de la matière organique.....	84
Tableau XI : Appréciation de la qualité de la matière organique Valeur C/N Appréciation ..	85
Tableau XII : Appréciation de l'azote(N) total Appréciation	85
Tableau XIII : Appréciation de la teneur du sol en bases échangeables Appréciation	86
Tableau XIV : Appréciation de SBE, CEC et V% Appréciation	86
Tableau XV : Appréciation de la teneur en phosphore assimilable (cette évaluation s'est faite par la méthode de Bray II).....	86
Tableau XVI : Profil des pipériculteurs	93
Tableau XVII : Répartition des producteurs selon l'appartenance ou non à l'IGPP.....	94
Tableau XVIII : Caractéristiques des plantations de poivre de Penja enquêtées.....	95
Tableau XIX : Fréquences de maladies et Ravageurs dans les plantations de poivre de Penja enquêtées	98
Tableau XX : Moyens de gestion des deux principales maladies présentent dans les plantations de poivre de Penja.....	100
Tableau XXI : Liste de produits utilisés dans les différentes plantations poivrières.....	100
Tableau XXII : Incidence de la pourriture racinaire blanche dans les différentes zones	106
Tableau XXIII : Effet mois sur l'évolution de la maladie ($P < 0,001$)	112
Tableau XXIV : Taux de mortalité des plants de poivrier dans les différentes plantations au cours des années.....	113
Tableau XXV : Corrélation entre la sévérité (%) de la maladie, l'index de jaunissement et les variables climatiques	113
Tableau XXVI : Différents isolats fongiques obtenus des différents échantillons (sol, racines, feuilles).....	120

Tableau XXVII : Proportion (%) des isolats fongiques provenant des organes de <i>P. nigrum</i> de chaque zone	120
Tableau XXVIII : Densité moyenne des nématodes observés par échantillons.....	121
Tableau XXIX : Longueur des lésions observées sur les plantules de poivrier	123
Tableau XXX : Description morphologique de Oomycètes.....	125
Tableau XXXI : Indice du degré d'antagonisme associé de <i>T. asperellum</i> sur <i>Phytophthium</i> sp.	136
Tableau XXXII : Evaluation de la production des conidies de <i>T. asperellum</i> sur le mycélium de <i>Phytophthium</i> sp.....	136
Tableau XXXIII : Vitesses moyennes de mycoparasitisme des souches de <i>T. asperellum</i> ..	137
Tableau XXXIV : Caractéristiques des extraits aux solvants des plantes utilisés.....	137
Tableau XXXV : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de PPF, PPK, PPP en présence des extraits hydroéthanolique de <i>P. amarus</i> ; <i>C. benghalensis</i> et de <i>C. odorata</i>	138
Tableau XXXVI : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de PPF, PPK, PPP en présence des extraits aqueux de <i>P. amarus</i> ; <i>C. benghalensis</i> et de <i>C. odorata</i> ..	139
Tableau XXXVII : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat PPF en présence des quatre fongicides de synthèse.....	140
Tableau XXXVIII : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat PPK en présence de quatre fongicides de synthèse	141
Tableau XXXIX : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat PPP en présence des quatre fongicides de synthèse.....	141
Tableau XL : Nature de l'inhibition de la croissance mycélienne des trois isolats de <i>Phytophthium</i> sp. (PPP, PPK, PPF) par les fongicides de synthèse et des extraits de plantes.....	142
Tableau XLI : Composition en métabolites secondaires des extraits de plantes aux solvants des trois plantes utilisées	143
Tableau XLII : Quantité de groupe de composés des extraits de <i>C. odorata</i> (aqueux et hydro éthanolique)	143
Tableau XLIII : Spectre de masse des composés phénoliques identifiés dans les extraits aux solvants (hydro-éthanolique et aqueux) de <i>C. odorata</i>	145
Tableau XLIV : Données quantitatives des différents composés phénoliques (Acide hydroxybenzoïque ; Acide hydroxycinnamique ; Flavones ; Flavonol ;	

Flavanones) identifiés dans les extraits aux solvants (hydro-éthanolique et aqueux) de <i>C. odorata</i>	146
Tableau XLV : Données climatiques de la zone de Njombé pendant la période de l'essai ..	149
Tableau XLVI : Caractéristiques Physico- chimiques du sol utilisé pendant l'essai.....	150
Tableau XLVII : Viabilité des boutures après 30ème, 60ème, et 90ème jour après transplantation.....	151
Tableau XLVIII : Variation des paramètres de croissance des plants de poivriers en fonction des traitements 90 jours post semis au cours de la saison 1 et 2	153
Tableau XLIX : Variation des paramètres de croissance des plants de poivriers en fonction des traitements 180 jours post semis saison 2	153
Tableau L : Variation de l'activité de la Gaiacol peroxydase (GPX), de la Phénylalanine ammonia lyase (PAL), et la Polyphénol oxydase (PPO) dans les feuilles de poivrier en fonction des traitements.....	161
Tableau LI : Corrélations entre les différents paramètres de croissances et la sévérité de la maladie	162
Tableau LII : Corrélations entre les paramètres biochimiques et la sévérité de sévérité de la maladie	162

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Différentes parties du poivrier	10
Figure 2 : Les différentes déclinaisons du poivre. (Poivres.info)	11
Figure 3 : Aire géographique de production du poivre de Penja	19
Figure 4 : Symptômes de pourriture racinaire blanche.	23
Figure 5 : Manifestation du dépérissement lent.	25
Figure 6 : <i>Trichoderma asperellum</i> (souche PR11)	29
Figure 7 : Plantes utilisées	34
Figure 8 : Biosynthèse des trois grands groupes des métabolites secondaires	35
Figure 9 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	36
Figure 10 : Structure de la molécule phénol et celle d'un polyphénol	37
Figure 11 : Structure d'un isoprène.....	39
Figure 12 : Quelques noyaux de base de la structure des alcaloïdes.....	40
Figure 13 : Mécanisme général de défenses chez les plantes	46
Figure 14 : Les quatre souches de <i>Trichoderma asperellum</i>	48
Figure 15 : Localisation géographique de la zone d'étude	49
Figure 16 : Disposition du transect dans les parcelles.....	53
Figure 17 : Différents traitements des échantillons.....	58
Figure 18 : Déroulement du test de pathogénicité.....	67
Figure 19 : Confrontation par contact direct entre <i>Phytophthium</i> sp. et <i>T. asperellum</i>	69
Figure 20 : Représentation schématisée du test de mycoparasitisme par la méthode de boîte précolonisée (precolonised plate method).	70
Figure 21 : Protocole d'extraction des différentes plantes	71
Figure 22 : Expérimentation in vivo.....	81
Figure 23 : Les principaux dégâts présents en champs	99
Figure 24 : Cercles de corrélation (A et C) et Analyses en composantes principales (ACP) (B et D) des données d'enquêtes.	102
Figure 25 : Caractéristiques des différentes plantations attaquées.....	104
Figure 26 : Sévérité du jaunissement dans les différentes zones de production durant trois années consécutives.....	110
Figure 27 : Degré moyen de jaunissement des trois zones au cours des trois années d'observations	111

Figure 28 : Effet des variables climatiques (Température moyenne et Quantité de pluie) sur la progression de la maladie.....	111
Figure 29 : Aspect de croissance mycélienne d' <i>Armillaria</i> sp. sur milieu MEA	122
Figure 30 : Résultats du test de pathogénicité sur poivrier.....	123
Figure 31 : Caractéristiques morphoculturelles de oomycètes. bar 10µm	124
Figure 32 : l'arbre maximum de vraisemblance basé sur les séquences ITS, montrant la position phylogénétique des isolats de <i>Armillaria</i> obtenus de <i>P. nigrum</i> et <i>S. mombin</i> (en gras) du Cameroun.	126
Figure 33 : L'arbre maximum de vraisemblance basé sur les séquences ITS, montrant la position phylogénétique des isolats de <i>Phytophthora</i> obtenus de <i>P. nigrum</i> (en gras) du Cameroun.	128
Figure 34 : Résultats d'une confrontation directe entre les souches de <i>T. asperellum</i> et les isolats de <i>Phytophthora</i> sp.	135
Figure 35 : Croissance de <i>Phytophthora</i> sp. (PPK) en présence de l'extrait hydroéthanolique de <i>P. amarus</i>	139
Figure 36 : Récapitulatif des différentes classes de composés phénoliques identifiées chez <i>C. odorata</i>	148
Figure 37 : Caractéristiques des racines à la fin du test	152
Figure 38 : Index de la sévérité de la maladie en fonction des traitements, de la saison et du nombre de jour post semis.	154
Figure 39 : Teneur en Chla, Chlb et en caroténoïdes (µg/mL) en fonction des traitements dans les feuilles de poivrier.....	157
Figure 40 : La teneur en Flavonoïdes, en Phénols totaux et en Protéines en fonction des traitements sur les plants de poivrier.	159

RESUME

Le poivre de Penja produit au Cameroun, est menacé par les ravageurs et les maladies. Cependant peu ou pas d'informations sont disponibles sur les ravageurs et les maladies ainsi que les mesures de lutte efficaces. De manière générale, les fongicides sont utilisés par la majorité des producteurs comme moyen de lutte. L'objectif de ce travail étaient d'identifier les principaux bioagresseurs associés aux principales maladies du poivre de Penja, d'évaluer les traitements chimiques pratiqués par les producteurs et proposer des solutions alternatives qui incluent l'utilisation des extraits de plantes et des antagonistes.

Pour atteindre les deux premiers objectifs, une enquête a été menée auprès de 71 producteurs, des observations ont été menées dans 35 plantations de poivre dans trois zones d'études (Njombe-Penja, Loum et Tombel) et une collecte des échantillons de sol et du matériel végétal qui permettra l'identification des principales maladies et des agents pathogènes. Le dépérissement lent du poivrier et la pourriture racinaire blanche ont été identifiés comme principales maladies dans les plantations de poivre de Penja. Elles étaient présentes chez 42 % (dépérissement lent) et 51 % (la pourriture racinaire blanche) des producteurs et causant en moyenne 5 % de perte par année ce qui représente des pertes de revenus énormes pour le producteur. Une analyse moléculaire des régions ITS de l'ADNr des isolats obtenus ont permis d'identifier *Armillaria* sp. et *Phytophthium* sp. comme les potentiels agents pathogènes de la pourriture racinaire blanche et du dépérissement lent respectivement.

La troisième partie du travail était consacrée aux méthodes de lutte alternatives. Les fongicides les plus utilisés par les producteurs, *Trichoderma asperellum* et les extraits aqueux et hydroéthanolique de trois plantes (*Chromoleana odorata*, *Phyllanthus amarus*, *Commelina benghalensis*) ont été testés afin de contrôler *Phytophthium* sp. Les deux, *T. asperellum* et l'extrait hydroéthanolique de *C. odorata*, ont montré une plus grande efficacité en réduisant la sévérité du dépérissement lent de 86,1 et 67,2 % respectivement. Cette sévérité a été négativement corrélée aux teneurs en chlorophylle a et en caroténoïde contenus dans les feuilles de poivrier.

On retient que, les principales maladies sont le dépérissement lent et la pourriture racinaire blanche et les potentiels agents pathogènes sont respectivement *Phytophthium* sp. et *Armillaria* sp. Les différentes méthodes de lutte testées contre *Phytophthium* sp. ont montré que *T. asperellum* et *C. odorata* sont des alternatives prometteuses à la lutte chimique. Etant donné que *Armillaria* sp. est plus difficile à contrôler, cette maladie nécessite plus de recherches.

Mots clés : Poivrier ; Extraits de plantes ; Lutte biologique ; Dépérissement lent ; *Armillaria* sp. ; *Phytophthium* sp.

ABSTRACT

Penja pepper production in Cameroon is threatened by pests and diseases. However, little or no information is available on what pests and diseases are responsible nor what effective control measures to implement. Fungicides are used by the majority of farmers as a means of control. The objective of this work was to identify the main bioaggressors associated to principals' diseases of Penja pepper, evaluate the chemicals treatments used by producers and propose the alternatives solutions including plants extracts and antagonists.

To achieve the first two objectives, a survey was carried out among 71 producers and field surveys were carried out in 35 pepper plantations located in three study areas (Njombe-Penja, Loum and Tombel). Plant and soil sampling were assessed to identify main diseases and causal agents. Slow decline of pepper and white root rot were identified as major diseases in Penja pepper plantations. They were present in 42% (slow decline) and 51% (white root rot) of the farmers, causing an average of 5% loss per year, which represents a huge loss of income for the producer.

DNA sequencing and phylogenetic analysis of the rDNA ITS regions of the isolates identified *Armillaria* sp. and *Phytophthium* sp. as potential pathogens of white root rot and slow decline respectively.

The third part of the work was devoted to alternative control methods. The fungicides most commonly used by farmers, *Trichoderma asperellum*, the aqueous and hydroethanolic extracts of three plants (*Chromoleana odorata*, *Phyllanthus amarus*, *Commelina benghalensis*) were tested for their control capacity on *Phytophthium* sp. Both *T. asperellum* and *C. odorata* hydroethanolic extract showed good efficacy in reducing the severity of slow decline by 86.1% and 67.2%, respectively. This severity was negatively correlated with chlorophyll a and carotenoid contents in pepper leaves.

It is noted that the main diseases were slow decline, white root rot and the potential pathogens are respectively *Phytophthium* sp. and *Armillaria* sp. The different control methods tested against *Phytophthium* sp. have shown that *T. asperellum* and *C. odorata* are promising alternatives to chemical control. *Armillaria* sp. being more difficult to control requires more specific research and attention.

Keywords: Black pepper; Plant extracts; Biological control; Slow decline; *Armillaria* sp.; *Phytophthium* sp.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le poivrier, *Piper nigrum* L., est une plante grimpante vivace de la famille des Pipéracées. Il appartient au genre *Piper* qui compte plus de 1000 espèces (Ahmad *et al.*, 2012). Le poivrier est essentiellement cultivé pour ses fruits, principalement utilisés comme épices et condiments. Les différents produits commercialisés tels que le poivre noir, blanc, vert, rouge sont obtenus du même grain de poivre, récolté à divers stades de maturité. Liane grimpante, le poivrier a besoin d'un tuteur (vivant ou mort), sur lequel s'accrocher, croître et peut ainsi atteindre 8 voire 10 mètres de haut. Sa production commence à partir de la troisième année post semi, le pic de production est observé vers la septième année, laquelle production pouvant s'effectuer pendant une vingtaine d'années (Perrouin *et al.*, 2014).

Originaire de l'Asie, plus précisément de la côte de Malabar en Inde, le poivrier est désormais cultivé dans de nombreux pays tropicaux. Depuis les temps anciens, le poivre, réputé pour ses multiples utilisations, s'est propagé de l'Inde pour Europe et a fini par conquérir le monde entier. Parfois appelé « Roi des épices » pour son piquant d'une part et la popularité de son utilisation d'autre part, il est également connu sous le nom d'« or noir » pour sa durabilité et sa valeur marchande. Epice la plus importante, populaire, et utilisée, le poivre est l'épice la plus commercialisée au monde (Gadekar *et al.*, 2006 ; Yogesh et Mokshapathy, 2013 ; Damanhoury et Ahmad 2014). Le poivre est utilisé en cuisine pour relever le goût de nombreux plats. Associé au sel de cuisine, il conquiert toutes les tables gastronomiques à travers le monde. En plus des propriétés culinaires, de nombreuses propriétés biologiques à savoir antihypertenseur, analgésique, antifongique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimutagène, antibactérien, la ménorragie, la dysménorrhée et bien d'autres ont été attribuées aux différentes parties du poivrier notamment les feuilles, fruits et grains. (Ahmad *et al.*, 2012 ; Meghwal et Goswami 2012a ; Damanhoury et Ahmad 2014 ; Takooree *et al.*, 2019). Selon Meghwal et Goswami (2012b), les grains de poivre sont riches en magnésium, calcium, sélénium, potassium, bore, manganèse, potassium et en vitamine A, C, E, K. D'après Zachariach *et al.* en 2010, 100g de poivre noir en base sèche contiennent environ 1.4 à 5.2 g de minéraux, 1.4 à 5.2 g d'huiles essentielles, 2.1 à 6.0 g de protéines, 32.1 à 42.8 g d'amidon, 2.3 à 8.0 de sucre, et 1.8 à 4.2 g de pipérine

La production mondiale du poivre a considérablement baissé ces dernières années. Elle est passée respectivement de 633 000 tonnes en 2019 à 497 000 tonnes en 2021 soit une baisse de 16 %. En 2021, la demande en poivre était estimée à environ 505 000 tonnes mais la production totale disponible était de 497 000 tonnes soit un déficit de 8 000 tonnes ce qui

constitue un véritable manque à gagner pour les producteurs. La diminution de la production du poivre s'est répercutée sur l'exportation qui est passée de 407 000 tonnes en 2019 à 280 000 tonnes en 2021. Avec cette production en repli depuis 2020, les prix du poivre n'ont cessé de croître passant ainsi d'environ 2 000 dollars/tonne en 2019 pour plus 4 500 dollars/tonne en 2021. Leader mondial dans la production du poivre depuis plusieurs années, avec une production moyenne de 201 265 tonnes en 2021, le Vietnam est suivi pendant la même période, par le Brésil avec 89 954 tonnes, l'Inde avec 66 000 tonnes, l'Indonésie avec 52 758 tonnes et en cinquième position la Chine avec 24 684 tonnes. En Afrique, les plus grands producteurs de poivre sont Madagascar, le Ghana et l'Ethiopie avec respectivement 4 532 tonnes, 4 409 tonnes, 3 732 tonnes produits en 2020. (IPC, 2022 ; FAOSTAT 2022).

Avec une production marginale (<0,02% de la production mondiale) (Faostat 2017), le Cameroun est classé parmi les pays à faible production. Toutefois, sa production a été multipliée par dix ces dernières années, en raison de l'intérêt croissant que le poivre suscite chez les agriculteurs locaux depuis la labellisation et la reconnaissance internationale du poivre de Penja. Ce poivre cultivé au Cameroun dans la zone du Moungo, dispose d'un caractère âcre, corsé, au goût parfumé et d'un arôme unique. Autant de qualités rares qui lui ont valu en 2013, aux côtés du « miel blanc d'Okou », et du « café de Guinée » le label « Poivre de Penja », première Indication Géographique Protégée (IGP) de l'Afrique Subsaharienne attribuée par l'Union Européenne (Nzenowo, 2017). L'Indication Géographique est reconnue comme étant un outil garantissant l'origine, la protection, la différenciation, la promotion de qualité, de développement rural et de coordination des acteurs au sein de la filière (Gloane *et al.*, 2010). L'impact de cette reconnaissance internationale ne s'est pas fait attendre. Le prix du « poivre de Penja » est passé du simple au triple¹ entraînant ainsi une amélioration des revenus des producteurs. A côté de la valorisation du statut des producteurs de cette épice, la labellisation de ce poivre depuis 2013 a stimulé l'intérêt pour cette culture, caractérisé par l'augmentation du nombre des producteurs, passé d'une dizaine au départ à plus de 200 après 2013, mais aussi et surtout des surfaces cultivées (Anonyme 1, 2016).

La culture de cette épice a d'énormes potentialités au Cameroun. Le meilleur encadrement de cette filière, à l'instar de ce qui est fait dans la filière cacao, sa vulgarisation et son développement pourraient davantage booster la production pour satisfaire la demande sans cesse croissante.

L'une des difficultés majeures à laquelle fait face aujourd'hui la culture du poivre

¹ 3000 Fcfa en 2013 à plus de 11 000 Fcfa en 2015

dans le monde, est sa vulnérabilité aux bioagresseurs. Plusieurs pathologies ont été enregistrées dans les plantations de poivre à travers le monde. Parmi ces pathologies, certaines sont considérées comme majeures pour les fortes pertes de production qu'elles occasionnent. Du nombre de ces principales maladies, figure la pourriture du pied « Foot rot disease », causée par *Phytophthora capsici*. Cette pourriture du pied était responsable dans les années 1950 d'une baisse de rendement d'environ 100 % à Sarawak en Malaisie (Holliday et Mowat, 1963), tandis qu'une baisse importante de rendement d'environ 40 à 50 % a été enregistrée dans d'autres pays producteurs du fait de cette même maladie (Erwin et Ribeiro, 1996 cité par Drenth et Sendall, 2004). Du point de vue économique, les pertes engendrées par cette maladie sont estimées à 4.5 à 7.5 millions de Dollars à l'échelle mondiale (De Waard, 1979).

Le jaunissement ou dépérissement lent « yellow disease ou slow decline disease est une autre maladie majeure » (Ramana *et al.*, 1991 ; Anandaraj et Sarma, 1995). L'exemple indonésien renseigne de ce que les pertes liées à cette maladie étaient estimées à un peu plus de 30 % (Sitepu et Kasim, 1991). Maladie complexe aux agents pathogènes multiples et très malconnus, elle serait causée par des agents pathogènes variés parmi lesquels les nématodes (*Meloidogyne incognita*, *Radopholus similis*), *Phytophthora capsici*, *Fusarium spp*, *Rhizoctonia spp*, *Pythium spp*. Des facteurs de stress abiotiques comme des carences en éléments nutritifs et les températures élevées causent également cette maladie (Sarma *et al.*, 2010, Nguyen & Bui, 2011). La lutte contre ces maladies trouve sa complexité du fait que ses agents pathogènes responsables peuvent agir individuellement ou en association. Pour faire face, les agriculteurs recourent à diverses méthodes de lutte (Ramana *et al.*, 1991 ; Sarma *et al.*, 1991 ; Nguyen et Bui, 2011 ; Thomas et Rajeev, 2015). La lutte chimique consistant à utiliser des produits chimiques pour contrôler, ou tuer les agents pathogènes est la méthode la plus pratiquée. Le Phorate, le Carbofuran comme nématicides, et les fongicides telles que la bouillie bordelaise, l'Oxychlorure de cuivre, le Potassium phosphonate et le Metalaxyl-mancozeb ont été largement utilisés pour lutter contre la pourriture racinaire et la maladie du jaunissement par cette méthode chimique (Ramana *et al.*, 1991 ; Nguyen et Bui, 2011 ; Thomas et Rajeev, 2015). La lutte génétique pour le moment est presque inexistante. Des plantes hybrides et des variétés encore en test présentent de faibles taux de résistances ou de tolérances à ces maladies (Mammooty *et al.*, 2008). La lutte culturale comme le désherbage, le drainage adéquat, l'élimination des plants infectés, l'amendement organiques avec des plantes comme le neem, ont montré à des degrés variables leur efficacité (Ramana *et al.*, 1991 ; Sarma *et al.*, 1991 ; Anandaraj et Sarma, 1995). La lutte biologique consistant à utiliser des agents biologiques contre les agents pathogènes, est de plus en plus utilisée. Des

microorganismes tels que *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma spp*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acaulospora laevies*, *Glomus faciculatum*, sont les plus utilisés (Thomas et Rajeev, 2015).

Au Cameroun, comme partout ailleurs dans le monde, les producteurs de « poivre de Penja » font face à de nombreuses contraintes de production dont la plus sévère est l'attaque parasitaire. Aucune étude sur les pathologies du poivre n'a encore été faite au Cameroun ; De ce fait, les agents pathogènes à l'origine des pathologies observées au Cameroun sont peu ou pas connus. Des pertes annuelles de 1 à 5 %, voire 50 % ont été enregistrées dans les plantations de poivre de Penja (communication personnelle, PHP). Ces pertes ayant une tendance évolutive d'années en années observées dans toutes les plantations. Ce constat est une alarme pour cette filière, dont la place prépondérante au fil des années dans l'économie du pays, et également sur le marché international n'est plus à démontrer. Les producteurs en détresse rencontrés, par souci de ne pas perdre d'avantage leur production, utilisaient quelques méthodes de lutte afin de réduire la pression parasitaire : la lutte chimique étant la plus utilisée ; des emballages de produits chimiques ont été retrouvés dans les plantations et les échanges avec ces producteurs ont révélé que ceux-ci utilisent quelques formulations chimiques achetées sur le commerce, avec une préférence pour le produit fourni par l'association des producteurs du poivre de Penja. La gestion des maladies par les producteurs a été difficile à la fois parce que les pathologies et les bio-agresseurs sont méconnus, mais également en raison des bonnes pratiques d'utilisation des pesticides qui ne sont pas appliquées. L'utilisation des produits chimiques sur des pathogènes non identifiés est non seulement coûteuse pour le producteur mais souvent inutile. De plus, les produits chimiques utilisés de manière anarchique pourraient occasionner l'apparition des agents pathogènes résistants (Conway, 2004), entraîner la toxicité des produits phytosanitaires pour l'utilisateur et le consommateur, et augmenter la présence de résidus toxiques dans l'alimentation et l'environnement. Il est donc très important de savoir quels sont les agents pathogènes responsables des principales maladies présentes dans les champs, ayant à l'esprit qu'une meilleure prise en charge passe par une identification préalable du problème.

Des méthodes de lutte alternatives telles que l'utilisation des extraits de plantes et des microorganismes antagonistes, peuvent être envisagées pour une production durable du poivre de Penja. Quelques progrès ont en effet été constatés à ce niveau malgré les difficultés. De nombreuses études ont été réalisées sur l'utilisation des extraits de plantes dans la lutte contre les microorganismes pathogènes avec des résultats assez satisfaisants (Anandaraj et Leela, 1996 ; Wang *et al.*, 2007 ; Djeugap *et al.*, 2011 ; Galani *et al.*, 2013 ; Petchayo *et*

al., 2013 ; Mekam *et al.*, 2019). Ces extraits de plantes produisent des métabolites secondaires donc les activités antimicrobiennes ont déjà été prouvées (Mazid *et al.*, 2011). Des études sur les métabolites secondaires des plantes responsables de leurs activités antimicrobiennes sont toujours d'actualité. Certains microorganismes à fort potentiel antagoniste sont proposés dans la lutte contre des agents pathogènes des plantes. La lutte biologique contre les agents phytopathogènes a aussi fait l'objet de plusieurs recherches durant les dernières décennies. L'utilisation des antagonistes microbiens du sol tels que les *Trichoderma* produisent des résultats satisfaisants. Au Cameroun, des études sur *Trichoderma asperellum* (PR11) ont montré des résultats satisfaisants dans le contrôle des pathogènes du sol (Mbarga *et al.*, 2012 ; Mbarga *et al.*, 2014 ; Tondje *et al.*, 2007a) ; de plus en plus les recherches sur la protection des cultures s'orientent vers l'utilisation des extraits végétaux et des microorganismes antagonistes comme une alternative aux pesticides chimiques.

Hypothèses de travail :

Hypothèse 1 : L'identification des principales maladies du *P. nigrum* dans la zone IG poivre de Penja permet de mieux cibler les options de contrôle pour les producteurs de poivre de Penja ;

Hypothèse 2 : Les options de biocontrôle (l'extrait hydroéthanolique de *Chromoleana odorata* et *Trichoderma asperellum*) permettent de réduire l'incidence du dépérissement lent dans la zone IG poivre de Penja.

Objectifs

L'objectif général de cette étude était d'identifier les principaux bioagresseurs associés aux principales maladies du poivre de Penja, évaluer les traitements chimiques pratiqués par les producteurs et de proposer des solutions alternatives qui incluent l'utilisation des extraits de plantes et des antagonistes.

Plus spécifiquement il s'est agi de :

- Identifier les principales maladies du *P. nigrum* dans la zone IG poivre de Penja
- Identifier les phytopathogènes associés aux principales maladies de *P. nigrum*
- Évaluer l'efficacité des produits chimiques utilisés par les producteurs, de *Trichoderma asperellum* et des extraits de trois plantes *in vitro* et *in vivo* contre le dépérissement lent

Introduction

Le travail sera fragmenté en trois parties : la première partie se focalisera sur la description des données bibliographiques relatives principalement à la culture du poivre : sa description, sa culture, les ravageurs et maladies, et enfin les méthodes de lutte. La deuxième partie traitera des matériels et des méthodes qui seront utilisés pour l'identification des pathogènes, évaluer les fongicides et tester les méthodes de lutte non chimique. La troisième partie sera consacrée à l'analyse des résultats des différents tests effectués puis à leur discussion. Enfin la conclusion et les perspectives pour clôturer le travail.

REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1 Généralités sur le poivrier (*Piper nigrum* Leonian)

I.1.1 Origine, histoire et utilisation du poivre

« Les épices ont toujours été au centre des voyages d'exploration et de découverte. »

Le poivre, est originaire du sud-ouest de l'Inde, plus exactement de la région du Kerala, sur la côte de Malabar. C'est pour cette raison que le poivre noir du Malabar est considéré comme le poivre originel. Les premières traces de son utilisation remonteraient à la période néolithique, soit plus de 4000 ans avant notre ère. Le poivre était nommé "pippali" en sanskrit, qui donna le nom grec "peperi" puis "piper" en latin.

L'histoire du poivre est aussi vieille que celle de la civilisation humaine elle-même. Considéré comme le roi des épices, il a porté plusieurs casquettes par le passé. A l'époque des pharaons, il fut utilisé comme parfum destiné aux dieux, et également comme mixture dans les rituels de momifications, pour les anciens d'aryans c'était un précieux médicament (Ravindran, 2000). Il a également été utilisé comme monnaie pour payer les impôts, la dot et même les rançons. De nos jours, il est considéré comme une épice incontournable dans la confection de certains plats et est également utilisé en pharmacopée traditionnelle. Ce fut l'un des premiers articles commercialisés entre l'Orient et l'Europe. Le poivre a emprunté plusieurs chemins longs et compliqués durant des siècles : de la mer de l'Inde au port de Bérénice (port Egyptien sur la mer Rouge) sur le Golfe Arabique, par voie terrestre et par chameaux jusqu'à Copos sur le Nil, puis par voie fluviale jusqu'à Alexandrie. En Afrique, le commerce du poivre et de certaines épices est apparu dès l'antiquité en Egypte, avec la conquête d'Alexandrie par les Arabes en 641 avant J.C. Ces derniers transportant des pierres précieuses, du poivre et d'autres épices à partir de la mer Rouge sur les bords du Nil où les carthaginois établissaient un monopole du commerce des épices dans tout le bassin méditerranéen. Le canal reliant le Nil à la mer Rouge ouvrant une voie plus rapide vers l'Inde et la Chine. Durant le premier siècle après J.C., les Romains conquièrent l'Egypte, menaçant ainsi le commerce des épices jusqu'à monopolisé par les Arabes. Au IV^e siècle après J.C. Rome sera conquis par Alaric et Gothic, ce qui conduira à la chute de l'empire Romain et permettra ainsi aux Arabes de reprendre le monopole du commerce des épices jusqu'à l'entrée du Portugal et d'autres pays Européen en scène. A partir du XV^e siècle après J.C., le Portugal devint une puissance incontournable, et s'empare peu à peu du commerce des épices mettant fin au monopole commercial détenu par

les arabes depuis lors. Les grands navigateurs comme Vasco de Gama, Afonso de Albuquerque et Fernand de Magellan (Fernando de Magalhaes), feront des découvertes et ouvriront des routes sur lesquelles le royaume s'appuiera pour prendre le contrôle du commerce du poivre et des autres épices sur la moitié du monde. En 1498, Vasco de Gama sera le premier navigateur européen à atteindre l'Inde en contournant l'Afrique. C'est lui qui ouvre la voie maritime appelée encore aujourd'hui « route des épices ». Au XVIIIe siècle le monopole du commerce jusque-là détenu par les portugais prendra fin avec l'arrivée des Hollandais, mais leur suprématie ne durera pas assez longtemps car ils seront vaincus par le roi de Travancore en 1741 après JC, période pendant laquelle les Français et les Anglais essayeront d'asseoir leur suprématie sur les côtes de Malabar (Ravindran, 2000 ; Pham, 2007 ; Andriantomanga, 2011). Durant cette période les Français créent la compagnie des Indes orientale pour faciliter le commerce vers l'Asie. Pierre le Poivre au XVIIIe siècle déroba des plants de poivrier, de muscadier et de giroflier qu'il introduisit à l'île de France actuellement île Maurice (Naves et Mazuyer, 1939 dans Crouzet et Richard, 2009) mettant ainsi fin au monopole mis en place par les portugais puis les hollandais. Il fut également responsable de l'introduction des épices aux Seychelles.

I.1.2 Description botanique du poivrier

I.1.2.1 Classification classique

Règne : Plantae

Phylum : Tracheophyta

Classe : Angiospermes

Sous-classe : Magnoliids

Ordre : Piperales

Famille : Piperaceae

Genre : *Piper*

Nom binomial : *Piper nigrum* Leonian

I.1.2.2 Caractères végétatifs

La partie souterraine, la partie aérienne, les inflorescences, les fleurs et les fruits sont les différents niveaux de la morphologie du poivrier

➤ Partie souterraine

Le poivrier possède des racines fibreuses et noirâtres avec un enracinement peu profond (30 à 60 cm). Son système racinaire est composé de cinq à vingt racines principales dites pivotantes d'où émergent un réseau de racines latérales (Fig. 1A). La plante développe des racines adventives au niveau des nœuds des tiges orthotropes qui lui permet de se fixer sur son support (Anonyme 2, 2009).

➤ Partie aérienne

Les feuilles de poivrier sont généralement de taille et de forme variables et sont de ce fait utilisées comme critère d'identification dans la caractérisation de différents cultivars (Fig. 1B). Il y a un dimorphisme foliaire entre les feuilles des tiges orthotropes, qui sont de forme régulière et de couleur foncée, et celles des rameaux plagiotropes, qui sont asymétriques par rapport à leur nervure principale et de teinte plus claire. En général les feuilles, en forme d'as de pique sont alternes, allongées, pétiolées et simples. Le limbe est long de 10 à 15 cm et large de 5 à 10 cm. La face supérieure est brillante, luisante et de couleur vert foncé. La face inférieure, par contre est de couleur verte plus claire. Le poivrier comprend trois sortes de bois ou rameaux (Fig. 1C) :

- Des stolons qui courent sur le sol à la base de la plante. Organe végétatif de multiplication asexuée.
- Des tiges orthotropes : elles constituent le bois de charpente de la plante et peuvent atteindre dix mètres de haut à l'état naturel. De nature flexible, elles présentent des entre nœuds et au niveau desquels se trouvent des racines crampons qui aident la plante à s'accrocher à un tuteur et servent également des points d'insertions des rameaux plagiotropes. Une feuille est normalement disposée à chaque nœud.
- Des rameaux plagiotropes : ils sont disposés de façon alternes sur les tiges, et portent des feuilles alternes à l'aisselle desquelles naissent des bourgeons qui évoluent le moment venu en branches fructifère. Ces rameaux sont de nature plus fins et plus courts et les nœuds ne portent pas de racines crampons.

Chez le genre *Piper*, il existe des pieds mâles, femelles et hermaphrodites. Habituellement les plantes sauvages sont dioïques, tandis que divers cultivars ont été

sélectionnés pour leurs fleurs hermaphrodites. Indépendamment du type de plants, la floraison ne change pas. Les fleurs (entre 50 et 150) sessiles, naissent à l'aisselles d'une bractée et sont apérianthées (ni sépales, ni pétales). Elles sont groupées en épis plus ou moins denses pendants, de 7 à 12 cm de longueur et prennent naissance au niveau d'un nœud sur le rameau plagiotrope à l'opposé d'une feuille. Les fleurs de couleur jaune-verdâtre sont hermaphrodites ou unisexuées. Il s'écoule entre 6 à 8 mois entre la pollinisation des fleurs (qui se fait grâce au vent, à la rosée) et la récolte. Les fruits du poivrier se développent sous forme de grappes constituées de baies qui sont de couleur verte, puis jaune et ensuite rouge à maturité (Fig. 1D). Les baies ne renferment qu'une seule graine composée d'un embryon droit, un endosperme réduit, et un important péricarpe (Maistre, 1964 ; Ravindran, 2000 ; Pharm, 2007 ; Prabhakaran Nair, 2004).

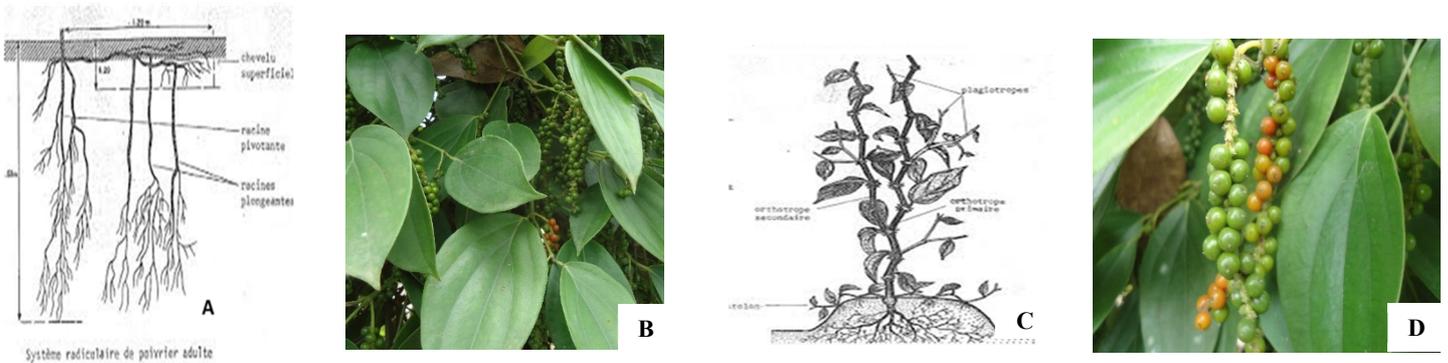


Figure 1 : Différentes parties du poivrier. **A :** système radicalaire ; **B :** Feuilles et grappes ; **C :** Types de tiges ; **D :** Grappes en maturité (Hubert, 1970 cité dans Wright, 2020 ; Petchayo Sandrine)

I.1.3 Les différents types de poivres

Il existe une centaine de cultivars de poivre surtout en Inde, toutes provenant d'une même espèce (*P. nigrum*). Les deux principaux cultivars sont : la variété « Lampong » à larges feuilles, grappes longues régulièrement garnies de grains de poivre petits et la variété « Bangka » à petites feuilles, grappes courtes avec de grains de poivre gros irréguliers (Borget, 1991). A partir de ces cultivars, on obtient différents types de poivre qui diffèrent selon le stade de maturité des baies et le type de préparation. On distingue donc : le poivre vert, le poivre blanc, le poivre noir, et le poivre rouge (Fig. 2).

➤ Le poivre vert : quelques semaines après la floraison, les grappes de poivre apparaissent sur les lianes. Ce poivre est récolté manuellement, grappe par grappe, au stade

laiteux avant que le grain ne soit formé, c'est à dire avant maturité. Il se conserve à température ambiante pendant une semaine, et est généralement conservé dans la saumure ou dans du vinaigre avec son péricarpe. Il est moins piquant que le poivre noir.

➤ Poivre blanc : Le poivre blanc, le plus raffiné, est issu de la baie cueillie à maturité optimale : le grain est complètement formé, et a fait le plein de son arôme. Il est récolté lorsque la pulpe rougit, puis est trempé dans l'eau courante pendant une dizaine de jours : c'est le rouissage. Il est ensuite lavé à grande eau, et séché au soleil. Débarrassé de la pulpe, le poivre blanc est moins piquant et plus doux que le poivre noir. C'est le plus parfumé et le plus discret dans la mesure où la molécule piquante du poivre (la pipérine) est principalement concentrée dans le péricarpe retiré. Mais l'arôme est concentré dans le cœur de la graine.

➤ Le poivre noir : c'est le poivre le plus populaire au monde, il a un arôme très puissant et très prononcé, son goût est piquant et amer. Il est obtenu à partir des baies cueillies avant maturité dès que le cœur du poivre est formé c'est à dire les grappes récoltées sont composées des baies de couleur verte et jaune. Elles sont ensuite séchées au soleil où elles prennent une coloration allant du brun au noir.

➤ Le poivre rouge : la récolte est la même que celle du poivre vert à la seule différence que les baies récoltées sont complètement mûres. Il est très rarement commercialisé. (Ravindran, 2000 ; Pharm, 2007 ; Perrouin *et al.*, 2014 ; Prabhakaran Nair, 2004).



Figure 2 : Les différentes déclinaisons du poivre. (Poivres.info)

I.1.4 Ecologie du poivrier

Le poivrier, plante des zones tropicales et subtropicales, est originaire de l'Asie Sud-Est (Inde, Indonésie, Vietnam...), et s'est propagé dans d'autres continents comme l'Amérique de Sud (Brésil...), et l'Afrique (Madagascar, Ethiopie, Cameroun, Ghana, ...).

I.1.4.1 Conditions climatiques

Le poivrier a besoin d'être bien arrosé ; la pluviométrie doit être régulière et bien répartie sur l'année (7 à 8 mois de saison de pluies). Les précipitations annuelles doivent être comprises entre 1800 et 3000 mm. Les fortes pluies entraînent généralement une stagnation d'eau dans les plantations de poivre et une chute des fleurs et les forts ensoleillements entraînent une maturation précoce des fruits. Les températures favorables pour sa croissance, se situent entre 23° C et 36° C pour une température optimale idéale autour de 28 °C. Etant originaire des forêts, le poivrier est une plante d'ombrage dont la densité varie en fonction des différents stades de croissance de la plante. Un ombrage plus dense est nécessaire pour les jeunes plants en pleine croissance, par contre l'ombrage doit être réduit pendant la maturation des fruits. (Ratsimbazafy,1995 ; Maistre, 1964 ; Thomas et Rajeev, 2015).

I.1.4.2 Conditions édaphiques

Les sols dont le pH est compris entre 5,5 à 6,5 sont préconisés pour la culture du poivre. Ces sols doivent être profonds, perméables, et bien drainés pour permettre un bon développement du système racinaire. Une abondante présence en humus, en matières organiques en décomposition, et une forte saturation en base de calcium et magnésium est favorable pour une bonne croissance du poivre. Les plantations situées entre 800 et 1500 mm d'altitude sont propices pour la culture de poivre (Maistre, 1964 ; Sadanandan, 1993).

I.1.5 Culture du poivre

I.1.5.1 Préparation du terrain

La préparation du sol pour la culture du poivrier se fait généralement en début de saison sèche en débarrassant la plantation des herbes ou des grands arbres. Le sol idéal pour la culture du poivre doit être profond, riche en humus organique et bien drainé (Chen *et al.*,2017 cité dans Lau, 2019). Le poivrier préfère les sols profonds, argilo-siliceux ou silico-argileux, meubles dont la surface est à plus de 2 m de la nappe phréatique, donc le plus souvent des pentes de collines. Les poivriers pour exprimer un meilleur potentiel de croissance, nécessitent la

présence d'un tuteur qui servira de support. Le tuteur utilisé peut être mort ou vivant. Une fois le terrain apprêté, le tuteur vivant peut être mis en place au moins un an avant les plants pour lui permettre de bien s'enraciner.

En choisissant d'utiliser les tuteurs vivants dans les plantations de poivre, ils ne serviront non seulement de support, mais fourniront également de l'ombrage. Le choix du tuteur doit tenir compte de son système racinaire qui ne doit pas entrer en compétition avec celui du poivrier. Les arbres utilisés comme tuteur ont généralement un système racinaire pivotant avec des ramifications latérales abondantes. Grimaldi et Sadoux en 1961 ont proposés quelques essences végétales pouvant servir de tuteur vivant : *Ceiba Pentandra* (Kapokier), *Bombax angulicarpum*, *Albizia ferruginea*, *Ficus thonningii*, *Erythrina* sp., *Morus mesozygea* (Mûrier), *Cola* sp. (Colatier), *Pterygota kamerunensis*. Ces tuteurs vivants sont placés à la distance de 2,5 m sur la ligne et 2,5 m entre les lignes, on arrive ainsi à la densité de 1600 tuteurs à l'hectare. Selon Ravindran *et al.* (2000) un espacement optimal pour la croissance du poivre est de 3 x 3m ou 3 x 2m.

Les tuteurs morts utilisés sont soit des colonnes de briques ou de bétons, soit des bois durs. Ils offrent une densité plus élevée de tuteur /hectare, nécessitent peu d'entretien et n'entrent pas en compétition avec le poivrier pour les éléments nutritifs. La difficulté qu'offre ce mode de tuteurage est le fait qu'il ne produit aucun ombrage exposant ainsi le poivrier à la sécheresse, de plus, le bois utilisé peut être attaqué par des termites et des insectes. Il est possible de mettre en place le tuteur mort de 3 à 5m de haut, après une préparation du sol faite par labour général ou trouaison, avec une densité de 2 x 2m, soit 2500 tuteurs par ha. Au Cameroun, seule la culture sur tuteur vivant est pratiquée.

I.1.5.2 Matériel végétal

Les techniques telles que le bouturage, le marcottage, le greffage et le semis peuvent être utilisés pour la propagation du poivrier mais la technique la plus utilisée et la plus répandue est le bouturage des tiges (Drenth et Sendall, 2004). Les boutures peuvent être prélevées sur les différents types de bois du poivrier à savoir les stolons, les orthotropes et les plagiotropes, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec les rameaux orthotropes. Le bouturage peut être directe c'est-à-dire planté directement sur les billons en plantation ou indirecte en passant par une préparation en pépinière. Les boutures sélectionnées pour la pépinière doivent porter 2 à 5 nœuds maximum et sont mis dans des sachets contenant un terreau puis transplantées en champs une fois que le plant ait atteint une croissance suffisante (Sasikumar et Johnson, 1992).

I.1.5.3 Plantation

Une fois les tuteurs mis en place, toutes les boutures pré racinées, les boutures en sachets de plastique ou les boutures fraîches non racinées peuvent être transplantées. Deux trous sont creusés de part et d'autre du tuteur afin de recevoir les boutures. Les plantations de poivre avec tuteurs vivants peuvent avoir une densité de 3200 plants de poivrier par hectare (à raison d'au moins 2 plants /tuteur) par contre celles avec tuteurs morts peuvent atteindre 5000 plants de poivrier/ha. De la fumure minérale et organique sera rajoutée à la terre qui servira pour à refermer les trous. La plantation proprement dite se fait de préférence en début de saison des pluies.

I.1.5.4 Entretien d'une poivrière

L'entretien d'une plantation de poivre concerne aussi bien le poivrier que le tuteur. Les opérations telles que l'attache au support, la taille, l'effleurage effectuées sur poivrier constituent des facteurs importants pour assurer une bonne productivité d'une poivrière. Les boutures mises en terre, une fois bien solides sont attachées à l'aide des ficelles au tuteur. L'attache se fait au niveau de chaque nœud du plant de poivrier. Une taille successive du plant est effectuée lorsque ce dernier débute sa croissance. Cette opération permettra non seulement de renforcer la base du plant, mais également d'éviter que cette base ne soit dégarnie suite à une élongation trop rapide. Un rabattement de la liane se fera les années suivantes afin qu'elles ne puissent pas dépasser les tuteurs. L'effleurage consiste à supprimer une partie des inflorescences d'une liane les trois premières années. L'effleurage peut se faire pendant la période de formation de la liane et en début de production afin d'éviter le trop grand échelonnement de la récolte. Lorsque les tuteurs vivants sont utilisés comme support, ils doivent également être taillés. Cette taille permettra de fournir un ensoleillement suffisant pour les plants de poivrier. Il est recommandé de procéder à la taille des tuteurs avant l'application préalable d'engrais pour maximiser l'absorption des nutriments par les lianes.

➤ Le paillage

Les plants de poivrier ont un système racinaire peu profond. L'utilisation d'une couverture organique du sol est donc très bénéfique. Elle maintient le sol humide pendant de plus longues périodes et réduit considérablement les fluctuations de température entre le jour et la nuit. De plus, la couverture végétale dans les plantations poivrières, réduirait l'infection à *Phytophthora* spp. (Ramachandran *et al.*, 1991). Il faut nécessairement procéder à l'élimination systématique des adventices dans une poivrière.

➤ **La fertilisation**

Le poivrier est une plante gourmande qui nécessite un apport important en engrais afin de maintenir un rendement élevé. Le calendrier de fertilisation varie selon la saison et l'âge de la plante. Généralement, l'apport de fertilisant se fait fréquemment par de petites quantités qui augmentent en fonction des différents stades de développement de la plante. Des applications modérées sont conseillées dès les tous premiers mois. Les éléments minéraux indispensables sont : l'azote (N), le Phosphore (P) et le Potassium (K). Les compositions telles que le 15 : 15 : 15 ou 9 : 9 : 9 ou le 12 : 12 : 17 : 2 + oligo-éléments sont recommandées pour la culture du poivre (Chen *et al.*, 2017 cité dans Lau, 2019). Yap en 2012 a estimé les besoins en nutriments d'un hectare de poivrier mature pendant une année à 202 kg d'azote, 13 kg de phosphore, 156 kg de potassium, 18 kg magnésium et 68 kg de calcium. Un apport conséquent en éléments minéraux (400 kg N, 180 kg P, 480 kg K, 425 kg Ca and 110 kg Mg /ha-/year) réduirait le jaunissement des feuilles et améliorerait la production du poivre (De Waard, 1979). Outre la fertilisation chimique, l'apport de fumure organique est très important dans le développement d'une plantation poivrière. Appliquer en début de saison des pluies, elle favoriserait une floraison abondante et précoce. La fumure organique doit être apportée à une distance de 20 à 30 cm de la liane.

➤ **Récolte**

La récolte consiste à cueillir pendant la période de récolte, les fruits mures et/ou murs, puis à les porter en sac, à les peser et à les ranger. La première récolte du poivre peut se faire après 3 à 4 ans de plantation. Le rendement augmente petit à petit jusqu'à atteindre le pic qui est généralement situé entre 7 et 8 ans. La plante reste en plein rendement jusqu'à 25 ans puis commence à décliner. Plus l'âge de la liane augmente, plus difficile sera la récolte. Les échelles sont utilisées dans les plantations les plus âgées car la liane peut atteindre 3 m de haut. Une plantation bien entretenue peut produire du poivre pendant plus de 25 ans. De la floraison au murissement des graines, Il peut s'écouler environ 8 mois et la récolte de ces graines peut s'étaler sur plus de 6 mois due au fait que les grappes n'atteignent pas la maturité en même temps.

I.2 Importance économique, production actuelle du poivre et répartition géographique

Le poivre est l'épice la plus répandue, consommée et commercialisée à travers le monde. Il représente à lui seul les 1/3 du marché des épices. Actuellement les principaux pays

producteurs du poivre dans le monde sont ceux qui forment l'International Pepper Community (IPC). Il s'agit des pays suivants classés selon leur volume de production, le Viet Nam, l'Inde, le Brésil, l'Indonésie, la Malaisie, la Chine et le Sri Lanka. Mais, il est aussi produit dans les pays d'Asie du Sud-Est, d'Amérique centrale, Sud et du Nord (l'Argentine, le Costa Rica, le Mexique, le Honduras) et ceux d'Afrique (Madagascar, le Cameroun, le Kenya, le Bénin, la Zambie, le Zimbabwe, l'Éthiopie, la Tanzanie, le Malawi, l'Ouganda) (Sarma *et al.*, 2010 ; Perrouin *et al.*, 2014).

I.2.1 Sur le plan mondial

La production mondiale du poivre a connu une croissance en dents de scie entre les années 1990 à 2008. Depuis dix ans, le Vietnam reste le leader mondial en termes de production et d'exportation de poivre avec plus de 30 % de la production et 50 % des exportations mondiales.

Notons qu'en 2008, la production mondiale était de 271 000 tonnes avec près de 85 % de la production localisée en Asie : le Viêt Nam produisait 34 % de la production mondiale (98 500 tonnes), Il était suivi de l'Inde (19 %, 50 000 tonnes), du Brésil (13 %, 35 000 tonnes), de l'Indonésie (9 %, 25 000 tonnes), de la Malaisie (8 %, 20 000 tonnes), de la Chine (7 %), du Sri Lanka (6 %) et de la Thaïlande (4 %). En 2009, la production mondiale était de 285 000 tonnes et estimée entre 320 000 à 350 000 tonnes en 2010.

En 2011, la production du poivre des vingt premiers plus grands producteurs a été estimée à 460 865 tonnes et évaluée à près de 960 millions de dollars à raison de 208 428 dollars/tonne. Le commerce international des vingt pays principaux commerçants s'élevait à 223 966 tonnes d'une valeur de 1,3 milliard de dollars donnant une valeur moyenne de 583 560 dollars / tonnes. (Anonyme 4, 2017).

En 2014, le Vietnam a exporté environ 158 000 tonnes pour 1,2 milliard de dollars (+19,3 % en volume). Le prix à l'export a atteint 7 679 dollars/tonne sur 11 mois (+14,76 %). L'Indonésie a exporté 36 000 Tonnes ; le Brésil avec 32 641 Tonnes, et enfin l'Inde qui en a exporté environ 23 750 Tonnes. Le total des exportations mondiales était d'environ 285 000 Tonnes soit 2,166 milliards de dollars en chiffre d'affaires, avec le prix moyennant les 7 600 dollars la Tonne. Les principaux pays importateurs sont les États-Unis, Singapour, les Émirats arabes unis, l'Inde et les Pays-Bas. (Nedspice, 2015 ; IPC, 2016).

En 2017, la production mondiale a atteint 690 467 tonnes, avec le Vietnam toujours en tête de liste avec une production de 252 576 tonnes suivie de l'Indonésie (87 029 tonnes) puis le Brésil (79 371 tonnes) et de l'Inde avec 72 000 tonnes (Faostat, 2020).

En 2021, la production mondiale était de 497 000 tonnes, faible comparée aux années précédentes et cette diminution a également été notée chez les principaux pays producteurs de poivre. Une production moyenne de 201 265 tonnes pour le Vietnam suivi, par le Brésil avec 89 954 tonnes, l'Inde avec 66 000 tonnes, l'Indonésie avec 52 758 tonnes et en cinquième position la Chine avec 24 684 tonnes (IPC, 2022 ; Faostat, 2022).

I.2.2 La production du poivre au Cameroun

Le Cameroun est considéré comme grenier en Afrique centrale, disposant d'un potentiel agricole considérable. Le secteur agricole emploie près de 70 % de la population et contribue à environ 25 % du produit intérieur brut, ce qui lui confère une place considérable dans l'économie camerounaise (Abdoul *et al.*, 2008). Les produits agricoles d'exportation comprennent le bois, le cacao, le café, la banane, le caoutchouc naturel, l'huile de palme, l'ananas et le coton. Le poivre quant à lui fait partie des cultures orphelines car n'étant pas dans le passé considéré comme culture d'intérêt pour l'économie du pays. Cette plante est cultivée dans quelques régions du pays telles que : Centre, de l'Ouest, Littoral et du Sud-Ouest, mais la plus grosse production vient de la région du Littoral (Fig. 3). Des données nationales sur les superficies allouées à cette culture ou sur la production totale de cette spéculacion ne sont pas disponibles. Néanmoins, en 2017 on estimait à 400 hectares la surface totale allouée à cette culture pour un rendement d'environ 500 à 900 kg par hectare en fonction de l'âge de la plantation. La production du poivre au Cameroun est en hausse, elle est passée de 215 tonnes en 2013 à plus de 300 tonnes en 2015 (Anonyme 5, 2017). 60% de cette production sont consommés localement contre 40 % destinés à l'exportation.

Cependant, selon les données de la FAOSTAT (2020), en 2010 la surface de production du poivre au Cameroun était d'environ 270 hectares pour un rendement estimé à 389 kilogrammes/Ha. Durant ces huit dernières années, ces données ont évolué en dents de scie. En 2017, la surface cultivée est restée inchangé depuis 2010 et le rendement était estimé à 343 kilogrammes/Ha.

Depuis 2013, le poivre Camerounais fait partie des produits agricoles les plus sollicités à l'international particulièrement celui cultivé dans le département du Mounjo (Cameroun) principalement dans la zone de Penja. Il possède un caractère âcre, corsé et un arôme unique, autant de qualités qui lui ont valu en 2013, le titre d'Indication Géographique Protégée et reconnu sous le nom de « Poivre de Penja ».

I.2.3 « Le poivre de penja » : Un poivre d'exception

Le « poivre de Penja » n'est pas une variété typique de poivre, mais un fruit issu des poivriers (*P. nigrum*) cultivés au Cameroun plus précisément à Penja et ses environs. La provenance des poivriers de Penja reste inconnue, mais il est admis qu'ils auraient été introduits au Cameroun dans les années trente par les premiers planteurs allemands et plus tard par les planteurs français et la Cameroon Development Corporation (CDC) qui les auraient rapporté du Cambodge, de l'ex Congo belge et de l'Inde (Scott, 2010). Dans cette partie du Cameroun, les effets des éléments constitutifs du microclimat, du sol et de l'altitude et les méthodes culturales se combinent pour produire la saveur hautement désirable, le piquant, le goût relevé et l'arôme particulier, attributs qui ont fait sa notoriété, faisant ainsi de lui un produit éligible en tant que Indication Géographique Protégée. En Septembre 2013 le poivre de Penja fut officiellement reconnu en tant que Indication Géographique Protégée et de ce fait, le tout premier produit en Afrique subsaharienne a porté cette étiquette au même titre que le miel d'Okou du Cameroun et le café de Ziama-Macenta (Guinée). Ne porte le nom de poivre de Penja, uniquement les poivriers cultivés dans l'aire géographique délimité par l'IGP constituée de six communes d'arrondissement : Mbanga, Mombo, Njombé-Penja, Loum, Manjo et Tombel appartenant aux régions du Littoral et du Sud-Ouest (Fig. 3). En plus de l'appartenance au périmètre délimité, il faut également respecter les techniques de conduite des cultures et de transformation du cahier des charges afin d'atteindre les qualités requises pour être qualifié de « poivre de Penja ». Cette labellisation semble être un véritable atout pour l'économie nationale. Actuellement, les producteurs bénéficient d'une amélioration de leurs revenus parce qu'ils peuvent déjà vendre leurs productions à des prix compétitifs sur les marchés national, régional et international (Metomo, 2015). Plus tard, le pays pourra même faire face à la forte concurrence observée sur les grands marchés internationaux (Anonyme 6, 2015). Certains grands chefs comme Christophe Aribert, Georges Blanc, Gilles Goujon avouent n'utiliser que ce poivre (Thierry, 2017). Cette épice qui a été labélisé, selon les experts rapporterait annuellement 24 milliards de Fcfa aux producteurs de cette localité. Le prix est passé du simple au triple depuis l'acquisition de l'IGP, elle coutait en moyenne 3000 Fcfa le kilogramme avant la labellisation en 2013 et est passé à 8000 Fcfa en 2014 et a atteint 13000 voire 14000 Fcfa le Kilogramme en 2015 renseignent les producteurs. La production du poivre de Penja a été estimée à moins de 100 tonnes par la FAO en 2015, par contre on parle de plus de 300 tonnes probablement consécutives au nombre croissant de producteurs (environ 200) durant les trois années qui ont suivi la labélisation (Anonyme 7, 2016).

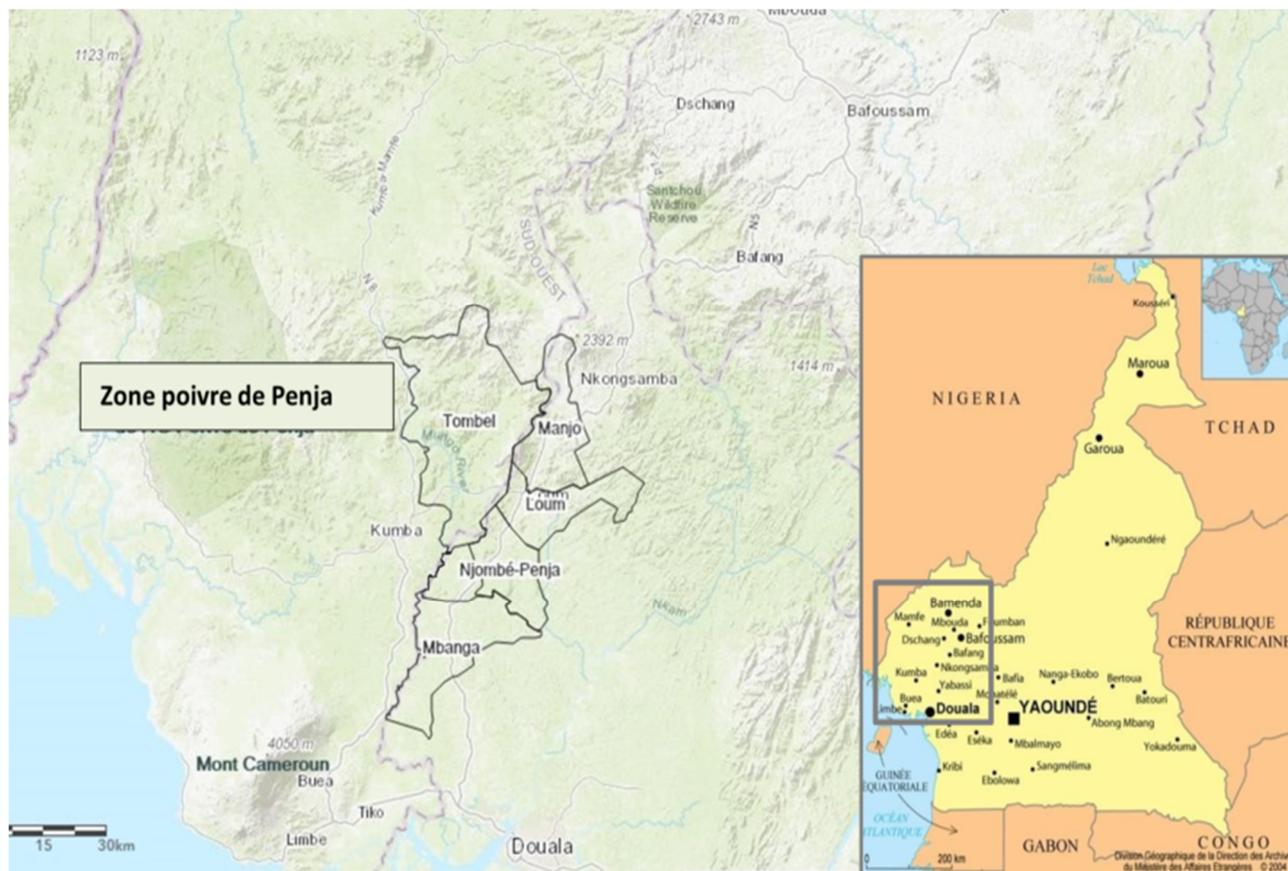


Figure 3: Aire géographique de production du poivre de Penja

I.2.4 Importance du poivre

Le poivre se consomme sous différentes formes ; en épice frais ou séché, sous forme de thé, comme conservateur d'aliment, entre également dans la fabrication des parfums, des biscuits....

Sa composition chimique lui confère de nombreuses propriétés :

- L'huile essentielle qui représente 1-3 % de la composition du poivre (blanc ou noir) est utilisée dans la fabrication des parfums pour homme, comme agent de saveur et aussi dans les boissons non alcoolisées. Essentiellement constituée de terpènes, elle est à l'origine de l'odeur typique du poivre que nous connaissons tous. Des études ont montré que l'huile essentielle du poivre a des propriétés antibactériennes (contre *Bacillus subtilis*, *Vibron cholerae*, *Clostridium botulinum* ...) antifongiques (contre *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium*, ...) (Damanhour et Ahmad, 2014 ; Nisar Ahmad *et al.*, 2012)

- La pipérine est présente dans toutes les parties de la plante, mais plus abondante dans les grains. Elle est à l'origine de la saveur piquante du poivre et représente 5 à 10 % du poids des grains de poivre. Elle est utilisée en parfumerie, dans l'aromatization des confiseries

et aussi comme antiseptiques dans les dentifrices ou dans les shampooings. Des récentes études ont mis en évidence de nombreuses propriétés imputées à la pipérine : telles que les propriétés anti-inflammatoires, l'amélioration de la biodisponibilité de certaines molécules, les propriétés anticancérigènes, antioxydantes, antimicrobienne... (Damanhour et Ahmad, 2014 ; Nisar Ahmad *et al.*, 2012).

➤ Le poivre est riche en vitamines et en minéraux soit 4 à 6 % : vitamine C, calcium, magnésium, phosphore, fer... Les bénéfices apportés par sa consommation seraient liés à sa composition en nutriments. Par exemple la vitamine C qui participe aux réactions d'oxydoréduction, le calcium qui participe à la contraction du muscle, le magnésium à la synthèse des protéines pour ne citer que ceux-là.

➤ Le poivre est fortement riche en amidon soit 40 à 50 %, en lipides (5 à 10 %) et en protéides (10 à 12 %) (Chikh et Rached, 2017).

I.3 Les ennemis du poivrier

I.3.1 Les ravageurs du poivrier

Les attaques des poivriers par les ravageurs sont l'un des principaux facteurs de baisse de production enregistrée dans les plus grands pays producteurs. Les principaux ravageurs du poivrier sont les insectes dont les plus importants sont :

Les boreurs de tige (*Lophobaris piperis*) : principalement retrouvés en Indonésie et en Malaisie, cet insecte s'attaque aussi bien aux tiges qu'aux grappes. Il perfore la tige empêchant ainsi le déplacement des éléments nutritifs vers la partie supérieure du plant. Il s'en suit le flétrissement puis le dessèchement du sommet du plant.

« Pollu » beetle (*Longitarsus nigripennis*) : c'est le plus dévastateur parmi les insectes. En tant qu'insecte endémique, il peut causer des pertes de production de l'ordre de 30 à 40 % (Thangaselvabal *et al.*, 2008). Ces coléoptères se nourrissent des jeunes pousses, des feuilles et des grappes. Les femelles pondent leurs œufs sur les feuilles et les grappes, les larves pénètrent les baies et se nourrissent des tissus internes. En cas d'infestation sévère, on note un pourrissement et une chute des feuilles et des grappes.

Top shoot borer (*Cydia hemidoxa*) : ils sont généralement présents dans les jeunes plantations (2-3 ans) et se nourrissent des jeunes pousses issues des branches orthotropes.

Leaf gall thrips (*Liothrips karnyi*) : on les retrouve également dans les jeunes plantations surtout celles qui sont en altitude. Ils infectent initialement les feuilles tendres provoquant une frisure des bords des feuilles vers le bas et vers l'intérieur, entraînant la formation des galles marginales. Plusieurs autres genres/espèces d'insectes sont responsables de nombreux dégâts sur les feuilles, les tiges et les baies dont ils se nourrissent et diminuent ainsi les rendements agricoles (Ravindran, 2000 ; Prabhakaran Nair, 2004 ; Thangaselvabal *et al.*, 2008 ; Sarma *et al.*, 2010).

I.3.2 Les maladies du poivrier

Bien qu'au moins dix-sept maladies aient été enregistrées sur poivrier, la maladie du pourrissement du pied, le dépérissement lent, la pourriture blanche racinaire, l'antracnose et la maladie du rabougrissement sont, dues à leur grande distribution et aux dégâts considérables qu'elles occasionnent dans les poivrières, considérées comme maladies majeures (Anandaraj et Sarma, 1995).

I.3.2.1 La maladie du pourrissement du pied (Foot rot disease)

Cette maladie a été mentionnée pour la première fois à Sumatra en 1885, où elle était qualifiée de « mort subite » et plus tard en 1928, elle a été renommée « foot rot disease » (Sitepu et Mustika, 2000 ; Muller 1936). Elle est présente dans presque tous les bassins de production du poivre dans le monde. L'agent causal de cette maladie, avait été identifié par Muller (1936) comme étant *Phytophthora palmivora* var *piperis*, et suite à des études morphologique et biochimique, il a été redécrit plus tard comme *Phytophthora capsici*. Cette maladie se caractérise par la présence des symptômes sur les parties aérienne et souterraine de la plante. Elle progresse rapidement surtout en temps de pluie, et met entre 2 à 3 semaines pour tuer le plant. L'expression des symptômes dépend de la partie de la plante affectée et de l'étendue des dégâts. Elle se manifeste par la pourriture des racines, du collet, puis progresse vers la partie aérienne de la tige où on observe un flétrissement, une apparition des tâches foliaires, une défoliation progressive, la chute des baies et des fleurs (Drenth et Sendall, 2004). Les pertes de l'ordre de 30 % dues à cette maladie ont été enregistrées au Vietnam (Nambiar et Sarma, 1977). La perte globale due à cette maladie dans les principaux pays producteurs de poivres, estimée entre 3 à 5 % de la superficie totale plantée, s'élèverait entre 4,5 à 7,5 millions de dollars US par an (De Waard, 1979).

I.3.2.2 La maladie du rabougrissement (Stunted disease)

Cette maladie est causée par deux virus à savoir le virus de la mosaïque du concombre et un badnavirus. Elle est connue sous le nom de maladie de la « mosaïque » et comme « petite feuille » au Sri Lanka et en tant que « maladie du rabougrissement » en Indonésie (Sitepu et Kasim 1991). Le principal moyen de propagation du virus réside dans l'utilisation des boutures infectées. Mais il peut aussi se transmettre à travers les insectes à partir des blessures occasionnées par des piqûres ou des accidents naturels. Les symptômes occasionnés par les virus sont de plusieurs types : les anneaux chlorotiques, les mosaïques, les rougissements de feuilles, les nécroses, l'enroulement de feuilles, le nanisme de la plante (Kueh et Sim, 1991 cité dans Anandaraj, 2000).

I.3.2.3 L'Anthracnose

On la retrouve dans plusieurs des pays producteurs de poivre. Elle est appelée maladie des baies noires en Malaisie et en Indonésie. Les champignons *Colletotrichum necator* et *C. gloeosporioides* ont été identifiés comme les agents pathogènes responsables de l'anthracnose (Anandaraj, 2000). Au Brésil, *Cephaleurus viresnscens* et *Colletotrichum gloeosporioides* ont été désignés comme principaux responsables de l'anthracnose (Sarma *et al.*, 2010). Ils provoquent des symptômes au niveau des feuilles, on observe des taches angulaires marrons entourées d'un halo jaune, au niveau des baies et des jeunes tiges (Sarma *et al.*, 2010).

I.3.2.5 La maladie de pourriture racinaire (Root rot disease)

La pourriture racinaire est l'une des maladies les plus dévastatrices qui attaquent le système racinaire de nombreuses plantes. Plusieurs espèces de plantes telles des arbres fruitiers, des arbres de forêts, des plantes pérennes ornementales et même certaines cultures vivrières sont concernées. Les Champignons, les bactéries, les virus, les nématodes, et les oomycètes sont les microorganismes du sol responsables de la pourriture racinaire. Dans les plantations de poivre, les agents pathogènes tels que *P. capsici*, les nématodes et le *Fusarium* spp. sont connus comme étant les principaux pathogènes responsables de la pourriture racinaire. *Fusarium solani* f. sp. Piperis, présent dans les plantations de poivre, réduit la durée de vie des plants qui passe de 20 à 8 ans voire 6 ans. Les plantations touchées par cette maladie présentent les symptômes de flétrissement et de jaunissement des feuilles (Anandaraj, 2000). Parmi les maladies de pourritures racinaires nous avons la pourriture racinaire blanche qui est causée par des champignons. En Côte d'Ivoire, elle est la principale cause des pertes enregistrées dans les

plantations d'hévéa (Neandris *et al.*, 1987), ainsi qu'au Nigéria. Elle est également présente au Sri Lanka, en Malaisie et au Congo où on observe des dégâts sérieux (Rajalakshmy et Jayarathnam, 2000). Elle a été retrouvée dans les plantations de poivre en Thaïlande et en Malaisie. Des champignons étaient responsables de la pourriture racinaire blanche chez les plantes. En Malaisie c'est le genre *Rigidoporus* spp. qui était à l'origine de la maladie (Chen *et al.*, 2017 cité dans Lau, 2019). *Rigidoporus lignosus* autrefois appelé *Fomes lignosus* avait été isolé sur les plants de poivrier présentant les symptômes de pourriture blanche en Thaïlande (Silayoi, 1987). Les principaux symptômes sont la présence des lames mycéliennes sous le bois, la présence des carpophores ou des basidiocarpes au niveau du collet. On peut également noter la présence des rhizomorphes soit sous l'écorce, soit au niveau des racines, ou dans le sol autour de la plante infectée (Omorusi *et al.*, 2014).

Au Cameroun, la pourriture racinaire blanche est présente dans les plantations d'hévéa, de cacao, et tout récemment on l'a retrouvé dans les plantations de poivre (Petchayo *et al.*, 2015). Les pipériculteurs du poivre de Penja, ont directement pensé au *Rigidoporus lignosus* comme agent pathogène de cette maladie comme c'était le cas dans d'autres pays producteurs de poivre où elle avait été enregistrée. Cependant, les symptômes de pourriture racinaire blanche observés au niveau des tuteurs et des poivriers, sont semblables à ceux causés par *Armillaria* spp. (Fig. 4A). Ces symptômes sont différents de ceux causés par *Rigidoporus* spp. par la présence des gommoses sur les cannelures présents au niveau du collet (Fig. 4B-C).

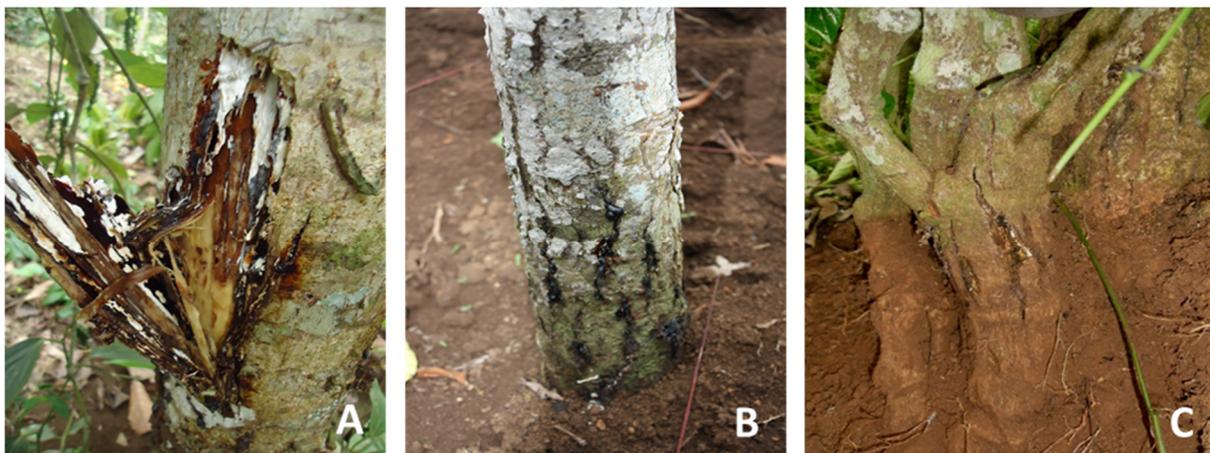


Figure 4 : Symptômes de pourriture racinaire blanche. **A** : Présence de lames mycéliennes ; **B** : Ecoulement de résine à la base du tronc du tuteur ; **C** : Craquement du collet du poivrier

I.3.2.5 Maladie du jaunissement ou dépérissement lent (Slow decline/yellow disease)

C'est l'une des principales maladies du poivrier, elle a été enregistrée pour la première fois à Bangka en Indonésie. Elle a longtemps persisté dans les pays producteurs de poivre incluant l'Inde, la Malaisie, Indonésie, le Brésil, la Thaïlande, mais cette maladie s'est étendue en même temps que la production du poivre c'est pourquoi on la retrouve dans plusieurs autres pays producteurs y compris le Cameroun. Cette maladie s'est vue attribuée divers noms « Slow wilt » (flétrissement lent) en Inde, « Slow decline » en Malaisie et « Yellow disease » (maladie du jaunissement) en Indonésie. C'est une maladie affaiblissante, où les plants affectés survivent pendant plusieurs années avant de dépérir progressivement sur une période de 3-4 ans. Elle est présente tout au long de l'année et se propage à travers le matériel végétal infecté, le sol, l'eau, les racines infectées et le matériel agricole infecté (Sarma *et al.*, 2010).

La maladie débute par une destruction progressive des racines nourricières à travers des lésions. En effet, l'attaque des racines entraîne une interruption et/ou une perturbation de la translocation de l'eau et des sels minéraux dans la plante. Cette dernière présente donc à ce moment des symptômes tels que le jaunissement des feuilles (Fig. 4), la chute ascendante des feuilles, des chloroses, et des brûlures aux extrémités des feuilles. Quelques fois au niveau des racines on note la présence des galles, des nécroses, et de la pourriture racinaire. La plante perd peu à peu de sa vigueur et de sa productivité, dépérit progressivement et finit par mourir (Nguyen et Bui, 2011).

Selon plusieurs auteurs la maladie était attribuée à *Radopholus similis* et *Meloidogyne incognita* dans presque tous les aires de production du poivre (Christie, 1957 cité dans Ramana et Santhosh, 2000). Cependant il existe différentes opinions sur l'étiologie de la maladie. Quelques chercheurs sont d'avis que la maladie est un complexe nématodes (*R. similis* et/ou *M. incognita*) - champignons couplés aux stress hydriques et à la malnutrition (Ramana et Santhosh, 2000). De Waard (1979) après les analyses chimiques du sol et des parties des plants malades, suggère que la cause de la maladie du jaunissement est liée à déficience du sol en éléments minéraux spécialement l'azote et le potassium. Anandaraj *et al.*, 1991 ont montré que cette maladie est due aux dégâts causés au niveau des racines nourricières soit par *P. capsici*, par *R. similis* ou par *M. incognita* ou bien par des combinaisons différentes de ces agents pathogènes. Une destruction des racines nourricières par *P. capsici* entrainerait des symptômes associés au dépérissement lent. (Ramana *et al.*, 1992).

Au Cameroun l'étiologie de cette pathologie reste encore un mystère. Cependant plusieurs microorganismes ont été isolés à partir du matériel végétal prélevé sur les poivriers présentant les symptômes de jaunissement (Fig. 5).



Figure 5 : Manifestation du dépérissement lent. **A** : plantation de poivre atteinte par la maladie ; **B** : plant de poivrier présentant les symptômes de jaunissement foliaire

I.4 Moyens de lutte utilisés dans les plantations de poivriers

La protection des poivriers contre certaines maladies comme : le dépérissement lent, la pourriture racinaire, la pourriture du pied passe par l'utilisation des produits phytosanitaires pour lesquels un choix limité de molécules est disponible.

I.4.1 Lutte Culturelle

Les pratiques culturelles principalement importantes dans la prévention des maladies, visent à obtenir des conditions favorables pour la croissance des plants de poivrier, mais défavorables pour le développement des nématodes, des champignons pathogènes, des virus et des ravageurs. Le choix du matériel végétal est la première étape dans la gestion des maladies. Les boutures doivent être prélevées sur des plants de poivriers sains afin d'éviter la propagation de la maladie (Anandaraj, 2000). Une bonne régulation de l'ombrage dans les plantations permet de réduire l'humidité qui favoriserait le développement de certaines maladies (Anandaraj et Sarma, 1995). L'amendement du sol par la fumure organique, le fumier, l'engrais vert, ainsi que les résidus et extraits de plantes améliore la texture du sol et augmente la croissance des microorganismes utiles antagonistes des agents pathogènes et des nématodes

(Anandaraj et Sarma, 1995 ; Sarma *et al.*, 2010, Thomas et Rajeev, 2015). Pour une bonne gestion du « Yellow disease » quelques pratiques sont importantes : une fertilisation adéquate ; Le drainage des eaux dans les plantations de poivre afin de réduire l'accumulation de l'inoculum de *P. capsici* ; la régulation de l'ombrage par la taille des tuteurs durant la saison des pluies est essentielle pour modifier le microclimat sous canopée ; la récolte sanitaire par la destruction des plants infestés afin de réduire le taux d'inoculum et la dispersion de l'agent pathogène. Le paillage d'une plantation poivrière avec 10-20 cm d'épaisseur du *Imperata cylindrica* à Bangka a permis de réduire jusqu'à 18 % l'incidence de la maladie du jaunissement (Wahid, 1976). Selon Kasim en 1985, un amendement du sol avec les pailles du maïs, du riz, du haricot, des arachides réduirait de 20-50 % la maladie de pourriture du pied de poivrier causé par *P. capsici*.

I.4.2 Lutte Chimique

La lutte chimique contre les maladies du poivrier renvoie généralement à l'utilisation des pesticides tels que : l'Oxychlorure de cuivre, mélange de bordeaux, métalaxyl et mancozeb, carbendazim, Phosphonate potassium, phorate, carbofuran. Notons que le type de produits utilisé et les quantités appliquées varient d'une maladie à une autre, d'une campagne agricole à une autre, et aussi d'une zone de production à une autre. En considérant que le « dépérissement lent » est due à une interaction entre les nématodes et les champignons, la lutte préventive commence en pépinière avec un traitement combiné de nématicide et de fongicide. L'application de nématicides comme le phorate 10 G (1 g) ou le carbofuran 3G (3 g) par polybag est recommandé pour réduire la charge initiale de nématodes en pépinière (Mohandas et Ramana, 1987).

En effet, une large gamme de fongicides est utilisée par les agriculteurs. Il s'agit du mélange bordeaux 1 %, de l'Oxychlorure de cuivre (0,2 %), du Phosphonate potassium (0,3 %), du métalaxyl mancozeb (0,125 %). L'application du fongicide mancozeb à 4 x 14 g /plant/année sous forme de drench combiné à l'épandage du nématicide Aldicarb 4 x 50 g/plant/année, réduirait la sévérité de la maladie du dépérissement lent de 15 % (Sitepu et Mustika, 2000). Anandaraj en 2000 a reporté que, le benomyl, le carbendazime, et le thiobendazole à 0,5 et 0,6 % seraient efficace contre la pourriture racinaire liée au *Fusarium*.

I.4.3 Lutte Génétique

La lutte génétique consiste à l'utilisation des variétés et des cultivars résistants ou tolérants aux différentes pathologies qui attaqueraient les plantes. Cette méthode de lutte dans

le cas du poivre reste encore un vaste champ de recherche à explorer. Les variétés résistantes contre les maladies majeures telles que la pourriture de pieds de poivrier « foot rot disease » et le dépérissement lent « slow decline » ne sont pas encore disponibles. Néanmoins plusieurs études ont montré qu'il existe des variétés tolérantes au *Phytophthora* et aux nématodes (Mammooty *et al.*, 2008 ; Archana et Rajan., 2013). Des études supplémentaires devront être encore menées afin d'utiliser ces variétés comme moyen de défense des plantes contre les agents pathogènes (Divya et Sharada, 2014).

I.4.4 Lutte Biologique

Ces dernières années, une large gamme de pesticides a été retirée du marché à cause de leur forte toxicité tant sur l'homme que sur l'environnement. La lutte biologique est une alternative de plus en plus envisagée dans le contrôle des maladies des plantes d'origine aériennes ou telluriques (Whipps, 1997). Elle renvoie à l'utilisation, des microorganismes antagonistes des agents pathogènes (champignons, bactéries, virus), des nématodes ainsi qu'à l'usage des plantes à effet antifongique.

I.4.4.1 Champignons antagonistes

La première utilisation référencée de la lutte biologique en utilisant les microorganismes antagonistes a été effectuée dans les vergers chinois, vers l'an 300 avant Jésus-Christ. Les fermiers utilisaient alors des fourmis tisserandes pour lutter contre les ravageurs des fruits. Depuis, d'autres utilisations ont été effectuées avec succès sur cacao, au Cameroun comme ailleurs dans le monde (Tondje *et al.*, 2005 ; Bateman *et al.*, 2005 ; Krauss *et al.*, 2010). De nombreux microorganismes antagonistes (champignons, bactéries) ont déjà fait l'objet des tests *in vitro* et *in vivo* sur les agents pathogènes du poivrier. Ces microorganismes antagonistes utilisés sous forme de formulations et testés en pépinière et en champ (Sasikumar *et al.*, 2009 ; Thomas et Rajeev, 2015) ont montré un effet suppressif contre certains agents pathogènes telluriques du poivrier (Anandaraj et Sarma, 1994). Des espèces de *Trichoderma* spp. utilisées dans les plantations poivrières ont montré leur antagonisme vis-à-vis de *P. capsici* (Anandaraj et Sarma, 1995). *Trichoderma* spp. reste l'antagoniste le plus utilisé et le plus efficace. Les propriétés nématocide et fongicide de *Trichoderma* ont été démontrées par de nombreux chercheurs, d'où leur utilisation dans le contrôle du dépérissement lent où les nématodes, *P. capsici* et *F. solani* sont impliqués (Anandaraj et Sarma, 1994 ; Shashidhara *et al.*, 2005). Ces antagonistes ont non seulement des propriétés fongicides mais également stimulatrice de croissance (Anandaraj, 1992). Cependant certaines espèces de *Trichoderma* spp. sont

considérées comme agents pathogènes responsables des maladies chez quelques plantes et même chez les humains. Par exemple des espèces de *Trichoderma aggressivum* ont été associées à l'épidémie de moisissure verte observée chez les champignons de paris cultivés en Europe et dans le nord de l'Amérique (Samuels *et al.*, 2002). L'une des souches de *Trichoderma viride* a été identifiée comme étant responsable de la maladie du « Dieback » relevée chez les plantules de Pin noir dans les parcs nationaux de Abruzzo, Lazio, et Molise en Italie (Li Destri Nicosia *et al.*, 2015). Les espèces de *Trichoderma* comme agents pathogènes chez les humains sont peu fréquents mais émergents. Les espèces suivantes, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma citrinoviride*, *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum*, *Trichoderma bissettii*, *Trichoderma orientale* ont été isolées des voies respiratoires, des tissus profonds chez l'homme et des tissus superficiels chez les animaux (Hatvani *et al.*, 2013).

I.4.4.2 Extraits de plantes

En dehors de l'utilisation des microorganismes comme agent de lutte biologique, les substances naturelles produites par les plantes ont attiré de nombreux chercheurs, à la recherche de nouveaux produits respectueux de l'environnement. Utilisés depuis longtemps traditionnellement, les plantes sont utilisées sous diverses formes : en extraits et en huiles essentielles. De nombreux travaux de recherches ont évalué les potentialités biologiques des extraits de végétaux et des huiles essentielles de nombreuses plantes (Petchayo *et al.*, 2013 ; Cowan, 1999 ; Djeugap *et al.*, 2011, Awuah, 1994). Des essais portant sur l'utilisation de quelques extraits de plantes notamment : *Chromoleana odorata*, neem, *Allium sativum*, *Lantana camera* pour lutter contre *Phytophthora* spp. et les nématodes ont été effectués dans les plantations de poivre ont montré des résultats intéressants (Sarma *et al.*, 1991 ; Anandaraj et Sarma, 1995, Thomas et Rajeev, 2015).

I.5 Microorganisme antagoniste : *Trichoderma* spp

I.5.1 Taxonomie, écologie et biologie

Trichoderma en tant que genre fut mentionné et décrit pour la première fois par Persoon en 1794. Le positionnement taxonomique des *Trichoderma* sp. n'a pas été facile car durant les décennies précédentes, de nombreuses recherches ont été marquées par de longue controverse sur sa classification (Bissett, 2004). Grâce aux analyses phylogénétiques et moléculaires, le genre *Trichoderma* regroupe plusieurs espèces aujourd'hui, qui autrefois était réduit à la seule espèce *Trichoderma viride*.

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp. est la suivante (Samuels,2006):

Règne : Champignons
Division : Ascomycota
Classe : Ascomycetes
Sous-classe : Sordariomycetidae
Ordre : Hypocreales
Famille : Hypocreacea
Genre : *Trichoderma*

Les *Trichoderma* sont des microorganismes ubiquistes, à croissance rapide car utilisant des substrats variés pour leur croissance (Klein et Eveleigh, 1998 cité dans Mclean, 2001). Ce sont des puissants envahisseurs opportunistes, on les retrouve aussi bien sur la terre que dans l'eau (Roquebert, 1996). Ils sont capables de se développer dans les prairies indigènes, les sols agricoles, les marais, les forêts, et les déserts de toutes les zones climatiques (Waghunde *et al.*, 2016).

Les *Trichoderma* sont des saprophytes, des endophytes, et ils ont également la capacité de parasiter d'autres êtres vivants (Caron et Laverdière, 2006). *Trichoderma* spp. a une reproduction asexuée par la production des conidies vertes (Fig.6) provenant des conidiophores et également par la production des chlamydospores très abondantes chez certaines espèces et jouant un rôle important pour sa survie (Samuels, 2006). Ces caractéristiques et le fait qu'un certain nombre d'isolats de *Trichoderma* possède des activités antibiotiques et mycoparasitiques, font d'eux des genres idéals comme agent de lutte biologique

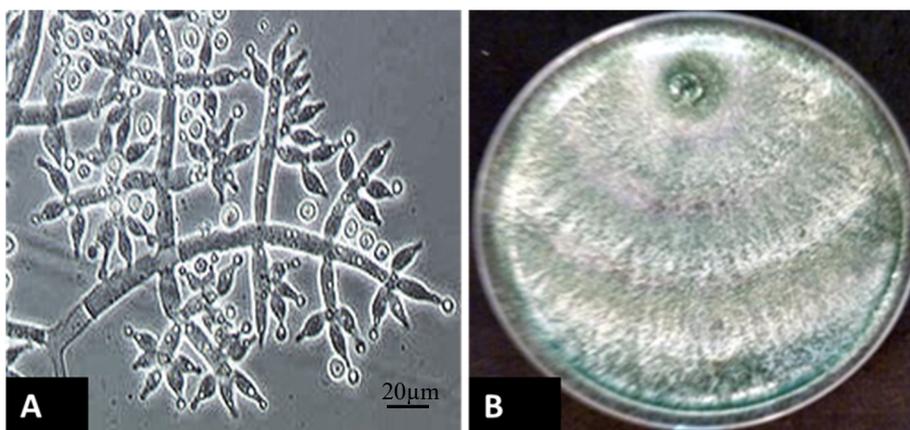


Figure 6 : *Trichoderma asperellum* (souche PR11): **A** : aspect microscopique ; **B** : aspect macroscopique (Anonyme 8 ; Petchayo T. Sandrine)

I.5.2 Mode d'action et mécanismes de défense des *Trichoderma* spp.

Les propriétés antagonistes de *Trichoderma* furent mentionnées pour la première fois en 1887 (Caron, 2002). Deux principaux mécanismes d'action du genre *Trichoderma* sont mentionnés dans la littérature à savoir un antagonisme direct où il est noté une interaction entre l'agent de lutte biologique et l'agent pathogène et un antagonisme indirect à travers les réactions de défenses de la plante. L'antagonisme direct regroupe l'antibiose, la compétition et le parasitisme tandis que l'antagonisme indirect fait appel à la résistance induite chez la plante. *Trichoderma* peut utiliser un ou plusieurs mécanismes d'action tout dépendra de la nature de l'agent pathogène rencontré ou des conditions physico-chimiques (lumière, température) du milieu (Samuels, 2004 ; Benitez *et al.*, 2004)

➤ **Le mycoparasitisme**

Le mycoparasitisme est une succession d'évènements complexes. Il débute par une reconnaissance qui a lieu entre les récepteurs situés sur la membrane des hyphes de *Trichoderma* et les effecteurs (fragments peptidiques) libérés par l'agent pathogène. Cette interaction entre les deux provoquera une cascade de réaction qui conduira à l'activation des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires ou des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (glucunase, kinases, peptidases). *Trichoderma* à l'aide de ses hyphes s'enroulera autour de l'agent pathogène et lui injectera des enzymes digestives et des toxines qui vont entraîner sa destruction (Nusret et Newman, 2004 ; Kubicek *et al.*, 2014).

➤ **L'antibiose**

Elle consiste à produire des métabolites secondaires de natures variées dirigées contre les champignons pathogènes en exerçant un effet toxique. Ces métabolites secondaires (antibiotiques) inhibent la croissance des champignons phytopathogènes et leur production dépend des conditions du milieu. Parmi ces composés, nous retrouvons des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (principalement contre les souches Gram +) et antiviraux. Certains de ces métabolites sont aussi nécessaires pour assurer des modifications chimiques de l'environnement (pH, ionisation) (Maroua, 2018).

➤ **La compétition**

Les *Trichoderma* présentent cette aptitude à utiliser les mêmes ressources (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons phytopathogènes. Ils sont parmi les microorganismes rhizosphériques les plus compétitifs. Ce mode d'action est généralement

utilisé par *Trichoderma* avant l'arrivée des agents pathogènes ce qui permettra de limiter leurs apparitions grâce à la colonisation de la surface racinaire et à la compétition trophique. Quand *Trichoderma* spp. colonise le milieu, il établit une zone d'interaction dans la rhizosphère des plantes et sécrète des molécules comme les sidérophores qui aident à absorber fer et inhibent la croissance des phytopathogènes (Benitez *et al.*, 2002).

➤ **Résistance induite**

L'aptitude de *Trichoderma* à provoquer les mécanismes de résistance localisée et systémiques chez la plante par la synthèse des substances chimiques, a été démontrée dans les années 90 (Enkerli *et al.*, 1999). Les molécules telles que l'hydroperoxyde lyase, la peroxydase et la xylanase (favorisent la formation des phytoalexines et la lignification des tissus) sont synthétisées par la plante en réponse aux molécules chimiques déversées dans le milieu par *Trichoderma* (Woo et Lorito, 2007).

➤ **Stimulateur de croissance**

Les mécanismes par lesquels *Trichoderma* stimulerait la croissance des plantes sont encore mal connus. Mais des études porteraient à croire que les mécanismes qui lui confèrent ses aptitudes antagonistes sont les mêmes qui permettraient la stimulation de croissance des plantes (Alabouvette et Cordier, 2018). Des facteurs tels que ; la suppression des dommages oxydatifs sur les racines, la sécrétion de facteurs de croissance par le champignon, l'inhibition de la microflore gênante et l'amélioration du transport des micronutriments produits par *Trichoderma* pourraient contribuer à cette stimulation de croissance (Abbou, 2014 ; Yedidia *et al.*, 2001). Des études ont montré que certaines plantes (Riz, Tomates, ...) traitées avec *Trichoderma* spp. présentaient une forte augmentation de la biomasse racinaire et aérienne (Mourria *et al.*, 2007 ; Ouedraogo et hien, 2015).

1.5.3 *Trichoderma asperellum*

T. asperellum est un agent de lutte biologique dont l'efficacité contre une large gamme d'agents pathogènes responsable des maladies chez les plantes a été démontré par de nombreux auteurs. Les straminopiles, les champignons, les nématodes et même les bactéries sont inhibées en présence de *T. asperellum* (Gary *et al.*, 2010). Ce dernier a été identifié dans de nombreux pays, par exemple aux USA on parle de la souche Tr 31 ; Tr 7, au Brésil on a la souche GJS 91-160, au Vietnam la souche GJS 90-7 pour ne citer que celles-là (Gary *et al.*, 1999). Au Cameroun, 4 souches de *T. asperellum* ont été identifiés ; PR10, PR11, PR12 et 659-7 (Tondje *et al.*, 2007). Ces différentes souches ont montré leur pouvoir antagoniste contre différents

agents pathogènes. Tondje *et al.* (2007) ont montré que *T. asperellum* pouvait réduire l'incidence de la pourriture brune dans les plantations de cacao et améliorer le rendement. Tchameni *et al.* (2017) ont montré que *T. asperellum* pouvait à la fois protéger les plants de cacao contre *Phytophthora magakarya* et stimuler la croissance de ces derniers. Une réduction de la sévérité de la pourriture racinaire de cacao causée par *Pythium myriotylum* a été observée en appliquant du *T. asperellum* sur les plants (Mbarga *et al.*, 2012).

I.6 Extraits végétaux et plantes utilisées au cours de l'étude

Les plantes sont constituées de différents types de composés de fonctions diverses.

I.6.1 Extraits végétaux

Un extrait d'une plante est une solution qui contient une partie des principes actifs de la plante soumise à un traitement précis. Aujourd'hui, certains pays en développement tentent de vulgariser l'utilisation d'extraits végétaux possédant des propriétés pesticides. Selon le mode d'extraction et de l'appareillage on distingue plusieurs types d'extraits naturels de plantes : les oléorésines, les huiles essentielles, les extraits aux solvants.

I.6.1.1 Les extraits aux solvants

- **Extraits aqueux**

L'eau est utilisée comme solvant d'extraction ; Mais le produit obtenu diffère selon que l'eau utilisée soit froide ou chaude : On parle de macérât lorsque l'extraction est faite à l'eau froide, et quand elle est faite à l'eau chaude on parle de décocté. Les extraits aqueux sont généralement très riches en composés polaires, Ils contiennent : anthocyanines, amidons, tannins, saponines, terpénoïdes, polypeptides et les lectines (Brigita *et al.*, 2005).

- **Les extraits aux solvants organiques**

Les solvants organiques les plus utilisés sont : éthanol, méthanol, hexane, éther et acétone. La nature des principes actifs extraits dépend du type de solvant utilisé. Certains composés comme les phénols, les anthocyanines (Brigita *et al.*, 2005) les tanins, les propolis, les terpénoïdes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les stérols et les polyacétylènes sont obtenus lorsque l'éthanol est utilisé comme solvant d'extraction (Brandao *et al.*, 1997).

I.6.2 Généralités sur les plantes utilisées dans cette étude

I.6.2.1 *Commelina benghalensis* L.

➤ Description botanique et écologique

Commelina benghalensis L. de la famille des Commelinaceae est originaire des régions chaudes tempérées, subtropicales et tropicales d'Afrique et d'Asie. Elle préfère les zones humides, mais elle est généralement retrouvée dans les forêts et les prairies. Elle est considérée comme une espèce adventice, une mauvaise herbe. C'est une plante annuelle ou vivace, très ramifiée, rampante à la base puis redressée à l'extrémité de plus de 40 cm de long. Les racines sont charnues, tubérisées, et fusiformes. Les feuilles sont ovales, brillantes, vert pale avec un sommet obtus à aigu et les fleurs ont des pétales bleu foncé (Fig. 7A) (Orni *et al.*, 2018).

➤ Usage

Bien qu'étant considéré comme une mauvaise herbe, *C. benghalensis* est utilisée à différentes fins thérapeutiques. Les feuilles sont utilisées en cataplasme pour soigner les blessures externes, et peuvent également être utilisées pour traiter les plaies, l'acné, les furoncles et les piqûres. En Afrique du Sud, elle est utilisée pour réduire l'hypertension artérielle et aussi pour lutter contre l'infertilité chez les femmes. Les feuilles sont utilisées comme fourrage pour les animaux et sont également consommées par les humains comme légumes (Orni *et al.*, 2018)

I.6.2.2 *Chromoleana odorata*

➤ Description botanique et écologique

Chromoleana odorata L. est une plante pérenne herbacée à boisée, appartenant à la famille des astéracées. Originaire de l'Amérique (Floride et Texas), elle pousse désormais en Afrique, en Asie et en Australie où elle est considérée comme mauvaises herbes des cultures. Elle pousse dans les zones riveraines, les bordures de routes, les pâturages et les plantations négligées. Elle atteint 2-3 mètres de haut et présente des feuilles simples, opposées et sans stipule. Les feuilles ont une forme en losange, ovale avec un sommet aigü et une base arrondie (Fig. 7B) (Zachariades *et al.*, 2009).

➤ Usage

Bien que considéré comme une mauvaise herbe, des études ont montré que *C. odorata* possède certaines potentialités. Elle a montré une efficacité en tant que fongicide, nématicide, insecticide, analgésique, antimicrobien (Kumar *et al.*, 2011 ; Phan *et al.*, 2001). Au Nigéria, des

études ont montré qu'elle améliore la fertilité du sol dans le système de rotation des cultures (Uyi *et al.*, 2014 ; Kumar *et al.*, 2011). Elle est utilisée chez la femme pour des problèmes de fécondité et consommée sous forme de tisane, elle permet d'éviter le développement du cancer du col de l'utérus.

I.6.2.3 *Phyllanthus amarus*

➤ **Description botanique et écologique**

Phyllanthus amarus Schum. & Thonn encore appelé « petit tamarin blanc » est une plante originaire de l'Amérique tropical mais que l'on retrouve aujourd'hui dans les pays tropicaux et subtropicaux du monde. On les rencontre sur les sols cultivés préférentiellement argileux et peu drainants. Elle appartient à la famille des Phyllanthaceae. Petite plante herbacée pouvant atteindre 60 cm de hauteur et possédant des ramifications fines et porteuses de feuilles. Les feuilles sont alternes, simples et subsessiles. Les fleurs et les fruits se retrouvent en dessous du pétiole (Fig. 7C). Le fruit est une capsule globuleuse déhiscente et les fruits n'ont pas de pétales et sont par conséquent vertes (Verma *et al.*, 2014).

➤ **Usage**

De nombreuses vertus médicinales lui sont attribuées. Toutes les parties de la plante sont utilisées et souvent associées avec d'autres espèces. En cataplasme de feuilles, le *P. amarus* soigne les maladies de peaux. Elle présente de nombreuses propriétés entre autres, antidiabétiques, analgésiques, antiinflammatoire et antimicrobiens. Elle a longtemps été utilisée en chine pour traiter les maladies chroniques du foie. En décoction la plante sert à traiter la jaunice et pris en association avec un médicament antiviral elle traiterait l'hépatite B. (Verma *et al.*, 2014 ; Calixto, 1998 ; Xia *et al.*, 2011)

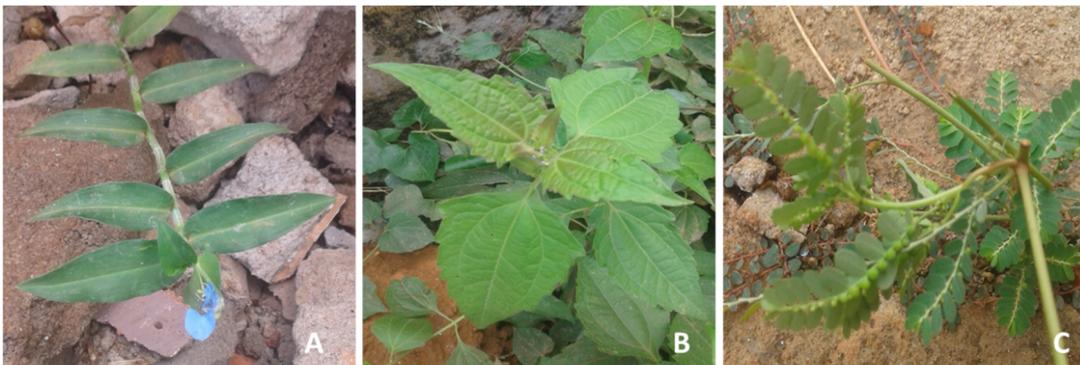


Figure 7 : Plantes utilisées ; **A :** *Commelinna benghalensis* ; **B :** *Chromoleana odorata* ; **C :** *Phyllantus amarus*

I.6.3 Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires (substances naturelles) sont des composés chimiques produits par la plante et non directement impliqués dans les fonctions vitales de la plante contrairement aux métabolites primaires. Leur absence n'est pas fatale pour la plante, elle peut soit n'avoir aucun effet, soit limiter la survie, la fécondité ou l'apparence de celle-ci. Les facteurs abiotiques, les facteurs biotiques, les molécules induites par des facteurs biotiques, telles les phytoalexines peuvent modifier sa nature et sa teneur dans la plante.

Chez la plante, les métabolites secondaires jouent des rôles divers comme par exemple régulateur de croissance, attraction des pollinisateurs, protecteur contre les pathogènes ou des herbivores, médiateur chimique entre les organismes vivants dans les écosystèmes (Elkolli, 2017). Ces métabolites secondaires en faible quantité et de très grandes diversités portent de multiples casquettes, ils sont utilisés en médecine dans le traitement des maladies, en cosmétiques dans la fabrication des produits de beauté et en agronomie dans l'élaboration des pesticides biologiques pour lutter contre les agents pathogènes des plantes, en alimentation dans la fabrication des épices et herbes aromatiques (Mohammedi, 2006).

Selon la structure et les fonctions, on estime à plus d'une centaine de milliers de métabolites secondaires rassemblés en trois grands groupes selon une classification élémentaire : les composés phénoliques, les terpènes et les composés contenant de l'azote et du soufre (Krief, 2003 ; Mazid *et al.*, 2011) (Fig. 8).

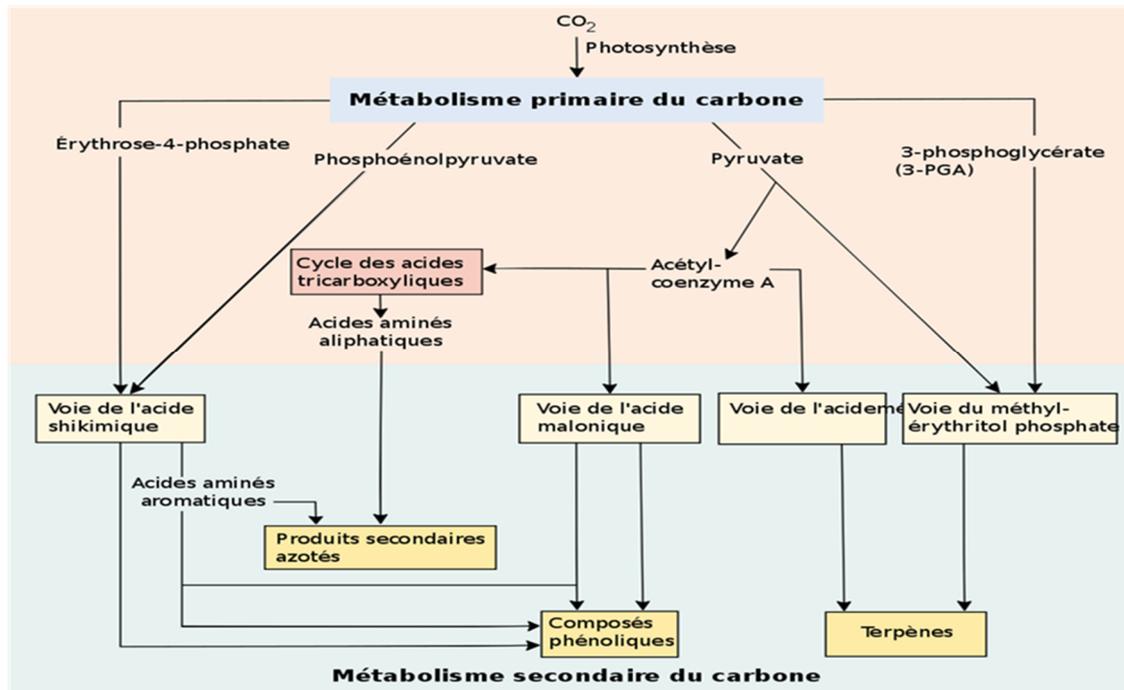


Figure 8 : Biosynthèse des trois grands groupes des métabolites secondaires : composés phénoliques, les terpènes et les composés contenant de l'azote (Lincoln et Zieger, 2006)

I.6.3.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont issus du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante, les racines, tiges, bois, feuilles, fleurs, et les fruits et n'exercent aucune action directe sur les fonctions vitales de celle-ci (Yusuf, 2006). La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ils sont constitués de plusieurs familles de composés (Fig. 9) à l'instar des flavonoïdes responsables de la coloration des fruits et des fleurs représentent le groupe le plus vaste. Les flavonoïdes dont les plus importantes sont les flavones et les flavonols ont tous une origine de biosynthèse commune et par conséquent possède tous un même squelette de base.

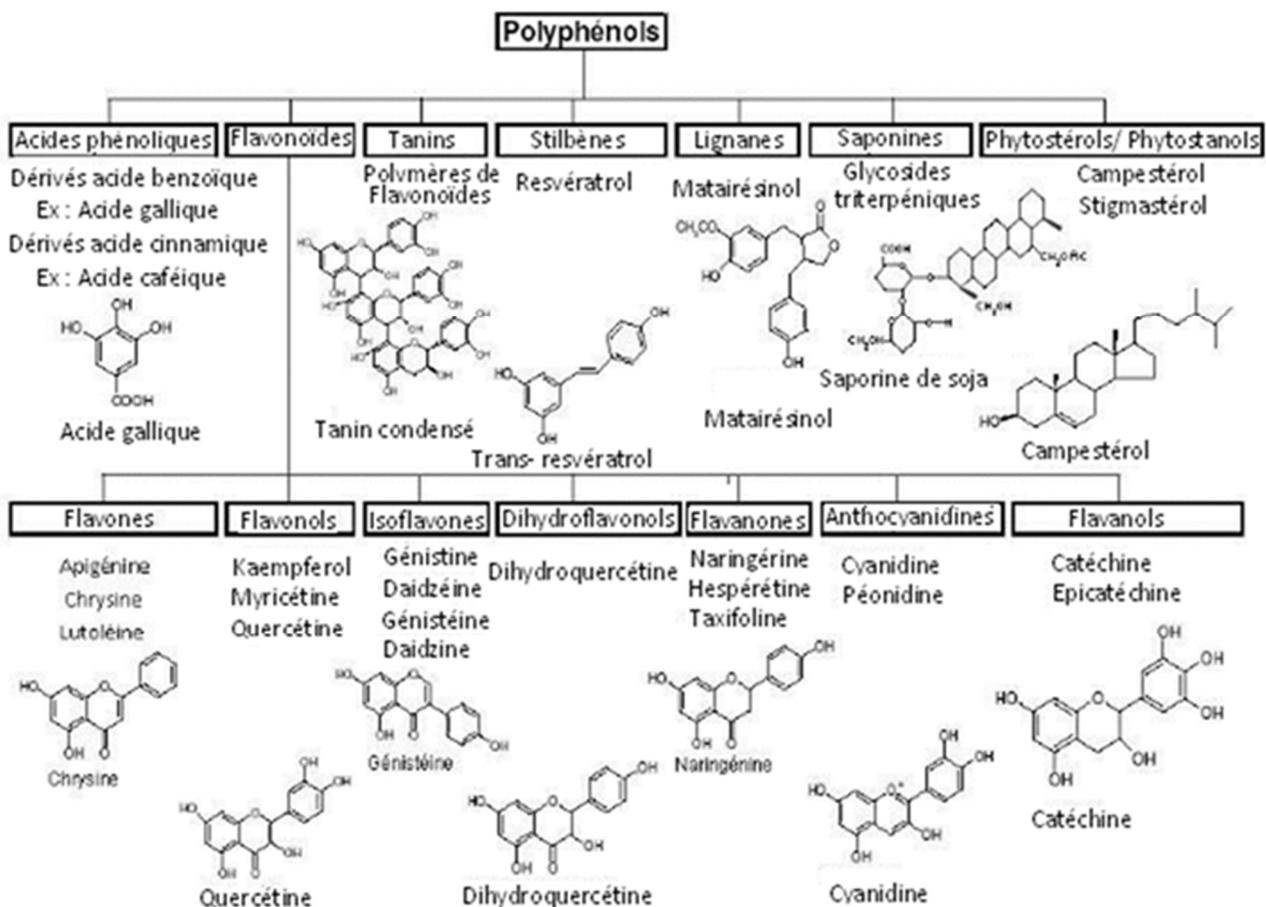
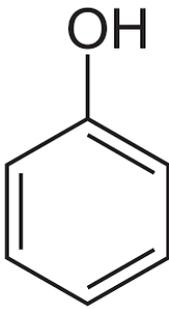


Figure 9 : Les différentes classes des composés phénoliques (Ellothmani *et al.*, 2017)

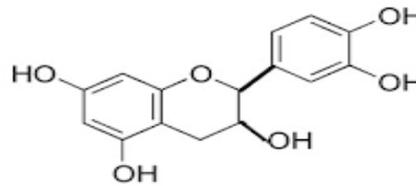
➤ Biosynthèse des composés phénoliques

Largement distribués, les polyphénols comptent au moins 9000 structures différentes connues (Baharun, 1996). Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés dans une fonction : ester, hétérosides, éther. Le

phénol est le composé de base de ce groupe et les dérivés portant plus de deux noyaux benzéniques sont appelés les polyphénols (Fig. 10). Les polyphénols sont formés à partir de deux acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine dérivant de la voie des acides shikimiques (Macheix *et al.*, 2005 cité dans Bellebcir, 2001). La biosynthèse des composés phénoliques se fait par deux voies : la voie des acides shikimiques où la dégradation des hydrates de carbones par la voie des pentoses phosphate et de la glycolyse produit l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate qui sont les précurseurs des tanins hydrolysables et des chalcones molécules de base de tous les flavonoïdes et les tanins condensés (Dewick, 1995). La voie de l'acétate est celle qui passe par le malonate issu de l'acétyl CoA provenant de la glycolyse et la β oxydation.



Phénol



Polyphénol

Figure 10 : Structure de la molécule phénol et celle d'un polyphénol

➤ **Les fonctions des composés phénoliques**

Les polyphénols sont constitués des molécules de signal, des pigments, des arômes qui peuvent jouer un rôle attractif ou répulsif et ils peuvent protéger les plantes contre les bio-agresseurs. Les composés phénoliques jouent un rôle dans le système de défense de la plante contre les bio-agresseurs y compris les nématodes (Wuyts *et al.*, 2006). Produits comme phytoanticipines, ils sont impliqués dans la résistance passive et comme phytoalexines ils sont considérés comme inducteurs de résistance chez les plantes. Ils sont également impliqués dans la fortification de la paroi cellulaire des plantes grâce à la lignine. Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires, antimicrobiens (Tableau I).

Tableau I : Quelques fonctions de phénylpropanoïdes (Heldt, 2005)

Phénylpropanoïdes	Fonctions
Coumarines	Antibiotiques, toxines contre les animaux brouteurs
Lignanes	Antibiotiques, toxines contre les animaux brouteurs
Lignines	Constituants de la paroi cellulaire
Subérine et Cutine	Formation de couches imperméables
Stilbènes	Antibiotiques, spécialement fongicides
Flavonoïdes	Antibiotiques, signal pour interaction avec les symbiotes, pigments de fleurs, substances de protection contre la lumière UV
Tanins	Tannage, fongicides, protection contre les herbivores

I.6.3.2 Les composés terpéniques

Ils constituent la plus grande classe des métabolites secondaires. Ils sont produits par de nombreuses plantes et sont responsables de la couleur, de l'odeur chez celles-ci. Ils ne sont pas exclusifs au règne végétal, on rencontre les sesquiterpènes et les diterpènes chez les animaux marins et les phéromones monoterpéniques chez les insectes. Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, cyclique ou non cyclique et constitués d'unités isoprénique à cinq atomes de carbone. Selon Bruneton, (1993), les composés terpéniques sont constitués de : les sesquiterpènes, les diterpènes, les saponosides, les hétérosides et les huiles essentielles.

➤ Biosynthèse des composés terpéniques

La biosynthèse des terpènes se passe généralement dans les aiguilles car elles sont remplies d'enzymes nécessaires à leur production. Les terpènes sont en général tous constitués à partir des unités d'isoprènes (Fig. 11) liées une à la suite de l'autre. Généralement, la chaîne de carbone ainsi formée à partir de l'unité commune (isoprène) peut se refermer pour former un ou plusieurs cycles (Sell, 2003). Le précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique obtenu après une série d'évènements (condensation enzymatique, réduction, déshydratation...) de trois molécules d'acétyl CoA (provient du pyruvate). Sa phosphorylation suivie d'une décarboxylation aboutie à l'unité isoprénique de base : le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère le diméthylalyl-diphosphate (DMAPP). A partir de ces différentes unités, la plupart des terpènes peuvent être générés et ainsi contribuer au métabolisme de la plante.

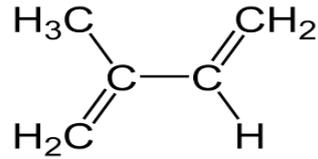


Figure 11: Structure d'un isoprène

➤ **Les fonctions des terpènes**

Les terpènes produits dans les plantes comme métabolites secondaires seraient impliqués dans les mécanismes de défense de la plante et auraient de par leurs propriétés odoriférantes un effet répulsif pour les insectes et les mammifères se nourrissant des plantes. Les familles de molécules les plus connues pour être des agents de défense contre divers agresseurs pour les conifères sont en majorités les monoterpènes et les sesquiterpènes (Mazid *et al.*, 2011). Les activités biologiques suivantes leur sont imputés : anti inflammatoire, analgésique, antibiotique, anticancéreux, irritant et calmant.

I.6.3.3 Les composés azotés : les alcaloïdes

Les composés azotés comprennent des alcaloïdes, des glucosides cyanogènes et des acides aminés non protéiques. Les alcaloïdes constituent un autre groupe des composés produits par la plante dite secondaires. Ce sont des molécules organiques mono ou polycycliques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azotées, plus ou moins basiques. Le premier alcaloïde, la morphine de l'opium fût isolée pour la première fois par Desrone en 1808. De nombreuses molécules appartenant aux alcaloïdes continuent d'être identifiées avec déjà plus 10 000 alcaloïdes connus à l'heure actuelle. De distribution restreinte, on les retrouve surtout dans la famille Papavéracées, Rutacées, Fabacées et Solanacées. On peut retrouver les alcaloïdes dans toute la plante mais particulière dans les organes en formations et en croissance. Les écorces, les feuilles (Ex. le tabac, le thé), les grains (Ex. le café, le poivre), les fruits, le latex de certaines plantes en contiennent. Sa teneur peut varier en fonction de l'âge de la plante et des conditions de sa croissance (à l'ombre ou exposé en plein soleil). Les plus connus sont : La nicotine, la caféine, la théobromine, la morphine, la cocaïne, la quinine.

➤ **Biosynthèses des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des molécules à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques : ce sont des dérivés des acides aminés (Fig. 12). Cependant tous les alcaloïdes n'ont pas pour précurseur des acides aminés, il y'en a dont l'azote est incorporé à un stade de sa synthèse

biologique par des réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (Bhat *et al.*, 2005). Les alcaloïdes peuvent donc être classés en fonction de leur précurseur dans une voie biologique. On distingue trois classes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes tous les deux étant des dérivés des acides aminés et les pseudo-alcaloïdes dont le squelette carboné de base ne dérive pas d'acides aminés (Seneca, 2007). La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acide aminés tels que le Tryptophane, l'Ornithine, la Lysine, l'Asparate, l'Anthranilate, la Phénylalanine et la Tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines qui sont couplées à d'autres squelettes carbonés. La Strictosidine et la Norcoclaurine sont deux composés centraux source de la moitié des alcaloïdes connus.

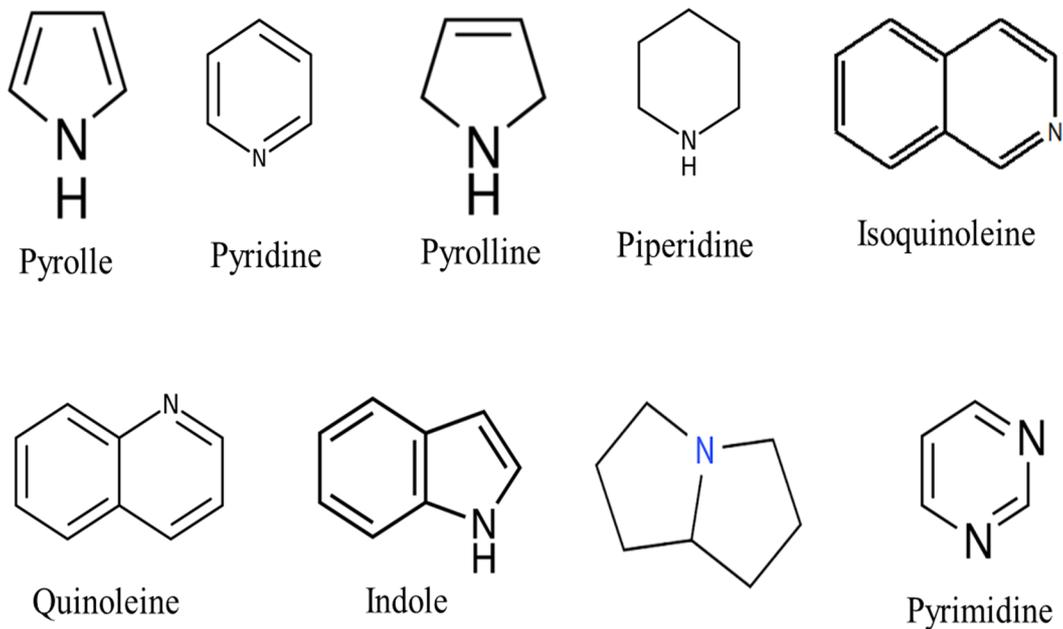


Figure 12 : Quelques noyaux de base de la structure des alcaloïdes

➤ **Fonctions des alcaloïdes**

Les alcaloïdes produits par la plante n'ont souvent aucun rôle précis, dans certains cas, ce sont juste des sous-produits du métabolisme végétal. Mais il en existe par exemple des alcaloïdes comme la nicotine extraite des feuilles de tabac qui jouent un rôle dans la protection des végétaux en tant qu'insecticide (Harbone et Herbert, 1995). De par leur amertume et leur toxicité, les alcaloïdes pourraient jouer un rôle de protection vis-à-vis des prédateurs et des herbivores. Ils pourraient servir de réserve azotée à la plante ou être des produits d'excrétions du métabolisme azoté. Chez l'homme, il est utilisé comme psychotrope (exemple la cocaïne), anticancéreux, stimulants, antipaludéen (exemple la quinine), antalgiques (exemple, morphine et codéine).

I.6.4 Métabolites primaires

Le métabolisme primaire se définit comme l'ensemble des voies de synthèse de la plante assurant les processus physiologiques de base commun à la plupart des plantes supérieures : comme la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ces voies permettent la synthèse des métabolites primaires nécessaire et vital à la survie de la cellule, de l'organisme tels que : les acides aminés (source primaire de construction des protéines), les glucides (source d'énergie, paroi cellulaire), les lipides (source d'énergie, membranes cellulaires) (Calatayud *et al.*, 2013).

I.7 Les mécanismes de défense des plantes

Les plantes sont des êtres vivants immobiles incapable de se déplacer, elles sont soumises régulièrement à des agressions biotiques (les prédateurs, les microorganismes pathogènes, herbivores, insectes) ou abiotiques (les conditions environnementales difficiles). Les plantes subissent des agressions qui conduisent parfois à des maladies engendrant des problèmes socio- économiques importants. Le mildiou de la pomme de terre en Irlande au 19^e siècle (2 millions de morts et une émigration importante vers les Etats-Unis) ou aujourd'hui une rouille du riz en Asie du Sud Est (15 milliards de dollars de perte annuelle) ne sont que quelques exemples de ces fléaux (Puggin *et al.*, 2005). Les hommes ont mis sur pied des produits phytosanitaires afin de contrôler ces différentes maladies. Mais la plante possède elle-même ses propres mécanismes de défense. Bien qu'elle ait développé au cours du temps différents moyens de défense, les bio-agresseurs possèdent également des stratégies qui leurs permettent de contourner ces barrières de défense. Chaque plante possède deux principales formes de défense : résistances passives c'est-à-dire déjà présentes dans la plante avant toutes agressions et résistances actives c'est-à-dire nouvellement produites à la suite d'une induction. Ces différents mécanismes de défense sont mis en place en utilisant deux principales stratégies de défense à savoir les défenses structurales et les défenses biochimiques.

I.7.1 Mécanismes de défenses passives

Elle est dite passive parce qu'elle est présente indépendamment de la présence d'un bio agresseur. Le premier niveau de défense de la plante est constitué par les barrières physico-chimiques préexistantes.

1.7.1.1 Les barrières physiques

Elles concernent les structures cellulaires de la plante. La surface des organes aériennes de la plante est constituée d'une fine couche appelée cuticule plus ou moins épaisse, voire cireuse, ce qui rend l'accès plus difficile à l'intérieur des cellules de l'épiderme foliaire. D'autres structures par exemples peuvent également intervenir comme barrières de défenses : les poils, les trichomes, les aiguillons, les épines, la cutine mais la cuticule est probablement la structure de protection la plus efficace (Benhanou et Rey, 2012). La paroi pectocellulosique enveloppe semi-rigide est une protection supplémentaire : elle entoure chaque cellule végétale et freine la progression du microorganisme parasite. La pectine et la cellulose sont les deux constituants de cette paroi. Dans le cas où ces bio-agresseurs ne parviennent pas à détruire ces barrières protectrices, ils peuvent pénétrer dans la plante à travers des ouvertures naturelles (stomates, pores) ou par des ouvertures mécaniques (blessures) (Agrios, 2005).

1.7.1.2 les barrières chimiques

Lorsque les barrières physiques sont franchies, et que le bio-agresseur se retrouve au niveau de l'apoplasme, ils se heurtent à une barrière chimique constituée de composés chimiques préformés qui renforcent le système de défense constitutif. Ces composés chimiques sont constitués des métabolites secondaires (composés phénoliques, les alcaloïdes, les lactones, les composés cyanogènes, les saponines), les enzymes de défenses (chitinases, β 1-3 endoglucanase), les lectines fongistatiques, protéines inhibitrices d'enzymes lytiques de microorganismes parasites (Touzé, 1979). Les métabolites secondaires sont encore appelés des phytoanticipines et sont des composés toxiques contre un grands nombre de bio-agresseurs (insectes, herbivores, bactéries, champignons) (González-lamothe *et al.*, 2009). Ils sont stockés dans la plante sous forme inactive soit en surface soit dans les vacuoles ou dans les organites et ne sont activés qu'à la suite d'une attaque (Benhamou, 2009 cité dans Benhamou et Rey (2012)). Les phytoanticipines peuvent inhiber complètement la croissance du bio-agresseur ou alors désactiver les composés chimiques qu'ils libèrent (toxines, enzymes, hormones, polysaccharides) dans la plante pour s'installer (Macheix *et al.*, 2005). En cas d'attaque parasitaires les concentrations en phytoanticipines augmentent et ceux produit dans ce cas sont appelés phytoalexines.

I.7.2 Mécanismes de défenses actives ou induites

Ce mécanisme est sollicité lorsque les premières lignes de défenses (constitutives) de la plante ont été contournées par les bio agresseurs. Les différentes étapes de la mise en place de la défense active sont la reconnaissance de l'agent pathogène, la traduction du signal et les réactions de défenses de la plante (Fig. 13).

I.7.2.1 La reconnaissance de l'agent pathogène

L'interaction entre la plante et l'agent pathogène peut conduire à deux types de réactions. Dans un premier cas, la plante ne reconnaît pas l'agent pathogène et ce dernier en profite pour envahir la plante et la maladie se développe. Dans un second cas, la plante identifie l'agent pathogène et déclenche un processus de réaction de défense intense et durable qui va entraîner l'arrêt de développement et la mort de l'agent pathogène. Dans la mesure où l'agent pathogène est reconnu par la plante, cette dernière peut développer deux types de résistances : une résistance dite basale ou non spécifique et une résistance spécifique ou « race spécifique » qui traduisent l'immunité innée chez la plante. (Iriti et Faoro, 2007 ; Jones et Dangl, 2006).

La résistance basale (de type PTI (pour Pathogens-Associated Molecular patterns-Triggered Immunity) est la première résistance active mise en place par la plante « sensible » suite à son exposition à un agent pathogène « virulent » (Jones et Dangl, 2006). Elle est déclenchée par la reconnaissance des éliciteurs (MAMPs ou PAMPS (pour « Microbial » or Pathogens-Associated Molecular patterns) qui sont des signatures moléculaires caractéristiques des agents pathogènes par des récepteurs à domaine extracellulaire de la plante (PRRs (pour Pattern-Recognition Receptors) (Zipfel, 2008). Ces PRR appartiennent à la famille des receptor-like kinases (RLK) ou des receptor-like protein (RLP) se différenciant par la présence ou l'absence d'un domaine kinase. Chaque groupe de microorganismes possède un certain nombre de MAMPs caractéristiques. Parmi les MAMPs, on trouve par exemple des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharides, les peptidoglycane), le peptide Pep 13 de la transglutaminase chez *Phytophthora sojae* (Fellbrich *et al.*, 2002), les élicitines présentes chez certains oomycètes ainsi que les xylanes et les chitines fongiques (Voegelé *et al.*, 2009). Le plus connu d'entre eux est un peptide de 22 acides aminés (flg22) contenu dans la flagelline, protéine majeure constituant le flagelle des bactéries (Zipfel *et al.*, 2004). Les agents pathogènes ont développé au fil du temps des moyens leur permettant de contourner cette première ligne de défense (de type PTI) et ont acquis des propriétés dues aux gènes dits d'avirulence. Les végétaux à leur tour ont développé une manière de contourner la nouvelle stratégie d'attaque

du pathogène en développant une deuxième ligne de défense comportant les gènes de résistance. La résistance spécifique est donc initiée par la traduction du signal transmis à la suite d'une reconnaissance d'une des protéines effectrices de l'agent pathogène par des protéines de résistance provenant de la plante (Flor, 1971). Ce type de résistance est donc déterminée par l'interaction entre le produit d'un gène de la plante hôte, le gène R, et le produit d'un gène de l'agent pathogène, le gène d'avirulence (gène Avr) : c'est le concept « gène pour gène » décrit par Flor en 1971. Ce modèle consiste à dire qu'une plante est résistante quand elle possède un gène de résistance dominant et que le pathogène présente le gène d'avirulence complémentaire et dominant.

I.7.2.2 Transduction des signaux initiés par la reconnaissance spécifique

Une fois que la plante reconnaît ou perçoit l'agent pathogène, une cascade de signaux est activée dans les cellules attaquées et transmis aux cellules voisines et à la plante entière via des messagers secondaires afin d'induire les réactions de défense. Des signaux précoces et secondaires accompagnent cette transduction.

Des signalisations précoces ont été identifiées chez la plante suite à la reconnaissance de l'agent pathogène. Plusieurs événements ont été décrits : - **Les modifications des flux ioniques** qui entraînent une acidification du cytoplasme. Elles consistent en une entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) et de protons (H^+) et en un efflux d'ions potassium (K^+), chlore (Cl^-) et sodium (Na^+). Le flux d'ions calcium est particulièrement important car il agit comme second messenger dans l'activation des mécanismes de défense. (Garcia-Brugger *et al.*, 2006, Ma *et al.*, 2008). La concentration intracellulaire importante du Ca^{2+} est impliquée dans plusieurs mécanismes incluant l'activation de la β -1,3-glucane synthase, la stimulation des protéines kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines, la transduction du signal au noyau (Kauss *et al.*, 1989 ; Poovaiah et Reddy 1993). - **La production des formes actives de l'oxygène** est généralement liée à une dépolarisation membranaire engendrée par la fixation des éliciteurs aux récepteurs : c'est le burst oxydatif ou stress oxydatif (Lamb et Dixon, 1997). Elle est constituée essentiellement du radical superoxyde (O_2^-), du radical hydroxyle (OH) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Torres *et al.*, 2006) qui limitent le développement du pathogène de façon directe grâce à leur toxicité mais également en participant au renforcement des parois cellulaires de la plante. - **Les cascades de phosphorylation/déphosphorylation des protéines** modifient l'activité des protéines, leur durée de vie et leur localisation. Les enzymes impliquées dans la

phosphorylation sont des kinases et dans la déphosphorylation ce sont des phosphatases et elles sont impliquées dans les inductions de presque toutes les réponses de défenses.

Les signaux secondaires font intervenir certaines phytohormones (l'acide jasmonique, l'éthylène, l'acide salicylique). Elles jouent un rôle essentiel dans la modulation des réponses de défense de la plante, bien que les mécanismes moléculaires restent encore peu connus (Bari et Jones, 2009). Elles constituent le lien entre les événements précoces de signalisation et l'activation des réponses de défense tardives. Il existe des interconnexions entre les différentes voies de signalisation impliquant à la fois l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide salicylique (Kunkel et Brooks, 2002). Les résistances systémiques acquises et induites sont modulées par ces différentes phytohormones.

I.7.2.3 Les réactions de défenses chez les plantes

Les agents pathogènes attaquent les plantes à travers les substances toxiques (les toxines, les enzymes, les antibiotiques) et en retour les plantes synthétisent une gamme de composés qui contribuent ensemble à la protection de la plante. Les composés responsables de la défense des plantes sont : - **Les composés structuraux** sont responsables de l'épaississement de la paroi cellulaire afin de retarder l'invasion de l'agent pathogène. La paroi des cellules végétales constitue une barrière physique à la pénétration des bio-agresseurs. Cependant certains parasites ont développé des moyens d'attaque de nature physique ou chimique leur permettant ainsi de traverser la paroi. En réponse à ces attaques, la plante modifie et renforce ses parois cellulaires à travers la production de certains composés tels que : la callose, la lignine, et des glycoprotéines riche en hydroxyprolines (Benhamou *et al.*, 1996 ; Boudart *et al.*, 1995). Le dépôt de ces composés structuraux notamment la callose au point de pénétration va permettre la formation d'une papille empêchant l'entrée du bio-agresseur tandis qu'une accumulation des composés phénoliques toxiques entrainera l'occlusion des espaces intercellulaires. - **Les protéines de défenses PR (Pathogenesis-related)** regroupent des enzymes, des inhibiteurs d'enzymes. Elles ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales et s'accumulent en cas de stress biotique ou abiotique (Stinzi *et al.*, 1993). Elles sont constituées d'environ dix-sept classes de protéines possédant des rôles biologiques différents. Par exemple les glucanases et les chitinases sont impliquées dans la dégradation des parois cellulaires des champignons ou bactéries pathogènes tandis que les peroxydases seraient impliquées dans le renforcement des parois cellulaires (Theis et Stahl, 2004 ; Van Loon *et al.*, 2006). - **Les composés issus du métabolisme secondaire** principalement constitués par les phytoalexines jouent un rôle

antimicrobien direct. Les phytoalexines sont synthétisées par la plante en réponse à une infection contrairement aux phytoanticipines qui sont constitutivement présentes dans la plante. Majoritairement constituées de composées phénoliques, les phytoalexines sont soit solubles dans le cytosol soit liées à la paroi cellulaire et dont l'accumulation se fait dans les zones localisées près des sites d'infection. Certains agents pathogènes parviennent à éviter l'effet inhibiteur des phytoalexines en les détoxifiant c'est le cas de *Fusarium solani* qui transforme la phaséolline synthétisée par des haricots, en hydroxyphaséollone, moins toxique (Touze, 1979). - **L'hypersensibilité** est un type de mort cellulaire qui se manifeste par l'apparition d'une nécrose au point de pénétration de l'agent pathogène (Mur *et al.*, 2008). Elle est semblable à la politique de la « terre brûlée » car toutes les cellules entourant le site d'infection meurent rapidement afin de limiter la progression de l'agent pathogène. Les mécanismes moléculaires de base de la réaction d'hypersensibilité sont peu ou mal connus car elles varient en fonction du pathosystème et de l'effecteur.

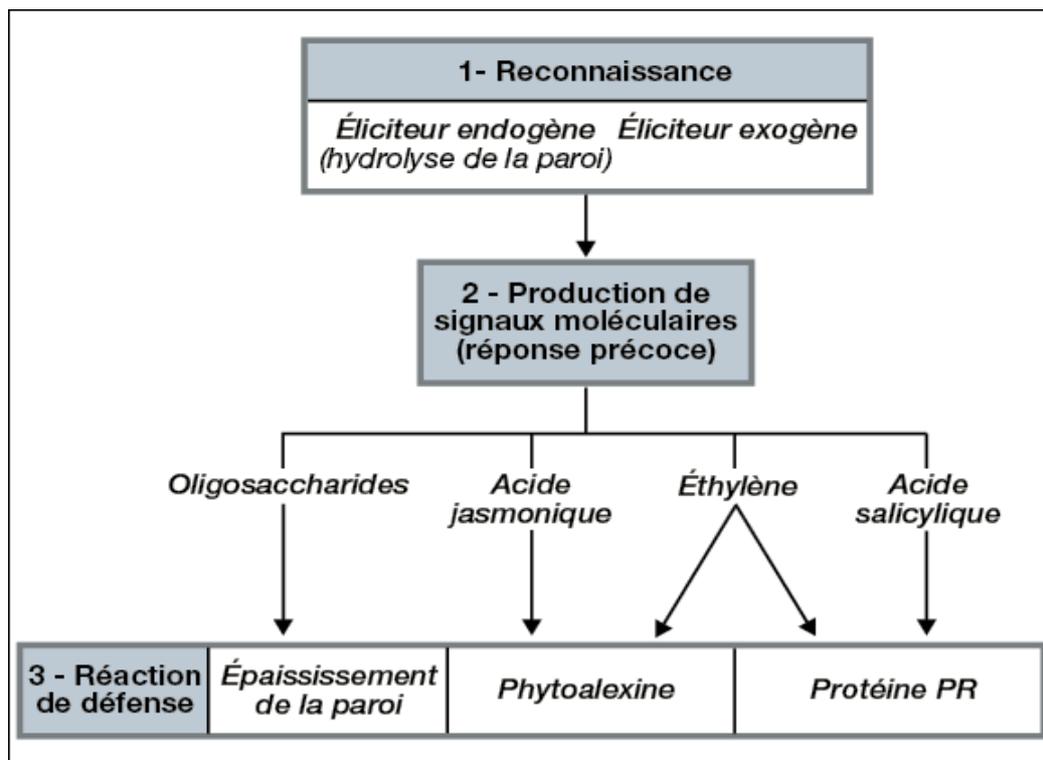


Figure 13 : Mécanisme général de défenses chez les plantes

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal : plantes sélectionnées et utilisées

La préparation de 6 extraits de végétaux utilisés a été obtenue à partir de trois plantes récoltées dans la ville de Yaoundé : *Phyllanthus amarus*, *Chromoleana odorata* et *Commelina benghalensis*. Le choix des plantes s'est opéré en fonction des connaissances sur leurs potentiels antimicrobiens, et leurs utilisations ethnobotaniques (Kumar *et al.*, 2011 ; N'guessan *et al.*, 2009 ; Nguefack *et al.*, 2009).

II.1.2 Pathogènes potentiels

Ils ont été isolés à partir des feuilles, des racines, du sol, des tiges prélevés sur des plants de poivrier (*Piper nigrum*) présentant des symptômes de dépérissement lent (jaunissement des feuilles) et des parties (racines, écorces) de plants de tuteur (*Spondias mombin*) présentant des symptômes de pourriture racinaire blanche : Il s'agit de *Phytophthium* sp. et *Armillaria* sp. respectivement.

II.1.3 Agents de lutte biologique

Quatre souches de *Trichoderma asperellum* PR10, PR11, PR12, 659-7 (Fig. 14) ont été utilisées dans cette étude. Les souches en question appartiennent à la collection de *Trichoderma* spp. du Laboratoire Régional de Lutte Biologique et de Microbiologie Appliquée de l'IRAD Cameroun. Les souches PR10, PR11 et PR12 ont été isolées à partir des échantillons de sols prélevés au niveau de la rhizosphère des plants de macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) présentant les symptômes de la pourriture racinaire, tandis que la souche 659-7 a été isolée à partir des sols prélevés au niveau de la rhizosphère des plants de bananier (Tondje *et al.*, 2007b). Une fois identifiées au niveau moléculaire à partir des séquences de tef1 alpha (facteur d'élongation traduit alpha 1), les différentes souches de *T. asperellum*, PR10, PR11, PR12, 659-7 ont été déposées dans une banque de gènes « GenBank » avec les numéros d'accessions EF185998, EF186002, EF185999, EF186001 respectivement. Elles sont conservées au laboratoire dans du glycérol à -70°C. Elles ont été réactivées et ensemencées dans le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour la réalisation des différents tests.

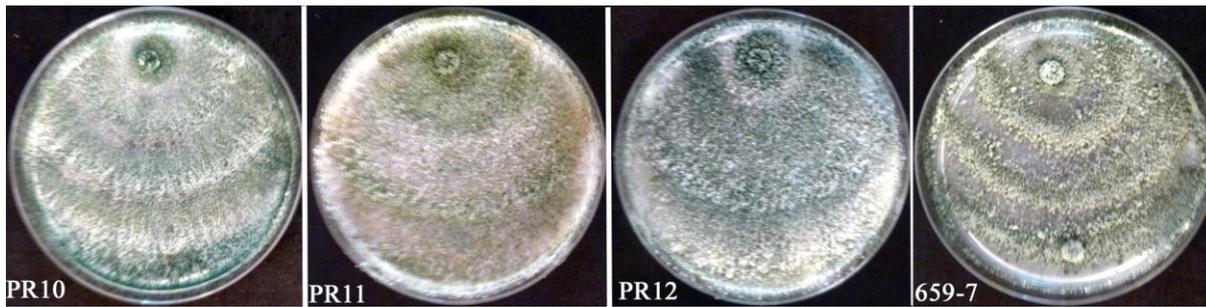


Figure 14 : Les quatre souches de *Trichoderma asperellum*.

II.1.4 Pesticides de synthèse

Quatre fongicides de synthèses et un nématicide ont été testés dans le cadre de ce travail. Il s'agissait de : Kocide® 2000, Banko® plus, Ridomil Gold® plus 66 WP et le Scooter® EC (Ridomil Gold® 480 EC) dont les monographies sont présentées dans le Tableau II. Le choix de ces fongicides a été basé sur leur utilisation par les producteurs dans le cadre du traitement de la maladie du dépérissement lent observée dans leur plantation.

Tableau II : Liste des fongicides utilisés

Nom commercial	Matière active	Dose d'application	Mode d'action
*Scooter® EC	Metalaxyl-M (Méfénoxam) 480 g/l	1l/ha soit 1l dans 300 l d'eau	Systémique
Banko® plus SC	Chlorothalonil (550 g/l) et le Carbendazime (100 g/l)	2l/ha soit 80 ml dans 15 ml d'eau pour 400 m ²	Systémique et contact
Ridomil Gold® plus 66 WP	Metalaxyl-M (Méfénoxam) 60 g et Oxyde de cuivre 600 g/l	50 g dans 15 l d'eau	Systémique
Kocide®2000 WG	Oxyde de cuivre 538 g/kg	60 g dans 15 l d'eau	Contact
Savanem 100 G	Ethoprophos 100g/kg	100 g dans 1 kg de sol	/

*Fongicide non homologué au Cameroun

II.2 Méthodes

II.2.1 Choix de la zone d'étude

Notre étude a été menée dans le département du Moungo de la région du Littoral et celui de Koupe Manengoumba de la région du Sud-Ouest. Ces deux zones sont les principaux bassins de production du fameux « Poivre de Penja ». Le poivrier y trouve des conditions idéales de croissance à cause de la qualité de la terre et du climat. Ne peut s'appeler « Poivre de Penja », les poivres se cultivent uniquement dans des zones bien précises appartenant à l'aire

géographique délimitée lors de l'accompagnement du produit vers l'Indication Géographique Protégée (IGP).

II.2.2 Présentation de la zone d'étude

La zone d'étude était incluse dans l'aire géographique constituée de quelques arrondissements appartenant aux départements du Mounjo (Njombe-Penja, Loum, Manjo, Mbanga, Mombo) et du Koupe Manengoumba (Tombel) (Fig.15).

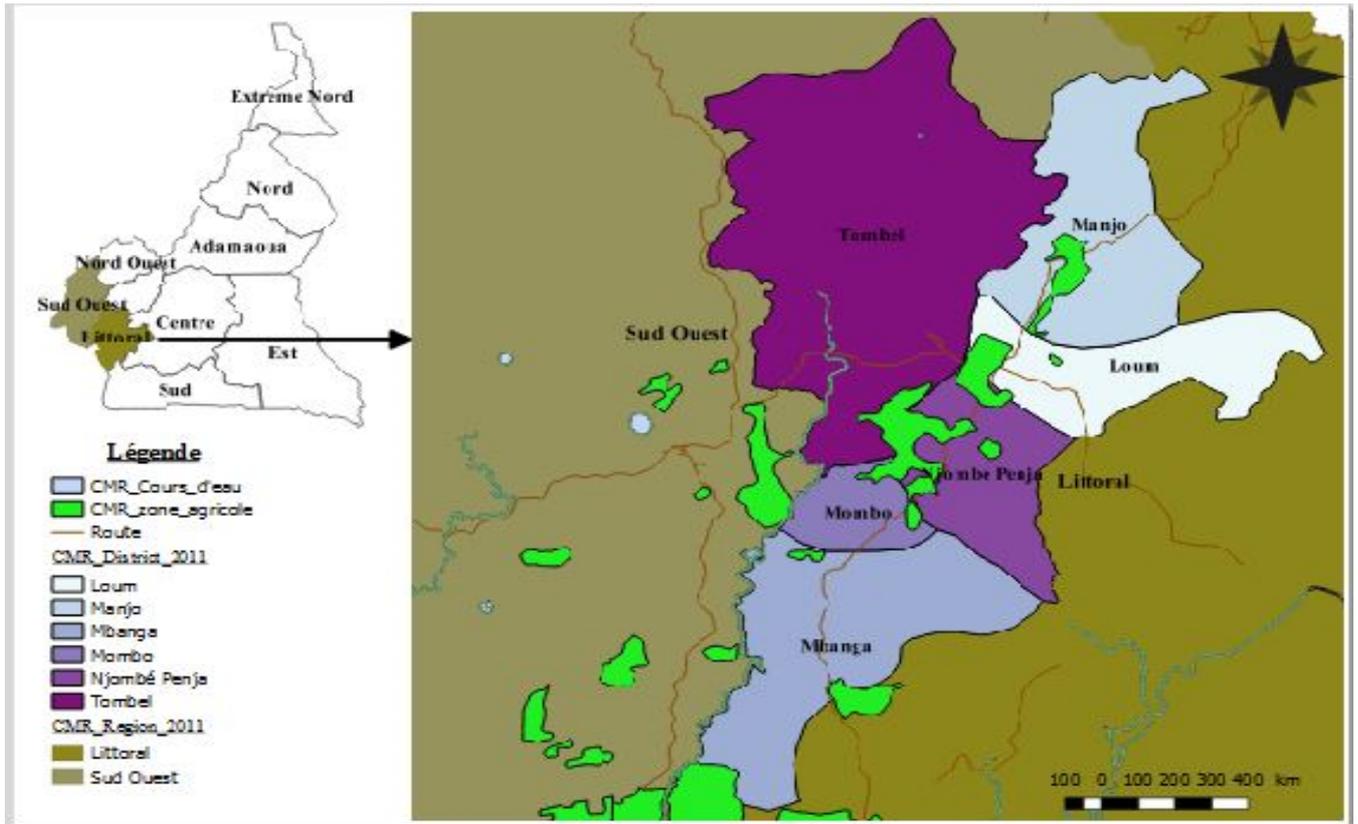


Figure 15 : Localisation géographique de la zone d'étude (Carte INC, 2016, modifiée)

II.2.2.1 Milieu physique

Les deux départements Mounjo et Koupe Manengoumba selon la carte de délimitation des zones agroécologiques du Cameroun, appartiennent à la zone IV zone de forêt humide à pluviométrie monomodale (IRAD, 2005). Les pluies sont abondantes en moyenne 2500 à 4000 mm. La température varie entre 22 - 29°C et l'humidité de l'air est comprise entre 61 et 90 % d'où le caractère lourd de l'atmosphère.

L'ensemble de la zone présente une altitude qui varie entre 150 m et 600 m. Le département du Moungo se trouve dans la région du littoral et s'étend sur une superficie de 3 723 km² et celui de Koupe manengoumba qui se trouve dans la région du Sud-Ouest s'étend sur une superficie de 3 404 km², avec un climat chaud et humide de type équatorial. Dans ces deux départements les sols sont volcaniques et fertiles, bruns eutropes, ferrallitiques typiques de types peu évolués (Bachelier *et al.*, 1956 cités par Martin et Sieffermann, 1967) (Annexe 1).

II.2.3 Identifier les principales maladies du *P. nigrum* dans la zone IG poivre de Penja : Etat des lieux de la culture du poivre de Penja par la collecte des données d'enquêtes

La collecte des données a concerné les données primaires et secondaires

II.2.3.1 Les données primaires

Les données primaires ont été collectées à l'aide de deux outils :

Le premier outil est un questionnaire adressé aux pipériculteurs (producteurs de poivre) de la zone d'étude (Annexe 2). Ce questionnaire avait pour but de faire une caractérisation des producteurs et des plantations poivrières, de soulever les problèmes phytosanitaires majeurs, de relever les actions menées par les producteurs dans la lutte contre les problèmes phytosanitaires.

Le second outil est une grille d'observation (Annexe 3) ayant servi à estimer l'incidence des principales pathologies présentes dans la zone d'étude et d'estimer les pertes de production.

II.2.3.2 Les données secondaires

Ces données ont été obtenues au sein de l'association : Groupement Représentatif Poivre de Penja (IGPP). Cette Association a obtenu le Récépissé de Déclaration, conformément à l'article 07 de la loi N° 90 /053 du 19 Décembre 1990 relative à la liberté d'association. Elle est constituée à majorité des acteurs identifiés (gros et petit producteurs), des pépiniéristes, des distributeurs et a pour objectif d'initier et d'assurer le contrôle de l'Indication Géographique Poivre de Penja. Elle est ouverte à toute personne physique à condition de respecter le cahier des charges. En 2016 un total de 159 membres (11 femmes, 148 hommes) (Annexe 4) remplissait les conditions d'adhésion à l'association et c'est sur cette base que notre échantillon a été prélevé.

II.2.3.3 Organisation de l'enquête sur le terrain

Une enquête pilote a été au préalable menée, avant la collecte proprement dite des données. Il s'agissait de soumettre le questionnaire à une dizaine de producteurs sélectionnés au hasard dans la base de données fournie par l'association, afin de détecter les incohérences dans le questionnaire, et de les corriger. Quatre enquêteurs ont été recrutés et formés pour la collecte de ces données.

II.2.3.4 Choix de l'enquêté et déroulement de l'enquête

Le choix de la population de producteurs a été principalement guidé par l'existence d'une association qui regroupe en son sein des pipériculteurs représentatifs de toute l'aire géographique de l'IGPP, ce qui nous a servi de point de départ. Les producteurs de « poivre de Penja » affiliés au Groupement Représentatif IGPP et qui ont accepté se soumettre au questionnaire nous mettaient en contact avec ceux non affiliés. La méthode d'échantillonnage utilisée était la stratification à deux niveaux : l'une des strates étant représentée par l'appartenance ou non au groupement représentatif IGPP et l'autre strate par le genre. Le questionnaire portant des questions ouvertes, fermées, et semi-ouvertes, était structuré en trois sections : i) informations générales sur l'exploitant, ii) informations générales sur l'exploitation, iii) informations spécifiques concernant le poivre. Un total de 88 pipériculteurs ont été soumis aux questionnaires, mais seulement 71 répondants ont été retenus (Annexe 5) et 17 fiches éliminées à cause des informations incomplètes.

II.2.3.5 Difficultés rencontrées et limites de l'étude

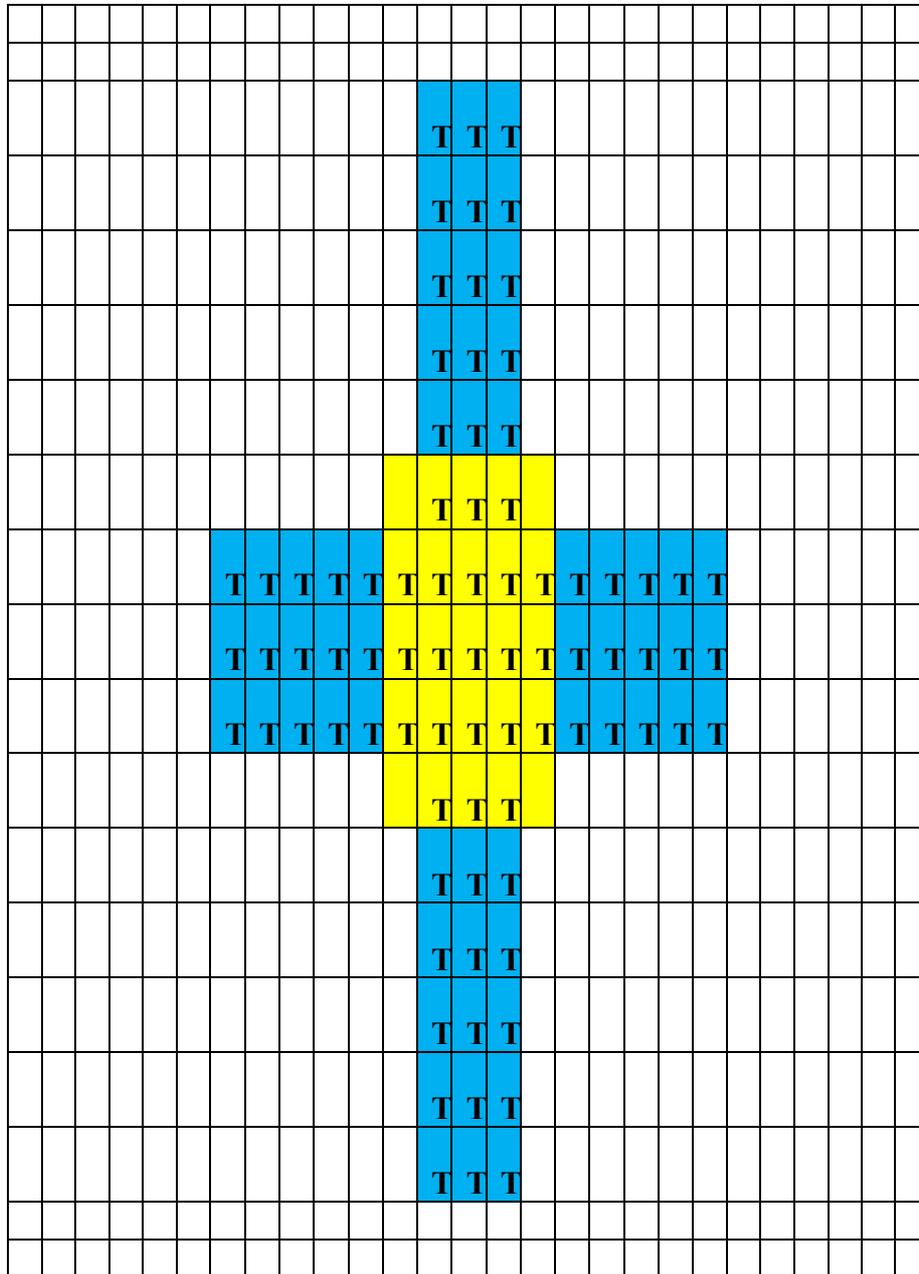
Les principales difficultés ont été de rencontrer les producteurs et d'accéder aux plantations. Certains producteurs vivants dans les zones reculées, n'avaient pas accès aux réseaux téléphoniques et étaient difficilement joignables. D'autres acceptaient de se soumettre aux questionnaires, mais nous refusaient l'accès à leurs plantations soi-disant que nous travaillions pour les impôts. Une autre difficulté a été celle de rencontrer les producteurs non adhérents à l'association des producteurs du « poivre de Penja ». De ce fait nous étions obligés de passer par des producteurs de l'association parmi lesquels on trouvait des réfractaires à l'étude qui n'acceptaient pas de nous aider.

II.2.3.6 Incidence et sévérité des principales maladies de *P. nigrum*

➤ Incidence.

Cette enquête s'est déroulée à la suite de l'administration du questionnaire aux producteurs. Elle avait pour but d'estimer les maladies et les pertes de production (liées aux pertes des poivriers) dans les plantations de poivre. Un total de 35 plantations appartenant aux producteurs enquêtés, a été visité. Le choix de ces plantations a été fait sur la base de leurs accessibilités, la volonté d'aider à l'enquête et la disponibilité des producteurs.

Deux transects perpendiculaires l'un à l'autre, étaient disposés au centre de chaque parcelle (Fig. 16). Chaque transect mesurait 28 m de long et comprenait trois rangées de poivriers plantés avec des tuteurs (*S. mombin*) avec un espacement de 2 x 2 m. Ainsi, un maximum de 81 plants de poivriers et tuteurs ont été examinés. Les données relatives à l'état sanitaire : sain/ malade, mort/absent (l'absence d'un poivrier ou d'un tuteur était reliée à la mort de ce dernier) ont été attribuées aux plants de poivre et aux tuteurs séparément. Les différences potentielles par arrondissement et par groupe d'âge de plantation (3-6, 7-10 et >10 ans) dans l'incidence de la "maladie de la pourriture blanche des racines" pour les tuteurs et l'incidence de la mortalité des poivriers ont été relevées.



En bleu les deux transects perpendiculaires constitués de trois rangées de poivrier (T) et en jaune les plants de poivriers appartenant aux deux transects qui ne seront observés qu'une fois.

Figure 16 : Disposition du transect dans les parcelles

➤ **Sévérité et dynamique temporelle de la maladie**

Il était question ici de comprendre comment la maladie évolue avec le temps. Est-elle influencée par certains facteurs abiotiques tels que le climat ? L'étude a été réalisée dans dix-neuf plantations (âgée en moyenne de 10 ans) réparties dans trois zones de l'aire géographique (Tableau IV). Une à trois sous parcelles de 25 poivriers ont été délimitées dans les plantations ceci en fonction de la superficie. La sévérité de la maladie du jaunissement foliaire a été enregistrée en utilisant une échelle d'évaluation de la maladie de 0-4 entre octobre 2013 et Septembre 2016. La gravité de la maladie a été enregistrée à intervalle mensuelle et les données suivantes entre autres ont été collectées : la présence ou non de la pourriture racinaire blanche sur tuteur, présence ou absence du poivrier sur tuteur, l'état de jaunissement des feuilles du poivrier selon l'échelle de notation suivante (0= 0%, 1=1 à 25 % de feuilles jaunies, 2=26 à 50 % de feuilles jaunies, 3= 51 à 75% de feuilles jaunies ; 4= > 75%). Une échelle de notation a été également conçue pour noter certains dégâts (galles, feuilles dévorées) sur les feuilles. L'index de sévérité (%) de la maladie a été calculée à partir de la formule de Mbayi *et al.* 2014 cités par Divya et Sharada (2014)

$$ISM(\%) = \frac{\Sigma(n \times v)}{N \times V} \times 100$$

ISM : index de sévérité de la maladie

n : nombre de plants infectés pour chaque score

v : indice de notation (0-4) ;

N : nombre total de plants ;

V : indice de notation le plus élevé

Le nombre de plants de poivrier morts a également été comptabilisé chaque année dans les différentes plantations. Ceci se faisait sur la base des observations mensuelles effectuées dans les différentes plantations d'observations. Les plants morts étaient comptabilisés et marqués chaque mois. Ceci nous a permis de calculer le taux de perte de poivrier enregistré dans chaque plantation par année.

Les données sur les différentes variables météorologiques telles que la température maximale, la température minimale, la température moyenne et les précipitations ont été enregistrées quotidiennement afin d'établir la relation entre les différents paramètres météorologiques et l'état de jaunissement de la plante par des études de corrélations. Ces

données nous ont été fournies par la PHP qui ont installé des stations météorologiques dans tout l'aire géographique.

Tableau III : Liste des parcelles sélectionnées

Parcelle	Zone	Coordonnées GPS		Surface (m ²)	Nombre de sous parcelles
1	Njombe-Penja	N 4 38.926	E9 39.969	/	3
2	Njombe-Penja	N3 38.799	E9 40.331	51757	3
3	Njombe-Penja	N4 39.587	E9 41.760	35839	3
4	Njombe-Penja	N4 38.609	E3 39.408	3188,3	2
5	Njombe-Penja	N4 37.348	E9 40.550	18720	3
6	Njombe-Penja	N4 38.077	E9 40.587	/	3
7	Njombe-Penja	N4 38.609	E9 39.408	/	1
8	Njombe-Penja	N4 39.912	E9 41.907	/	1
9	Njombe-Penja	N4 38.449	E9 39.022	18720	3
10	Njombe-Penja	N4 40.261	E9 39.006	1725,5	1
11	Tombel	N4 39.747	E9 37.104	4653,6	2
12	Tombel	N4 39.604	E9 37.497	2354,3	2
13	Tombel	N4 39.683	E9 37.975	4427,0	1
14	Tombel	N4 39.550	E9 37.738	3692	2
15	Loum-Manjo	N4 41.804	E9 43.309	21412	2
16	Loum-Manjo	N4 43.019	E9 42.610	/	1
17	Tombel	N4 38.264	E9 37.829	986,3	1
18	Njombe-Penja	N4 39.796	E9 39.149	/	2
19	Loum-Manjo	N4 42.092	E9 37.829	16485	1

II.2.3.7 Analyses des données

Les données collectées à partir du questionnaire d'enquête ont été dépouillées, codifiées et saisies dans le logiciel Microsoft Office Excel 2016. Des analyses descriptives effectuées ont consisté à calculer les sommes, les moyennes, les fréquences et les pourcentages. Les corrélations existantes entre les différentes composantes quantitatives de l'enquête ont été mises en évidence par l'analyse multivariée du type ACP à partir du logiciel R version 4.0.2.

Les données d'observations ayant permis le calcul de la sévérité, l'incidence, le taux de mortalité des plants ont été au préalable saisis avec le logiciel Microsoft Office Excel 2016. La sévérité de la maladie a été calculée en utilisant la formule de Mbayi *et al.* 2004 basée sur une échelle de notation de la maladie. L'incidence de la maladie a été calculée en faisant le rapport du nombre de plants de tuteur présentant les symptômes tels que la cannelure du collet et la résine noire sur le nombre total de plants observés. Le taux de mortalité a été calculé en faisant le rapport du nombre de poivriers morts chaque année sur le nombre de poivriers total. Une

Analyse des Variances (ANOVA) s'est faite avec le Logiciel R (version 4.0.2). Elle nous a permis de comparer les trois zones d'observation, de même que les trois années d'observation afin de déceler si la maladie variait avec les sites et les années d'observation. Le test de Tukey au seuil de probabilité 5 % a été utilisé à chaque fois pour comparer les différentes moyennes.

Les interactions entre sévérité, zone d'étude, année d'observation ou mois d'observation ont été testées. Des corrélations avec Pearson entre la sévérité, l'index de jaunissement des feuilles, la mortalité des plants et les facteurs météorologiques ont été effectuées, afin de mettre en évidence leur contribution dans le développement de la maladie du dépérissement lent. Les facteurs examinés étaient les précipitations et la température moyenne.

II.2.4. Identification des potentiels agents pathogènes associés aux principales maladies

II.2.4.1. Collecte des échantillons et culture des isolats

Dans le cadre de cette thèse, diverses prospections sur l'ensemble de l'aire géographique du « Poivre de Penja » au Cameroun ont été menées. Les descentes dans les différentes zones nous ont permis durant trois ans, de collecter de nombreux échantillons en différentes périodes de l'année (saisons sèches-saisons des pluies). L'échantillonnage s'est fait de façon aléatoire dans 25 plantations réparties dans les différentes zones de production (Tableau IV). Les échantillons de sol (44), de racine (120), de tronc et de feuille (90) ont été collectés aux pieds et sur les plants de poivriers et de tuteurs. Ces échantillons ont été transportés au laboratoire de Phytopathologie de l'IRAD de Nkolbisson à Yaoundé à l'aide des sacs étiquetés en plastique (pour le sol), en papier (pour les feuilles, les racines et les troncs).

Tableau IIV : Nombre de plantations et types d'éléments échantillonnés

Zone	Nombre de parcelle	Echantillons poivrier			Echantillons tuteur
		Racine	Sol	Feuilles	Racine-écorce
Loum -Manjo	6	24	12	30	10
Njombe-Penja	14	44	22	30	12
Tombel	5	20	10	30	10
Total	25	88	44	90	32

II.2.4.2. Isolement des microorganismes associés aux principales maladies

- **Cas des feuilles**

Les parties infectées des feuilles (feuille présentant des taches de nécroses, de galles, de jaunissements) ont été découpées en morceaux de 5mm, puis les morceaux ont été désinfectés dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) 1 % pendant 5 min, puis rincés à l'eau distillée stérilisée. Elles ont ensuite été séchées puis déposées sur milieu eau gélosée (Fig. 17A) et dans la chambre humide (papier buvard imbibé d'eau distillée déposé dans une boîte de Pétri). Elles ont été incubées à l'obscurité et à $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant deux jours ; à la suite, les feuilles présentant des structures visibles des microorganismes (Mycélium, spore...) ont été directement prélevées aseptiquement et déposés sur le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar). Deux jours après incubation, les mycéliums ayant émergé des feuilles ont été isolés, puis repiqués sur des milieux de culture fraîchement préparés.

- **Cas des racines et écorces : poivrier et tuteur**

Les racines et écorces ont été lavées au préalable à l'eau courante pour se débarrasser de la terre, ensuite découpées en petits morceaux de 2 cm. Différents traitements ont été appliqués : désinfection à l'aide une solution de NaClO 1% suivie d'une solution hydroalcoolique 70 %, puis rinçage dans de l'eau distillée stérilisée ; désinfection à l'aide d'une solution de NaClO 1 % uniquement ; aucune désinfection. Suite aux différents traitements appliqués, les échantillons ont été déposés dans les milieux suivants : papier buvard humidifié avec de l'eau distillée stérilisée, milieu de culture PDA, milieu de culture PARPH (Pimaricine 10ppm, Ampicilline 250ppm, Rifampicine 10ppm, Pentachloronitrobenzène 100ppm, Hymexazol 100ppm), Milieu composé de 2 % de Malt Extract Agar (MEA) supplémenté avec du Benomyl, Dichloran, et streptomycine (BDS) (Worrall, 1991) (Fig. 17B). Ils ont été incubés à l'obscurité à la température de 25 ± 2 °C pendant quatorze semaines. Après incubation, le mycélium ou les fructifications visibles ayant émergés des échantillons, ont été isolés, puis repiqués sur des milieux nutritifs gélosés fraîchement préparés et non supplémentés : PDA, MEA.

- **Cas du sol**

Deux méthodes d'isolement ont été utilisées : la méthode d'isolement directe (suspension du sol) et la méthode par piégeage (Drenth et Sendall, 2001) :

- La méthode d'isolement directe a consisté à introduire des suspensions de sol (1 g de sol dans 5 mL d'eau distillée stérilisée) (Fig. 17C) dans les boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé avec (PARPH) et sans antibiotiques. Les boîtes de Pétri ont été rincées avec l'eau distillée stérilisée après 48 h d'incubation. Toutes les colonies de champignons observées ont été isolées.
- La méthode d'isolement par piégeage a consisté à utiliser les feuilles d'avocatier comme piège (Pegg, 1977) (Fig. 17D). Les feuilles entières d'avocatier ont été lavées puis trempées dans une suspension de sol (20 g de sol dans 200 mL d'eau distillée stérilisée) et incubées pendant sept jours à l'obscurité à 25 ± 2 °C. Les feuilles d'avocatiers présentant les nécroses à la fin de l'incubation ont été découpées puis déposées sur milieu gélosé (gélose 15g/l). La purification des microorganismes ayant émergés s'est faite sur milieu nutritif gélosé PDA.

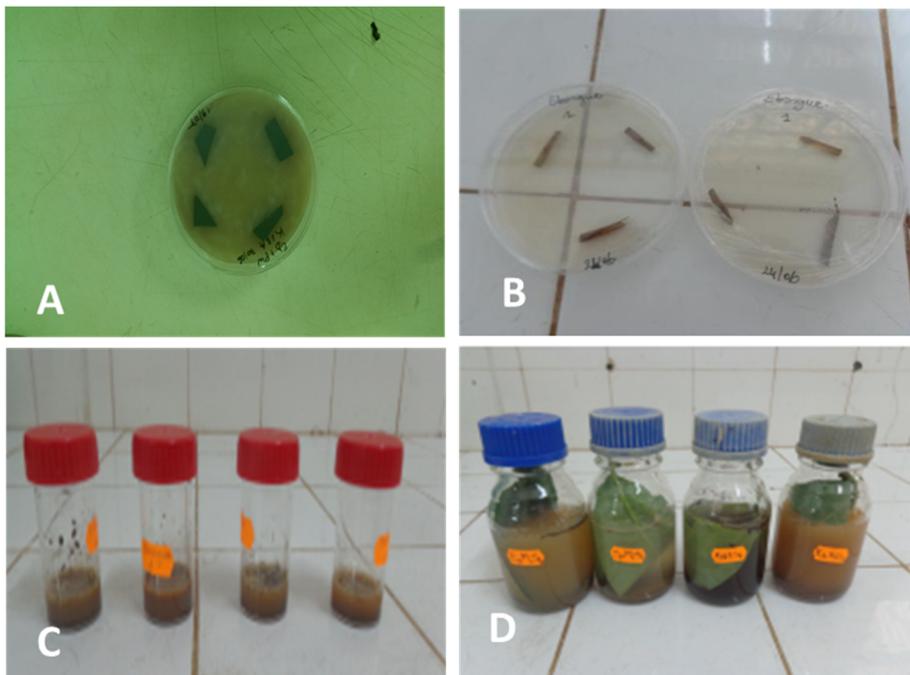


Figure 17 : Différents traitements des échantillons. A : feuilles sur milieux de culture ; B : racines sur milieux de culture ; C : suspension de sol ; D : technique de piégeage avec feuilles d'avocat

- **Isolement des nématodes**

Les échantillons de racines (20) et de sol (10) prélevés dans différentes plantations pour l'isolement des nématodes ont été traités au Laboratoire de Nématologie du CARBAP (Centre Africain de Recherche pour la Banane Plantain). L'extraction a été faite par la méthode modifiée de Baermann (Coyne *et al.*, 2010). Les échantillons de sol ont été dans un premier

temps tamisé afin d'extraire toutes les grosses particules. Les racines ont été soigneusement lavées à l'eau courante, puis sectionnées en fragments de 1 cm de longueur. Environ 10 g de racine et 100 ml de sol, ont été pesés et déposés séparément sur un filtre à papier placé dans un tamis et déposés dans une soucoupe. L'eau a été ensuite rajoutée dans la soucoupe en évitant de toucher le papier filtre mais permettant l'humidification du sol et des racines. L'ensemble a été laissé au repos pendant 48 heures en rajoutant l'eau si nécessaire. Les nématodes du sol ou des tissus végétaux traverseront le filtre de papier pour se retrouver dans l'eau au fond de la soucoupe. L'eau de la soucoupe a été récupérée, décantée puis passée au travers d'un tamis de très petite maille (20 à 30 μm). L'observation et le comptage des nématodes ont été réalisés à partir d'une suspension déposée dans une cellule de comptage quadrillée et placée sous un stéréo microscope. L'identification morphologique était basée sur la clé d'identification de (Jacob et Middepiats, 1988) qui s'appuie sur l'observation de certains caractères discriminants (la longueur et la forme du stylet, la forme de la tête, de la queue, la longueur du corps, la disposition de la glande œsophagienne par rapport à l'intestin). Les populations de nématodes du sol sont exprimées en nombre de nématode par litre de sol.

II.2.4.3. Identification des microorganismes isolés

Les isolats obtenus ont été identifiés à travers certains caractères morphologiques basés sur les caractères macroscopiques et microscopiques ; ils ont été également soumis à une identification moléculaire.

- **Identification morphologique**

Les particularités morphologiques et les structures de reproduction permettent au moyen des clés d'identifications classiques, la caractérisation du genre. Les cultures pures des champignons et Oomycètes obtenues des différents milieux de culture (PDA, MEA) ont été analysées en fonction de leur aspect physique. Les caractères morphologiques tels que : la couleur du mycélium, la forme de croissance, l'aspect de la colonie et des spores ont été évalués par observation microscopique.

- **Identification moléculaire**

Extraction d'ADN

Les mycéliums de culture pure d'*Armillaria* sp. sur MEA 2% et de *Phytophthium* sp. sur PDA ont été récoltés puis lyophilisés et réduit en fine poudre en utilisant un broyeur

cellulaire (Retsch GmbH, Germany). L'ADN génomique a été extrait en utilisant le protocole CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium) telle que décrit par Möller *et al.* (1992). 60 µg de la poudre fine de mycélium a été introduit dans des Eppendorf contenant 500 µL de tampon TES (100mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2 % SDS) et 100 µg de protéinase K. Le mélange sous agitation régulière a été incubé pendant 30 min à 60°C puis la concentration en sel a été ajustée à 1,4 M avec 140 µL de NaCl et 60 µL de CTAB 10 % et ensuite réincubé pendant 10 min à 65°C. 700 µL de SEVAG (Chloroforme : isoamyl alcool (24 :1)) a été ajouté au mélange précédent et incubé pendant 30 min à 0°C puis centrifugé pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans 1,5 mL d'Eppendorf et 225 µl de NH₄AC 5M, a été ajouté et le mélange sous agitation a été placé dans la glace pendant 30 min puis centrifugé à 4°C. Le surnageant obtenu a été transféré dans un autre tube et 510 µL d'isopropanol a été ajouté pour précipiter l'ADN et centrifugé immédiatement pendant 5 min. Le culot obtenu a été lavé 2 fois avec de l'éthanol 70 %, séché et redissout dans environ 50 µL de TE. Le spectrophotomètre à Nano gouttes ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) a été utilisé afin d'ajuster la concentration initiale à 100ng/µl avant l'amplification de l'ADN.

Amplification de l'ADN

Le protocole utilisé pour l'amplification de l'ADN est celui décrit par Tchoumi *et al.* (2017). A partir des conditions spécifiques d'amplification, les fragments PCR des régions ITS (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs transcrits internes) ont été générés à partir du couple d'amorce universelle ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) obtenus de FABI (Forestry and Agricultural Biotechnology Institute). Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 5 µL de 5 x de tampon de réaction Mytaq fourni avec l'enzyme, 0,5 µL (10 mmol. L⁻¹) de ITS1 et 0,5 µL (10 mmol. L⁻¹) de ITS4, 0,5µL de Taq polymérase (Bioline), 1 µl de l'ADN génomique et 17,5 µL de l'eau stérile SABAX (Adcock Ingram Ltd, Bryanston, S.A.). Les réactions d'amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur (Veriti; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dans les conditions suivantes : une dénaturation à 96°C pendant 4 min suivie de 40 cycles à 96, 58, et 72°C respectivement pendant 30 s, 30 s et 1 min. Le programme s'est terminé par l'étape d'allongement à 72°C pendant 7 min. Les fragments issus de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et coloré avec un colorant d'acide nucléique (Biotium Incorporation, USA) et visualisés sous lumière ultraviolette. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide de colonnes G-50 Sephadex (Sigma, Steinheim, Ger nombreux) comme recommandé par le fabricant.

Séquençage de l'ADN et analyse phylogénétique

Le séquençage par la méthode de Sanger a été réalisé avec un analyseur d'ADN ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) à l'université de Prétoria en utilisant les mêmes amorces utilisées pour la PCR en suivant le protocole décrit par Tchoumi *et al.* (2017). Le séquençage a été effectué dans 12 µL d'un mélange réactionnel constitué de 1 µL (10 mmol. L⁻¹) d'amorce (ITS1 ou ITS4), 0,5 µL de colorant (Perking-Emmer, Warrington, Royaume-Uni), 3 µL d'amplicon d'ADN purifié, 2,5 µL de tampon de séquençage et 5 µL d'eau stérile SABAX. Le programme cycleur thermique était constitué de 25 cycles à 96 °C pendant 10 s, 58 °C pendant 10 s et 60 °C pour 4 min. Les produits du séquençage ont été purifiés à l'aide de la même approche que pour les produits PCR.

Le CLC Main Workbench v.7.6.1 a été utilisé pour éditer les lectures de séquençage bidirectionnel et pour assembler les contigs. Les séquences d'ITS obtenues, ont été soumis dans la base de données des séquences d'ADN fongiques GenBank à l'aide de l'outil de recherche NCBI BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) afin de trouver des correspondances.

Un ensemble de séquences d'ITS d'*Armillaria* constitué des séquences de cette étude (*P. nigrum* et *S. mombin*) obtenues des différentes localités, de celles obtenues par Roux *et al.* 2012 sur cacao (*Theobroma cacao*) au Cameroun, ainsi que celles obtenues par BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tools) dans GenBank avec une identité $\geq 97\%$ a été regroupé. Les Séquences représentant *A. hinnulea* ont été inclus dans l'ensemble de données en tant que groupe externe (Tableau VI). L'ensemble de données a été soumis à un alignement multiple des séquences avec le programme en ligne MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) avant l'analyse phylogénétique basée sur le critère du maximum de vraisemblance (ML) en utilisant RaxML (Stamatakis 2006) dans raxmLGUI 1.3 (Silvestro et Michalak 2012). L'analyse a utilisé 10 passages parallèles et 1000 répliques bootstrap et a appliqué le modèle GTR + G de l'évolution des séquences déterminé comme étant le plus adapté au critère d'information d'Akaike (AIC) en utilisant JModeltest v2.1.6 (Darriba *et al.*, 2012 ; Miller *et al.*, 2010).

Les séquences d'ITS de *Phytophthium* ont regroupé celles de cette étude obtenue des trois principales zones d'échantillonnage, et celles utilisées par Abdul-Baten *et al.* (2015), ainsi que celles obtenues par BLASTn dans GenBank avec une identité $\geq 93\%$. Les séquences de *Phytophthora nicotianae* ont été inclus dans l'ensemble des données en tant que groupe externe (Tableau VII). L'arbre phylogénétique a été généré comme décrit précédemment.

Tableau V : Isolats utilisés dans l'analyse phylogénétique de *Armillaria*

Species	Strain	Host	Geographical origin	GenBank accession numbers (ITS)	Reference
<i>Armillaria camerunensis</i>	TH 9926	Dead wood	Cameroon	KU170951	Koch et al. 2017
<i>A. camerunensis</i>	TH DJA 91	<i>Gilbertiodendron dewevrei</i>	Cameroon	KU170952	Koch et al. 2017
<i>Armillaria</i> sp.	CMW34125	<i>T. cacao</i>	Cameroon (Bokito)	MG254549	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW36819	<i>T. cacao</i>	Cameroon (Ngat)	MG254551	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW36820	<i>T. cacao</i>	Cameroon (Ngat)	MG254552	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW36821	<i>T. cacao</i>	Cameroon (Kedia)	MG254553	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW43766	<i>Spondias mombin</i>	Cameroon (Penja)	MG182003	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44921	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Penja)	MG182004	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44922	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Penja)	MG182005	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44923	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Penja)	MG182006	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44924	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Penja)	MG182007	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44927	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Loum)	MG182008	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44956	<i>Piper nigrum</i>	Cameroon (Njombe)	MG182009	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW45278	<i>Piper nigrum</i>	Cameroon (Penja)	MG182010	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW45281	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Njombe)	MG182011	This study
<i>A. fuscipes</i>	CMW10165	<i>Prunus persica</i>	Zimbabwe	AY882966	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW2717	<i>Pinus elliottii</i>	South Africa	AY882971	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW2740	<i>Pinus patula</i>	South Africa	AY882970	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW3164	<i>Pelargonium asperum</i>	La Reunion	AY882975	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4871	<i>Widdringtonia whytei</i>	Malawi	AY882976	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4873	<i>Indigenous shrub</i>	Malawi	AY882977	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4874	<i>Araucaria cunninghamii</i>	Zimbabwe	AY882967	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4949	<i>Pinus elliottii</i>	Tanzania	AY882978	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4950	<i>Pinus strobes</i>	Tanzania	AY882979	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4953	<i>Pelargonium asperum</i>	La reunion	AY882974	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW5844	<i>Pinus patula</i>	Ethiopia	AY882969	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW5846	<i>Pinus patula</i>	Ethiopia	AY882968	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW7184	<i>Cypress</i> sp.	Kenya	AY882973	Coetzee et al. 2005

<i>A. fuscipes</i>	CMW7187	<i>Camellia sinensis</i>	Kenya	AY882972	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW3173	<i>Tectona grandis</i>	Zambia	AY882981	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW4455	<i>Camellia sinensis</i>	Zimbabwe	AY882985	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW4456	<i>Brachystegia utilis</i>	Zimbabwe	AY882984	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW3152	Unknown	Cameroon	AY882980	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW10115	<i>Acacia albida</i>	Zimbabwe	AY882983	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW10116	<i>Newtonia buchananii</i>	Zimbabwe	AY882982	Coetzee et al. 2005
<i>A. hinnulea</i>	NZFS22376	Unkown	New Zealand	EU734746	Unpublished
<i>A. hinnulea</i>	NZFS2394	Unkown	New Zealand	EU734745	Unpublished

Tableau VI : Isolats utilisés dans l'analyse phylogénétique de *Phytophthium* sp.

Species	Strain	Host	Geographical origin	GenBank accession numbers (ITS)	Référence
<i>Phytophthium boreale</i>	CBS551.88	Soil	China, Beijing	AB725879	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. carbonicum</i>	CBS112544	Coal-dust	N. France, Henin-Beaumont	AB725876	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. citrinum</i>	CBS119171	Soil	France, Dijon	AY197328	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. cucurbitacearum</i>	CBS748.96	Cucumber	Fukuoka, Japan	AB725877	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. delawarensense</i>	382B	Soybean	USA, Ohio	AB725875	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>Phytophthium</i> sp.	FP1	Buckwheat	Japan, Akita,	AB690621	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>Phytophthium</i> sp.	HonMa	Buckwheat	Japan, Fukui	AB690615	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. vexans</i>	2D111	Soil	Japan, Gifu	AB725880	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. vexans</i>	2D111C1	Soil	Japan, Gifu	AB920529	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>Pythium</i> sp.	PE101	/	/	DQ217603	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. helicoides</i>	CBS286.31	Soil	USA	AB725878	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. helicoides</i>	CBS286.31TA1	/	/	AB217658	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. megacarpum</i>	CBS112351	Soil N.	France, Lille	AB725881	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. mercurial</i>	CBS122443	Grapevine	South Africa, Vredendal	AB690614	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. mercurial</i>	CBS122443C1			AB920517	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. montanum</i>	CBS111349	Soil	Germany, Bavarian Alps	AB725883	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015

<i>P. oedoehilum</i>	CBS252.70	Soil	Netherland, Wageningen	AB690618	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. oedoehilum</i>	CBS292.37	Soil	Netherland, Wageningen	AB690619	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. ostracodes</i>	CBS768.73	Soil	Spain, Ibiza	AY598663	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>P. sindhum</i>	CBS124518	Banana field	Sindh, Pakistan	HM244825	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>O. littorale</i>	GUCC1132	Water	Japan, Shizuoka	AB920536	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>O. littorale</i>	GUCC1072	Water	Japan, Okinawa	AB920537	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015
<i>Phytophthora nicotianae</i>	GF101	Karankoe	Japan, Gifu	AB688384	Abdul-Baten <i>et al.</i> 2015

II.2.4.4 Test de pathogénicité

Le test de pathogénicité est de s'assurer du rôle joué dans la maladie par les microorganismes (champignons et Oomycète) isolés des plants ayant présenté la maladie. Selon le Lepoivre, 2003, le postulat de Koch stipule que pour être considéré comme étant agent pathogène, un microorganisme doit être capable de reproduire les mêmes symptômes observés en champs en milieu contrôlé.

Phytophthium sp. et *Fusarium* sp. sont les microorganismes qui ont été retenus comme potentiels agents pathogènes responsables de la maladie du jaunissement foliaire observée chez les poivriers. Le choix de ces trois microorganismes a été fait selon les critères suivants : le premier est basé sur l'abondance des souches isolées et le second basé sur les données de la littérature mettant en évidence l'implication du genre *Fusarium* et Oomycètes dans les symptômes décrits. L'*Armillaria* utilisé dans ce test a été le principal champignon isolé de la pourriture blanche racinaire observée sur poivrier et sur tuteur. Trois isolats de *Phytophthium* sp nommés PPP, PPK et PPW sur lesquels a porté notre test sont ceux qui présentaient une grande vitesse de croissance en culture et une forte production de structures infectrices (Oospore, Sporange). Un seul isolat de *Fusarium* sp nommé PPFU a été utilisé. Ces microorganismes ont été cultivés sur milieu V8, PDA pour *Phytophthium* et *Fusarium*, et sur milieu MEA pour *Armillaria* au Laboratoire de Phytopathologie de l'Irad à Nkolbisson-Yaoundé.

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum de *Phytophthium* sp. a été obtenu en raclant délicatement les mycéliums à la surface des cultures pures (Cinq boîtes pour une suspension) préalablement cultivées sur milieu V8 et incubés pendant 5 jours à température ambiante (25 ± 2 °C). Ces mycéliums ont été ensuite introduits dans de l'eau d'étang stérilisée et incubés pendant 48h sous une photopériode continue afin de stimuler la production des structures infestantes : oospore, oogone, anthéridie, sporange (Abdul-Baten *et al.*, 2015, modifié).

L'inoculum de *Fusarium* a été obtenu à partir des cultures pures et fructifères âgées de 5 jours sur milieu PDA. Les boîtes de Pétri contenant le *Fusarium* ont été immergées d'eau distillée stérilisée (EDS), puis le mycélium frotté à l'aide d'un pinceau stérilisé. La suspension de conidies obtenue a été filtrée et ajustée à une concentration de 10^6 conidies/mL à l'aide de l'hématimètre.

L'inoculum de l'*Armillaria* a été obtenu à partir de boîte de Petri contenant l'inoculum âgée de trois semaines, des fragments de milieu de cultures contenant le mycélium et les rhizomorphes ont été utilisés comme inoculum.

- **Inoculation**

L'inoculation a été effectuée sur des plantules de poivrier âgées de 6 mois provenant d'un pépiniériste de l'IGPP et obtenu par bouturage de tige. Le test s'est déroulé dans une pépinière aménagée au Laboratoire de lutte biologique et de microbiologie appliquée de l'Irad de Nkolbisson-Yaoundé (Fig. 18A). Deux méthodes d'inoculations ont été utilisées :

- La première méthode a consisté à inoculer l'agent pathogène au niveau des racines des plants de poivrier (Fig. 18C). Ces derniers ont été déracinés des pots d'origine afin de mettre à nu leurs racines. Les racines, ont été par la suite scarifiées/blessées à l'aide d'un scalpel puis trempées dans une suspension de spores (100 mL d'inoculum) pendant 10 min. Après inoculation (par trempage), les plants ont été replantés dans de nouveaux sachets de pépinières contenant du substrat (2/3 terre noire + 1/3 sable fin). Les plants témoins constitués de huit plants ont subi le même traitement mais avec de l'eau distillée à la place des inocula. Un lot de huit plants de poivriers a été inoculé avec *Phytophthium* sp., un autre lot ayant le même nombre de plants a été inoculé avec un mélange 50/50 de *Phytophthium* sp. et *Fusarium* sp et le troisième lot a été inoculé avec *Fusarium* sp uniquement. Les plants ont été disposés au hasard, et chaque pot était identifié par une étiquette portant : la date de l'inoculation, le type d'inoculation, le numéro du pot et le nom du microorganisme. Les observations ont porté sur la description des symptômes observés en rapport avec ceux observés en champs à savoir le jaunissement des feuilles. La mesure de la hauteur du plant, le diamètre du collet, le nombre de feuille, le poids des racines secs.

- La deuxième approche n'a concerné que les deux isolats de *Phytophthium* sp. et *Armillaria* sp. La technique utilisée ici est semblable à celle réalisée par Ford *et al.* (2016). Elle a consisté à faire une scarification avec une lame au niveau du collet et d'y insérer l'agent pathogène (Fig. 18B). Chaque plant a été infecté en mettant un bouchon mycélien du pathogène (5 mm x 5 mm) directement en contact avec la zone décapitée. Le bouchon mycélien a ensuite été recouvert de coton imbibé d'eau pour maintenir l'humidité. Les plants témoins recevaient des disques de milieux de culture sans microorganismes. Les plants (huit par isolats) ont été disposés au hasard, et chaque pot était identifié par une étiquette portant : la date de l'inoculation, le type d'inoculation, le numéro du pot et le nom du microorganisme.

Les paramètres telle que : le nombre de feuilles, la surface foliaire des plants, le diamètre du collet des plants ont été notés. Ces données ont été collectées avant l'inoculation et 120 jours après l'inoculation afin de déterminer s'il y'a eu un impact sur le développement végétatif de la plante hôte. A la fin du test, les plants ont été déracinés, nettoyés, puis séchés séparément (feuilles, racines) à 60°C dans l'étuve et ensuite pesés. En outre, les symptômes de la maladie (le jaunissement des feuilles), ainsi que la longueur de lésions faites par l'inoculum ont été notés.



Figure 18 : Déroulement du test de pathogénicité. A : Pépinière ; B : inoculation au niveau du collet ; C : Inoculation par trempage des racines dans l'inoculum

II.2.4.5 Analyses statistiques des données

Les séquences d'ADN obtenues après polymérisation et séquençage sont assemblées en utilisant le logiciel Chromas et ensuite identifiées en les comparant à d'autres séquences connues et stockées dans un genbank par la méthode de Blast. Les relations entre les séquences obtenues par PCR et les correspondances obtenues dans le genbank sont déterminées en construisant l'arbre phylogénétique et la méthode de bootstrap a permis d'estimer la significativité statistique des résultats

II.2.5 Evaluation de l'efficacité des produits chimiques utilisés par les producteurs, de *Trichoderma asperellum* et des extraits de trois plantes *in vitro* et *in vivo* contre le dépérissement lent.

II.2.5.1 Evaluation *in vitro* du potentiel antagoniste de *Trichoderma asperellum* (PR10 PR11 PR12 657-9) contre trois isolats de *Phytophthium* sp.

➤ Test de confrontation directe entre *T. asperellum* et *Phytophthium* sp.

La confrontation directe entre les souches de *T. asperellum* (PR10, PR11, PR12, 659-7) et celles de *Phytophthium* sp (PPP, PPF, PPK,) a été réalisée en boîte de pétri sur milieu PDA. Les souches de *T. asperellum* et de *Phytophthium* sp. ont été mises en culture séparément sur milieu PDA et l'incubation a eu lieu à 25 ± 2 °C pendant 5 jours avec une photopériode de 12 h. Ensuite des implants de 5 mm de diamètre des cultures de *Phytophthium* sp en croissance active ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce sur le front de croissance et placés dans de nouvelles boîtes de pétri contenant encore le milieu PDA. Après 48 heures, les implants des souches de *T. asperellum* de même diamètre ont été également prélevés et mis en culture dans les boîtes de pétri où ceux de *Phytophthium* sp ont été préalablement déposés. Les deux implants sont placés suivant un axe diamétral, à 60 mm l'une de l'autre et à équidistance du centre de la boîte de pétri (Fig. 19) selon la procédure de Muhammad *et al.* (2010). Les boîtes témoins étaient constituées des cultures de *Phytophthium* sp. seules réalisées dans les mêmes conditions que les cultures en confrontation. L'incubation a eu lieu à 25 ± 2 °C ; sous une photopériode de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité jusqu'à ce que les boîtes témoins soient entièrement pleines. Ce test a été réalisé deux fois successivement dans le temps, avec cinq (05) boites pour chacune des confrontations (*Phytophthium* sp.-*T. asperellum*). Par la suite, le degré d'antagonisme a été évalué après 7 jours d'incubation suivant l'échelle de Bell *et al.* (1982) présentant 5 classes (1-5) définies comme suit :

Classe 1 = la souche de *Trichoderma* envahit complètement l'agent pathogène et couvre entièrement la surface du milieu dans la boîte.

Classe 2= la souche de *Trichoderma* envahit au moins 2/3 de la surface du milieu.

Classe 3= la souche de *Trichoderma* et l'agent pathogène colonisent chacun approximativement 1/2 de la surface du milieu (plus d'1/3 et moins de 2/3).

Classe 4= l'agent pathogène colonise au moins 2/3 de la surface du milieu et est résistant à l'empiètement de la souche de *Trichoderma*.

Classe 5= l'agent pathogène envahit complètement la souche de *Trichoderma* et occupe entièrement la surface du milieu.

En outre, la souche de *Trichoderma* est considérée comme étant un antagoniste de l'agent pathogène si la moyenne des notes pour une comparaison donnée (se situe autour du nombre total des classes ou est plus proche de celui-ci), c'est-à-dire si elle est ≤ 2 , mais non hautement antagoniste si elle est ≥ 3 . Les caractéristiques morphologiques de la conidiation, quant à elles, ont été analysées de manière visuelle à partir du point de contact suivant l'échelle de notation suivante : 0= Aucune conidiation, 1= conidiation faible, 2= conidiation moyenne, 3= conidiation dense

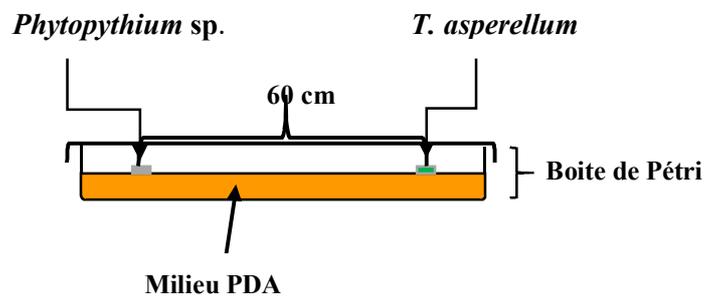


Figure 19 : Confrontation par contact direct entre *Phytophthium sp.* et *T. asperellum*

➤ **Evaluation de la célérité du mycoparasitisme nécrotrophique des souches de *T. asperellum* sur la croissance de *Phytophthium sp.***

La détermination des vitesses du mycoparasitisme nécrotrophique de *T. asperellum* s'est faite selon la méthode modifiée des boîtes précolonisées développées par Krauss *et al.* (1998). Les quatre souches de *T. asperellum* et celles de *Phytophthium sp.*, ont été mises en culture séparément dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu PDA. Un quadrillage constitué de 36 carrés de dimension 0,25 cm² (0,5 x 0,5) chacun a été délimité à la base des boîtes de pétri devant contenir uniquement *Phytophthium sp.* Ces boîtes ont été mises à incubation à 25 ± 2 °C, pendant cinq (05) jours. Après une colonisation totale des boîtes de pétri, une bande du milieu de culture de 1×3 cm entièrement recouvert du mycélium de *T. asperellum* a été prélevée à l'aide d'un scalpel et déposée délicatement dans les boîtes de pétri colonisées par les souches de *Phytophthium sp.* sur la première ligne du quadrillage. Après 24 heures d'incubation à 25 ± 2 °C, chaque jour et pendant six (06) jours, une bande de 0,5 x 6 cm perpendiculaire à la bande colonisée par *T. asperellum*, a été découpée dans le sens de la longueur, puis divisée en cubes de 0,25 cm² afin d'obtenir un ensemble de 6 cubes, à partir des marges distales vers la zone de dépôt de la lamelle du mycoparasite. Ceci représente l'évolution

dans le temps de la croissance de *T. asperellum* sur les colonies de *Phytophthium* sp. Par la suite, les six (06) cubes sont individuellement introduits dans une boîte de pétri contenant le milieu PDA amendé avec du benomyl à 300 µg/l (PDA+B), positionnés suivant un ordre de 0 à 5 cm (Fig. 20). Après 48 heures d'incubation, des observations de la croissance ou de l'absence de croissance de *Phytophthium* sp sont faites sur la périphérie de chaque cube, tout en notant à chaque fois la distance de *T. asperellum* qui correspond au numéro du cube où l'on n'a enregistré aucune croissance de *Phytophthium* sp.

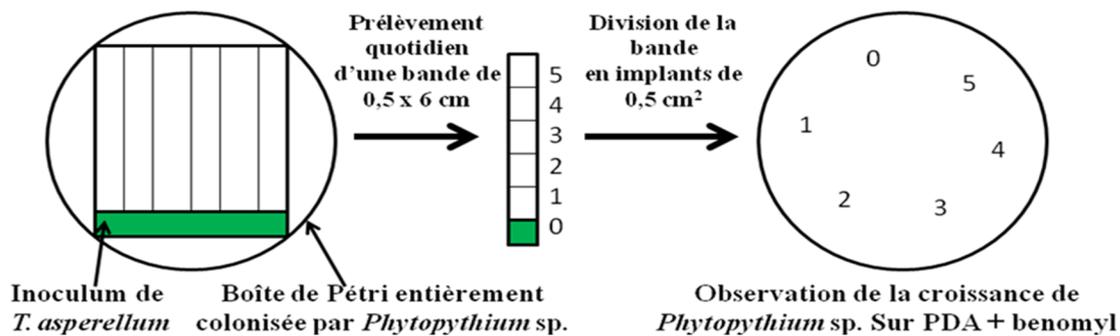


Figure 20 : Représentation schématisée du test de mycoparasitisme par la méthode de boîte précolonisée (precolonised plate method) (Ten Hoopen, 2007).

II.2.5.2 Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits de plantes et des fongicides de synthèse sur *Phytophthium* sp. (Dépérissement lent du poivrier)

➤ Préparation des différents types d'extraits de plantes

Les poudres des plantes (*C. odorata*, *P. amarus*, *C. benghalensis*) ont été obtenues par broyage des feuilles des plantes séchées à l'ombre pendant au moins deux semaines. Ces poudres ont été séparément soumis à deux types d'extraction : une extraction à l'eau froide et une extraction à l'alcool 70 %.

100 grammes de poudre ont été pesés et introduits dans un erlenmeyer de 500 mL. La poudre de chaque plante et pour chaque type d'extrait a été délipidée en y ajoutant 300 mL d'hexane pure et qu'on agitait de temps en temps pendant 24 h. Le mélange a été filtré à l'aide d'une toile quadrillée et le résidu a été récupéré et séché à température ambiante jusqu'à évaporation complète de l'hexane. Ce traitement est un préalable pour la suite des différentes extractions aux solvants utilisés ; eau et l'éthanol 70 %. Le résidu sec obtenu après délipidation a été réintroduit soit dans 500 mL d'eau distillée (EA) soit dans 500 mL d'une solution hydro-

éthanolique (EE) pendant 24 heures. Pour l'EA, le mélange a été filtré avec une toile quadrillée par contre l'EE a été filtré à travers le papier Whatmann n°1. Les filtrats obtenus (EA et EE) ont été centrifugés à 7000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant de l'EE a été au préalable débarrassé de l'éthanol à l'aide d'un évaporateur rotatif puis lyophilisé par contre l'EA a été directement lyophilisé sans évaporation du solvant. Les poudres obtenues ont été pesées et conservées à l'abri de l'humidité et de la chaleur (Fig. 21). Les rendements d'extraction sont calculés par rapport au poids du matériel végétal de départ en utilisant la formule ci-dessous :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{Masse du lyophilisat}}{\text{Masse du matériel végétal}} * 100$$

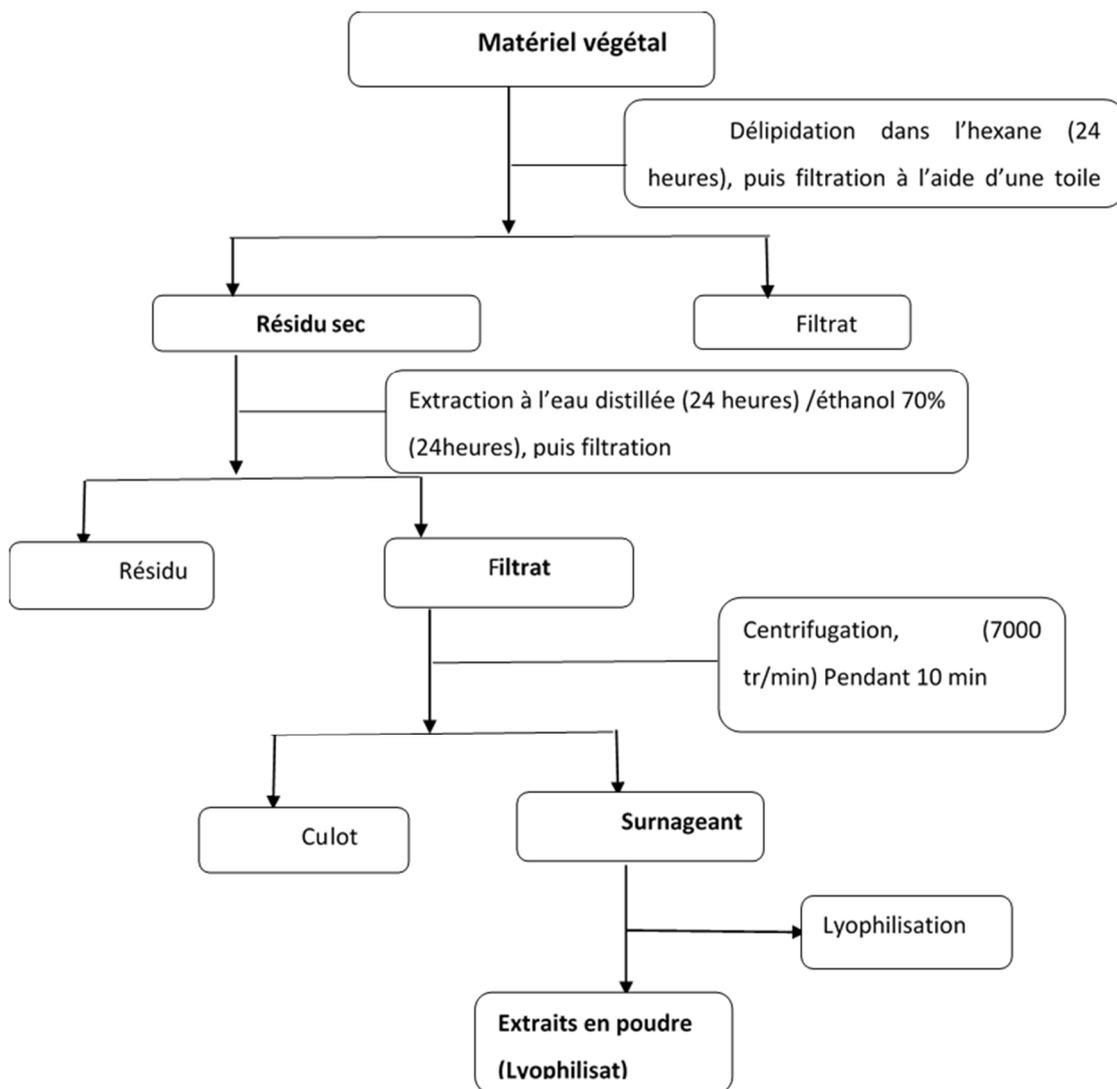


Figure 21 : Protocole d'extraction des différentes plantes

➤ **Potentiel antifongique des extraits de plantes et fongicides de synthèse sur *Phytophthum* sp.**

Les activités antifongiques des extraits de plantes et des fongicides de synthèse ont été évaluées par la méthode des milieux supplémentés décrite par Benjilali *et al.* (1982). Cette méthode nous permet de déterminer la concentration minimale permettant une inhibition complète de la croissance du microorganisme.

❖ **Principe**

La méthode des milieux supplémentés consiste à faire croître un champignon dans un milieu de culture dans lequel le fongicide de synthèse ou l'extrait de plante a été dispersé préalablement à différentes concentrations. L'activité antifongique étant marquée par une inhibition de la croissance mycélienne. La comparaison de la croissance obtenue sur les milieux supplémentés avec celle obtenue sur les milieux non supplémentés en fongicide ou en extrait permet d'évaluer le pouvoir antifongique.

❖ **Protocole.**

• **Préparation des milieux supplémentés en fongicides**

Les milieux de culture PDA, ont été préparés suivant le protocole en annexe 5, puis autoclavés à 121°C pendant 15 min à 1,1 bar. Ces milieux sont par la suite maintenus liquides entre 40°C et 50°C sous une hotte à flux laminaire. Les fongicides (Kocide® 2000, Banko® plus, Ridomil Gold® plus 66 WP, le Scooter® EC) dilués dans de l'eau distillée à différentes concentrations (de 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, 1, 10, 10², 10³ µg/mL du Métalaxyl-M pour Ridomil et Scooter, Hydroxyde de cuivre pour le Kocide® 2000 et du Chlorothalonil pour le Banko® plus), ont été ajoutés dans les milieux de cultures. L'ensemble du mélange a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique et coulé dans des boîtes de Pétri stérile de 90 mm de diamètre (15 à 20 mL de milieu de culture). De l'eau distillée stérile a été ajoutée à la place des fongicides dans les boîtes de Pétri ayant servi de témoins.

• **Préparation des milieux supplémentés en extrait de plantes**

Les lyophilisats ont été pesés puis dissous dans un peu d'eau distillée et ajoutés dans les milieux de cultures pour obtenir des concentrations de 10000 µg/mL, 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL. Ces extraits ont été ajoutés aux milieux de culture après qu'ils aient été autoclavés à 121°C pendant 15 min à 1,1 bar. Ces milieux sont par la suite maintenus liquides

entre 40°C et 50°C sous une hotte à flux laminaire. Une fois l'extrait introduit dans le milieu de culture, l'ensemble du mélange a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique et coulé dans des boîtes de Pétri stérile de 90 mm de diamètre (15 à 20 mL de milieu de culture). De l'eau distillée stérile a été ajoutée à la place des extraits dans les boîtes de Pétri ayant servi de témoins.

- **Ensemencement des milieux de culture et incubation**

Après solidification des milieux de culture, un disque mycélien de 5 mm de diamètre est prélevé dans la zone périphérique d'une culture du champignon âgée de 10 jours, et déposé au centre de la boîte de Pétri. La boîte ainsi ensemencée a été scellée avec du papier parafilm et incubée en position renversée sur le couvercle, entre 25 ± 2 °C à l'obscurité pendant 5 jours. Chaque concentration a été répétée trois fois et l'expérience refait deux fois. Trois isolats de *Phytophthium* sp. ont été utilisés pour ce test : PPP, PPK, PPF.

- ❖ **Evaluation de l'inhibition de la croissance mycélienne de *Phytophthium* sp.**

Le diamètre de croissance radiale du champignon a été mesuré dans chaque boîte après 5 jours d'incubation le long de 2 axes perpendiculaires tracés au verso des boîtes de Pétri avant inoculation. Pour chaque extrait et chaque concentration, la toxicité ou l'activité antifongique de l'extrait a été déterminée par le pourcentage d'inhibition de croissance mycélienne par rapport au témoin (boîtes non supplémentées), selon la formule de Pandey *et al.* (1982) :

$$I (\%) = \frac{Dc - Dt}{Dt} * 100$$

Avec :

I (%) : pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

Dt : diamètre moyen de croissance mycélienne dans les boîtes témoin

Dc : diamètre de croissance mycélienne dans les boîtes tests

Lorsque pour une concentration donnée, il n'y a aucune croissance mycélienne observée, le germe est repiqué sur un milieu gélosé dépourvu d'extrait végétal ou fongicide. Une reprise de la croissance traduit un effet fongistatique et l'absence de croissance un effet fongicide. Paramètres antifongiques recherchés :

- **CMI** (concentration minimale inhibitrice) : c'est la plus petite concentration d'extrait pour laquelle il n'y a aucune croissance visible à l'œil nu.

- **CI₅₀** (concentration qui induit 50 % d'inhibition)

II.2.5.3 Screening et dosage phytochimique des extraits aux solvants

Pour mieux comprendre les propriétés antimicrobiennes des extraits des plantes, il est intéressant de connaître les principaux groupes de composés antimicrobiens qu'ils contiennent (Cowan, 1999). Dans le cadre de ce travail, les groupes de métabolites secondaires à activités antifongiques ont été recherchés dans les extraits aux solvants.

➤ Screening de quelques métabolites secondaires dans les extraits des trois plantes utilisées

La présence de groupes de composés majeurs tels que les alcaloïdes, les phénols, les stérols, les flavonoïdes, les glycosides, les tanins, les coumarines des extraits aux solvants a été déterminée suivant le protocole ci-dessous :

- **Test des alcaloïdes**

On ajoute 0,5 mL d'extrait (0,5 g de lyophilisat de chaque plante dissout dans 10 mL d'eau distillée) 1 mL de H₂S₀₄ (dilué au 1/10). L'ensemble est homogénéisé et porté à ébullition pendant 2 min, puis on y ajoute 5 gouttes de réactif de Meyer. Le développement d'une turbidité confirme la présence des alcaloïdes (Odebeyi et Sofowora, 1978).

- **Test des phénols**

On mélange 0,5 mL d'extrait (0,5 g de lyophilisat de chaque plante dissout dans 10 mL d'eau distillée) et 1,5 mL de méthanol puis la mixture est chauffée au bain-marie pendant 15 min. à ce mélange, on ajoute 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparée. Le précipité vert marque la présence des phénols (Harbone, 1976).

- **Test des stérols**

On ajoute successivement 4 gouttes d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré dans un mélange de 0,5 mL d'extrait (0,5 g de lyophilisat de chaque plante dissout dans 10 mL d'eau distillée) et 0,5 mL de chloroforme. L'apparition de la couleur bleu verdâtre traduit la présence des stérols (Harbone, 1976).

- **Test des flavonoïdes**

A un mélange de 0,5 mL d'extrait (0,5 g de lyophilisat de chaque plante dissout dans 10 mL d'eau distillée) et 0,5 mL de méthanol, on ajoute quelques copeaux de magnésium puis du HCL concentré goutte à goutte. La présence des flavonoïdes se traduit par une effervescence avec un changement de couleur qui peut être rouge brique ou violette (Harbone, 1976).

- **Test des glycosides**

On introduit 0,5 mL d'extrait (0,5 g de lyophilisat de chaque plante dissout dans 10 mL d'eau distillée) dans 1 mL de HCl, qu'on neutralise par 1 mL de NAOH à 5 %. La solution de Fehling (A+B) est ajoutée goutte à goutte. La présence des glycosides se manifeste par l'apparition d'un précipité rouge brique (Odebeyi et Sofowora, 1978).

- **Test des tannins**

On ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 0,5 mL d'extrait (0,5 g de lyophilisat de chaque plante dissout dans 10 mL d'eau distillée). La présence des tannins se caractérise par un changement de coloration de la solution : la coloration bleu foncé indique la présence des tannins galliques, alors que la coloration vert noirâtre traduit la présence des tannins catéchiques (Harbone, 1976).

- **Test des coumarines**

Sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM), on dépose une goutte d'une solution alcoolique de l'extrait qu'on expose aux vapeurs d'ammoniaque. Les coumarines sont détectées par des spots dont la coloration exaltée en présence des vapeurs d'ammoniaque, varie du bleu au pourpre. Par ailleurs, les coumarines peuvent être identifiées en exposants les spots à la lumière UV : elles y donnent une florescence bleue.

L'intensité comparative des différents extraits de la coloration des coumarines à la fin de chaque test a été traduit par les signes tel que suit : (+) présent, (++) pour absent.

II.2.5.4 Dosage de quelques groupes de métabolites secondaires et primaires dans les extraits aux solvants de *C. odorata*

➤ **Phénols totaux**

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un

mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/mL.

Un volume de 0,5 mL d'extrait est ajouté à 2 mL du réactif Folin-ciocalteu, après 3min, 4mL de carbonates de sodium (Na_2CO_3 7,5 % w/v) sont ajoutés. L'ensemble est mélangé, puis les tubes sont maintenus à température ambiante et à l'obscurité pendant 120 min. La lecture est faite à 760 nm, la concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage ($y=0,0013x-0,0015$, avec coefficient de corrélation $R^2= 0,998$, (Annexe 6) obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard préparé à différentes concentrations (50, 100, 250, 500 mg/mL). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme de poudre d'extrait sec (mg EAG/g).

➤ **Flavonoïdes totaux**

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3), a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes. Le principe est basé sur la formation d'un complexe jaunâtre, obtenu en ajoutant du chlorure d'aluminium à l'extrait. Cette coloration est due à la fixation des ions Al^{3+} sur les atomes d'oxygène, présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. La catéchine a été utilisée comme standard pour la détermination de la teneur des flavonoïdes dans un échantillon (Bahorun *et al.*1996).

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/mL.

0,5 mL d'extrait sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée et 0,15 mL de solution de NaNO_2 à 5% (nitrite de sodium). Après 6 minutes, 0,15 mL d' AlCl_3 à 10% sont ajoutés et laissés pendant 6 minutes, puis 2 mL de NaOH (soude) à 4% sont ajoutés. Le volume est ajusté à 5 mL avec l'eau distillée et la solution finale est incubée pendant 15 min à température ambiante à l'abris de la lumière. L'absorbance est mesurée à 510 nm et l'eau distillée a été utilisée comme blanc. La concentration des flavonoïdes est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue ($y=0,0031x-0,011$, avec coefficient de corrélation $R^2= 0,993$) en utilisant la catéchine comme standard préparée en parallèle dans les mêmes conditions opératoire en dissolvant la catéchine dans de l'eau distillée aux concentrations allant de 2,5 à 25 mg dans 100 mL (25, 50, 100, 250 mg/L). Les valeurs obtenues sont exprimées en mg de catéchine équivalent par gramme d'extrait sec (mg. CE/g).

➤ **Tannins totaux**

Les tannins ont été extraits des échantillons en utilisant une méthode de précipitation de protéine (Hagerman et Butler 1978). Les tanins sont connus par leur propriété principale, qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA dans le dosage des tannins en milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique (FeCl₃) réagit avec les tannins (en milieu alcalin : SDS/TEA pour former des chélates de couleur violette).

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/mL.

1mL d'extrait et 2 mL de la solution de BSA 1mg/mL (albumine de sérum bovin dissous dans 1 mg/mL d'une solution de tampon d'acétate de 2,0 M à pH 5 et contenant 0.17 M de chlorure de sodium) préparés dans le tampon acétate (2M, pH= 5) ont été mélangés. Après 15 min d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé à 5000 x g pendant 15 min. Le précipité est dissout dans 4 mL de la solution tampon SDS/TEA (1% sulfate de Dodecyl de sodium et 5% de Triethanolamine) et mis à l'obscurité pendant 15mn ,0.5 mL de la solution de chlorure ferrique (0,01 M de chlorure ferrique dans 0,01 N de HCl) est ajouté, après une incubation de 30 min, la lecture de l'absorbance est effectuée à 510 nm et l'eau est utilisée comme blanc. La concentration en tannins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage avec la catéchine comme précédemment décrite. Les concentrations sont exprimées en mg de catéchine équivalent par gramme de poudre d'extrait (mg. CE/g).

➤ **Alcaloïdes totaux**

Les alcaloïdes totaux sont quantifiés en utilisant la méthode spectrophotométrique. Cette méthode est basée sur une réaction entre l'alcaloïde et le vert de bromocresol comme décrit par Tabasum *et al.* (2016).

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/mL.

0.5 mL d'extrait est dissout dans du HCl dilué (2 N) et filtré. A 1 mL de la solution précédente est ajouté 5 mL du vert de bromocresol et 5 mL de la solution tampon phosphate à Ph 7. Le mélange est agité et le complexe formé est extrait avec du chloroforme sous agitation vigoureuse. L'eau est utilisée comme blanc. L'absorbance du complexe dilué dans le chloroforme est mesurée à $\lambda = 415$ nm. Les concentrations d'alcaloïdes ont été estimées en mesurant l'absorbance par gram de poudre d'extrait mAbs/g).

➤ **Protéines totales**

La méthode utilisée pour le dosage des protéines totales est celle décrite par Bradford (Bradford, 1976). Elle est basée sur la formation d'un complexe entre les résidus d'acides aminés basiques et aromatiques avec le colorant du bleu de Coomassie G250.

Les extraits sont préparés à une concentration de 1mg/mL

A 1 mL d'extrait a été ajouté 1 mL du réactif de Bradford. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance a été lue à 595 nm avec l'eau comme blanc. Les solutions standard de BSA (Bovine Serum Albumin) ont été préparées en dissolvant le BSA dans de l'eau à des concentrations allant de 1 à 7 g/mL. La droite étalon obtenu ($y=0.0322x-0.0052$, avec coefficient de corrélation $R^2= 0.9916$, (Annexe 6) a été utilisée pour estimer la teneur en protéines et les résultats sont exprimés en mg équivalents BSA par gramme d'extrait sec (mg. BSA/g).

➤ **Polysaccharides totaux**

La teneur totale en polysaccharides a été mesurée à l'aide d'acide phénol-sulfurique après une hydrolyse acide légère, conformément à la méthode décrite par Dubois *et al.* (1956).

Les extraits ont été hydrolysés dans du HCl (1 mol. L⁻¹) pendant 2 h à 105°C. Une fois les extraits hydrolysés refroidis, elles ont été dissoutes dans de l'eau puis filtrées et 100 µl ont été ajoutées à 100 µl du phénol 5% dans de l'eau (v/v). Une solution concentrée d'acide sulfurique (1 mL) a été ajoutée au mélange précédent puis l'ensemble est passé au vortex pendant quelques secondes ensuite, la teneur en polysaccharide totale a été mesurée par spectrophotométrie à 500 nm. Des solutions standard de glucose ont été préparées en dissolvant le glucose à des concentrations s'étendant de 0.5 à 10 mg dans 100 mL d'eau (5, 25, 50, 100 mg/ L). La droite de régression linéaire obtenue ($y=0.014 x-0.0249$, avec coefficient de corrélation $R^2= 0.9988$) a permis d'estimer la teneur en polysaccharide qui a été exprimée en concentration de glucose par gramme d'extrait sec (mg. Glucose/g).

II.2.5.5 Profil phénolique des extraits de *C. odorata* analysé par chromatographie en phase liquide à ionisation electrospray couplée à la spectrométrie de masse en TANDEM (LC-ESI/MS/MS)

Le profil phénolique des extraits de *C. odorata* a été réalisé à partir de la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-

ESI/MS/MS) décrit par Mena *et al.*, 2016. Vingt milligrammes de poudre des différents extraits ont été dissoutes dans 1 mL de solvant (d'eau et d'éthanol 70%). L'appareil (Agilent technologie Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) est équipé d'un dégazeur à vide, un échantillonneur automatique, une pompe binaire et d'un piègeur d'ion. Une colonne de type Agilent 1200 C18 (5 mm, 250 x 4,6 mm) a été choisie, le taux de flux utilisé était 1 mL/min et l'analyse a été effectuée à température ambiante. Les extraits de *C. odorata* ont été injectés dans des mélanges de solvants eau/ acide formique (99 :1 v/v) (éluant A) et Acétonitrile/Acide formique (99,9 :0,1 v/v) (éluant B). Le gradient a commencé avec 1 % du solvant B pendant 1 min puis a augmenté linéairement jusqu'à 40% du solvant B en 13 min. La composition de la phase mobile a été portée à 99 % du solvant B en 13 minutes et maintenu ainsi pendant 2 min afin de laver la colonne avant de revenir à l'état initial.

L'identification des composés phénoliques dans les extraits a été effectuée à l'aide d'un balayage complet MS2 avec les spectres de masse (m/z) allant de 100 à 800. Les flavonols ont été quantifiés en tant qu'équivalent de quercétine-3-glucoside, les acides hydroxybenzoïques en tant qu'équivalent d'acide gallique ou d'acide protocatéchique et les acides hydroxy cinnamiques en tant qu'équivalent d'acide caféique ou d'acide coumarique.

II.2.5.6 Tests *in vivo* en pépinière de l'efficacité des produits biologique et chimique sur la maladie de dépérissement lent du poivrier.

Les fongicides de synthèse qui ont été les plus actifs *in vitro* ont été retenus pour les tests en pépinière. Il s'agissait du Ridomil Gold® 66 WP et du Scooter® EC (Ridomil Gold® 480 EC). Les doses d'application utilisées sont celles qui ont été indiquées par le fabricant. Celles-ci ont été consignées dans un Tableau III. Parmi toutes les plantes testées, l'extrait hydroéthanolique de *C. odorata* a été retenu pour la suite de l'essai en pépinière à cause sa nature fongicide en boîte de Pétri. La concentration de 2 % pour les EE de *C. odorata* a été retenue pour les essais ceci en relation avec la concentration qui a présenté une inhibition totale du microorganisme en boîte de Pétri. *T. aperellum* PR11 est la souche qui a été utilisée pour les tests *in planta* parmi les quatre souches de départ, non seulement pour son mycoparasitisme élevé contre *Phytophthora* sp. et également pour son adaptation en milieu réel selon des études antérieures. Le nématicide savenem a été utilisé dans l'essai en pépinière car bien que la densité des nématodes trouvée dans quelques plantations poivrières de la zone d'étude soit faible ils sont présents.

➤ **Préparation du substrat**

La terre arable utilisée pour la pépinière a été prélevé dans trois plantation distinctes (Njombé, Penja et Loum) fortement infestées par la maladie au vu du nombre de plants de poivrier présentant les symptômes de jaunissement. Cette terre a été mélangée avec de la pozzolane et de la parche (3 :1 :1v/v). L'inoculum de la souche de *Phytophthium* sp. était constitué de mycélium prélevé avec le milieu de culture. Trois quarts de calotte mycélienne issues d'une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, a été utilisée pour inoculer le sol. Cette calotte a été mélangée à 1 kg de substrat par pot.

➤ **Déroulement de l'essai**

Afin d'évaluer l'efficacité de l'EE de *C. odorata*, de *T. asperellum*, du nématicide, Ridomil Gold® 66 WP et du Scooter® EC sur la maladie de dépérissement lent, des tests en pépinière ont été effectués à Njombé au sein d'une ombrière (Fig. 22A). L'essai a été réalisé deux fois, une fois durant les périodes sèches de l'année (Novembre 2016 à Février 2017) et une deuxième fois durant les périodes pluvieuses de l'année (Juin 2017 à Novembre 2017). La durée totale des essais a été de 4 mois pour le premier essai et de 6 mois pour le second essai.

Les pots ont été disposés suivant un dispositif complètement aléatoire constitué de sept unités expérimentales ou traitements (trois produits chimiques, deux produits biologiques et deux témoins) comportant chacune quatre pots ; chaque unité expérimentale étant répétée trois fois (Fig. 22B)

Les boutures qui ont été utilisées dans cet essai provenaient des plants de poivriers âgés entre 5 et 7 ans. Ces plants de poivrier ne présentaient aucun symptôme d'une quelconque maladie (apparence saine). Aucune caractérisation variétale des poivriers n'étant encore faite, et afin d'uniformiser le matériel végétal, la sélection des boutures était basée sur des caractéristiques morphologiques de la plante.

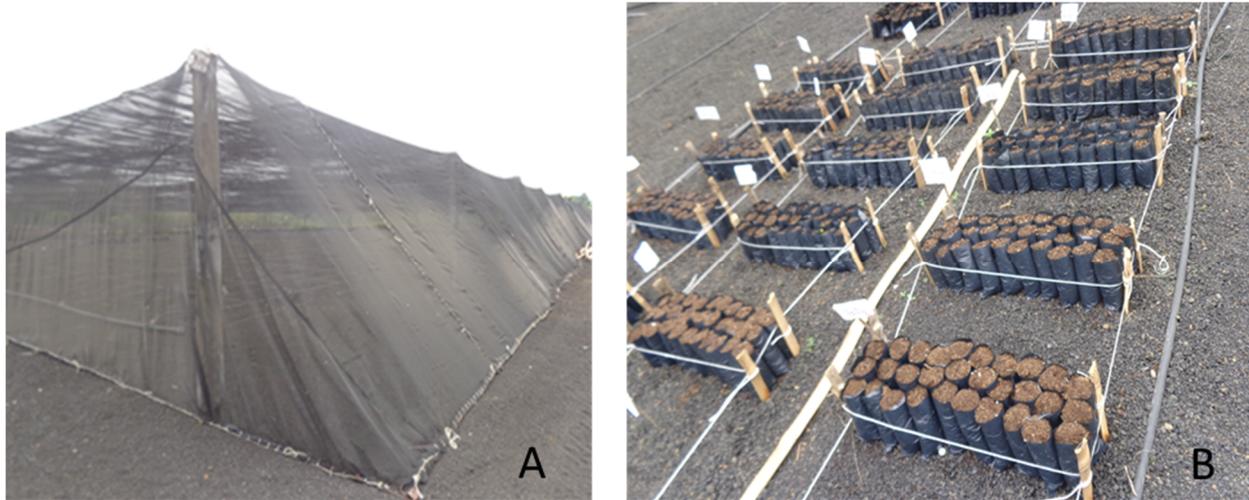


Figure 22 : Expérimentation *in vivo*. **A** : Ombrière où a eu lieu l'essai *in vivo* (PHP) ; **B** : disposition des pots dans l'ombrière

Les différents traitements réalisés (Tableau VIII) au cours de l'essai étaient les suivants :

- Le Ridomil Gold® Plus 66 WP (**RI**) : 100 mL de la dose recommandée (50g/151) a été apporté aux plants par arrosage du substrat. Quatre traitements ont été mis en place : **(i)** application deux semaines avant le bouturage, **(ii)** application après l'apparition des premières feuilles soit au 3^{ème} mois, **(iii)** application au 4^{ème} et 5^{ème} Mois. La périodicité de traitement a été de 21 jours.

- Le Scooter ou Ridomil Gold® 480 (**SC**) : 100 mL de la dose recommandée (11/300l) a été apporté aux plants par arrosage du substrat. Les différents traitements ont été effectués comme précédemment décrit avec le Ridomil Gold® Plus 66 WP.

- L'extrait de *C. odorata* (**CO**) : 25 g de poudre sec a été apporté par amendement au substrat puis 100 mL d'extrait EA à la dose de 2 % a été apporté par arrosage du substrat deux semaines avant le bouturage. Après l'apparition des premières feuilles, les plants de poivrier ont été traités six fois soit une périodicité de 14 jours.

- Le *T. asperellum* PR11(**TA**) : 25 g du produit (1×10^{12} cfu/g) ont été apporté par amendement au substrat soit deux semaines avant le bouturage. Un seul traitement a été effectué durant tout l'essai.

- Le nématicide Savanem 10G (**NE**) : 25 g de produit a été apporté par amendement au substrat soit deux semaines avant le bouturage. Un seul traitement a été effectué.

- Deux lots de témoins ont été mis en place : témoin n°1 (**T1**) contenant de la terre infestée ayant servi de base pour tous les tests et lot témoin n°2 (**T2**) contenant uniquement de

la terre stérilisée. Les différents traitements effectués au cours de l'essai ont été réalisés avec de l'eau.

Un arrosage régulier des plants se faisait à l'aide d'un asperseur installé dans l'ombrière. En saison des pluies, les plants étaient arrosés uniquement en absence de pluie et durant la saison sèche, un arrosage matin et soir était effectué.

Tableau VII : Différents traitements effectués

Produits	Dose /kg de terre	Type de traitement du sol
Ridomil Gold® plus 66 WP	100mL de la dose recommandée (50g/15l)	Arrosage
Scooter® EC	100 mL de la dose recommandée (1 litre/300 litre d'eau)	Arrosage
<i>T. asperellum</i> PR11	25g (1x10 ¹² cfu/g de produit)	Amendement
<i>C. odorata</i> (extrait hydro-éthanolique)	25 g de matière végétale + 100 mL d'une solution de 2%	Arrosage
Savanem 10G	25 g	Amendement

Paramètres mesurés : Les données relatives à l'importance de la maladie ont concerné la sévérité de la maladie qui a été évaluée à partir de la formule de Mbayi *et al.*, (2004) suivant l'échelle de mesure de la maladie allant de 0 à 4. Dans cette échelle 0 représente un plant sans symptôme de jaunissement, le chiffre 1 est attribué aux plants ayant entre 1 et 25 % de feuilles jaunies et des taches, le 26 et 51% de jaunissement des feuilles avec taches, et 3 plus de 50 % de jaunissement avec début de dessèchement des feuilles et 4 correspondants à la mort du plant.

Les données relatives à la biomasse portaient sur :

-le taux de viabilité des boutures : il a été obtenu en comptant le nombre de bouture viable par unité expérimentale. L'appréciation du suivie s'est effectuée au 30^e et 60^e jours.

-le nombre moyen de feuilles (Nbre Moy des feuilles) ; il a été évalué en comptant le nombre de feuilles par plant de chaque unité expérimentale. Il a été évalué au 90^e et 180^e jours

-la hauteur moyenne du plant (Hauteur Moy du plant) : cette valeur a été obtenue en mesurant le plant de poivrier à partir du nœud de bourgeonnement jusqu'à la base de la feuille la plus haute (la ramification primaire) ceci à l'aide d'une règle graduée.

- **le diamètre moyen du collet (Dtre Moy du collet)** : il a été obtenu en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse la base de la première ramification primaire du plant au 90^e et 180^e jours.

- **le nombre moyen de nœuds (Nbre Moy de nœuds)**: il a été obtenu en comptant le nombre de nœuds présent sur la ramification principale de chaque plant à 90 et 180 jours.

- **le nombre moyen de racine primaire (Nbre Moy de racine P.)**: au 180^e jour du test, les plants ont été déracinés et débarrassés de la terre. Seules les racines primaires c'est-à-dire celles directement fixées sur les boutures étaient comptées. Le nombre de racine de chaque plant a permis de calculer le nombre moyen de racines/plant/unité expérimentale.

-**la longueur moyenne de la racine primaire (Long Moy de la racine P.) et le chevelu racinaire** : au 180^e jours du test, les plants ont été déracinés et débarrasser de la terre, ensuite à l'aide d'une règle graduée la longueur de la racine principale a été mesurée. La densification des racines primaires a été notée en fonction de la quantité chevelu présents au niveau des racines (+ moins denses ; ++ moyennement dense ; +++ forte densité).

-**le poids sec des feuilles et racines (Pds sec Moy des FLL et Pds sec Moy des racines)** : les plants ont été transportés au laboratoire où les différentes parties (racines, feuilles) ont été séchées à 60°C à l'étuve pendant trois jours puis pesées à l'aide d'une balance.

III.2.5.7 Qualités physicochimiques des sols utilisés pour les tests *in planta*

L'analyse de sol a visé à caractériser la composition et les qualités physicochimiques des sols. Ces analyses ont été effectuées sur du sol collectés dans les pots de nos différents traitements en pépinières. Pour chaque traitement trois échantillons de terre ont été prélevés dans les pots sélectionnés au hasard puis mis ensemble pour constituer l'échantillon du traitement.

➤ Traitement des sols avant analyses

300 g de terre a été retenue, puis séché à l'étuve à 40°C pendant 48 heures puis tamisé à l'aide d'un tamis de 2 mm de mailles afin d'obtenir une fraction fine pour les analyses. Les analyses suivantes ont été effectuées : texture, la matière organique, les bases échangeables, la capacité d'échange cationique et le phosphore assimilable.

➤ **Différentes analyses des sols**

• **Granulométrie**

L'étude des différents constituants granulométriques à travers une analyse mécanique a permis de déterminer la distribution pondérale des différentes fractions texturales (sable, argile et limon). La classe texturale a été déterminée à partir du triangle textural de classification USDA en utilisant la méthode de la pipette Robinson-Köhn (Robinson, 1922).

• **Acidité (pH eau et pH KCl)**

La préparation d'une suspension de terre en introduisant 10 g de terre dans 100 mL d'eau contenu dans un bécher a été faite. Le mélange a été agité énergétiquement puis laissé au repos (ceci en trois cycles). Avant toute mesure, le pH-mètre (marque Hanna Instruments) est calibré à l'aide d'une solution tampon (pH 4 et PH 7). La mesure du pH-H₂O (acidité actuelle) a été réalisée 24 h après la préparation de la suspension de terre. Pour la mesure du pH KCl (acidité potentielle ou totale), 25 mL de KCl 1N a été ajouté à la suspension de terre précédemment préparée, puis le mélange a été agité et laissé au repos pendant 10 min ensuite le pH-KCl a été mesuré. L'appréciation de l'acidité du sol a été faite selon Beerneart et Bitondo, 1992 (Tableau IX).

Tableau VIII : Appréciation de l'acidité du sol

Valeur	Appréciation
<4.0	Très acide
4.0- 5.03	Acide
5.03-6.0	Modérément acide
6.0-7.0	Légèrement acide
7.0-8.5	Modérément Alcalin
>8.5	Alcalin

Source :(Beernaert et Bitondo, 1992)

• **La matière organique (MO)**

La quantité de MO a été déterminée par oxydation du carbone organique (CO) par le potassium dichromate en milieu acide selon la méthode de Walkley et Black cité dans FAO 2019. La relation empirique ci – dessous permet de déterminer MO en fonction de CO :

$$MO = 1,724 \times CO$$

Le taux de la matière organique (M.O) a été apprécié suivant Sys *et al.*, (1991)(Tableau X)

Tableau IX : Appréciation du taux de la matière organique

Teneur en M.O	Appréciation
<1%	Très faible
1-2%	Très faible
2-4%	Moyenne
4-6%	Elevée
> 6%	Très élevée

Source : (Sys *et al.*, 1991)

La qualité de la M.O s'est appréciée selon Beernaert et Bitondo,1992 (Tableau XI) à travers le rapport C/N (carbone/azote) qui montre le taux de carbone par rapport à celui de l'azote dans le sol. Ce rapport est d'une importance capitale car, les microorganismes décomposent et consomment le C et N pour leur activité biologique. Bien plus, la nutrition équilibrée de la plante en hydrates de carbones et composés azotés nécessitent un bon équilibre de ce rapport.

Tableau X : Appréciation de la qualité de la matière organique Valeur C/N Appréciation

Valeur C/N	Appréciation
< 8	Faible
8-12	Bon
12-13	Tolérable
>14	Mauvais

Source :(Beernaert et Bitondo,1992)

- **Azote total**

L'azote total a été déterminé par titration après minéralisation et distillation à l'entraînement à la vapeur d'après la méthode de Kjeldahl (Gerhardt, 2015). L'appréciation de l'azote total s'est faite sur la base de la classification de Eurooosult, 1989 (Tableau XII)

Tableau XI : Appréciation de l'azote(N) total Appréciation

Valeur de N (% ou g/kg)	Appréciation
<0.50	Très faible
0.50-1.25	Faible
1.25-2.25	Moyen
2.25-3.00	Elevée
>3.00	Très élevé

Source :(Eurooosult, 1989)

- **Bases échangeables et capacité d'échange cationique (CEC)**

Les bases échangeables ou cations à caractère basique ont été déterminés par complexométrie ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$) et par photométrie de flamme (K^+ et Na^+). Les bases échangeables ont été extraites par saturation de complexe adsorbant du sol avec une solution d'acétate d'ammonium 1N (CH_3COONH_4) à Ph 7. La capacité d'échange cationique de chaque sol a été mesurée après extraction de 2 g de sol par 10 mL de solution de $BaCl_2 + NH_4Cl$ à 0,2 M. Les cations ont été ensuite dosés par spectrométrie d'absorption de flamme. L'appréciation en base échangeables est faite selon Eurooosult,1989 (Tableau XIII).

Tableau XII : Appréciation de la teneur du sol en bases échangeables Appréciation

Ca ²⁺ (meq/100g)	Mg ²⁺ (meq/100g)	K ⁺ (meq/100g)	Na ⁺ (meq/100g)	Appréciation
<2.0	<0.5	<0.8	<0.1	Très faible
2.0-5.0	0.5-0.3	0.1-0.3	0.1-0.3	Faible
5.0-10.0	1.5-3.0	0.3-0.6	0.3-0.7	Moyen
10.0-20.0	3.0-8.0	0.6-1.2	0.7-2.0	Elevé
>20.0	>8	0.6-1.2	>2	Très élevé

Source :(Eurooonsult,1989)

Par ailleurs, l'équilibre cationique Ca-Mg-K est respectivement de 76-18-6 % d'après (Sys *et al.*,1991). Taux de saturation en base a été obtenu par la formule $V (\%) = SBE/CEC$ où SBE est la somme des bases échangeables et CEC la capacité d'échange cationique. Tous ces paramètres du sol sont appréciés selon Beernaert et Bitondo,1992 (Tableau XIV).

Tableau XIII : Appréciation de SBE, CEC et V% Appréciation

SBE (meq/100g)	CEC (meq/100g)	V%	Appréciation
<2.0	<0.5	0-20	Très faible
2-5	5-10	21-40	Faible
5-10	10-25	41-60	Modéré
10-15	25-40	61-80	Elevé
>15	>40	80-100	Très élevé

Source : (Beernaert et Bitondo,1992).

- **Phosphore assimilable**

La détermination du phosphore assimilable s'est faite selon la méthode de Bray II qui combine l'extraction du phosphore (P) en milieu acide (HCl) à la complexation, par l'ammonium fluorure (NH₄F). La teneur du phosphore assimilable est appréciée selon la norme établit par Eurooonsult, 1989 (Tableau XV).

Tableau XIV : Appréciation de la teneur en phosphore assimilable (cette évaluation s'est faite par la méthode de Bray II).

Valeur (%)	Appréciation
<7.0	Très faible
7.0-16	Faible
16.0-46.0	Moyenne
>46.0	Élevée

Source : (Eurooonsult, 1989)

II.2.5.8 Profil enzymatique et dosage de quelques composés des feuilles de poivrier issus des différents traitements en pépinière.

Le dosage de quelques composés et enzymes a été effectué à la fin du test *in vivo* sur les feuilles des poivriers.

➤ **Extraction et dosage des Chlorophylles a et b, et des caroténoïdes**

• **Extraction**

A 1 g du matériel végétal découpé en petits morceaux et introduit dans des tubes à essai, par la suite 3 mL d'acétone 80 % à 4 °C ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 24h pour permettre la solubilisation des pigments photosynthétiques.

• **Dosage**

Le dosage des chlorophylles et des caroténoïdes s'est fait en mesurant les densités optiques à 470, 646 et 663 nm. Les teneurs en chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb) et en caroténoïdes ont été calculées selon les formules de Lichtenthaler et Wellburn (1983).
Chlorophylle a ($\mu\text{g/mL}$) = $12,21 \text{ DO}_{663} - 2,81 \text{ DO}_{646}$

$$\text{Chlorophylle b } (\mu\text{g/mL}) = 20,13 \text{ DO}_{646} - 5,03 \text{ DO}_{663}$$

$$\text{Caroténoïdes } (\mu\text{g/mL}) = [1000\text{DO}_{470} - 3,27(\text{Chla}) - 104(\text{Chlb})] / 227$$

Ces teneurs ont été exprimées en $\mu\text{g/g}$ de poids frais (PF).

➤ **Extraction et dosage des composés phénoliques et flavonoïdes**

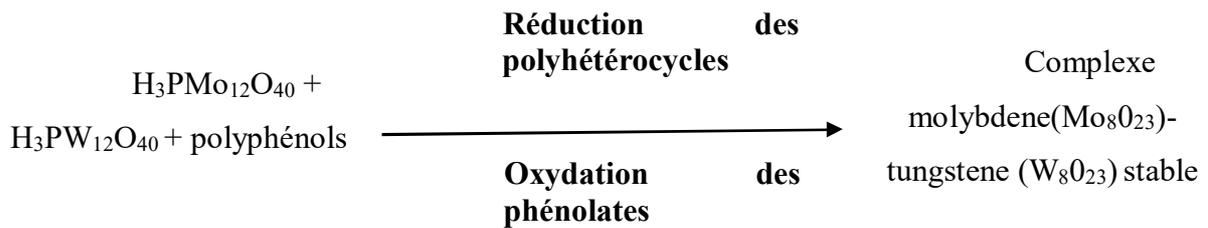
• **Extraction**

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée suivant le protocole de Luthria et Pastor-Corrales (2006) modifié par Mujica *et al.* (2009). Elle repose sur la libération des composés phénoliques présents dans les cellules par rupture du tissu végétal et par diffusion dans le solvant d'extraction.

A 1g de chaque matériel végétal (des sept traitements) a été ajouté a 10 mL de méthanol 80% acidifié à 0,1 % avec le HCl. Le mélange a été homogénéisé, incubé 2 heures à température ambiante et centrifugé à 1800 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été récupéré et le culot retraité de nouveau tel que décrit précédemment jusqu'à épuisement. Les extraits méthanoliques (surnageant) ainsi obtenus ont servi au dosage des composés phénoliques et flavonoïdes.

- **Dosage des composés phénoliques**

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé suivant le protocole modifié de Singleton et Rossi, (1965). En présence de polyphénols, le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange des acides phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$)) est réduit en un complexe bleu de tungstène et de molybdène. Ce complexe dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en composés phénoliques, présente un maximum d'absorption au voisinage de 725 nm.



Un millilitre (1 mL) du réactif de Folin-ciocalteu 10% a été ajouté à 0,2 mL d'extrait méthanoliques (surnageant). Le mélange a été homogénéisé et incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, 0,8 mL de Na_2CO_3 20 % a été ajouté. Deux heures après, l'absorbance du complexe de coloration bleu formé a été lue à 725 nm contre un blanc (de composition identique que le tube test mais ne contenant pas d'extrait). L'étalonnage a été réalisé à l'aide d'une solution d'acide chlorogénique (10 $\mu g/mL$), chaque essai a été répété 3 fois et les teneurs en composés phénoliques ont été déterminées à partir de l'équation de la droite de régression ($Y=0,005x$; $R^2=0,9996$) de la courbe d'étalonnage.

Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent d'acide chlorogénique (EACHl) par gramme de matière végétal.

- **Dosage des flavonoïdes**

La teneur en flavonoïdes des extraits a été estimée selon la méthode décrite par KramLing et Singleton, (1969). Cette méthode est basée sur la précipitation des flavonoïdes par le formaldéhyde et leur quantification par différence, entre la quantité de phénols totaux et celle des phénols non flavonoïdes restant dans l'extrait.

A 4 mL d'extrait méthanoliques, ont été ajoutés respectivement 2 mL de HCl dilués à 5 % et 2 mL de formaldéhyde (préparé en dissolvant 8 mg de formaldéhyde dans un litre d'eau). Le mélange a été incubé pendant 24h à température ambiante puis filtré pour enlever le produit condensé. Le filtrat ainsi recueilli représentant les composés phénoliques non flavonoïdes a été dosé conformément au protocole décrit plus haut (Singleton et Rossi 1965) et la teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la formule suivante :

$$T_{\text{Flavonoïde}} = T_{\text{(Phénols totaux)}} - T_{\text{(Phénols non flavonoïdes)}}$$

$T_{\text{Flavonoïde}}$: Teneur en flavonoïdes

$T_{\text{(Phénols totaux)}}$: Teneur en phénols totaux

$T_{\text{(Phénols non flavonoïde)}}$: Teneur en phénols non flavonoïdes

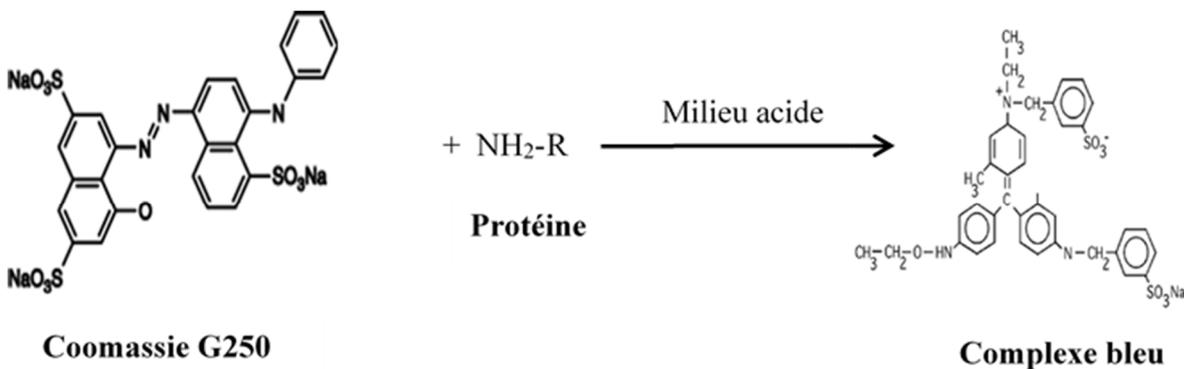
➤ **Extraction et dosage des protéines solubles**

• **Extraction**

Les protéines solubles totales ont été extraites suivant le protocole décrit par Tarafdar et Marschner, (1994). Il repose sur la libération des protéines présentes dans les cellules en fonction de leur solubilité dans le tampon phosphate (pH 7) suite à la rupture du tissu végétal. Un gramme de matériel végétal a été broyé dans un mortier contenant 5mL de tampon phosphate 0,1 M à pH 7 placé dans de la glace. Après centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes, le surnageant récupéré a constitué l'extrait enzymatique brut. La teneur en protéines solubles totales des extraits a été estimée suivant le protocole décrit par Bradford (1976).

• **Principe du dosage**

En présence des chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine), aromatiques et sur les fonctions amines libres de la chaîne polypeptidique ; le bleu de Coomassie G₂₅₀ forme un complexe chromogène de coloration bleu, présentant un maximum d'absorption à 595 nm. L'équation de la réaction est celle donnée ci-dessous :



- **Mode opératoire**

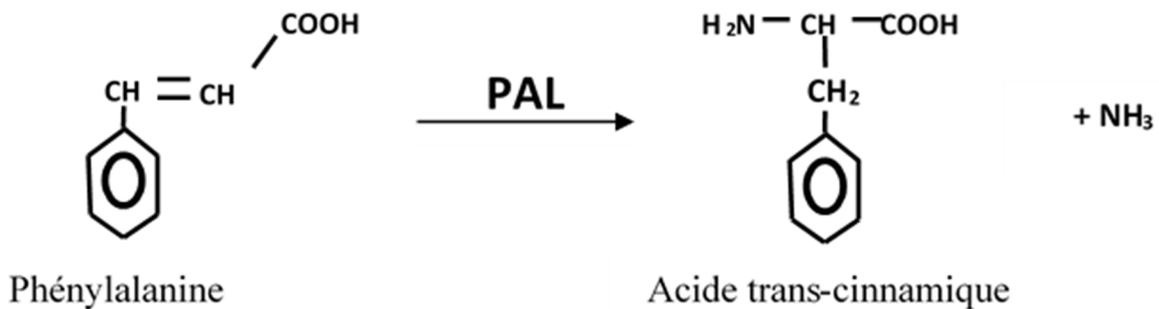
100 μ L de l'extrait protéique (surnageant) précédemment obtenu ont été prélevés et on y a ajouté 0,5 mL de tampon phosphate, 400 μ L d'eau distillée et 2 mL du réactif de Bradford pour un volume final de 3 mL. Les valeurs obtenues après lecture au spectrophotomètre à 595 nm ont été comparées aux valeurs exprimées par une courbe d'étalonnage préparée à partir des solutions de BSA (*Bovine Serum Albumine*) allant de 0 à 70 μ g/mL ($y=1.205x$; $R^2=0.904$). Les teneurs en protéines sont exprimées en μ g/g MF (matière fraîche).

➤ **Evaluation de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL)**

L'activité de la phénylalanine ammonia-lyase a été évaluée suivant le protocole décrit par Zucker (1968) avec quelques modifications et cité par Erez (1973).

- **Principe**

En présence de la Phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la Phénylalanine est désaminée en acide trans-cinnamique capable d'absorber la lumière à une longueur d'onde de 290 nm. L'équation de la réaction est la suivante :



- **Mode opératoire**

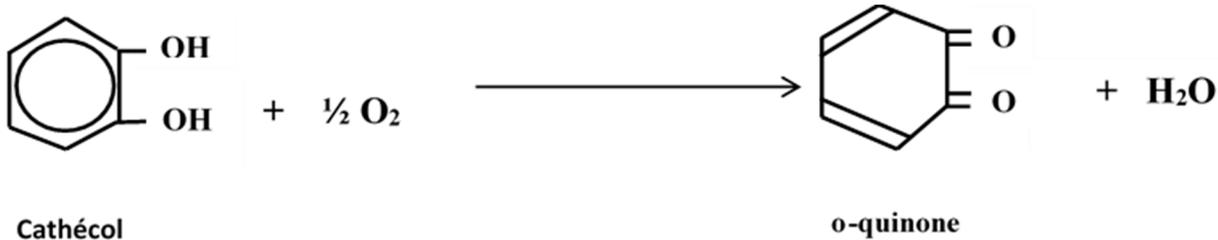
Dans chaque tube test, 1 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH 7) a été mélangé à 1 mL de phénylalanine 50 mM contenu dans un tube à essai, puis 1 mL d'extrait enzymatique a été ajouté. Après incubation à 37°C pendant 1h, la réaction a été stoppée par ajout de 0,5 mL de HCl 5N et l'absorbance mesurée par spectrophotométrie à 290nm contre le blanc. Chaque essai a été répété 3 fois. Une unité d'activité de la PAL est définie comme la variation d'absorbance par millilitre d'extrait enzymatique. L'activité spécifique de l'enzyme a été exprimée en unités par microgramme de protéines.

➤ **Evaluation de l'activité de la polyphénol oxydase (PPO)**

L'activité du polyphénol oxydase a été évaluée suivant le protocole décrit par Ensimer et Vamos-Vigyazo (1995).

• **Principe**

Il repose sur l'oxydation par la polyphénol oxydase (PPO) des composés phénoliques en o-quinones capable d'absorber la lumière visible à une longueur d'onde de 540nm. Ceci peut être schématisé comme suit :



• **Mode opératoire**

Le tampon phosphate (1 mL, 0,1 M, pH=7,0) a été mélangé à 1 mL de catéchol 0,024 M contenu dans un tube à essai, puis 3 mL d'eau distillée y ont été ajoutés. La réaction enzymatique a commencé suite à l'introduction de 0,5 mL d'extrait enzymatique obtenu plus haut. Après incubation pendant 5 minutes et ralentissement dans la glace, l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm contre un blanc constitué uniquement de catéchol 0,024 M, de tampon et d'eau distillée. Chaque essai a été répété 3 fois.

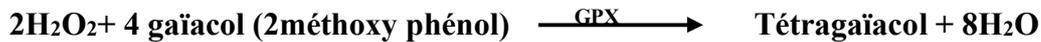
Une unité d'activité de PPO est définie comme la variation d'absorbance par millilitre d'extrait enzymatique. L'activité spécifique de l'enzyme a été exprimée en unités par microgramme de protéines.

➤ **Activité du gaïacol peroxydase (GPX)**

L'activité du gaïacol peroxydase a été déterminée selon la méthode de Fielding et Hall (1978).

- **Principe**

Il repose sur l'absorption du tétragaïacol suite à la polymérisation du gaïacol à 470 nm due à la Polymérisation du gaïacol en tétragaïacol en présence de peroxyde d'hydrogène selon la réaction :



- **Mode opératoire**

Pour un volume final de 3 mL, le mélange réactionnel contient : 100µl d'extrait enzymatique, 50 µL d'H₂O₂ à 0,3 % et 2850 µL de tampon phosphate-Gaïacol (50 mM tampon phosphate, 8 mM de gaïacol, pH=7,20). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde d'hydrogène. Après incubation à température ambiante pendant 1 minute, la réaction a été stoppée par ajout de 0,5 mL de HCl 5N et l'absorbance mesurée par spectrophotométrie à 470 nm contre le blanc. Chaque essai a été répété 3 fois.

II.2.5.9. Analyses des résultats (analyses statistiques)

Les résultats des tests d'inhibition des extraits végétaux, de *T. asperellum* et des fongicides contre *Phytophthium* sp. ont été exprimés sous formes de pourcentage d'inhibition et soumis à une analyse de la variance. Les moyennes ont été séparées par le test de Tukey à 5 % en utilisant le logiciel R (version R 4.0.2). Pour le calcul des CI₅₀, une détermination graphique a été effectuée sur la courbe de tendance entre les concentrations des extraits ou des fongicides et les pourcentages d'inhibition observées et cela grâce au logiciel Excel 2016 (Annexe 7). Les données brutes des variables expérimentales en pépinière à savoir : les paramètres de croissances, la sévérité de la maladie, les métabolites primaire et secondaire, l'activité des enzymes ont été soumises à une analyse de la variance et les moyennes ont été séparées par le test de Tukey à 5 %. Des corrélations de Pearson entre la sévérité de la maladie en pépinière et les paramètres de croissance et biochimique ont été effectuées à l'aide du logiciel R (version R 4.0.2)

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Etats des lieux de la production du « poivre de Penja » dans l'aire géographique

La culture du poivre de Penja connaît depuis quelques années des contraintes parasitaires qui pourraient réduire considérablement sa production. Une enquête questionnaire a donc été menée auprès d'un échantillon de pipériculteurs pour identifier les principales contraintes biotiques ou abiotiques liées à la production afin de leur proposer des solutions durables qui pourront préserver cette culture.

III.1.1. Caractéristiques sociodémographiques des producteurs de poivre de Penja

Sur un échantillon de 71 producteurs enquêtés, 94 % (n=67) était constitué d'homme contre 6 % de femmes. Indépendamment du sexe environ 90 % (n=64) des producteurs étaient mariés, contre 7 % (n=5) de célibataires. Le nombre moyen d'enfants par ménage était 5,81 très peu variable en fonction de la zone (Tableau XVI). L'âge moyen des producteurs étaient de 50 ans dont le plus jeune était âgé de 21 ans et le plus âgé avait un peu plus de 80 ans. Les producteurs avaient en moyenne 5 enfants dans leur ménage. Plus de 98 % (n= 70) des producteurs savaient lire et écrire. En moyenne 23 % (n=16) avaient le niveau du primaire, alors que plus de la moitié des producteurs 62 % (n=44) avaient atteint le niveau du secondaire et une minorité 14 % (n=10) avait atteint le cycle l'universitaire (Tableau XVI).

Tableau XV : Profil des pipériculteurs

Localité	Nbre de producteurs	Âge moyen	Sexe (%)		Niveau d'instruction (%)				Nbre moyen d'enfant
			Homme	Femme	Supérieur	Secondaire	Primaire	Aucun	
Loum-Manjo	17 (24)	50	16 (94)	1 (6)	2 (12)	9 (53)	6 (35)	0 (0)	5
Njombe-Penja	29 (41)	51	29(100)	0 (0)	7 (24)	20 (69)	2 (7)	0 (0)	5
Tombel	25 (35)	47	22 (88)	3 (12)	1 (4)	15 (60)	8 (32)	1 (4)	6
Total	71	50	67 (94)	4 (6)	10 (14)	44 (62)	16 (23)	1 (1)	5

Tableau XVI : Répartition des producteurs selon l'appartenance ou non à l'IGPP

Zones	Effectif producteur	Membre IGPP (%)		Activités du producteur (%)		
		Oui	Non	Principale (Agriculture)	Secondaire	Aucune
Loum-Manjo	17	11 (65)	6 (35)	17 (100)	7 (41)	10 (59)
Njombe-Penja	29	24 (83)	5 (17)	29 (100)	16 (55)	13 (45)
Tombel	25	18 (72)	7 (28)	25 (100)	7 (28)	18 (72)
Total	71	53 (75)	18 (25)	71 (100)	30 (42)	41 (58)

Les producteurs de poivre de Penja ce sont réunis en association appelée Groupement Représentatif poivre de Penja (IGPP). Les membres bénéficient de certains privilèges tels que, l'octroi des crédits pour l'achat des intrants, les formations et l'encadrement technique, l'amélioration des prix de vente du poivre de Penja. Les trois quarts 75 % (n=53) des producteurs de poivre enquêtés appartiennent à l'IGPP contre 25 % (n=18) qui ne le sont pas (Tableau XVII). La non adhésion de certains producteurs à ladite association trouve leur origine dans le manque d'information sur les modalités d'inscriptions ; le manque de moyen financier pour certains due au fait que leurs plantations ne sont pas encore rentables ; le manque de sérieux des responsables de l'association est également l'un des motifs avancés pour justifier la non adhésion.

L'agriculture reste la principale activité des producteurs de poivre de Penja (tableau XVII). Parmi ces producteurs 42 % en plus de l'agriculture pratique d'autres activités dites secondaire contre 58 % qui n'ont aucune autre activité en dehors de l'agriculture. Comme activité secondaire, on retrouve parmi les pipériculteurs, des commerçants, des artisans, des consultants pour ne citer que ceux-là. Dans cette pratique de l'agriculture, la principale source de revenue chez 78 % de producteur provient de la culture du poivre de Penja.

III.1.2 Caractéristiques des plantations poivrières

Le poivrier a besoin d'un tuteur pour sa croissance et dans le cas du poivre de Penja c'est un tuteur vivant appelé *Spondias mombin* (n=71 ; 100 %) qui est utilisé dans toutes les plantations de l'aire géographique. La superficie moyenne d'une plantation poivrière des enquêtés était de 12 270 m² (Tableau XVIII) et elle a varié entre 2000 pour la plus petite surface à 70 000 m² pour les plus grandes. Le nombre moyen de plantation par producteur était de 1,35 soit environ 70 % (n=49) ayant une seule plantation, 27 % (n=19) pour deux plantations et 4 % (n=3) au moins 3 plantations. Ces plantations étaient relativement jeunes, 56 % ont entre 0 et 5 ans, 34 % entre 6 et 12 ans et 10 % représente celles ayant plus de 12 ans d'âge. Plus de 98 %

des producteurs étaient des propriétaires terriens bien que le mode d'acquisition soit différent. L'achat des terres constituent 63% du mode d'acquisition, 31 % l'ont reçu en héritage et très peu ont opté pour la location (1%). Avant la mise en place des plantations poivrières sur ces différents terrains, 18 % des parcelles n'étaient pas exploitées (jachère), 11 % étaient des recrus de forêts et 71 % portaient différentes cultures. Le cacao et café étaient les cultures les plus prisées, avec une fréquence de 37 %, ensuite viendront les cultures vivrières regroupant le macabo, le manioc, la banane-plantain, le maïs (23 %), puis les fruits représentant 11 % des précédents cultureux (Tableau XVIII). Près des trois quarts (73 %) des agriculteurs pratique de l'association de culture alors que 27 % n'ont que du poivre dans leur plantation (Tableau VXIII). Dans les plantations de poivre de Penja, l'association peut se faire avec plusieurs cultures en même temps. Par exemple, on peut avoir des plantations avec un mélange de cacao, café, fruits, et vivriers (27 %), des mélanges de fruits et vivriers (17 %), ou bien on peut avoir des plantations avec des cultures d'un même type telles, les fruits (17 %), des vivriers (27 %), les cultures de rentes (cacao, café ; 12 %).

Tableau XVII : Caractéristiques des plantations de poivre de Penja enquêtées

Caractéristiques	Zones			
	Loum-Manjo	Njombe-Penja	Tombel	Total
Effectif plantation (n)	17	29	25	71
Surfaces moyenne (m²)	16176	14653	8980	12270
Age moyen en an (%)				
0-5	9 (53)	19 (66)	12 (48)	40 (56)
06-12	6 (35)	7 (24)	11 (44)	24 (34)
>12	2 (12)	3 (10)	2 (8)	7 (10)
Mode d'acquisition des poivrières (%)				
Achat	12 (71)	21 (72)	12 (48)	45 (63)
Location	1 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
Héritage	3 (18)	7 (24)	12 (48)	22 (31)
Don	1 (6)	1 (3)	1 (4)	3 (4)
Précédents cultureux (%)				
Cacaoyères, Caféiers	1 (6)	11 (38)	14 (56)	26 (37)
Fruitiers	0 (0)	8 (28)	0 (0)	8 (11)
Forêt	2 (12)	1 (3)	5 (20)	8 (11)
Jachère	2 (12)	5 (17)	6 (24)	13 (18)
Vivriers	12 (70)	4 (14)	0 (0)	16 (23)
Système de culture (%)				
Mono culture	5 (29)	5 (17)	9 (36)	19 (27)
Culture associée	12 (71)	24 (83)	16 (64)	52 (73)

III.1.3 Matériel végétal et mise en place de plantations poivrière

Les pipériculteurs de l'aire géographique IGPP estiment qu'ils existent plus d'une variété de poivre de Penja, dont la distinction se fait à partir d'un certain nombre de critères : la morphologie des feuilles, la grosseur des grappes, la longueur des grappes, la densité des grappes, et la période de floraison. Certains producteurs se basent soit sur un critère (n=6 ; 8 %), soit sur deux critères (n=33 ; 46 %), soit sur trois critères (n=13 ; 18 %) ou sur plus de trois critères (n=19 ; 27 %) pour les distinguer. Pour la mise en place d'une plantation poivrière, 97 % (n=69) des producteurs produisent eux-mêmes leur matériel végétal et la principale technique utilisée est le bouturage en pépinière (97 % ; n=69). Néanmoins, le choix du type de bouture varie grandement. Différentes parties du poivrier sont utilisées pour le prélèvement des boutures : les tiges rampantes (n=4 ; 5 %), les tiges grimpantes (n=31 ; 44 %), les tiges retombantes (n=12 ; 17 %), ou n'importe laquelle des tiges (n=24 ; 34 %). La longueur de la bouture varie également d'un producteur à un autre. Nous avons la grande majorité des producteurs qui préfèrent utiliser des boutures de trois nœuds (n=44 ; 62 %), certains préfèrent celles avec deux nœuds (n= 11 ; 15 %), d'autres celles de quatre nœuds (n=8 ; 11 %) et 11 % ne tient pas compte du nombre de nœuds. L'âge moyen des plants utilisés pour la plantation est de 7 mois et l'écartement moyen entre les plants est de 2 mètres avec en moyenne un plant par tuteur. Les plantations de poivre se créent généralement pendant la saison des pluies, les producteurs du poivre de Penja le font entre le mois de Mars et celui d'Octobre, mais 70 % (n=50) des producteurs préfère effectuer le planting au mois de Juin.

III.1.4 les opérations culturales de la plantation et rendement

La mise sur pied d'une plantation de poivre nécessite une implication physique et monétaire de la part du producteur. Selon les résultats de l'enquête, plusieurs tâches sont effectuées lors de la création d'une poivrière dans l'aire géographique : le défrichage, le désherbage (chimique ou manuel), le labour, le planting, l'attache, le butage, l'épandage, l'élagage, les traitements phytosanitaires, la récolte. Pour toutes ces tâches quel que soit la surface de la plantation, elles nécessitent des moyens financiers et une main d'œuvre (familiale ou salariale) pour la réalisation. L'origine des fonds pour l'entretien des plantations des producteurs est de provenances diverses, 76 % (n=54) des producteurs utilisent leur fond propre, 34 % (n=17) optent pour des prêts : formels via des banques ou informels via des associations (Tontines). Une fois que la plantation a été établie, un entretien régulier est effectué. Ceci passe par le désherbage qui est soit manuel (n=46 ; 63 %) soit chimique (n=25 ;

37 %) tout dépend du producteur bien que généralement le choix de l'un ou de l'autre dépend de l'âge des plants de poivrier, plus ils sont jeunes moins ils utiliseront du désherbage chimique. Indépendamment du type de désherbage, cela se fait à une fréquence moyenne de trois fois par an. La fertilisation est une opération courante dans les plantations de poivre de Penja, environ 76 % (n=54) des pipériculteurs épandent de l'engrais dans leur plantation contre 34 % qui ne le font pas. Différents types de fertilisants sont utilisés : les fertilisants chimiques (NPK, Urée, KcL), les fertilisants organiques (composts, fumiers, fientes), et les fertilisants foliaires. Le nombre moyen de fertilisation par an est de quatre et les périodes varient d'un producteur à un autre. Néanmoins, la période de fertilisation va de Mars à Octobre avec une préférence pour les mois de Mars, Avril, Mai et Octobre. Concernant les traitements phytosanitaires, les résultats obtenus révèlent qu'en moyenne 48 % (n=34) des plantations ne reçoivent pas de traitements phytosanitaires. Celles qui sont traitées (n=37 ; 52 %) reçoivent en moyenne trois traitements par an bien que les périodes d'applications varient grandement. Les mois les plus sollicités sont Mars, Juin et Octobre. La récolte consiste à cueillir les grappes de poivre. En fonction du type de poivre sollicité, la récolte se fait à différents stades de maturité.

Les rendements varient en fonction de l'âge de la plantation sachant que le poivre n'est récolté qu'à partir de la 3ème année post plantation. De nos investigations, il ressort qu'en moyenne 28 % (n=20) des plantations sont encore non productives contre environ 72 % (n=51) qui le sont. Celles qui ne produisent pas encore ont entre 0 et 4 ans. Les plantations de moins de 10 ans d'âge ont un rendement qui s'élève autour de 171 kg/ha et de 215 kg/ha pour celles ayant plus au moins 10 ans d'âge.

Le poivre frais récolté par la majorité des pipériculteurs (n=49 ; 69%) était essentiellement transformé en poivre blanc, contre 3 % (n=2) qui transformait leur poivre frais à la fois en poivres noir, vert et blanc, les 28 % (n=20) des pipériculteurs restant n'ayant pas encore de production car les plantations étaient jeunes hésitaient entre le poivre noir et le poivre blanc. Les périodes de récoltes vont de Novembre à Mai selon la surface de production. Le prix moyen du kilogramme de poivre blanc de Penja a varié d'une année à l'autre. Il est passé de 4000 Fcfa en 2010 à près de 7000 Fcfa en 2013 et depuis sa labélisation les prix n'ont cessé d'augmenter jusqu'à atteindre 14 000 fcfa le kilogramme en 2015. De 2016 à 2020, il a varié entre 12 000 fcfa et 14 000 Fcfa.

III.1.5 Principales contraintes de production liées aux Bioagresseurs

La culture du « poivre de Penja » au Cameroun comme toutes autres cultures de poivre de par le monde, est sujette à des attaques parasitaires. Un certain nombre d'affection à des degrés variable a été enregistré dans l'aire géographique protégée. Certaines affections pouvant être à l'origine de nombreuses pertes, et d'autres considérées comme mineures à cause de leur faible impact sur la production. Des dégâts causés par les ravageurs sur poivrier ont été signalés par les producteurs. La principale maladie mentionnée par 42 % des producteurs sur poivrier était le dépérissement lent des plants (caractérisé en champs par un jaunissement et une mort progressive des plants) (Fig. 23C-D), ensuite nous avons la présence de la gale sur les feuilles (14 %) (Fig. 23A), la pourriture du collet de même que le nanisme ont également été mentionnés par les agriculteurs. La principale maladie mentionnée au niveau du tuteur par 51 % des producteurs était la pourriture racinaire blanche (on observe au niveau du collet un fendillement et une libération de la résine) (Fig. 23B). Les principaux ravageurs étaient les défoliateurs (chenilles, les criquets, les coccinelles), les foreurs de tiges, les fourmis et termites dont les fréquences moyennes respectives étaient : 17 % ; 20 % ; 15 % (Tableau XIX) (Fig. 23E-H). Deux principales maladies ressortent de ce tableau : le dépérissement lent et la pourriture racinaire blanche.

Tableau XVIII : Fréquences de maladies et Ravageurs dans les plantations de poivre de Penja enquêtées

Principales maladies et ravageurs	Zones			Total
	Loum-Manjo	Njombe-Penja	Tombel	
Maladies sur poivrier (%)				
Dépérissement lent	8 (47)	14 (48)	8 (32)	30 (42)
Pourriture du collet	0 (0)	2 (7)	3 (12)	5 (7)
Gale sur feuilles	4 (24)	5 (17)	1 (4)	10 (14)
Virose	1 (6)	1 (3)	1 (4)	3 (4)
Maladies sur tuteur (%)				
Pourriture racinaire blanche	6 (35)	11 (40)	19 (76)	36 (51)
Ravageurs (poivrier+tuteur) (%)				
Défoliateurs	3 (18)	4 (14)	5 (20)	12 (17)
Fourmis, termites	4 (24)	3 (10)	4 (16)	11 (15)
Foreurs de tiges	3 (18)	3 (10)	8 (32)	14 (20)



Figure 23 : Les principaux dégâts présents en champs ; **A** : galles sur feuilles de poivrier ; **B** : craquement du collet et exsudat de couleur noir sur tuteur (pourriture racinaire blanche) ; **C-D** : jaunissement et dessèchement d'un plant de poivrier (dépérissement lent) ; **E** : tache de rouille sur feuille de poivrier ; **F** : pourriture du collet et des racines du poivrier ; **G** : foreur de tige sur poivrier ; **H** : défoliateur sur feuille de poivrier

III.1.6 Gestion des principales maladies par les producteurs

Bien que les maladies présentes dans les plantations de poivre de Penja ne soient pas encore formellement identifiées, les pipériculteurs essaient de contrôler ces maladies en utilisant diverses méthodes. Le tableau XX ci-dessous présente les différentes méthodes utilisées pour contrôler les deux principales maladies sur poivrier et Tuteur à savoir le « le dépérissement lent » et « la pourriture racinaire blanche ». 83 % des producteurs touchés par la maladie du dépérissement lent (caractérisée par le jaunissement foliaire du poivrier) utilisent principalement les produits chimiques comme moyen de lutte contre 17 % qui n'appliquent aucun traitement. Le principal mode d'application est la pulvérisation foliaire (n=24 ; 96 %). Une fréquence de 30 % des producteurs dit n'utiliser aucune mesure sanitaire face à la maladie de la pourriture racinaire blanche, par contre 20 % font des remplacements de plants une fois que les symptômes de maladie sont visibles et à un stade avancé, les 50 % restant utilisent les produits chimiques (Tableau XX). Ces derniers sont appliqués soit par pulvérisation au niveau des feuilles (n=8 ; 44 %), ou au niveau du collet (n=7 ; 39 %) soit en épandant le produit au niveau du sol (13 %).

Tableau XIX : Moyens de gestion des deux principales maladies présentes dans les plantations de poivre de Penja

Méthodes de lutte utilisées	Principales maladies (%)	
	Dépérissement lent	Pourriture racinaire blanche
Produits chimiques	25 (83)	18 (50)
Remplacement des plants malades	0 (0)	7 (20)
Aucun traitement	5 (17)	11 (30)
Total	30	36

Le métalaxyl M est la matière active la plus utilisée dans la lutte contre les maladies dans les plantations de poivre. Il est utilisé dans le traitement contre le dépérissement lent de même que contre la pourriture blanche racinaire. Plusieurs produits chimiques sont utilisés dans les plantations de poivre de Penja (Tableau XXI) : les fongicides sont majoritaires mais on retrouve également des nématicides et des insecticides. Ces produits sont utilisés pour traiter à la fois des maladies sur poivrier et sur tuteur. On note également d'après le tableau XXI ci-dessous que la fréquence d'application des différents produits est variable.

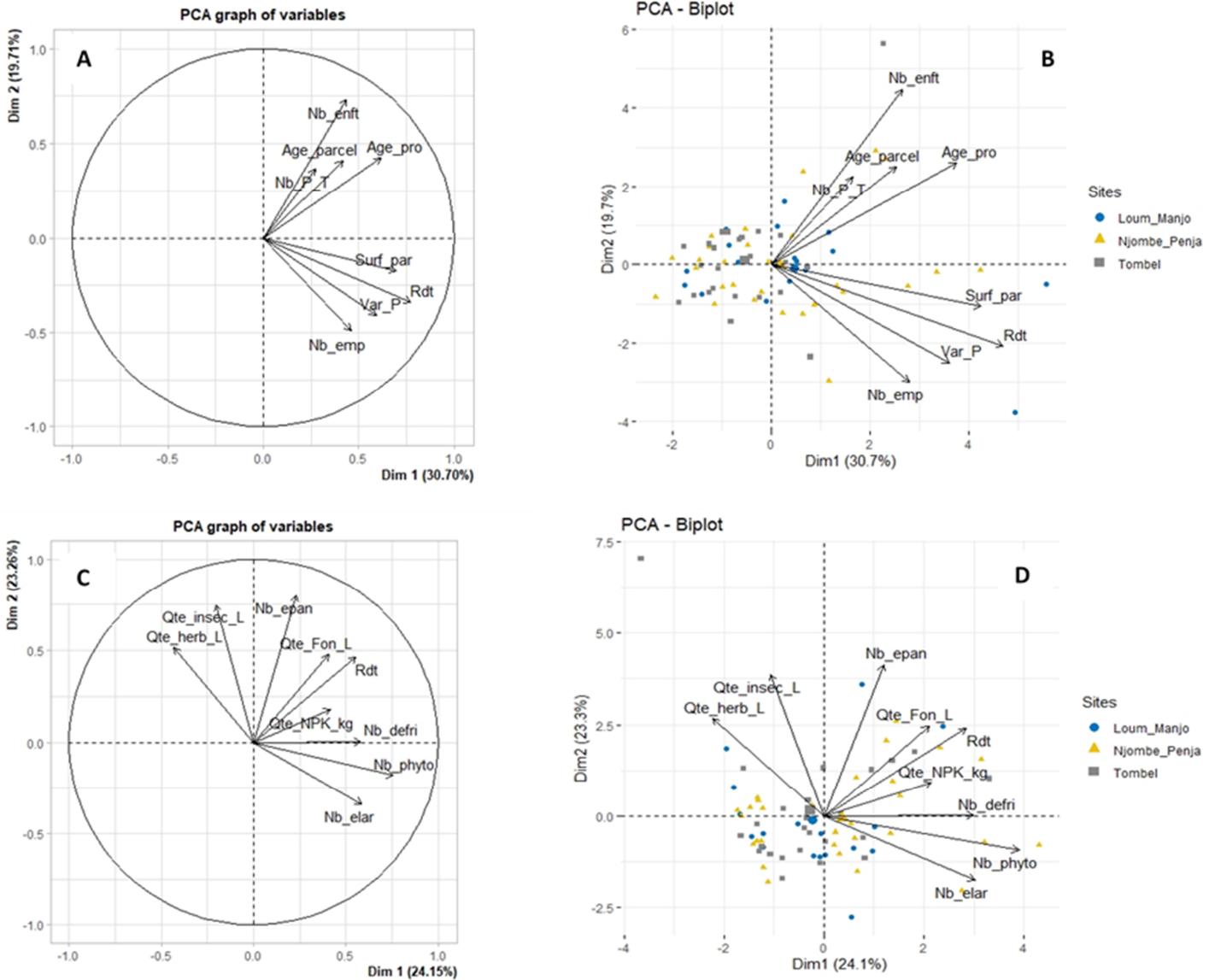
Tableau XX : Liste de produits utilisés dans les différentes plantations poivrières

Produits utilisés	Matière(s) active(s)	Effectif d'utilisateur	Nature du produit	Fréquence d'application/an
Cypercal 50EC	Cyperméthrine 50 g/l	1	Insecticide	2
Hydrox super	Hydroxide de cuivre (eq.50% Cuivre métal 770 g/kg)	2	Fongicide	2
Gawa 30 SC	Imidaclopride (30 g/l)	1	Insecticide	2
Counter	Terbufos 100 g/kg	2	Insecticide- Nématicide	1
Pyriforce	Chlorpyrifos-ethyl 600 g/l	1	Insecticide	2
Mocab 15G	Ethoprophos 150 g/kg	1	Nématicide	1
Scooter (Ridomil Gold 480g/l) EC	Mefonoxam 480 g/litre	16	Fongicide	2 à 6
Nordox 75WG	Oxyde de Cuivre 86%	1	Fongicide	2
Ridomil 66WP	Mefonoxam(Metalaxyl-M) 6%+ Oxyde de cuivre 60 %	10	Fongicide	2 à 7
Banko plus	Chlorothalonil 550g/l +Carbendazime 100 g/l	4	Fongicide	1 à 12
Kocide 2000	Cuivre de l'hydroxyde de cuivre 350 g/kg	5	Fongicide	1 à 6
Capsidor 50Sc	Fipronil 50 g/l	1	Insecticide	2
Tapir	Chlorpyrifos-Ethyl 600 g/l	1	Insecticide	1
Dursban	chlorpyrifos 480 g/L	1	Insecticide	1 à 3
Lamida Gold	Imidaclopride 30 g/l + LambdaCyhalothrine 60 g/	1	Insecticide	1
Metlam 72WP	Métalaxyl 120 g/kg + Oxyde de cuivre 600 g/kg	1	Fongicide	1
Pencozeb 75DG	Mancozèbe 750g/kg	4	Fongicide	1 à 3

III.1.7 Analyse en composantes principales (ACP) des données de l'enquête.

Les graphes A et C de la figure 24 illustrent les cercles de corrélation de quelques variables quantitatives issues des données d'enquête et représentées selon deux axes factoriels. L'interprétation des cercles de corrélation indiquent en général que les variables situées dans les mêmes quadrants sont positivement corrélées et celles situées dans les quadrants opposés (en fonction des axes) sont négativement corrélées. Ainsi le graphe A indique que les variables, nombre d'employé (Nb_emp), surface des parcelles (Surf_par), nombres de variétés de poivre (Var_P) sont positivement corrélés à la variable rendement (Rdt) et l'ensemble de ces variables est négativement corrélé aux variables situées dans le quadrant opposé (variable âge des producteurs (Age_pro), nombre d'enfant (Nb_enft), âge des parcelles (Age_parcel), nombre de poivrier/tuteur (Nb_P_T)). Le graphe C montre que les variables nombre d'épandage des engrais (Nb_epan), quantité de fongicide utilisé (Qte_Fon_L), quantité de NPK utilisé (Qte_NPK_Kg) sont positivement corrélées avec la variable rendement qui est négativement corrélée aux variables quantité d'insecticide utilisé (Qte_insec_L), nombre de traitement phytosanitaire (Nb_phyto), la quantité d'herbicide utilisé (Qte_herb_L), nombre d'élargage du tuteur (Nb_elar).

Les graphiques B et D illustrent les ACP (biplot) des variables d'études et des observations (pipériculteurs enquêtés) respectivement pour les variables caractéristiques socio-démographiques et les caractéristiques des parcelles (graphe B) et les pratiques culturales effectuées par les pipériculteurs (graphe D). On observe sur les deux graphiques que la majorité des parcelles situées dans le quadrant des variables positivement corrélées au rendement (Nb_emp, Surf_par, Var_P, Nb_epan, Qte_Fon_L, Qte_NPK_Kg) sont les parcelles de Njombe-Penja et celles qui y sont le moins représentées sont celles de Loum-Manjo. Ainsi, selon notre étude, les pipériculteurs de Njombé-Penja seraient donc ceux qui auraient les caractéristiques (socio-démographiques et parcelles) et les pratiques culturales plus favorables au rendement. Néanmoins il faut noter que sur ces deux graphiques la grande majorité des pipériculteurs des trois zones d'étude sont assez mal représentés (faible proximité avec les variables d'études sur les graphes). Ceci pourrait être dû à la forte hétérogénéité dans les réponses dans enquêtés.



Légende :A-B :caractéristiques socio-démographiques des pipériculteurs et caractéristiques d'une plantation de poivrier (Nb_enft : Nombre d'enfant ; Age_parcel: Age parcelle ; Age_pro: Âge production ;Surf_par: Surface des parcelle ; Rdt : Rendement ; Var_P: Nombre de variété de poivre ; Nb_emp: Nombre d'employé) ; C-D : pratiques culturales effectuées par les pipériculteurs (Qte_insec_L : Quantité d'insecticide (L) ;Qte_herb_L: Quantité d'herbicideutilisée (L) ; Nb_epan: Nombre d'épandage des engrais ; Qte_Fon_L: Quantité de fongicide utilisée (L) ; Qte_NPK_Kg : Quantité de NPK utilisée (Kg) ; Nb_defri: Nombre de défrichage manuel ;Nb_phyto:Nombre de traitement phytosanitaire ; Nb_elar: Nombre d'élargage du tuteur)

Figure 24 : Cercles de corrélation (A et C) et Analyses en composantes principales (ACP) (B et D) des données d'enquêtes.

III.1.8. Sévérité et incidence des principales maladies

Trente-cinq plantations de poivre réparties dans trois différentes zones de l'aire géographique ont été visitées à la suite de l'administration des questionnaires. La méthode de transect a été utilisée afin d'évaluer de manière ponctuelle, l'incidence et la sévérité des deux principales maladies dans les plantations du poivre de Penja. La dynamique temporelle de la maladie du dépérissement lent a été suivie dans dix-neuf plantations. Parallèlement les échantillons prélevés dans ces différentes plantations ont permis d'identifier différents microorganismes.

III.1.8.1 Description des symptômes des maladies en champs

La pourriture racinaire blanche est l'une des principales maladies citées par les producteurs et observées dans les plantations de poivre de Penja. Elle attaque principalement le tuteur bien que des symptômes similaires aient été observés sur les plants de poivrier. Elle se caractérise au niveau du collet du tuteur par un fendillement de l'écorce avec libération de la résine de couleur noire. On note également la présence des raies noires dans le bois et des lames mycéliennes blanches entre le bois et l'écorce. La pourriture des racines entraîne ainsi la chute des plants atteints par la maladie. Au sein des plantations de poivre, cette maladie est aléatoirement répartie. Mais au sein d'un foyer d'infection, la maladie se propage autour de la première plante atteinte (Fig. 25A).

La maladie du jaunissement foliaire ou du dépérissement lent est présente dans presque toutes les plantations visitées. Les plants présentant les symptômes de jaunissement sont souvent présents dans les mêmes foyers que la maladie de la pourriture racinaire blanche (Fig. 25B). Les plants de poivrier généralement atteints du dépérissement lent présentent une réduction de la surface foliaire, de plus on observe dans les plantations au niveau des foyers l'absence des poivriers ou des tuteurs sans poivriers (Fig. 25C).



Figure 25 : Caractéristiques des différentes plantations attaquées : **A** : progression de la pourriture racinaire blanche ; **B** : Foyer de la maladie du jaunissement foliaire ou du dépérissement lent ; **C** : plantation de tuteur avec très peu de poivriers

III.1.8.2 Incidence de la pourriture racinaire blanche, dans les plantations de poivriers

L'âge moyen des 35 plantations visité était d'environ 8 ans (3 à 15 ans) (Tableau XXII). Sur un total de 2852 arbres inspectés, 157 (5,5 %) tuteurs présentaient les symptômes de la pourriture racinaire blanche tels que le craquement au niveau du collet et la libération de la résine. Le pourcentage d'arbres affectés par la maladie dans les différentes plantations a varié de 1,3 % à près de 65 %, mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les trois zones ($p=0,501$). A Loum des 9 plantations visitées nous avons noté la présence de la maladie dans 2 (22,2 %) l'incidence de la maladie dans cette zone varie de 4,5 % à 64,9 %. A Njombe-Penja sur les 13 plantations visitées la maladie a été observée dans 3 plantations (20 %), l'incidence de la maladie dans les plantations de la zone variait de 1,3 % à 52 %. A Tombel sur 13 plantations, 7 plantations (53,8 %) étaient visiblement affectées et l'incidence de la maladie dans cette zone va de 1,3 % à 33,3 %. Il est également à noter que dans certaines plantations ($n=13$), la maladie n'a pas été observée dans le transect délimité, mais qui selon les données de l'enquête menée auprès des planteurs était présent en champs.

Sur un total de 2852 tuteurs observés, 515 (18,2 %) poivriers étaient absents. L'absence des poivriers ou le taux de mortalité est défini dans toutes les plantations, contrairement à la maladie de la pourriture racinaire blanche qui ne concernait que certaines plantations. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes zones en ce qui concerne le taux

de mortalité ($P=0,123$). La mort des plants de poivrier débute selon les producteurs par un jaunissement du feuillage ensuite suivra le dessèchement complet du plant.

Aussi bien la maladie de la pourriture racinaire blanche que celle du dépérissement lent, aucun lien n'a été établi entre elles et l'âge de la plantation ($P=0,208$, $P=0,958$, respectivement). Elles sont autant présentes dans les jeunes plantations que dans les vieilles plantations.

Tableau XXI : Incidence de la pourriture racinaire blanche dans les différentes zones

Zones	Nbre de plantation	Obs des planteurs. 1	Incidence de la pourriture racinaire du tuteur (%) ²	Taux de mortalité du poivrier (%) ³	Age (année)	Cultures associées	Précédents culturaux
Tombel	T1	+	3,4	27,2	9	<i>Prunus africana</i> , <i>Persea americana</i> , <i>Cola acuminata</i>	<i>Coffea</i> sp.
	T2	+	30,0	87,7	3	Aucun	<i>Coffea</i> sp., <i>T. cacao</i>
	T3	+	4,4	16	3	<i>P. africana</i> , <i>P. americana</i> , <i>C. acuminata</i>	<i>Coffea</i> sp.
	T4	+	17,2	21	15	<i>T. cacao</i> , <i>Dioscorea alata</i>	<i>Coffea</i> sp., <i>A. comosus</i>
	T5	+	1,3	1,2	7	<i>T. cacao</i>	Recru de forêt
	T6	+	33,3	33,3	15	<i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i>
	T7	+	28,6	56,8	7	<i>T. cacao</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i>
	T8	-	-	21	10	<i>T. cacao</i> , <i>D. alata</i>	Aucun
	T9	+	-	22,2	5	<i>Ananas comosus</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>Coffea</i> sp.
	T10	-	-	3,7	5	<i>Musa</i> sp.	Aucun
	T11	+	-	67,6	10	<i>T. cacao</i> , <i>D. alata</i>	<i>T. cacao</i>
	T12	-	-	19,8	4	<i>T. cacao</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i> , <i>Coffea</i> sp.
	T13	+	-	4,9	8	<i>T. cacao</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>Coffea</i> sp.
Njombe-Penja	N1	+	1,3	3,7	10	<i>Citrus sinensis</i> , <i>C. acuminata</i>	<i>T. cacao</i>
	N2	+	5,5	32,1	11	Aucun	<i>T. cacao</i>
	N3	+	51,9	3,7	12	Aucun	Recru de forêt, <i>Musa</i> sp.
	N4	+	-	6,2	7	Aucun	<i>T. cacao</i>
	N5	+	-	38,3	8	Arbres fruitiers	<i>T. cacao</i>
	N6	+	-	6,2	25	<i>Musa</i> sp., <i>D. alata</i>	<i>C. acuminata</i> , <i>T. cacao</i>
	N7	+	-	9,9	10	None	<i>T. cacao</i>

	N8	+	-	18,5	n.d.	<i>Musa sp.</i>	Recru de forêt <i>C. papaya</i> , <i>A. comosus</i>
	N9	-	-	8,6	8	<i>Musa sp.</i>	<i>T. cacao</i> , <i>C. acuminata</i>
	N10	+	-	32,1	7	<i>C. acuminata</i> , <i>Musa sp.</i>	<i>Carica papaya</i>
	N11	-	-	6,2	3	<i>Carica papaya</i> , <i>A. comosus</i>	<i>A. comosus</i>
	N12	+	-	2,5	6	Aucun	<i>Musa sp.</i>
	N13	+	-	8,6	6	<i>Musa sp.</i> , <i>C. papaya</i>	
	L1	+	4,5	18,5	4	Aucun	<i>T. cacao</i>
	L2	+	64,9	28,4	6	Aucun	<i>T. cacao</i>
	L3	-	-	7,4	16	<i>C. papaya</i>	<i>T. cacao</i>
	L4	+	-	4,9	5	Aucun	<i>Coffea sp.</i> , <i>Manihot esculenta</i>
Loum	L5	-	-	9,8	10	<i>Musa sp.</i>	<i>Zea mays</i> , <i>Musa sp.</i>
	L6	-	-	39,5	17	<i>Musa sp.</i> , <i>D. alata</i>	<i>Musa sp.</i>
	L7	-	-	2,5	8	Aucun	<i>T. cacao</i>
	L8	+	-	18,5	8	Aucun	<i>Coffea sp.</i>
	L9	-	-	29.6	11	Aucun	<i>Musa sp.</i>

¹ +/- presence ou absence de la maladie dans les plantations selon les producteurs

² Incidence de la pourriture racinaire du poivrier basée sur le transect, - = absence de la pourriture racinaire dans le transect

³ taux de mortalité du poivrier base sur le transect

n.d. = non determine

III.1.8.3 Etiologie de la maladie du jaunissement ou dépérissement lent du poivrier

➤ Description de la maladie du jaunissement foliaire dans les plantations du poivre de Penja

Le dépérissement lent des poivriers se traduit dans un premier temps par le jaunissement du feuillage des plants et ceci de manière cyclique. Cette maladie progresse lentement et un plant présentant les symptômes du jaunissement peut faire entre 2 à 4 ans avant de dépérir. L'état de jaunissement des feuilles varie en fonction des saisons, plus accentué pendant la saison de sèche (Décembre- Mi-Mars) et le plant est affaibli. Lorsque les pluies reprennent vers Mi-Mars, le feuillage reprend une coloration verte et le plant semble vigoureux comme s'il était en bonne santé. Cette reprise peut s'observer pendant au moins deux ans puis progressivement on assistera à une perte de vigueur, une chute des feuilles, une réduction de la surface foliaire puis d'un coup à un dessèchement complet de la plante. Le système racinaire des plantes affectées par cette maladie présente de temps en temps un pourrissement racinaire.

➤ Sévérité de la maladie, Index de jaunissement et dynamique temporelle

Des observations mensuelles sur l'état du jaunissement et la perte des plants de poivrier ont été effectuées mensuellement dans 19 plantations (11 à Njombe-Penja : 3 à Loum-Manjo et 5 à Tombel) pendant trois ans (2013-2016). L'année 1 correspondant aux observations allant de Octobre 2013 à Septembre 2014, l'année 2 allant de Octobre 2014 à Septembre 2015 et l'année 3 allant de Octobre 2015 à Septembre 2016. Les données climatiques (températures moyennes et les précipitations) ont également été relevées durant ces trois années.

La sévérité de la maladie n'a pas significativement varié en fonction de la zone d'étude ($p=0,347$) mais un effet significatif sur celle-ci a été observé en comparant l'année ($p=0,08$) et les mois d'observations ($p<0,001$) ainsi que les différentes parcelles ($p<0,001$). La Figure 26A montre la même dynamique de la maladie dans les différentes zones. Indépendamment des années d'observations, aucune différence significative ($p=0,423$) n'a été observée entre les taux de sévérité de la maladie dans les différentes zones (Njombe-Penja, Loum-Manjo et Tombel : 47,9 %, 52,2 %, 48,9 % respectivement). Mais indépendamment de la zone d'étude, on note un effet année sur le taux de sévérité de la maladie. En effet une différence significative a été notée entre les trois années d'observations ($p=0,017$) et l'année 3 (55,0 %) étant celle où le taux de sévérité était significativement plus élevé comparé aux taux de sévérité de l'année 1 (46,3 %) et l'année 2 (47,8 %). On note également un effet mois sur la sévérité de la maladie avec une différence significative ($P<0,001$) observée entre le taux de sévérité des différents mois au cours des années d'observation. Les mois de Décembre, Janvier, Février, Mars avaient les taux de

sévérités les plus élevés (Tableau XXIII). Le taux de sévérité de la maladie dans les différentes parcelles d'observations indépendamment de l'année a varié. En effet, les taux de sévérités dans parcelles P1, P2 et P7 ont été significativement plus élevés ($P < 0,001$) que ceux des autres parcelles. En observant les figures 26 B, C, D qui représentent la variation du taux de sévérité de la maladie dans les différentes zones d'observations individuellement, on note que la dynamique de la maladie est semblable d'une année à une autre. En effet, une augmentation du taux de sévérité de la maladie durant les mois de Décembre, Janvier, Février et Mars a été observée. Dans la zone de Njombe-Penja aucune différence significative n'a été notée entre les taux de sévérité obtenus des trois années d'observations ($p = 0,314$) par contre indépendamment de l'année, une différence significative ($P < 0,001$) a été noté entre les taux de sévérité des différents mois d'observations. Dans la zone de Loum-Manjo, le taux de sévérité de la maladie a été significatif lorsqu'il était comparé par mois et par année ($P = 0,014$; $P = 0,016$ respectivement). En effet l'année 3 est celle qui a présenté le taux de sévérité le plus élevé. Les mêmes tendances ont été observées pour la zone de Tombel où le taux de sévérité a significativement varié en fonction de l'année et du mois d'observation ($P = 0,002$; $P < 0,001$ respectivement).

L'index de jaunissement des plants obtenue à partir de l'échelle d'annotation (0-4) a été obtenue annuellement en calculant la moyenne des notes de chaque parcelle. Cet index de jaunissement a significativement varié en fonction des parcelles ($P < 0,001$) et des mois ($P < 0,001$) d'observations. Mais aucune variation significative n'a été observée en comparant les trois zones ($P = 0,347$) ainsi que les trois années ($P = 0,08$) d'observations. En observant l'index de jaunissement dans chaque zone (Njombé-Penja, Loum-Manjo, Tombel), on note une différence significative entre les mois d'observations dans toutes les zones par contre l'année d'observation n'a eu aucun effet significatif sur l'index de jaunissement dans les zones à l'exception de la zone de Tombel ($P = 0,0016$) (Figure 27).

Le climat aurait une influence sur le jaunissement foliaire des poivriers (Figure 28). En effet, en regardant l'évolution de l'index de jaunissement et de la sévérité de la maladie au cours des différentes années d'observations et pour toutes les zones on constate que les mois ayant été moins arrosés ont présenté les plus grandes sévérités avec des index de jaunissement plus élevés. La température moyenne a significativement varié en fonction des zones ($P < 0,001$) et en fonction des années d'observations ($p = 0,0037$). En effet la température moyenne était significativement plus élevée à Tombel ($26,5^{\circ}\text{C}$) avec une température maximale à $32,3^{\circ}\text{C}$ et à Njombé-Penja (26°C) avec une température maximale à $32,2^{\circ}\text{C}$ comparée à celle de Loum ($25,3^{\circ}\text{C}$) avec une température maximale à $30,6^{\circ}\text{C}$. Elle a été significativement plus élevée

durant l'année 3 (26,5°C) comparée aux années 2 (25,9°C) et 1(25,8°C) (Annexe 8). Les précipitations ont varié d'une année à l'autre et d'une zone à l'autre mais aucune différence significative entre les valeurs n'a été obtenue ($P=0,64$ pour la zone ; $P=0,37$ pour l'année). Par contre les précipitations par mois d'observations sont significativement différentes ($P<0,001$) et les moins arrosés étaient les mois de Novembre, Décembre, Janvier, Février. Une corrélation négative ($Cor= -0,734$; $P<0,001$) a été notée entre le taux de sévérité de la maladie et les quantités de pluies tombées au cours de l'essai (précipitations) par contre elle a été positivement corrélée ($Cor= 0,746$; $P<0,001$) avec les températures moyennes. Une corrélation positive ($Cor= 0,753$; $P<0,001$) a été notée entre l'index de jaunissement et la température moyenne par contre elle est négativement corrélée aux précipitations. ($Cor= -0,748$; $P<0,001$) (Tableau XXV).

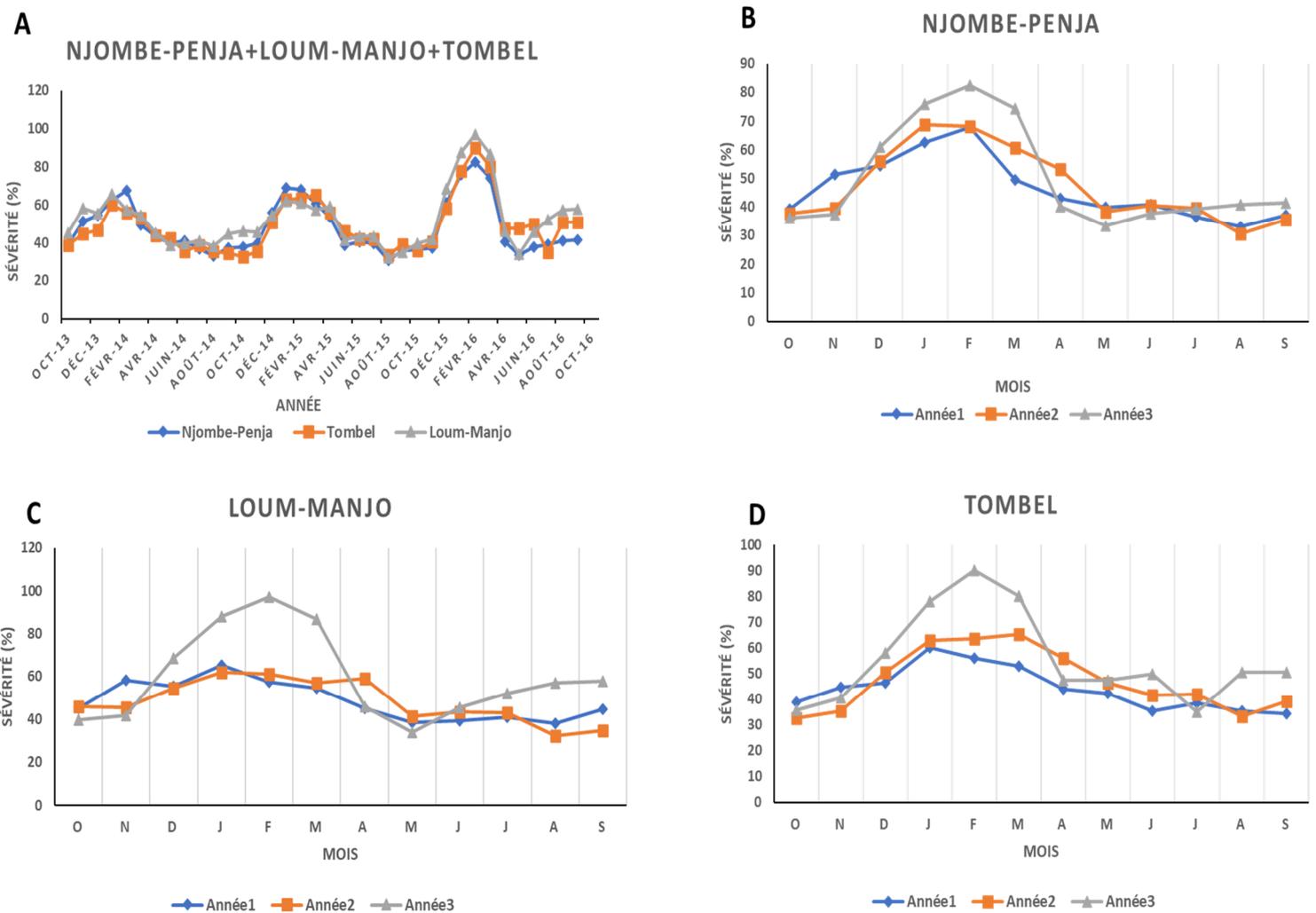


Figure 26 : Sévérité du jaunissement dans les différentes zones de production durant trois années consécutives. **A** : sévérité des trois zones ; **B** : sévérité à Njombé-Penja ; **C** : sévérité à Loum-Manjo ; **D** : sévérité à Tombel.

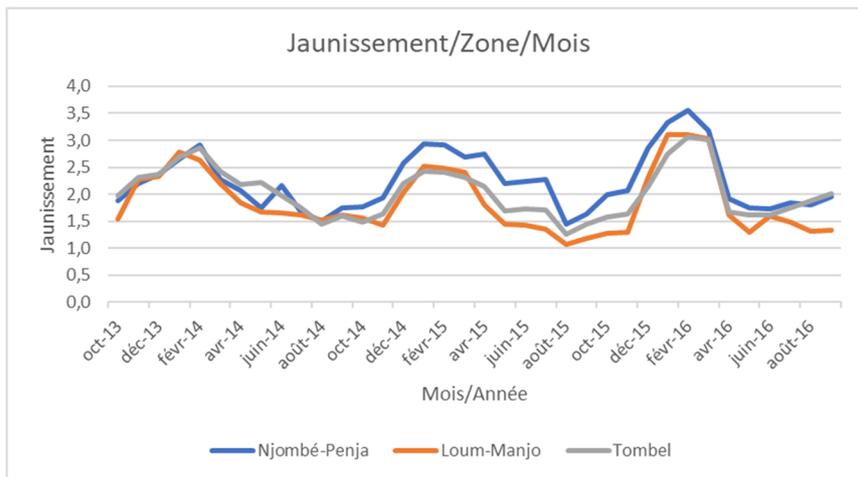


Figure 27 : Degré moyen de jaunissement des trois zones au cours des trois années d’observations

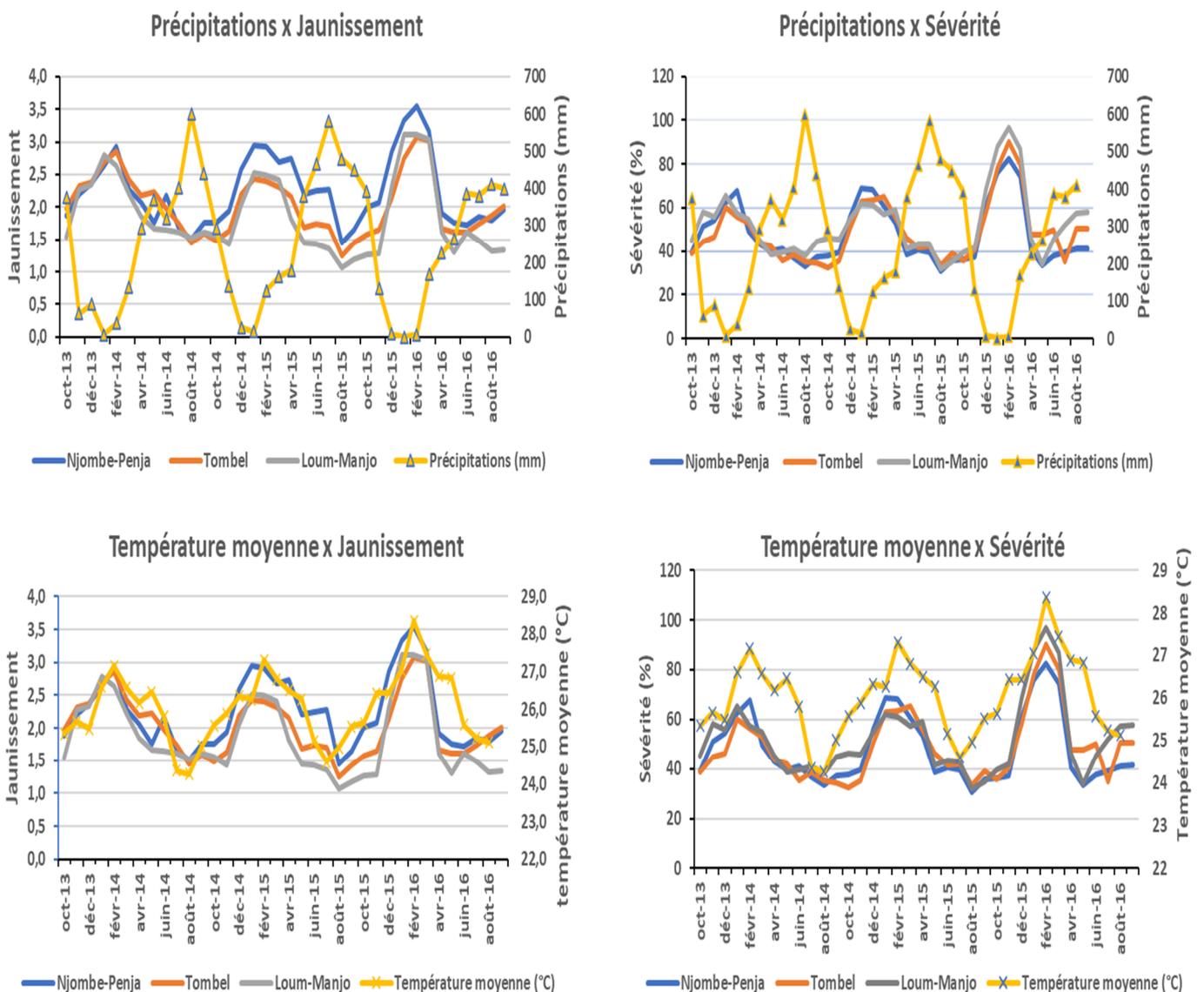


Figure 28 : Effet des variables climatiques (Température moyenne et Quantité de pluie) sur la progression de la maladie

Tableau XXII: Effet mois sur l'évolution de la maladie ($P < 0,001$)

Mois	Sévérité (%) ¹
Janvier	68,2 ± 1,8 ^{de}
Février	71,2 ± 1,9 ^e
Mars	62,2 ± 1,9 ^{cd}
Avril	46,3 ± 1,8 ^b
Mai	38,4 ± 1,9 ^{ab}
Juin	40,0 ± 1,9 ^{ab}
Juillet	38,7 ± 1,9 ^{ab}
Aout	36,4 ± 1,9 ^a
Septembre	39,2 ± 1,8 ^{ab}
Octobre	38,4 ± 1,7 ^{ab}
Novembre	42,1 ± 1,9 ^{ab}
Décembre	55,1 ± 1,9 ^c

Les valeurs de la sévérité affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5 %

¹Sévérité (%) est la moyenne obtenue tous les mois durant les trois années d'observation dans les différentes zones

➤ Taux de mortalité dans les plantations

Au cours des observations, les pertes des plants de poivrier ont été comptées. Le tableau XXIV montre les différents taux de pertes enregistrés chaque année dans les différentes parcelles d'observations. Il en ressort que le taux de mortalité des plants varie d'une plantation à une autre et d'une année à une autre. Il va de 0 à un peu plus de 52 % durant les trois années d'observations. Sur un total de 894 plants de poivrier observé dans les trois zones, on a compté un total 117 plants morts au cours des trois années soit un peu plus 13 % de taux de mortalité. Indépendamment de l'année une différence significative ($P=0,0008$) a été observé entre les zones. Loum-Manjo a enregistré le taux de mortalité le plus élevé significativement différent de celui de Tombel et Njombé-Penja. A Njombe-Penja, sur les 596 plants de poivriers observés, une perte de 92 plants a été enregistré au cours des trois années soit un taux de mortalité de 15,4 %. Loum-Manjo a enregistré une perte de 19 plants sur les 99 soit un peu plus de 19 % de taux de mortalité. Tombel a enregistré moins de perte, avec 6 plants sur 199 plants de départ soit un taux de 3,0 %. Une différence significative ($P=0,0015$) a été observée entre les trois années d'observations, avec une perte de plant plus élevée enregistrée pendant la troisième année significativement différente de celle de la deuxième et la première années (Tableau XXIV).

Tableau XXIII : Taux de mortalité des plants de poivrier dans les différentes plantations au cours des années

Zones	Parcelle	Nbre de plants	Mortalité ¹ (%) /Année		
			Année1	Année2	Année3
Njombé-Penja	P1	71	4,7	4,9	8,6
Njombé-Penja	P2	68	6,0	3,1	14,5
Njombé-Penja	P3	63	3,2	2,9	0,0
Njombé-Penja	P4	50	0,0	0,0	12,4
Njombé-Penja	P5	73	2,8	1,4	1,4
Njombé-Penja	P6	75	1,3	2,7	10,7
Njombé-Penja	P7	24	8,1	0,0	17,0
Njombé-Penja	P8	25	0,0	4,0	0,0
Njombé-Penja	P9	74	1,4	2,7	1,4
Njombé-Penja	P10	25	4,0	0,0	13,1
Njombé-Penja	P11	48	17,2	12,3	17,8
Loum-Manjo	P12	49	0,0	8,1	4,2
Loum-Manjo	P13	25	8,0	0,0	52,9
Loum-Manjo	P14	25	0,0	0,0	0,0
Tombel	P15	50	4,00	0,00	0,00
Tombel	P16	50	0,00	0,00	0,00
Tombel	P17	24	0,00	0,00	4,17
Tombel	P18	50	2,00	0,00	2,00
Tombel	P19	25	4,00	0,00	0,00
Total/Moyenne		894	3,5 ^a	2,2 ^a	8,4 ^b
Valeur de P			0,0015		

¹La mortalité représente la somme des taux de pertes enregistrés chaque mois pour une année. Les valeurs moyennes du taux de la mortalité/année affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5 %

Tableau XXIV: Corrélation entre la sévérité (%) de la maladie, l'index de jaunissement et les variables climatiques

		Paramètres climatiques	
		Température moyenne	Quantité de pluie
Sévérité (%)	Valeur de P	<0,001	<0,001
	Coefficient de corrélation	0,746	-0,734
Jaunissement	Valeur de P	<0,001	<0,001
	Coefficient de corrélation	0,753	-0,748

III.1.9 Discussion

Le poivre de Penja n'est pas une variété de poivre mais un poivre présentant des caractères particuliers et cultivés dans une aire géographique bien délimitée au Cameroun. Il était question dans cette étude de : Dresser un état des lieux de la culture du poivre de Penja. Nombre de producteurs de poivre de Penja sont membres de l'association IGPP. L'IGPP est un groupement représentatif des producteurs de poivre de Penja qui a été mis en place depuis 2009 et fonctionne selon un statut. Ne bénéficie des services proposés tels que : l'accès facile aux crédits auprès des microfinances pour l'achat des intrants, des formations techniques, fixer les prix d'achat du poivre chaque année, uniquement les membres respectant le statut de fonctionnement. Cette association permet aux producteurs à travers leur cahier de charge de fournir aux consommateurs des produits de qualités ayant respectés toutes les étapes de transformations post récolte. Elle permet également la traçabilité des produits qui sont vendus et de faciliter leur identification. Ceci diffère de la culture du cacao où il n'existe aucun cahier de charge et les producteurs seraient responsables des $\frac{3}{4}$ de la valeur aromatique du cacao. Les pipériculteurs n'étant pas membres de l'IGPP expliquent leur non-adhésion par le manque d'argent afin d'assurer les cotisations exigées en tant que membre. Une minorité parle du manque de sérieux des responsables de l'association.

La culture du poivre de Penja est en majorité dominée la gent masculine dont l'âge moyen était d'environ 50 ans. Les femmes dans cette zone du Moungo font essentiellement dans la culture des produits vivriers tels que la morelle noire, le macabo, le manioc, la banane plantain et bien d'autres. Il est connu que dans la distribution traditionnelle des tâches, l'entretien et la gestion de la production vivrière revenaient aux femmes, tandis que les cultures de rentes étaient accaparées par les hommes (Bopda, 1993). De plus selon les études de MICS en 2014, seulement 8 % des femmes au Cameroun ont accès à une propriété foncière pourtant elle représente 50,1 % de la population (Onana, 2020). Les facteurs tels que le statut matrimonial, le droit coutumier, le statut d'activité seraient les facteurs qui influenceraient l'accès des femmes à la terre. Dans la chaîne de production du poivre de Penja, elles sont néanmoins impliquées dans certaines tâches telles que la récolte, la fertilisation, les opérations de conditionnement des produits.

On note un niveau d'instruction hétérogène mais on observe que 99 % des pipériculteurs ont été scolarisés et savent lire et écrire ce qui révèle que le travail des acteurs de développement dans la zone pourrait être facile. Le fait que la culture du poivre soit rentable pourrait également expliquer le fait qu'en quête de travail après les études, la population s'oriente vers ce secteur

agricole. L'activité principale des producteurs de poivre de Penja était majorée autour de l'agriculture ce qui renforce le fait que le Moungo soit considéré comme l'un des greniers du Cameroun. En effet, l'agriculture est le premier et le dernier rempart pour la survie de la majeure partie des populations. La population vit essentiellement de l'agriculture bien que d'autres activités y soient menées. La culture du poivre est une source de revenu significative pour les uns tiers des répondants. Cependant, une forte variabilité a été notée car pour onze de ces producteurs le poivre occupe plus de 80 % de leur revenu. Par contre 17 producteurs ont encore de jeunes plantations qui ne génèrent pour le moment aucun revenu. Le rendement moyen du poivre sec était de 176 kg/ha/an pour les 51 producteurs ayant des parcelles productives. Mais on a noté une forte variabilité au niveau de la production du poivre probablement due à la taille des plantations et également à l'hétérogénéité d'âge entre les plants de poivrier dans une plantation. Les pratiques culturales effectuées par les pipériculteurs dans les plantations pourraient également expliquer cette variabilité. Il est toutefois important de noter que les données de productions ont été obtenues auprès des producteurs et non des mesures réelles.

La caractérisation des poivrières montre que plus de la moitié des plantations ont été établies sur des vieilles cacaoyères et caféières. Cet état de chose traduit le fait que dans les années 80, une forte crise économique avait perturbé le secteur agricole dans de nombreux pays producteurs de cacao (Tano, 2012). Au Cameroun, entre autres à travers la dévaluation du franc CFA, la hausse des prix des intrants agricoles, l'abandon des politiques de soutien et de stabilisation des prix de la filière cacao et café, de nombreux producteurs ont abandonné la culture de ces spéculations (Tano, 2012) au profit d'autres cultures plus rentables tels que le poivre. De nombreux producteurs de cacao-café se sont convertis en pipériculteurs suite à la labélisation du poivre de Penja en 2013. Ceci se traduit par la jeunesse des plantations dont la majorité a moins de 6 ans. Les plantations de poivre sont en majorité associées à d'autres cultures, principalement les cultures vivrières ceci afin d'optimiser les petites étendues de terre disponible. Certaines cultures associées au poivre sont soit destinées à la vente ce qui permet à l'agriculteur d'avoir des sources de revenus complémentaires soit destinées à la consommation familiale. Les plus gros producteurs de poivre qui ont environ plus de quarante hectares, à l'instar de la PHP, font de la culture intensive du poivre sans d'autres formes d'association sauf le tuteur utilisé pour optimiser la croissance du poivre.

La création d'une plantation poivrière passe par la production d'un bon matériel végétal. Selon le cahier des charges fournis par l'association IGPP, la filière poivre de Penja regroupe trois principaux acteurs parmi lesquels les pépiniéristes, les producteurs et les distributeurs. Les

pépiniéristes sont chargés de produire le bon matériel végétal, ceci passe par le bon choix de la bouture et la production des plants prêts pour les plantations. Une hétérogénéité a été observée dans la production du matériel végétal chez les différents pipériculteurs tant sur la partie du poivrier à prélever que sur la longueur des boutures. La majorité des producteurs ont choisi de produire leur propre matériel végétal car selon eux, le prix de 1000 frs fixé pour un plant de poivrier est très élevé. Il a été noté que cette mixité de techniques de production du matériel végétal au sein des producteurs est autant présente chez les membres de l'association que chez les non membres. Ce qui traduirait une communication entre les différents producteurs de poivre de Penja.

L'entretien des plantations poivrières se fait par différentes opérations culturales : le désherbage, la taille (élagage) des tuteurs et des poivriers, la fertilisation, les traitements phytosanitaires et la récolte. Le désherbage se fait généralement lorsque les conditions de culture le réclame, mais ils le font en moyenne trois fois par an ceci en rapport avec le niveau d'enherbement des plantations. Les récoltes peuvent s'étaler sur six mois probablement due à l'hétérogénéité des plants de poivrier dans les plantations, mais elles débutent en général vers le mois de Novembre pour les plus précoces et s'achève en Mai. La superficie, le nombre de plantations et la disponibilité de la ressource humaine sont des facteurs qui peuvent influencer la durée de récolte. La fertilisation occupe une place importante dans la culture du poivre car c'est une plante exigeante en nutriments (Sadananda, 2000). Elle est pratiquée par les trois quarts des producteurs du poivre de Penja avec une majoration autour de l'utilisation des fertilisants chimiques. Ces derniers étant coûteux pour les producteurs, l'association mets à leur disposition des crédits leur permettant d'acquérir les engrais ce qui traduit le nombre élevé des producteurs fertilisants les plantations poivrières. Les traitements phytosanitaires sont utilisés par un peu plus de la moitié des producteurs de poivre de Penja. On retrouve parmi les produits utilisés des pesticides, des insecticides, des fongicides, des nématicides utilisés pour lutter contre les agressions parasites.

Des cas d'attaques parasites ont été signalées dans les plantations de poivre de Penja, dont les principales étaient la maladie de jaunissement des poivriers ou de dépérissement lent et le pourridié-agaric ou pourriture racinaire blanche qui touchait aussi bien les tuteurs que les poivriers. D'autres affections telles que la galle observée au niveau des feuilles était présente dans plusieurs plantations, la présence des défoliateurs a également été mentionné comme problème sanitaire dans certaines plantations. Il est intéressant de noter que les galles de feuilles ont été attribuées à la fois aux insectes et aux pathogènes, ce qui montre qu'il y a un manque de

connaissances sur les ravageurs et les pathogènes affectant la production au Cameroun. Dans le cas de ces galles foliaires, bien que l'agent causal soit encore inconnu, on soupçonne qu'il s'agit d'une sorte de croute causée par un champignon. Ces informations relatives aux agressions parasitaires dans les plantations du poivre Penja avaient déjà été mentionnées par Scott (2010). Ces maladies observées dans les plantations de poivre de Penja sont semblables à celles observées dans d'autres plantations de poivre dans d'autres pays producteurs à l'instar de l'Inde, la Malaisie, le Vietnam, le Brésil (Sasikumar *et al.*, 2009 ; Sarma *et al.*, 2010).

Aucunes informations sur l'identité des différents agents pathogènes responsables des maladies observées dans les plantations de Penja ne sont disponibles. Néanmoins, les producteurs du poivre de Penja sur la base des informations relatives aux bio agresseurs des autres cultures telles que le cacao ou le café, utilisent les produits chimiques (insecticides, fongicides, nématicides) destinés à ces cultures. La principale matière active utilisée pour contrôler les deux principales maladies enregistrées était le métalaxyl M. Deux principaux produits utilisés dans les plantations sont le Ridomil Gold 66 WP et le Scooter EC. Le métalaxyl M est une molécule utilisée dans le contrôle des maladies causées par les Oomycètes (Agrios, 2005). En effet, *Phytophthora capsici* a été indexé en Asie principalement en Inde comme étant l'un des agents pathogènes de la maladie du jaunissement ou du dépérissement lent du poivrier (Ramana *et al.*, 2014 ; Subila et suseela Bhai, 2020). L'application de ces produits chimiques par les pipériculteurs se faisait essentiellement par pulvérisation foliaire, mais de nombreuses pertes étaient toujours enregistrées. Le choix des produits utilisés par certains producteurs était basé soit sur les conseils d'un tiers, soit par imitation, soit sur conseil de l'association des producteurs. Il est aussi vrai que de nombreux agriculteurs utilisent des pesticides sans discernement, sans tenir compte du type de ravageurs ou des agents pathogènes qui attaquent leur culture, ni en décidant soigneusement quel pesticide (le cas échéant) serait approprié, ni quand et comment il doit être appliqué. L'utilisation incorrecte et non contrôlée de fongicides pour lutter contre un organisme nuisible ou une maladie peut avoir des effets négatifs, comme la dégradation de la santé des agriculteurs et de l'environnement, la résistance aux agents pathogènes et les résidus indésirables de pesticides dans le produit à commercialiser (Christopher *et al.*, 2010). Pour éviter de tels effets négatives dues à une utilisation inadéquate des produits chimiques, les agents pathogènes doivent être correctement identifiés afin de proposer des stratégies adéquates de gestion des maladies.

La pourriture racinaire blanche se caractérisait dans les plantations par la présence des cannelures au niveau du collet et une coulée de résine noire sur les plants attaqués (tuteur

comme poivrier). Etant une maladie d'origine tellurique, l'apparition des symptômes au niveau de la partie aérienne traduisait déjà une avancée conséquente de la maladie au niveau du sol. En outre, lorsqu'on retire l'écorce du tuteur, on observe une nappe mycélienne blanche tapis sur du bois. Dans toutes les plantations infectées, cette maladie se constituait en foyer et l'incidence variait d'une plantation à l'autre. Cette variabilité pourrait s'expliquer par la structure des plantations en termes de précédents culturaux et de cultures associées. En effet, c'est une maladie qui affecte presque toutes les espèces d'arbre à bois dur. Si des souches d'arbre des cultures précédentes n'ont pas été complètement enlevées avant l'installation des plantations de poivriers ceci aurait pu constituer un foyer de contamination. Sachant que le Cacaoyer est sensible à ce pathogène (Roux *et al.*, 2012), les plantations de poivre installées sur les anciennes cacaoyères sont prédisposées à contenir cette maladie. De même si les cultures associées sont déjà porteuses du mycélium de l'agent pathogène responsable de cette pourriture racinaire blanche alors le fait que le poivrier et son tuteur soient sensibles expliquerait la présence de la maladie dans certaines plantations. D'autant plus qu'on retrouvait la maladie aussi bien dans les jeunes plantations que dans les plantations poivrières plus âgées.

La maladie du jaunissement ou dépérissement lent se caractérisait en champs par un jaunissement du feuillage du poivrier. Aux vues de l'hétérogénéité des plants de poivriers dans les plantations, la maladie était présente et disposée de manière aléatoire. L'index de jaunissement des plants de poivriers a varié durant les trois années d'observations. Cette variation a été corrélée aux données climatiques enregistrées durant la période des observations. Indépendamment de la zone d'étude, les périodes sèches des différentes années d'observations (de Décembre à Mars) étaient accompagnées par des index de jaunissement élevés des plants de poivriers par contre durant les périodes humides quelques plants reprenaient des apparences saines. Cette variation pourrait s'expliquer par le stress hydrique engendré par le manque de pluie qui aurait d'avantage accentué le jaunissement observé chez les plants. En effet, Mayek-Perez *et al.* (2002) ont mentionné que sur une plante l'effet simultané d'un stress hydrique et de l'infection par un agent pathogène peut agir de manière synergique et entraver la croissance et le développement de la plante. La sévérité de la maladie a également varié d'une parcelle à l'autre et était positivement corrélée aux températures moyennes et négativement aux précipitations. La variation des paramètres climatiques observés dans les différentes zones et au cours des trois années d'observations pourrait expliquer cette variation au niveau de la sévérité de la maladie. Les données de température montrent que la dernière année d'observation (2016) a été plus chaude que les deux années précédentes ce qui expliquerait une sévérité plus élevée durant la troisième année. Ces observations sont similaires à celles décrites

dans les plantations de poivrier en Inde par Ramana *et al.* (1994) où les plants de poivrier au début de la maladie étaient d'apparence saines mais les symptômes de jaunissement s'intensifiaient lorsque la quantité d'eau dans le sol diminuait c'est-à-dire pendant la période sèche de l'année. De manière générale, la culture du poivre de Penja est sérieusement affectée par deux principales maladies : la pourriture racinaire blanche et le dépérissement lent. Cette dernière selon les observations en champs serait influencée par les paramètres climatiques tels que les températures et les précipitations. Le déficit hydrique observé durant les périodes sèches de l'année accentuerait les principaux symptômes de la maladie à savoir le jaunissement du feuillage. Ce stress pourrait être réduit en évitant la taille des tuteurs durant la période sèche ce qui augmenterait l'ombrage et réduirait l'évapotranspiration. De même, le paillage ou mulching qui est une pratique culturale permettant de disposer au pieds des poivriers des paillis qui permettra de garder le sol humide en réduisant l'évaporation pourrait être envisagé.

III.2 Isolement et Identification des différents microorganismes associés aux maladies

III.2.1 Isolement des microorganismes phytopathogènes associés à la maladie du jaunissement sur poivrier

- **Champignons et Oomycètes**

Un total de 65 cultures pures d'isolats fongique a été obtenu des différents échantillons collectés des parcelles de *P. nigrum*. De l'échantillon sol, 44 isolats fongiques ont été obtenus, 5 isolats des échantillons racines et 16 isolats des feuilles.

En se basant sur les clés d'identifications des genres à savoir les caractères cultureux et la morphologie microscopique (la formes des conidies) établies par Botton *et al.* (1990), il s'est avéré que les 65 isolats fongiques appartiennent aux 5 genres (Tableau XXVI) :

- Douze isolats appartenant au genre *Trichoderma* principalement isolés du sol
- Onze isolats ont été classés dans le genre *Lasiodiplodia* isolés du sol et des feuilles
- Vingt-deux isolats appartenant aux Oomycètes isolés à partir du sol
- Neuf isolats étant apparentés au genre *Fusarium* provenant des échantillons de sol et de racine
- Six isolats apparentés aux genre *Rhizopus* isolés du sol
- Cinq isolats du genre *Collétotrichum* isolés des feuilles et des grappes.

Tableau XXV : Différents isolats fongiques obtenus des différents échantillons (sol, racines, feuilles)

Isolats fongiques	Types d'échantillons			Total
	Sol	Racines	Feuilles	
<i>Trichoderma</i>	12	0	0	12
<i>Lasiodiplodia</i>	1	0	10	11
Oomycètes	21	0	1	22
<i>Rhizopus</i>	6	0	0	6
<i>Fusarium</i>	4	5	0	9
<i>Collétotrichum</i>	0	0	5	5
Total	44	5	16	65
Proportion (%)	67	7,6	24,6	

Sur l'ensemble de la collection, les isollements issus du sol sont plus élevés (67 %) par rapport aux autres types d'échantillons (Tableau XXVI). Dans le Tableau XXVII ci-dessous, les proportions d'isolats en fonction des organes sont présentées, Njombe-Penja a enregistré un taux moyen d'isolement fongique plus élevé (52 %).

Tableau XXVI : Proportion (%) des isolats fongiques provenant des organes de *P. nigrum* de chaque zone

Zone	Types d'échantillons (%)			Moyenne
	Racines	Sol	Feuilles/baies	
Loum -Manjo	20	29,5	37,5	29
Njombe/Penja	60	52,2	43,8	52
Tombel	20	18,3	18,7	19

- **Nématodes**

Aucun nématode n'a été retrouvé dans les racines des poivriers échantillonnés par contre 2 genres différents de nématodes ont été observés dans les échantillons de sol : *Rotylenchulus reniformis* et *Meloidogyne* sp. Le Tableau XXVIII ci-dessous présente la répartition des nématodes dans les différents échantillons de terre prélevés.

Tableau XXVII : Densité moyenne des nématodes observés par échantillons

N° Echantillon	Espèce de nématodes	Nombre moyen de nématode/Litre de sol
1	<i>Meloidogyne</i> sp.	15
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	65
2	<i>Meloidogyne</i> sp.	115
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	180
3	<i>Meloidogyne</i> sp.	30
4	<i>Meloidogyne</i> sp.	30
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	80
5	<i>Meloidogyne</i> sp.	30
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	850
6	<i>Meloidogyne</i> sp.	15
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	15
7	<i>Rotylenchus reniformis</i>	165
8	<i>Meloidogyne</i> sp.	30
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	15
9	<i>Meloidogyne</i> sp.	65
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	200
10	<i>Meloidogyne</i> sp.	15
	<i>Rotylenchus reniformis</i>	80

Les résultats présentés dans ce Tableau montrent la présence de ces deux genres de nématodes dans presque tous les 10 échantillons de sol. On peut donc penser qu'elles représentent la nématofaune phytoparasite dominante dans ces zones.

III.2.2 Isolement des Champignons phytopathogènes associés à la maladie de la pourriture racinaire blanche

Un total de 33 isolats fongiques a été obtenus des échantillons de racines et d'écorces prélevées sur le tuteur et le poivrier. 30 isolats provenant du tuteur et 3 isolats du poivrier. Les isolats de poivrier proviennent de Loum-Manjo (02 isolats) et de Njombe-Penja (01 isolats). Les trente isolats issus du tuteur sont répartis dans les trois zones, 15 isolats appartenant à la zone de Loum-Manjo ; 10 isolats provenant de Njombé-Penja et 05 isolats de Tombel. Basé sur la principale caractéristique culturelle des isolats en boîtes de pétri à savoir la présence des rhizomorphes (Fig. 29) et sur les symptômes observés en champs, tout laisse à croire que nous sommes en présence d'*Armillaria* sp.

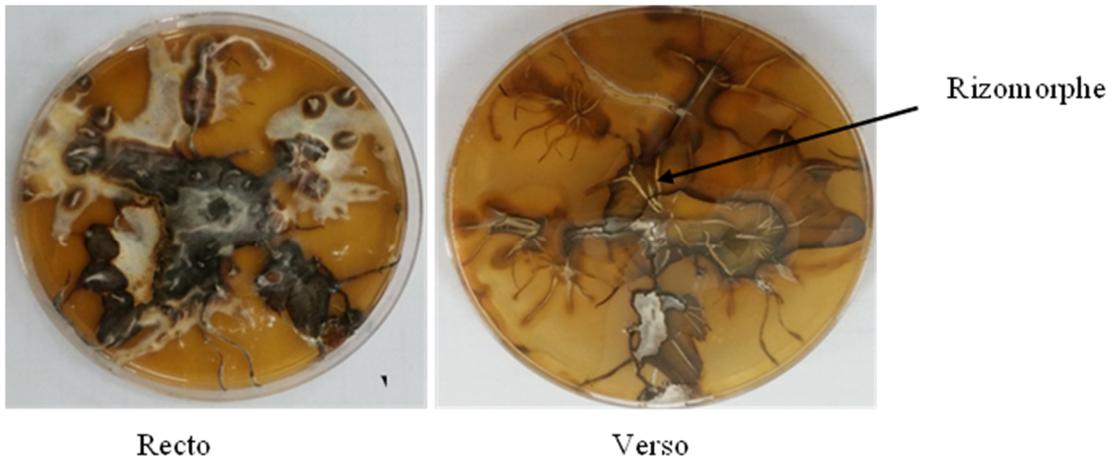


Figure 29 : Aspect de croissance mycélienne d'*Armillaria* sp. sur milieu MEA

III.2.3 Test de pathogénicité

Pour identifier les agents pathogènes responsables du dépérissement lent du poivrier, le choix s'est porté sur les Oomycètes (*Phytophthium* sp.) et *Fusarium* sp. à cause de la récurrence d'isolement chez *P. nigrum* d'une part et sur la base de données de la littérature. Les oomycètes sont considérés comme des espèces phytopathogènes à l'origine des maladies rencontrées sur poivrier, notamment la maladie du pourrissement du pied « Foot rot disease » et la maladie du dépérissement lent ou maladie du jaunissement « Yellow disease or Slow decline » chez le poivrier.

Armillaria sp. a été utilisé comme agent pathogène responsable de la maladie de la pourriture blanche des racines car il était le seul microorganisme à avoir été isolé.

Trois isolats de Oomycètes (PPP, PPK, PPW) et un isolat de *Fusarium* sp. ont été utilisés dans ce test de pathogénicité. Deux techniques d'inoculation ont été utilisées :

➤ La première technique consistait à tremper les racines blessées des plantules de poivrier dans les suspensions d'inocula des microorganismes. Il en ressort que l'infection des plantules de poivrier avec *Fusarium* sp. seule n'a produit aucun symptôme attendu c'est-à-dire on a observé aucun symptômes de jaunissement des plantules. Aucune différence significative entre les traitements n'a été observé en ce qui concerne les paramètres tels que le nombre de feuilles, la hauteur des plants, la surface foliaire, le poids secs des feuilles et des racines ($P > 0,05$). Avec les isolats de Oomycètes, on a observé le jaunissement de quelques plantes bien que la quantité de plants présentant les symptômes soit faible. Sur un total de 16 plants inoculés avec les isolats de Oomycètes, 06 plants ont présenté les symptômes de jaunissement (Fig.30a-b). Des nécroses ont également été observées au niveau des racines. Le mélange d'inocula *Fusarium* sp. +

Oomycètes a permis d'avoir deux plantes sur 8 avec les symptômes de jaunissement. Un ré isolement de *Phytophthium* sp. a été possible en prélevant le sol à la fin de l'essai.

➤ La deuxième méthode consistait à déposer le mycélium des isolats au niveau du collet préalablement scarifié. Deux isolats d'*Armillaria* sp. (ARM1 et ARM2) et trois isolats Oomycètes (PPP, PPW, PPK) ont été utilisés. On n'a pas observé de symptômes liés à la présence de l'Armillaire sur les plants de poivriers néanmoins on a noté la présence des lésions dans les tiges après destruction des plantules (Fig. 30c). Une différence significative ($P=0,017$) a été obtenue en comparant au témoin la longueur des lésions obtenues à partir des deux isolats d'*Armillaria* sp. (ARM1 et ARM2) (Fig. 30d). Les lésions ont également été observées avec les trois isolats de Oomycètes (PPP, PPW, PPK). La longueur des lésions obtenues avec l'isolat PPW est significativement différent ($P<0,05$) de celles obtenues avec les deux autres isolats de Oomycètes (Tableau XXIX). Le ré isolement de l'*Armillaria* sp. et de Oomycètes n'a pas été possible au niveau des lésions obtenues.

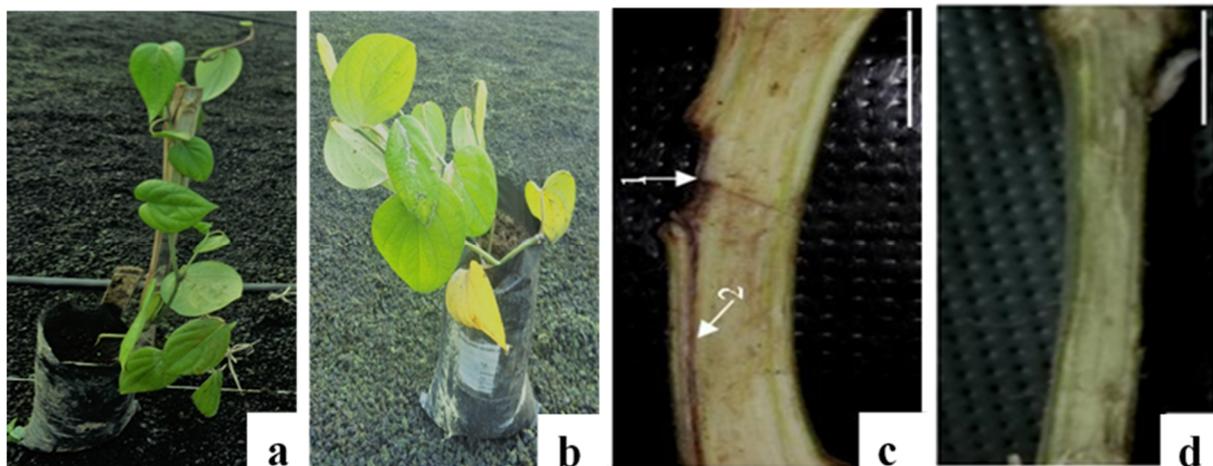


Figure 30 : Résultats du test de pathogénicité sur poivrier : **a-** plant témoin ; **b-** plant infecté présentant les symptômes de jaunissement ; **c-** lésion observée après inoculation ; **d-** plant témoin sans lésion apparente. **1-** point d'inoculation et **2-** lésion observée

Tableau XXVIII : Longueur des lésions observées sur les plantules de poivrier

Pathogènes potentiels	Isolats	Longueur de la lésion (mm)	Valeur de P
Oomycètes	PPW	24,6 ^a	0,0017
	PPF	10,0 ^b	
	PPP	6,9 ^b	
Témoin	T	0,0 ^b	
<i>Armillaria</i> sp.	ARM1	4,5 ^{ab}	<0.05
	ARM2	7,1 ^b	
Témoin	T	0,0 ^a	

Pour chaque groupe de pathogènes, les longueurs de la lésion affectées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Tukey)

III.2.4 Description morphoculturelle des Oomycètes associés au dépérissement lent chez *P. nigrum*

A la suite du test de pathogénicité, *Fusarium* sp. a été écarté comme potentiel agent pathogène du dépérissement lent, les oomycètes ont été considérés comme l'un des microorganismes responsable du dépérissement lent observé dans les plantation de poivre de Penja. La figure 31 et le Tableau XXX ci-dessous présentent les caractéristiques morphoculturelles des oomycètes observés.

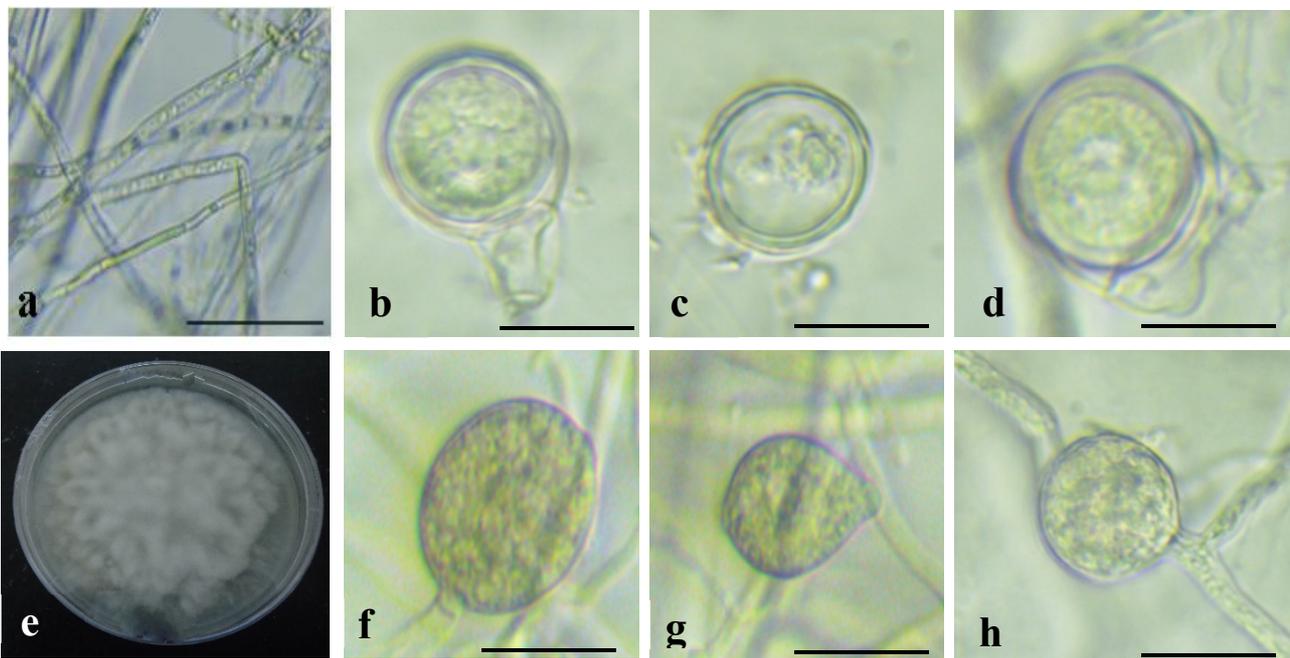


Figure 31 : Caractéristiques morphoculturelles de oomycètes. **a** : hyphes non cloisonnés ; **b-d**: oogone et anthéridie; **e**: colonie sur PDA; **f-h**: sporanges : bar 10µm

Les isolats de Oomycètes obtenus des différentes zones d'échantillonnage ont tous présenté des hyphes non cloisonnés (Fig.31a) et la présence des oospores traduisant ainsi leur caractère homothallique. Ces oospores étaient aplérotiques à parois lisse et épaisse pour un diamètre moyen de $10,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ et qui variait de $8,4 - 11,7 \mu\text{m}$. Les anthéridies étaient grandes, allongés, amphigyne (Fig. 31 b-d). Ces différents isolats présentaient les mêmes caractéristiques morphologiques à savoir une croissance en rosette, un aspect duveteux du mycélium (Fig. 31 e). On a également noté la présence des sporanges de formes Globulaire ou sub(globulaire) ou ovoïde, papillés ou non (Fig. 31f-h). La longueur et la largeur moyennes

étaient de $40,5 \pm 1,9$ (26,1 – 62,4) μm , $32,6 \pm 1,9$ (26,1 - 45,1) μm pour un rapport longueur largeur de $1,3 \pm 0,1$ (0,9 – 2,2) μm (Tableau XXX).

Tableau XXIX : Description morphologique de Oomycètes.

Organes	Caractéristiques	Dimensions (μm)
Hyphes	-Non cloisonnés -Courtes branches latérales	Largeur : $4,2 \pm 0,3$ (8,4 – 11,7) μm
Sporanges	-Ovoïdes -Globulaire ou Sub (globulaire) -Papillé ou non -Terminal -Avec prolifération interne	Longueur : $40,5 \pm 1,9$ (26,1 – 62,4) μm , Largeur : $32,6 \pm 1,9$ (26,1 - 45,1) μm Rapport longueur largeur de $1,3 \pm 0,1$ (0,9 – 2,2) μm ,
Oogones	-Sphériques à parois lisses -Contenant des oospores -Ondulés ou ornés	ND
Oospores	-Aplérotique à paroi épaisse et lisse	$10,5 \pm 0,2$ (8,4 – 11,7) μm
Anthéridies	-Grandes, allongés -Amphigyne avec un ou deux lobes attachés à l'oogone	ND
Mycélium	-Hyalin, Ramifié	ND

ND : Non Déterminé

III.2.5 Identification moléculaire des deux pathogènes associés au dépérissement lent et à la pourriture racinaire blanche

III.2.5.1 *Armillaria* sp.

Les régions d'ITS1 et d'ITS4 ont été amplifiées et séquencées avec succès pour 9 isolats sur les 33 de départ. La taille des amplicons obtenus a varié de 616 à 618 Pb. Les séquences des amplicons ont présenté 99 % de similarités avec les isolats d'*Armillaria* obtenus des cacaoyers au Cameroun (Roux *et al.*, 2012) et de *Tectona grandis* en Zambie (Coetzee *et al.*, 2005). D'après le phylogramme (Fig. 32) basé sur le critère du maximum de vraisemblance (ML), les isolats d'*Armillaria* issus des poivriers de Penja sont regroupés en un seul clade phylogénétique avec un support bootstrap de 86 %, proche du type d'*A. camerunensis* aussi bien que des isolats associés à la pourriture racinaire du cacaoyer au Cameroun. Dans le même clade on retrouve les isolats provenant de diverses plantes hôtes en Zambie et au Zimbabwe (Fig. 32). Le clade de *A. camerunensis* est un clade sœur de celui de *A. fuscipes* qui est soutenu par une forte valeur de bootstrap de 99 %.

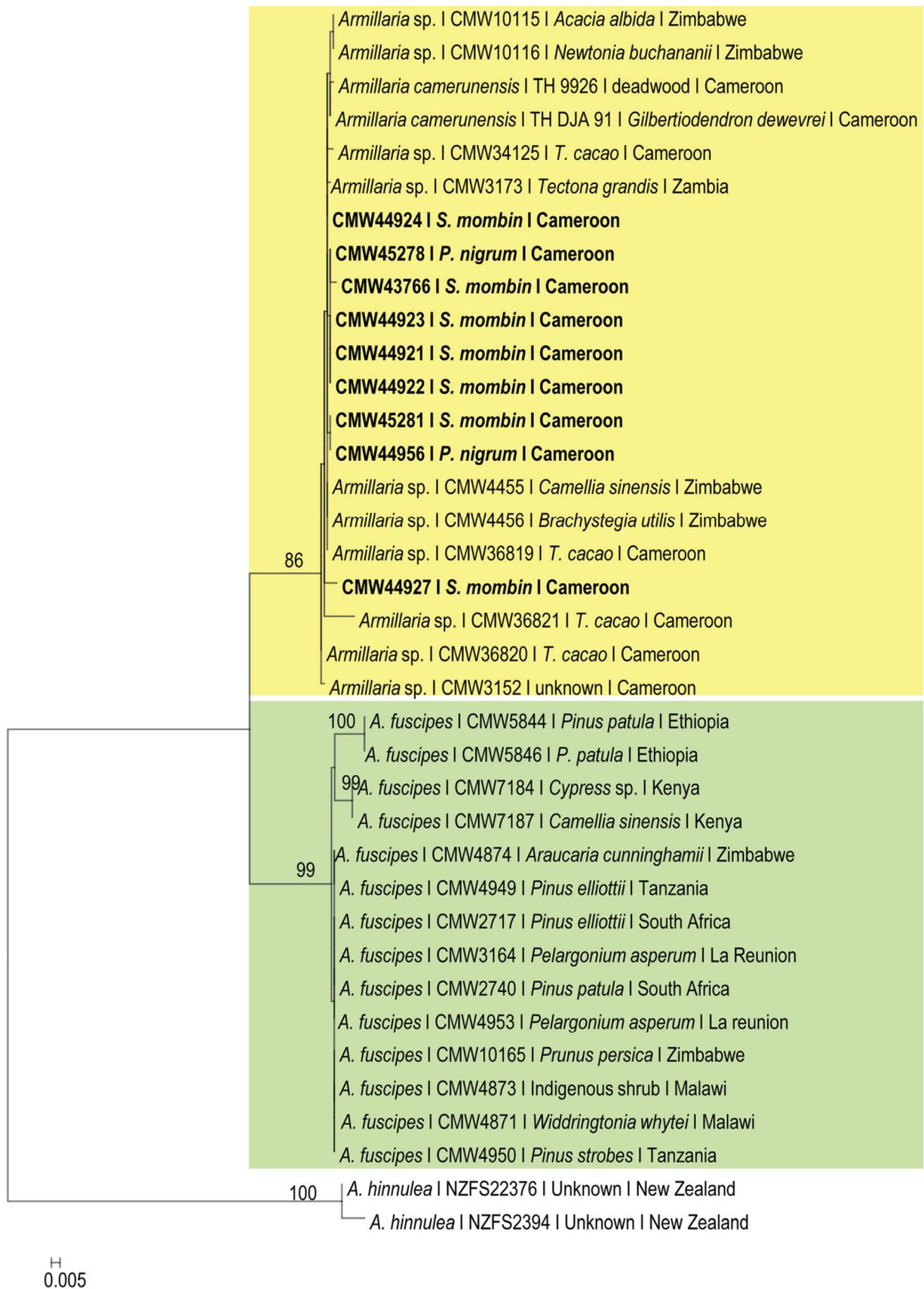


Figure 32 : l'arbre maximum de vraisemblance basé sur les séquences ITS, montrant la position phylogénétique des isolats de *Armillaria* obtenus de *P. nigrum* et *S. mombin* (en gras)

du Cameroun. Les séquences du groupe externe *Armillaria hinnulea* (KX618553 et KX618555) ont servi à l'enracinement de l'arbre. Les nombres sur les branches indiquant les valeurs « Bootstrap » ≥ 70 % pour 1000 répliques

III.2.5.2 Oomycètes

Des 4 isolats de départ, un seul a été amplifié et séquencé avec succès. La taille de ses amplicons obtenus a varié de 857 à 867 pb. L'arbre inféré (Fig. 33) par la méthode de maximum de vraisemblance montre que l'isolat issu du *Piper nigrum* du Cameroun forme un clade phylogénétique avec un support Bootstrap de 91 %, proche du type *Phytophthium cucurbitacearum* de la pourriture du concombre au Japon (Fig. 33). Dans ce même clade, on retrouve *P. vexans* provenant du sol au Japon. Le clade voisin à celui des isolats de l'étude est constitué de deux sous clades sœurs avec des valeurs de Bootstrap de 81 % et 100 %.

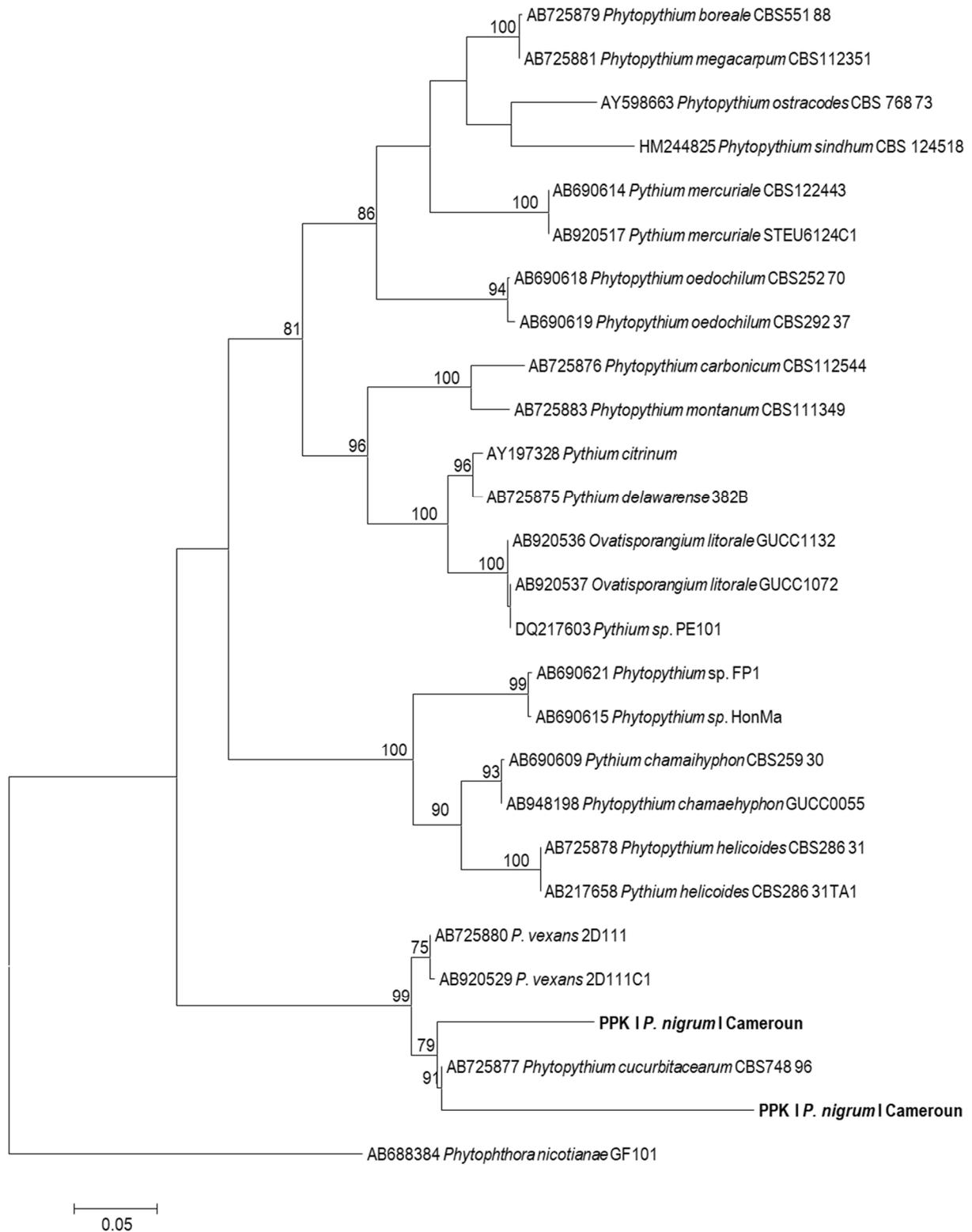


Figure 33 : L'arbre maximum de vraisemblance basé sur les séquences ITS, montrant la position phylogénétique des isolats de *Pythium* obtenus de *P. nigrum* (en gras) du Cameroun. Les séquences du groupes externe *Phytophthora nicotianae* (GF101) ont servi à l'enracinement de l'arbre. Les nombres sur les branches indiquant les valeurs « Bootstraps » 70% pour 1000 réplifications

III.2.6 Discussion

L'objectif de cette partie était d'identifier les différents agents biotiques qui sont associés aux principales maladies.

- **Pourriture racinaire blanche**

Du matériel végétal prélevé sur tuteur et poivrier présentant la pourriture racinaire blanche, dans les plantations infectées, nous a permis d'isoler un seul genre de champignon, l'*Armillaria*. Ce résultat est différent de celui présenté par Sarma *et al.* (2010) qui ont mentionné *Rigidoporus lignosis* et *Rigidoporus microporus* comme agents pathogènes de la pourriture racinaire blanche dans les plantations poivrières en Malaisie et en Inde. D'après l'arbre phylogénétique basé sur les ITS, les isolats d'*Armillaria* provenant des plantations de poivre de Penja sont regroupés en un seul clade phylogénétique proche de l'*A. camerunensis* associé à la pourriture racinaire du cacao au Cameroun. Ce clade est sœur à celui de *A. fuscipes*. Les résultats obtenus sont similaires à ceux de Coetzee *et al.* (2005) qui à travers les analyses phylogéniques basées sur les ITS et l'IGS1 ont séparé *A. fuscipes* (au sens strict) en deux espèces sœurs bien distinctes car à l'époque elle était considérée comme une seule entité spécifique. Une espèce représentant *A. fuscipes* (au sens strict) incluait les espèces de l'Afrique du Sud, du Zimbabwe, du Kenya et de la Réunion. La seconde espèce à laquelle les isolats de Penja semblent appartenir, représentait une espèce non décrite et incluait les espèces du Cameroun, du Zimbabwe et de la Zambie. Roux *et al.* (2012) ont utilisé l'IGS1 pour identifier les isolats d'*Armillaria* isolés de la pourriture racinaire du cacao au Cameroun et ont conclu que ces espèces étaient congénitales au second clade non nommé de *A. fuscipes* (au sens strict). Ce clade a été identifié plus tard par Koch *et al.* (2017) comme étant *A. camerunensis*. Contrairement à l'ITS tel que vu dans cette étude, l'arbre phylogénétique basée sur l'IGS1 montre une sous-structure substantielle du clade *A. camerunensis* du Cameroun (Roux *et al.* 2012), qui pourrait être le signe d'une grande diversité génétique et éventuellement la spéciation cryptique de cette espèce. Bien que deux autres espèces d'*Armillaria* aient été signalées dans le passé au Cameroun, notamment *A. elegans* et *A. heimii* (*A. fuscipes*) (Hennings 1895 ; Roux *et al.* 2012 ; Koch *et al.*, 2017), les études de séquences d'ADN n'ont jusqu'à présent permis de retrouver *A. camerunensis*. Le poivrier (*P. nigrum*) et le tuteur (*S. mombin*) ne sont pas connus comme étant des hôtes de l'armillaire. Le fait que les cacaoyers, les caféiers ou les arbres fruitiers (les safoutiers, les agrumes, les avocatiers, les kolatiers) ont été présents ou sont toujours présents dans les plantations, et la présence des arbres forestiers ou des souches de racines pourraient expliquer la présence de *Armillaria* car ces différentes plantes sont des hôtes

potentiels de l'*Armillaria* (Roux et Coetzee, 2016). L'*Armillaria* a été signalée au Cameroun depuis 1892 (Hennings 1895) et a été retrouvé sur du cacao au Cameroun, dès 1907 (Roux et Coetzee, 2016), ainsi que dans plusieurs autres pays d'Afrique de l'Ouest tels que Sao Tomé, le Togo et le Ghana (Dade, 1927 ; Rishbeth, 1980 ; Roux et Coetzee, 2016).

Au vu des symptômes en champs et des résultats de l'isolement aucun doute sur la nature de l'agent pathogène suspecté dès le départ, il s'agit bien du genre *Armillaria* et dont avec l'identification moléculaire on a obtenu l'espèce *camerunensis* déjà isolé sur d'autres cultures au Cameroun. *Armillaria* spp. étant capable de survivre plusieurs années dans les souches d'arbres et les racines présents dans le sol (Roux et Coetzee 2016), la préparation du sol est un préalable nécessaire avant la mise en place d'une plantation poivrière. Cette maladie se transmet soit par contact racinaire entre une plante infectée et une plante saine soit par l'intermédiaire des rhizomorphes ou du mycélium présent dans le sol (Denman *et al.*, 2000). Avant la création d'une plantation de poivre, il est recommandé de détruire manuellement du matériel végétal tel que les souches et les racines des arbres potentiellement infectés par *Armillaria* spp. La fumigation du sol et l'utilisation des champignons antagonistes (par exemple Otieno *et al.*, 2003) pourraient aider à préparer le terrain bien qu'elles ne soient pas efficaces à 100 %. La méthode des tranchées est une technique qui est souvent utilisée pour empêcher la progression de la maladie (Worrall, 2004). Mais cette méthode n'est efficace que si ces tranchées sont effectuées bien au-delà de la dernière ligne des arbres malades. Cette méthode a été conseillée aux producteurs de poivre de Penja, et quelques producteurs de la zone de Njombé-Penja l'ont essayé mais malheureusement les résultats n'ont pas été concluants. Ceci pourrait s'expliquer soit par le fait que les tranchées ont été creusées trop près des poivriers déjà malades soit parce que les plantations étant sur des pentes, les eaux de ruissellements auraient transporté les propagules au-delà des tranchées. Le moyen le plus utilisé par les producteurs de poivre de Penja face à cette maladie était la méthode chimique c'est-à-dire l'utilisation des fongicides, malheureusement la lutte chimique n'est pas très efficace pour contrôler la pourriture des racines due à *Armillaria* (Thomidis et Exadaktylou 2012 ; Roux et Coetzee 2016). La pourriture racinaire due à *Armillaria* étant plus récurrente sur le tuteur que sur le poivrier au vu de l'incidence élevée sur tuteur, ceci laisse penser que la propagation de la maladie se fait par contact direct entre la racine du tuteur et celle du poivrier. De ce fait, l'une des propositions soumis auprès des producteurs fut de choisir un autre tuteur vivant moins sensible à l'*Armillaria* ou à défaut utiliser les tuteurs morts bien que cette dernière proposition serait coûteuse pour la majorité des producteurs. Des cas de poivrier présentant la pourriture racinaire due à *Armillaria*

porté par des tuteurs d'apparence saine ont également été observés. Néanmoins on remarque les deux plantes sont des hôtes de *Armillairia*

- **Dépérissement lent ou Jaunissement foliaire**

Sur la base des caractéristiques morphologiques différents microorganismes (*Trichoderma* sp., *Lasiodiplodia* sp., Oomycètes, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp.) ont été morphologiquement identifiés. Ils provenaient du matériel végétal prélevé des plants de poivriers et de la rhizosphère autour des plants présentant les symptômes de jaunissement ou de dépérissement lent. De tous ces microorganismes, les Oomycètes et les *Fusarium* ont été retenus comme potentiels agents pathogènes responsables du dépérissement lent du poivrier. D'après les données de littérature, les microorganismes suivants : *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Fusarium* sp., et les nématodes sont considérés comme les agents pathogènes responsables du dépérissement lent observé dans la majorité des plantations poivrières (Anandaraj, 2000 ; Ravindra *et al.*, 2014). Deux principales espèces de nématodes ont été isolées du sol prélevé dans les plantations de poivre de Penja (*Rotylenchus reniformis.* et *Meloidogyne* sp.). Ces deux espèces ont déjà été isolées et associées aux poivriers dans plusieurs pays (Ramana et Mohandas, 1987 ; Thuy *et al.*, 2012 ; Ravindra *et al.*, 2014). Bien que la présence de l'espèce *Meloidogyne* sp. dans les plantations de poivre se traduit par la présence des galles au niveau des racines, aucune présence de galle n'a été notée au niveau des racines principales des poivriers de Penja. Ceci pourrait trouver une explication dans le fait que la densité moyenne de nématodes par litre de sol (environ 35 nématodes/l de sol) comparé par exemple à celle obtenue par Thuy *et al.*, 2012 (soit 200-250 nématodes/100 g de sol) étant faible. L'utilisation des nématicides pour lutter contre les nématodes qui attaquent la banane-plantain dans les différentes zones d'études pourrait expliquer cette faible densité. Une autre explication pourrait venir du fait que les nématodes infectent préférentiellement les racines secondaires ou tertiaires (radicelles). Cependant dans la zone de prélèvement (c'est -à-dire autour du pied des poivrier) on ne retrouve que les racines principales sur lesquelles les extractions ont été faites, les radicelles sont généralement très loin du pied. Afin de vérifier les nématodes inféodés aux racines, il faudra faire un nouveau prélèvement mais cette fois au niveau des radicelles. Pour se faire, procéder au déterrement de quelques racines afin de prélever les racines secondaires et tertiaires.

L'étude du rôle des microorganismes isolés dans le développement de la maladie a révélé une absence de symptômes suite à l'inoculation des plants de poivrier réalisée avec le

genre *Fusarium*, ce qui laisse penser que ce dernier n'est pas responsable des symptômes observés en champs. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Shahnazi *et al.* (2012) en Malaisie ; Nascimento *et al.* (2015) au Brésil qui ont montré que les *Fusarium* spp. (*Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*) étaient responsables du dépérissement lent et de la pourriture racinaire chez les poivriers respectivement. Le jaunissement de quelques plants de poivriers enregistré par inoculation artificielle des différents isolats de *Phytopythium* sp. semble montrer que ce dernier serait impliqué dans le développement des symptômes précédemment décrits. Le fait que nous n'ayons pas obtenu un 100 % de jaunissement des plants inoculés avec *Phytopythium* sp. pourrait s'expliquer par le fait que d'autres facteurs (climat, microflore du sol) seraient impliqués dans le développement de la maladie. D'après les observations sur l'évolution de la maladie en champs, le jaunissement du poivrier était plus accentué pendant la saison sèche lorsque la plante était soumise à un stress hydrique. Certains auteurs ont montré que la combinaison de certains facteurs comme, le complexe champignon-nématode, la déficience nutritionnelle et le stress hydrique seraient à l'origine de la maladie du dépérissement lent à Kerala en Inde (Nambiar et Sarma, 1979).

Une identification moléculaire a été réalisée afin de confirmer l'identité de l'agent pathogène dont les caractéristiques morphologiques sont semblables à celles de *Phytopythium* sp. Le séquençage des isolats effectué a montré une identité de 93 % avec les séquences ITS de *Phytopythium cucurbitacearum* (CBS748.96). En outre l'analyse phylogénétique a été effectuée indiquant que l'isolat de l'étude appartiendrait au clade *Phytopythium vexans* qui comprend *P. cucurbitacearum*. *Phytopythium* sp. est un nouveau genre appartenant au groupe *vexans* où on retrouve également *Pythium vexans* déjà connu comme agent pathogène du poivrier (Peregrine et Ahmad, 1982 ; Willians *et al.*, 1976). *P. vexans* fait également parti de la collection des microorganismes isolés des échantillons provenant des plantations de poivrier (Poivre de Penja), mais les tests de pathogénicité réalisés avec ces derniers n'ont pas été concluants. Il est connu que le genre *Pythium* comporte 11 clades regroupés suivant des caractéristiques morphologiques spécifiques. Le clade K au quel *P. vexans* appartient est phylogénétiquement distinct des autres *Pythium* spp. Il présente des caractéristiques réunissant à la fois celles des *Phytophthora* et des *Pythium*. A partir d'une étude multigène, Villa *et al.* (2006) ont montré que les *Pythium* appartenant au clade K sont plus proche de *Phytophthora* que de *Pythium* en général. Bala *et al.* (2010) ont proposé un nouveau genre pour ce clade K, *Phytopythium*. On ne parle plus de *Pythium vexans* mais désormais de *Phytopythium vexans*. Une étude de De Cock *et al.* (2015), en comparant plus de 300 espèces de *Phytophthora*, *Phytopythium* et *Pythium* confirme ce nouveau classement.

hyphes et des sporanges de *P. cucurbitacearum* décrites pour la première fois par Takimoto en 1941, la taille des organites de nos Oomycètes semble plus grande ce qui pourrait penser que nous sommes en présence d'une nouvelle espèce. *P. cucurbitaecerum* (*Pythium cucurbitaecerum*), est une espèce du groupe vexans mais considéré comme taxon invalide du fait que son étude taxonomique n'est pas conforme due à l'absence de la description en latin (De cock *et al.*, 2015). Ce qui voudrait dire que des études supplémentaires doivent être effectuées sur cette espèce. Dans la suite de ce travail au lieu de *Phytopythium cucurbitacearum*, on va parler *Phytopythium* sp. Considérer *Phytopythium* sp. comme étant le principal agent pathogène potentiel du dépérissement lent observé dans les plantations du poivre de Penja ne serai pas absurde. En effet, les genres *Pythium* et *Phytophthora* sont connus comme étant les agents pathogènes responsables de cette pathologie dans quelques pays producteurs et *Phytopythium* regroupe les caractéristiques de ces deux genres. Ce nouveau genre, *Phytopythium* sp. est connu comme étant pathogène de certaines plantes à l'instar du pommier (*Malus domestica*) où il est responsable du dépérissement (Jabriri *et al.*, 2020), des plantanes orientaux (*Plantanus orientalis*) où il cause la pourriture racinaire et du collet (Dervis *et al.*, 2020), le soja où en combinaison avec *Pythium* il occasionne la pourriture racinaire (Wrather et Koenning, 2006 ; Feng *et al.*, 2020). Sa pathogénicité étant déjà reconnue sur d'autres cultures, il n'est pas exclu qu'il soit également impliqué dans la maladie du dépérissement lent du poivrier de Penja. L'identification des principaux agents pathogènes responsables des principales maladies indexées et observées dans les plantations de poivre de Penja à savoir la pourriture racinaire blanche et le dépérissement lent a été effectué.

Selon différents auteurs, la maladie du dépérissement lent serait causée par un complexe champignons-nématodes, associé à certains facteurs climatiques et à la déficience nutritionnelle des poivriers. Cette dernière hypothèse a été écarté car les analyses physico-chimiques des sols et des feuilles du poivriers ont montré que ces derniers ne présentaient aucune carence nutritionnelle (Communication personnelle PHP). Nous avons vu plus haut que les nématodes étaient présents dans les plantations bien que la densité ne soit pas conséquente. *Fusarium* sp. connu comme pathogène du poivrier n'a pas présenté agressivité vis-à-vis du poivrier de Penja. Les conditions de test de pathogénicité en pépinières étant différentes de celles en champs pourrait également expliquer le fait que nous n'avons pas eu des résultats concluants vu que nous avons observé que le climat pourrait jouer un rôle dans l'évolution de la maladie. La récurrence d'isolement de *Phytopythium* sp., sa pathogénicité prouvée et le fait qu'il soit considéré comme agent pathogène dans d'autres cultures nous ont conforté dans le fait qu'il serait l'un des protagonistes de la maladie du dépérissement lent. La lutte chimique est la

principale méthode de lutte utilisée par les pipériculteurs du poivre de Penja. Quatre produits chimiques ont été choisis parmi ceux utilisés par ces derniers afin d'évaluer leur efficacité sur *Phytophthium* sp. Connaissant les nombreux inconvénients de l'utilisation des produits chimiques, nous avons testé quelques produits biologiques et naturels afin de proposer aux pipériculteurs d'autres alternatives de lutte.

III.3 Evaluation du potentiel antifongique *in vitro* et *in vivo* des produits chimiques utilisés par les planteurs, *Trichoderma asperellum* et les extraits de plantes contre *Phytophthium* sp.

III.3.1 Efficacité *in vitro* des différents produits chimiques, *T. asperellum* et extraits de plantes

III.3.1.1 Potentiel antagoniste de *Trichoderma asperellum* (PR10, PR11, PR12 et 659-7) contre les isolats de *Phytophthium* sp. (PPP, PPF, et PPK)

- **Confrontation directe entre les différentes souches de *T. asperellum* et les différents isolats de *Phytophthium* sp.**

Le résultat du test de confrontation montre que toutes les souches de *T. asperellum* (PR10, PR11, PR12 et 659-7) ont présenté une activité antagoniste contre les isolats de *Phytophthium* sp. (PPP, PPF, et PPK). Le contact entre *T. asperellum* et *Phytophthium* sp. s'est produit au 2^e jour d'incubation, et on a noté un arrêt de croissance chez les isolats de *Phytophthium* sp (Fig. 34 A-D) par contre les souches de *T. asperellum* ont continué de croître et sporulé (conidiation) par-dessus les isolats de *Phytophthium* sp. Dans toutes les confrontations, aucune zone d'inhibition n'a été observée entre les deux microorganismes (*T. asperellum* et *Phytophthium* sp.). (Fig. 34 E-S)

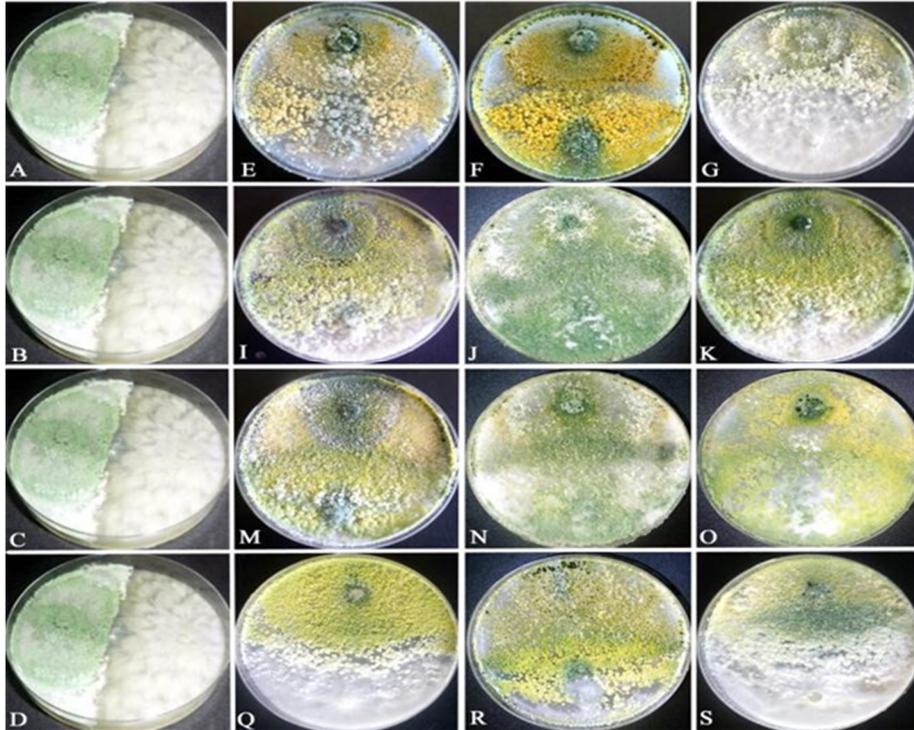


Figure 34 : Résultats d'une confrontation directe entre les souches de *T. asperellum* et les isolats de *Phytophthium* sp. **A-D** : contact entre *Phytophthium* sp. et les souches PR12, PR11, PR10 et 659-7 respectivement ; **E-G** : conidiation et envahissement de la souche PR12 sur les isolats PPF, PPK, PPP, respectivement ; **I-K** : conidiation et envahissement de la souche PR11 sur les isolats PPF, PPK, PPP respectivement ; **M-O** : conidiation et envahissement de la souche PR10 sur les isolats PPF, PPK, PPP respectivement ; **Q-S** : conidiation et envahissement de la souche 659-7 sur les isolats PPF, PPK, PPP respectivement.

L'antagonisme des souches de *T. asperellum* a été étudié en suivant la méthode décrite par Bell *et al.* (1982). Une espèce est considérée comme hautement antagoniste si la note moyenne était ≤ 2 , mais pas hautement antagoniste si la note moyenne ≥ 3 . On peut dire que toutes les souches de *T. asperellum* ont été antagonistes contre les isolats de *Phytophthium* sp. et cela à des degrés variables. Le tableau XXXI ci-dessous montre que 75% des combinaisons évaluées ont présenté un degré d'antagonisme élevé avec des indices ≤ 2 contre 25 % ayant un antagonisme moyen avec des indices compris entre 2 et 3 ($2 > \text{indices} \leq 3$). Une différence significative a été notée entre le degré d'antagonisme des différentes souches de *T. asperellum* ($P=0,0025$; $F(2) = 17,13$) et les souches PR10 et PR12 ont présenté un antagonisme élevé contre tous les isolats de *Phytophthium* sp. PR11 a montré un antagonisme élevé pour les isolats PPP et PPK par contre on a observé un antagonisme modéré avec PPF. La souche 659-7 a montré un antagonisme moyen avec les isolats PPP et PPF et un antagonisme élevé avec l'isolat PPK.

Tableau XXX : Indice du degré d'antagonisme associé de *T. asperellum* sur *Phytophthium* sp.

Souches de <i>T. asperellum</i>	Souches de <i>Phytophthium</i> sp.		
	PPP4	PPF	PPK
PR10	2,0 ^a	2,0 ^a	1,8 ^a
PR11	1,6 ^a	2,3 ^b	1,2 ^a
PR12	1,7 ^a	1,4 ^a	1,2 ^a
659-7	2,3 ^b	2,4 ^b	1,3 ^a

Classification proposée par Bell *et al.*, 1982 ; a- hautement antagoniste ; b- antagoniste moyen

➤ **Conidiation des souches de *T. asperellum* sur le mycélium de *Phytophthium* sp.**

L'analyse du Tableau XXXII a montré que toutes les combinaisons *T. asperellum*-*Phytophthium* sp. ont présenté une production de conidies car tous les indices > 0. Les plus fortes conidiations ont été observées sur l'isolat PPK avec trois souches de *Trichoderma* (PPR11, PP12, 659-7). Les combinaisons PPP-*T. asperellum*, PPF-*T. asperellum* ont présenté des conidiations faibles. Indépendamment des isolats de *Phytophthium* sp. aucune différence significative n'a été observée entre les conidiations des différentes souches de *T. asperellum* ($P=0,42$)

Tableau XXXI : Evaluation de la production des conidies de *T. asperellum* sur le mycélium de *Phytophthium* sp.

Souches de <i>T. asperellum</i>	Souches de <i>Phytophthium</i> sp		
	PPP	PPF	PPK
PR10	1,0	1,0	1,9
PR11	1,8	0,7	2,7
PR12	1,1	1,6	2,6
659-7	1,1	0,9	2,4

➤ **Mécanisme d'action des vitesses du mycoparasitisme nécrotrophique des souches de *T. asperellum* in vitro**

L'absence de croissance des isolats de *Phytophthium* sp. dans le milieu sélectif traduit le mycoparasitisme nécrotrophique des différentes souches de *T. asperellum* (PR10, PR11, PR12, 659-7). D'après le Tableau XXXIII, la vitesse de mycoparasitisme des souches de *T. asperellum* a varié d'un isolat à un autre. La souche PR11 a montré une plus grande vitesse de mycoparasitisme sur les isolats PPP et PPK comparé aux trois autres souches (PR10,

PR12, 659-7). On a noté une variabilité significative entre les vitesses du mycoparasitisme des différentes souches de *T. asperellum* sur les isolats PPP et PPF par contre aucune différence n'a été noté avec l'isolat de PPK.

Tableau XXXII : Vitesses moyennes de mycoparasitisme des souches de *T. asperellum*

Souches de <i>T. asperellum</i>	Vitesse de mycoparasitisme (mm j ⁻¹)		
	PPP	PPF	PPK
PR10	7,02 ^{ab}	9,76 ^b	8,28 ^a
PR11	7,13 ^b	9,54 ^{ab}	9,16 ^a
PR12	5,98 ^{ab}	10,31 ^b	8,08 ^a
659-7	5,56 ^a	8,08 ^a	8,05 ^a
Valeur de <i>P</i>	0,020	0,004	0,75

Pour chaque isolat de *Phytophthium*, les valeurs de la vitesse de mycoparasitisme affectées de la même lettre en exposant ne sont pas significativement différents entre les souches de *Trichoderma* au seuil de probabilité 5%.

III.3.1.2 Potentiel antifongique des extraits de plantes (*Chromoleana odorata*, *Phyllanthus amarus*, *Commelina benghalensis*) contre *Phytophthium* sp. (PPP, PPF, PPK)

➤ Rendement d'extraction des trois plantes

Le Tableau XXXIV ci-dessous présente les caractéristiques des extraits obtenus des différentes plantes utilisées.

Tableau XXXIII : Caractéristiques des extraits aux solvants des plantes utilisés

Espèces végétales	Famille	Partie de la plante	Rendement (% p/p)	
			EA	EE
<i>C. odorata</i>	Asteraceae	Les feuilles	5,8	5,3
<i>P. amarus</i>	Phyllanthaceae	Plante entière	1,3	2,3
<i>C. benghalensis</i>	Commelinaceae	Plante entière	3,9	3,3

EA/ : extrait aqueux ; EE : extrait hydroéthanolique

En comparant le rendement des différents extraits de plantes, il ressort que *C. odorata* présente le rendement plus élevé quel que soit le type d'extraits.

➤ **Efficacité des extraits hydroéthanoliques (EE) de *Chromoleana odorata*, *Phyllanthus amarus*, *Commelina benghalensis* sur *Phytophthium* sp.**

Les résultats de l'activité antifongique des extraits hydro éthanoliques des trois plantes à savoir *P. amarus* ; *C. benghalensis* et de *C. odorata* testées sur trois isolats de *Phytophthium* sp. (PPF, PPK, PPP) sont présentés dans le Tableau XXXV. On note que tous les EE des différentes plantes utilisées ont présenté des activités inhibitrices ce à partir de la plus faible concentration 1250 µg/mL. Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale de *Phytophthium* sp. augmente avec la concentration des extraits (Fig. 35). Quel que soit l'isolat sur lequel les extraits ont été testés, on a noté que l'EE de *C. odorata* a été la plus active avec une inhibition totale (100 %) observée à partir de la concentration 5000 µg/mL. L'extrait de *P. amarus* a montré une inhibition de 100 % à 10000 µg/mL uniquement avec l'isolat PPP.

Tableau XXXIV : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de PPF, PPK, PPP en présence des extraits hydroéthanolique de *P. amarus* ; *C. benghalensis* et de *C. odorata*

<i>Phytophthium</i> sp. /Valeur de P	Plantes	Concentrations des extraits hydroéthanolique (µg/mL)				
		Pourcentages d'inhibition (%)				
		0	1250	2500	5000	10000
PPF <i>P</i> <0,001	<i>P. amarus</i>	0 ± 0,0 ^a	7,0 ± 2,6 ^{ab}	19,4 ± 0,9 ^{ab}	21,5 ± 1,7 ^b	63,5 ± 1,7 ^c
	<i>C. benghalensis</i>	0 ± 0,0 ^a	6,6 ± 0,2 ^{ab}	13,9 ± 0,3 ^{ab}	25,4 ± 0,0 ^b	58,7 ± 0,3 ^c
	<i>C. odorata</i>	0 ± 0,0 ^a	23,1 ± 2,8 ^b	72,6 ± 0,8 ^c	100 ± 0,0 ^d	100 ± 0,0 ^d
PPK <i>P</i> <0,001	<i>P. amarus</i>	0 ± 0,0 ^a	8,5 ± 3,3 ^{ab}	26,2 ± 1,6 ^b	43,1 ± 0,8 ^c	75,0 ± 2,0 ^d
	<i>C. benghalensis</i>	0 ± 0,0 ^a	4,4 ± 3,8 ^a	2,0 ± 0,8 ^a	8,6 ± 0,8 ^{ab}	24,4 ± 1,7 ^b
	<i>C. odorata</i>	0 ± 0,0 ^a	24,5 ± 3,1 ^b	75,0 ± 0,8 ^d	100 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^e
PPP <i>P</i> <0,001	<i>P. amarus</i>	0 ± 0,0 ^a	11,2 ± 7,9 ^{abc}	29,7 ± 0,3 ^{cd}	54,1 ± 0,0 ^e	100 ± 0,0 ^g
	<i>C. benghalensis</i>	0 ± 0,0 ^a	7,2 ± 0,9 ^{ab}	12,4 ± 0,7 ^{abc}	19,5 ± 1,1 ^{abc}	34,6 ± 0,3 ^d
	<i>C. odorata</i>	0 ± 0,0 ^a	24,4 ± 3,1 ^{bcd}	72,6 ± 0,8 ^f	100 ± 0,0 ^g	100 ± 0,0 ^g

Les chiffres affectés des mêmes lettres pour chaque isolat ne sont pas significativement différents au seuil 5 %

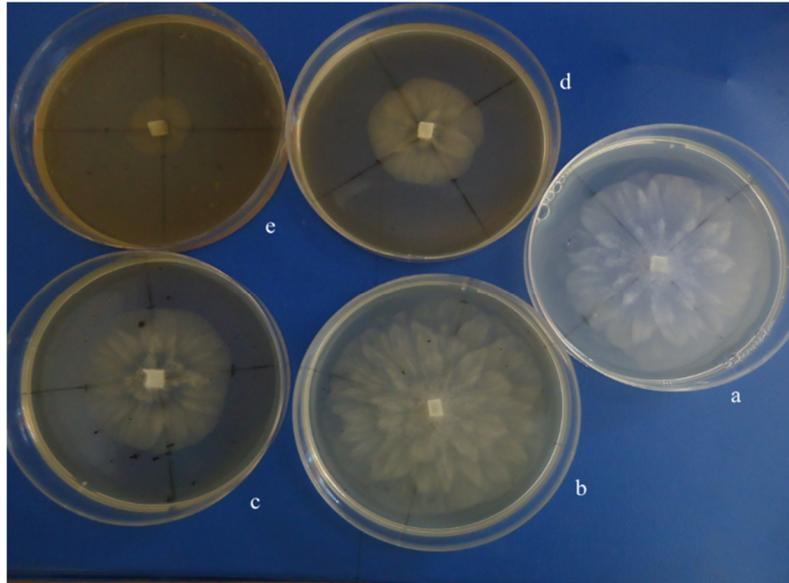


Figure 35 : Croissance de *Phytopythium* sp. (PPK) en présence de l'extrait hydroéthanolique de *P. amarus* a : témoin ; b : 1250µg/mL ; c : 2500µg/mL ; d : 5000µg/mL ; e : 10 000 µg/mL

➤ **Efficacité des extraits aqueux (EA) *Chromoleana odorata*, *Phylantus amarus*, *Commelina benghalensis* sur *Phytopythium* sp.**

Le potentiel antifongique des extraits aqueux de trois plantes : *P. amarus* ; *C. benghalensis* et de *C. odorata* a été testé sur trois isolats de *Phytopythium* sp. (PPF, PPK, PPP). Les résultats sont présentés dans les tableaux XXXVI ci-dessous.

Tableau XXXV : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de PPF, PPK, PPP en présence des extraits aqueux de *P. amarus* ; *C. benghalensis* et de *C. odorata*

<i>Phytopythium</i> sp. / Valeur de P	Plantes	Concentrations des extraits aqueux (µg/mL)				
		Pourcentage d'inhibition (%)				
		0	1250	2500	5000	10000
PPF <i>P</i> <0,001	<i>P.amarus</i>	0 ± 0,0 ^a	4,0 ± 1,0 ^b	10,7 ± 0,1 ^{cd}	14,8 ± 0,0 ^e	36,2 ± 0,4 ^f
	<i>C. benghalensis</i>	0 ± 0,0 ^a	8,0 ± 2,3 ^c	-9,1 ± 1,7 ^a	-4,1 ± 1,7 ^a	9,7 ± 0,3 ^{cd}
	<i>C. odorata</i>	0 ± 0,0 ^a	8,5 ± 3,3 ^c	-7,6 ± 0,8 ^a	3,3 ± 0,8 ^b	11,9 ± 0,8 ^d
PPK <i>P</i> <0,001	<i>P.amarus</i>	0 ± 0,0 ^a	8,9 ± 4,1 ^{cd}	28,4 ± 2,5 ^e	30,4 ± 1,1 ^e	74,0 ± 1,1 ^f
	<i>C. benghalensis</i>	0 ± 0,0 ^a	7,2 ± 0,9 ^{bc}	-7,9 ± 0,3 ^a	-4,4 ± 0,0 ^a	4,8 ± 1,3 ^b
	<i>C. odorata</i>	0 ± 0,0 ^a	4,6 ± 3,5 ^b	4,9 ± 0,6 ^b	5,1 ± 0,3 ^b	11,1 ± 0,9 ^d
PPP <i>P</i> <0,001	<i>P.amarus</i>	0 ± 0,0 ^a	6,6 ± 0,2 ^{bc}	23,3 ± 0,6 ^e	46,4 ± 0,9 ^f	100 ± 0,0 ^g
	<i>C. benghalensis</i>	0 ± 0,0 ^a	4,9 ± 3 ^b	1,6 ± 0,7 ^a	5,7 ± 0,8 ^{bc}	9,9 ± 1,0 ^c
	<i>C. odorata</i>	0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,3 ^{bc}	6,4 ± 5,8 ^{bc}	15,1 ± 1,4 ^d

Les chiffres affectés des mêmes lettres pour chaque isolat ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité 5 %

De ce tableau, il ressort qu'indépendamment des isolats, la concentration 10000 µg/mL semble être la dose présentant la plus grande inhibition de la croissance radiale des isolats. De

manière générale, l'EA de *P. amarus* a été la plus active avec une inhibition de 100 %, 74 % et 36,2 % à 10000 µg/mL pour les isolats PPP, PPK, PPF respectivement. On note qu'aux concentrations de 5000 et 2500 µg/mL la plante *C. benghalensis* a stimulé la croissance des isolats PPF et PPK.

III.3.1.3 Potentiel antifongique de quatre Fongicides de synthèse contre les isolats de *Phytophthium* sp.

Quatre fongicides de synthèse (Banko® plus, Ridomil Gold® 66 WP, Scooter® EC et Kocide® 2000) ont été testés dans le cadre de ce travail sur trois isolats de *Phytophthium* sp. (PPF, PPK, PPP). Il ressort des tableaux XXXVII, XXXVIII, XXXIX que les fongicides Scooter® EC et Ridomil Gold® 66 WP ont totalement inhibé la croissance mycélienne des trois isolats (PPF, PPK, PPP) à 1000 et 100 µg/mL. La concentration 1000 µg/mL a été la plus active car tous les fongicides de synthèse à cette concentration ont inhibé à 100 % la croissance mycélienne des isolats. Le fongicide de synthèse Kocide® 2000 à la concentration 10⁻³ µg/mL a stimulé la croissance microbienne des trois isolats

Tableau XXXVI : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat PPF en présence des quatre fongicides de synthèse

	Concentrations des fongicides (µg/mL)							
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
Banko® plus	0,0 ^a ± 0,0	3,1 ^b ± 1,8	11,3 ^b ± 0,9	9,8 ^b ± 1,8	37,1 ^b ± 3,2	78,0 ^b ± 19,1	100 ^b ± 0,0	100 ^a ± 0,0
Ridomil Gold® 66 WP	0,0 ^a ± 0,0	46,6 ^c ± 3,2	65,8 ^c ± 0,0	72,0 ^c ± 0,0	89,1 ^c ± 0,2	92,8 ^b ± 0,7	100 ^b ± 0,0	100 ^a ± 0,0
Scooter® EC	0,0 ^a ± 0,0	85,8 ^d ± 0,3	86,4 ^d ± 0,5	88,2 ^d ± 0,5	88,9 ^c ± 0,3	90,6 ^b ± 0,9	100 ^b ± 0,0	100 ^a ± 0,0
Kocide® 2000	0,0 ^a ± 0,0	-2,4 ^a ± 0,1	2,9 ^a ± 1,7	3,9 ^a ± 0,8	5,4 ^a ± 0,8	5,4 ^a ± 0,8	48,3 ^a ± 2,2	100 ^a ± 0,0
Valeur de P	<0,001							

Les chiffres affectés des mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité 5 % pour une même concentration

Tableau XXXVII : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat PPK en présence de quatre fongicides de synthèse

	Concentrations des fongicides (µg/mL)							
	Pourcentages d'inhibition (%)							
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
Banko® plus	0,0 ^a ±0,0	6,8 ^a ±0,8	8,7 ^a ± 7,5	13,0 ^b ± 1,4	28,5 ^b ± 2,2	59,1 ^b ± 2,3	88,3 ^b ± 0,5	100 ^a ± 0,0
Ridomil Gold®66 WP	0,0 ^a ± 0,0	23,9 ^b ±5,1	53,4 ^b ± 1,2	63,0 ^c ± 0,9	88,1 ^c ± 4,4	92,1 ^c ± 3,1	100 ^c ± 0,0	100 ^a ± 0,0
Scooter® EC	0,0 ^a ± 0,0	84,3 ^c ±1,2	86,7 ^c ± 0,5	86,1 ^d ± 0,8	89,4 ^c ± 0,2	90,6 ^c ± 1,1	100 ^c ± 0,0	100 ^a ± 0,0
Kocide® 2000	0,0 ^a ± 0,0	2,9 ^a ± 0,4	5,9 ^a ± 1,1	2,3 ^a ± 2,4	6,4 ^a ± 0,4	8,3 ^a ± 0,7	49,1 ^a ± 1,1	100 ^a ± 0,0
Valeur de P	<0,001							

Les chiffres affectés des mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité 5 % pour une même concentration

Tableau XXXVIII : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat PPP en présence des quatre fongicides de synthèse

	Concentrations des fongicides (µg/mL)							
	Pourcentage d'inhibition (%)							
	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
Banko® plus	0,0 ^a ± 0,0	2,6 ^a ± 1,3	16,7 ^c ± 0,8	9,2 ^b ± 1,3	28,1 ^b ± 1,5	58,2 ^b ± 1,4	89,2 ^b ±0,3	100 ^a ±0,0
Ridomil Gold®66 WP	0,0 ^a ± 0,0	45,4 ^b ±2,5	63,1 ^b ± 1,4	73,5 ^c ± 1,6	87,4 ^d ± 0,3	93,6 ^c ± 0,5	100 ^c ± 0,0	100 ^a ±0,0
Scooter® EC	0,0 ^a ± 0,0	88,7 ^c ±1,1	90 ^d ± 0,7	90,4 ^d ± 0,9	90,4 ^c ± 1,1	91,4 ^c ± 1,7	100 ^c ±0,0	100 ^a ±0,0
Kocide® 2000	0,0 ^a ± 0,0	-1,2 ^a ± 1,2	3,5 ^a ± 2,1	1,9 ^a ± 1,5	1,9 ^a ± 1,5	10,4 ^a ± 2,1	51,9 ^a ±0,8	100 ^a ±0,0
Valeur de P	<0,001							

Les chiffres affectés des mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité 5 % pour une même concentration

➤ **Paramètres antifongiques : CMI et CI₅₀**

Le tableau XL représente la nature de l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *Phytophthium* sp. par les extraits de plantes et par les fongicides de synthèse ainsi que l'CI₅₀ des produits efficaces.

Tableau XXXIX : Nature de l'inhibition de la croissance mycélienne des trois isolats de *Phytophthium* sp. (PPP, PPK, PPF) par les fongicides de synthèse et des extraits de plantes

Concentration minimale inhibitrice (CMI) µg/mL	Nature de l'inhibition	Type d'extraits	Espèces végétales et fongicides de synthèse	CI ₅₀ (µg/mL)		
				<i>Phytophthium</i> sp.		
				PPK	PPF	PPP
10000	Fongistatique	EE	<i>P. amarum</i>	5154,7	8643,7	3647,5
10000	Fongistatique	EA		5902,0	3.5x10 ⁴	4046,7
10000	Fongicide	EE	<i>C. odorata</i>	1780,3	1862,1	1825,5
5000	Fongicide	EE		8,4 x10 ⁹	5,1 x 10 ⁶	4,0 x 10 ⁶
1000	Fongicide	/	Banko® plus	1,82	1,20	2,39
1000	Fongicide	/	Kocide® 2000	68,42	73,84	63,29
1000	Fongicide	/	Ridomil Gold® 66	0,01	0,0003	0,0005
100	Fongicide	/	WP			
1000	Fongicide	/	Scooter ® EC	2,04 x10 ⁻¹⁵	9,81x10 ⁻¹⁷	1,12x10 ⁻²²
100	Fongistatique	/				

Il ressort de ce tableau que l'extrait hydro éthanolique de *P. amarum* et *C. odorata* à 10000 µg/mL ont présenté des natures différentes d'inhibition bien qu'ayant tous les deux totalement inhibés la croissance mycélienne des isolats. L'extrait de *P. amarum* a été fongistatique et celle de *C. odorata* a été fongicide. Le seul extrait aqueux ayant inhibé à 100 % la croissance mycélienne de l'un des isolat (PPP) est celui de *P. amarum* à 10000 µg/mL a été fongistatique. Les extraits hydroéthanoliques de *C. odorata* à 10000 et 5000 µg/mL ont été fongicides contre la croissance mycélienne de tous les isolats. Les fongicides à 1000 µg/mL ont été tous fongicides contre tous les isolats. À 100 µg/mL le fongicide Ridomil Gold® 66 WP a été plus actif que Scooter® EC à la même concentration en étant fongicide et l'autre fongistatique. En se référant aux valeurs de CI₅₀ les valeurs des EE ont été plus basses que celles des EA et ce sont révélées être les plus efficaces aux faibles concentrations. En comparant celles des EE *C. odorata* et *P. amarum*, les EE de *C. odorata* sont les plus efficaces. Parmi les fongicides Scooter ® EC est celui ayant présenté les plus faibles CI₅₀.

III.3.1.4 Profil phytochimique des extraits aqueux et hydro éthanoliques des différentes plantes utilisées.

Des analyses qualitatives d'un certains nombres de composés métaboliques ont été réalisées sur les extraits aqueux et hydro éthanoliques des trois plantes. D'après le Tableau XLI, Les stérols sont absents dans les extraits aqueux et hydroéthanoliques de *C. benghalensis* et *C.*

odorata. Les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes sont présents dans tous les extraits de *P. amarus*, *C. benghalensis* et *C. odorata*.

Tableau XL : Composition en métabolites secondaires des extraits de plantes aux solvants des trois plantes utilisées

Métabolites secondaires	Types d'extraits	<i>P. amarus</i>	<i>C. Benghalensis</i>	<i>C. odorata</i>
Alcaloïdes	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	+	+
Phénols	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	+	+
Flavonoïdes	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	+	+
Stérols	Hydroéthanolique	+	-	-
	Aqueux	+	-	-
Tanins hydrolysables	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	-	+
Tannins condensés	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	-	+
Glycosides	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	+	+
Coumarines	Hydroéthanolique	+	+	+
	Aqueux	+	-	+

+ : Présent ; - : Absent

III.3.1.5 Dosage phytochimique de quelques groupes de composés dans les extraits aqueux et hydro éthanoliques de *C. odorata*.

Le Tableau XLII nous renseigne sur la quantité des composés tels que les phénols totaux, les flavonoïdes totaux les tanins totaux, les alcaloïdes totaux, les protéines totales et les polysaccharides dans les extraits aqueux et hydroéthanolique de *C. odorata*

Tableau XLI : Quantité de groupe de composés des extraits de *C. odorata* (aqueux et hydro éthanolique)

Groupes de composés	EE de <i>C. odorata</i>	EA de <i>C. odorata</i>
Phénols totaux (mg GAE/g)	118,3 ± 7,8	38,0 ± 1,5
Flavonoïdes totaux (mg CE/g)	12,0 ± 1,0	39,7 ± 0,6
Tanins totaux (mg CE/g)	3,8 ± 0,6	8,8 ± 2,8
Alcaloïdes totaux (mg CE/g)	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Les protéines totales (BSA mg/g)	8,5 ± 0,2	3,0 ± 0,5
Polysaccharides totaux (glucose mg/g)	19,0 ± 2,6	21,0 ± 0,5

Il ressort de ce tableau que l'extrait hydroéthanolique de *C. odorata* est au moins trois fois plus riche en phénols totaux. La quantité des flavonoïdes totaux, des tanins totaux et les polysaccharides totaux a été plus élevée dans l'extrait aqueux que dans l'extrait hydroéthanolique.

III.3.1.6 Identification et quantification des composés phénoliques contenus dans les extraits aqueux et hydro éthanoliques de *C. odorata*

L'identification des composés phénoliques présents dans les extraits (aqueux et hydro éthanolique) de *C. odorata* a été effectuée en comparant les temps de retentions et les spectres de masses à ceux des standards connus. Les composés restants ont été identifiés en comparant aux données de la littérature les mesures de masses précises $[M-H]^-$ des ions pseudo-moléculaires et d'ions fragments. Le chromatogramme de base des extraits de *C. odorata* obtenu à partir de la méthode LC/ESI/MS/MS est présenté en Annexe 9. Trente composés ont été identifiés et classés en trois groupes : les flavonoïdes, les dérivés de l'acide hydroxycinnamique et de l'acide hydroxybenzoïque. Tous ces composés ont été identifiés en interprétant leurs spectres (MS/MS) obtenus. Ces composés sont présentés dans le tableau XLIII.

La quantification des composés est présentée dans le tableau XLIV et la figure 36 et exprimée en gramme de composé par litre de la matière sèche. On note que les flavones et les flavonols sont les composés majoritaires dans EE respectivement 85,6 % et 10,9 %. Dans EA, les composés majoritaires sont les flavones (43,9 %) et les acides hydroxycinnamiques (30,0 %). L'EE contient plus de composés phénoliques que l'EA soit $282,7 \pm 6$ mg/L et $162,5 \pm 5,1$ mg/L respectivement. Une autre différence entre les deux extraits se trouve au niveau de la présence du flavanone dans l'EA (Tableau XLIV et Fig. 36).

Tableau XLII : Spectre de masse des composés phénoliques identifiés dans les extraits aux solvants (hydro-éthanolique et aqueux) de *C. odorata*

Pic	TR	Composés	[M-H] ⁻ m/z	MS ² ion fragments (m/z) (Intensité, %)	<i>C. odorata</i>	
					EE	EA
9	9	Acide Vanilique-O-hexoside	329	167 (100%), 152 (20%)	+	-
	9,7	Acide Protocatechique-O-hexoside	315	153 (100%), 109 (14%)	+	-
10	10,1	Acide Protocatechique	153	109 (100%)	-	+
	10,1	Acide Caféique-hexoside	341	179 (100%), 135 (22%)	+	-
11	11	Lutéoline-6-C-hexoside-8-C-hexoside	609	489 (100%), 399 (26%), 519 (22%), 369 (19%)	+	-
	11,4	Naringénine-O-hexoside	433	271 (100%)	-	+
	11,6	Isomère Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside	593	473 (100%), 353 (95%), 383 (26%), 503 (18%)	+	-
	11,6	Isomère Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside	593	473 (100%), 353 (53%), 383 (44%), 503 (27%)	-	+
	11,8	Lutéoline-C-hexoside-C-pentoside	579	459 (100%), 489 (34%), 399 (30%), 369 (26%)	+	-
12	11,8	Naringénine-O-hexoside	433	271 (100%)	-	+
	12,1	Lutéoline-6-C-pentoside-8-C-pentoside	549	459 (100%), 399 (31%), 489 (24%), 369 (2%)	+	-
	12,2	Lutéoline-O-hexoside-C-pentoside	579	417 (100%), 459 (34%), 399 (30%), 369 (26%), 459 (7%), 519 (5%), 489 (4%)	+	-
	12,2	Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside isomer	593	503 (100%), 473 (99%), 353 (95%), 383 (63%)	-	+
	12,3	Isomère Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside	593	473 (100%), 327 (53%), 357 (28%), 503 (18%)	+	-
	12,4	Apigénine-C-hexoside-C-pentoside	563	473 (100%), 353 (54%), 443 (32%), 503 (40%), 383 (35%)	+	-
	12,4	Apigénine-O-rhamnoside	415	269 (100%)	-	+
	12,6	Lutéoline-6-C-pentoside-8-C-pentoside	549	459 (100%), 399 (39%), 489 (23%), 369 (13%)	+	-
	12,6	Apigénine-6-C-pentoside-8-C-pentoside	533	443 (100%), 353 (30%), 383 (26%), 473 (14%)	+	-
	12,7	Lutéoline-C-hexoside	447	327 (100%), 357 (91%)	+	-
	12,7	Apigénine-C-hexoside-C-pentoside	563	443 (100%), 473 (42%), 353 (41%), 383 (11%), 503 (7%)	+	-
13	13,2	Apigénine-6-C-pentoside-8-C-pentoside	533	443 (100%), 383 (55%), 353 (23%), 473 (43%)	+	-
	13,5	Quercétine-3-O-rutinoside	609	301 (100%)	-	+
	13,6	Apigénine-C-hexoside	431	311 (100%), 341 (3%)	+	-
	13,8	Lutéoline-3-O-rutinoside	593	285 (100%), 447 (21%)	+	-
14	14	Isomère Acide Coumaroyl-ferulique	357	313 (100%), 163 (72%), 193 (62%), 119 (35%), 134 (15%), 149 (13%), 178 (12%)	-	+

14,1	Luteolin-3-O-hexoside	447	285 (100%)	+	-
14,2	Lutéoline-C-pentoside	417	357 (100%), 327 (40%) 313 (100%), 193 (5%), 134 (4%), 163 (2%), 119 (2%)	+	-
14,6	Isomère AcideCoumaroyl-ferulic	357		-	+
14,7	Dérivé de Myricetin-3-O-(6'' galloyl) glycoside	691	335 (100%), 631 (42%), 273 (20%), 317 (14%)	+	-
17	17,1 Liquiritin isomer	417	255 (100%)	-	+

+ : présent ; - : absent ; TR = temps de rétention en min ; [M-H]⁻= pseudo ions moléculaires ; MS²= ions fragmentés (intensité relative des pics), EA= extrait aqueux ; EE= extrait hydroéthanolique

Tableau XLIII : Données quantitatives des différents composés phénoliques (Acide hydroxybenzoïque ; Acide hydroxycinnamique ; Flavones ; Flavonol ; Flavanones) identifiés dans les extraits aux solvants (hydro-éthanolique et aqueux) de *C. odorata*

Classe	Composés	<i>Chromoleana odorata</i>	
		Extrait hydro-éthanolique(mg/L)	Extrait aqueux(mg/L)
Acide Hydroxybenzoïque^a			
	9 Acide Vanilique-O-hexoside	4,1 ± 0,2	n.d.
	9,7 Acide Protocatechique-O-hexoside	4,1 ± 0,2	n.d.
	10,1 Acide Protocatechique	n.d.	21,4 ± 0,2
Total		8,2 ± 0,3	21,4 ± 0,3
% d'abondance		2,9	13,2
Acide Hydroxycinnamique^b			
	10,1 Acide Cafeique-hexoside	1,5 ± 0,1	n.d.
	14 Isomère d'acide Coumaroyl-ferulique	n.d.	37,48±0,48
	14,6 Isomère d'acide Coumaroyl-ferulique	n.d.	11,3 ± 0,4
Total		1,5 ± 0,1	48,8 ± 0,9
% d'abondance		0,5	30,0
Flavones^c			
	11 Lutéoline-6-C-hexoside-8-C-hexoside	3,2 ± 0,0	n.d.
	11,6 Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside isomère	8,5 ± 0,2	n.d.
	11,8 Lutéoline-C-hexoside-C-pentoside	29,1 ± 0,5	n.d.
	12,1 Lutéoline-6-C-pentoside-8-C-pentoside	2,1 ± 0,3	n.d.
	12,2 Lutéoline-O-hexoside-C-pentoside	3,7 ± 0,5	n.d.
	12,3 Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside isomère	1,6 ± 0,0	n.d.

	12,4	Apigénine-C-hexoside-C-pentoside	85,2 ± 1,5	n.d.
	12,6	Lutéoline-6-C-pentoside-8-C-pentoside	14,1 ± 0,0	n.d.
	12,6	Apigénine-6-C-pentoside-8-C-pentoside	2,5 ± 0,7	n.d.
	12,7	Lutéoline-C-hexoside	4,8 ± 0,1	n.d.
	12,7	Apigénine-C-hexoside-C-pentoside	9,3 ± 0,6	n.d.
	13,2	Apigénine-6-C-pentoside-8-C-pentoside	72,2 ± 0,1	n.d.
	13,6	Apigénine-C-hexoside	1,1 ± 0,0	n.d.
	13,8	Lutéoline-3-O-rutinoside	2,1 ± 0,0	n.d.
	14,1	Lutéoline-3-O-hexoside	0,9 ± 0,0	n.d.
	14,2	Lutéoline-C-pentoside	1,7 ± 0,0	n.d.
	11,6	Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside isomère	n.d.	49,6±2,7
	12,2	Apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside isomère	n.d.	6,8 ± 0,2
	12,4	Apigénine-O-rhamnoside	n.d.	14,9 ± 0,3
Total			242,0 ± 4,7	71,3 ± 3,2
% d'abondance			85,6	43,9
Flavonol^d				
	14,7	Myricétine-3-O-(6'' galloyl) glycoside dérivé	30,9 ± 0,9	n.d.
	13,5	Quercétine-3-O-rutinoside	n.d.	2,5 ± 0,0
Total			30,9 ± 0,9	2,5 ± 0,0
% d'abondance			10,9	1,5
Flavanones^e				
	11,4	Naringénine-O-hexoside	n.d.	10,1 ± 0,4
	11,8	Naringénine-O-hexoside	n.d.	5,1 ± 0,4
	17,1	Liquiritine isomère	n.d.	3,4 ± 0,1
Total			0	18,6 ± 0,9
% d'abondance			0	11,4

Les valeurs sont exprimées en mg/L de la matière sèche et représentent la moyenne ± l'écart type des trois répétitions (n.d. non détecté). **a** : quantifié comme équivalent d'acide gallique (dérivé d'acide gallique) ou équivalent de acide protochatechique (dérivé d'acide protochatechique) ; **b** : quantifié comme équivalent d'acide caféique (dérivé d'acide caféique) ou équivalent d'acide coumarique (dérivé d'acide coumarique) ou équivalent d'acide férulique (dérivé d'acide férulique) ; **c**, **d**, **e** : déterminé comme équivalent de quercétine-3- glucoside

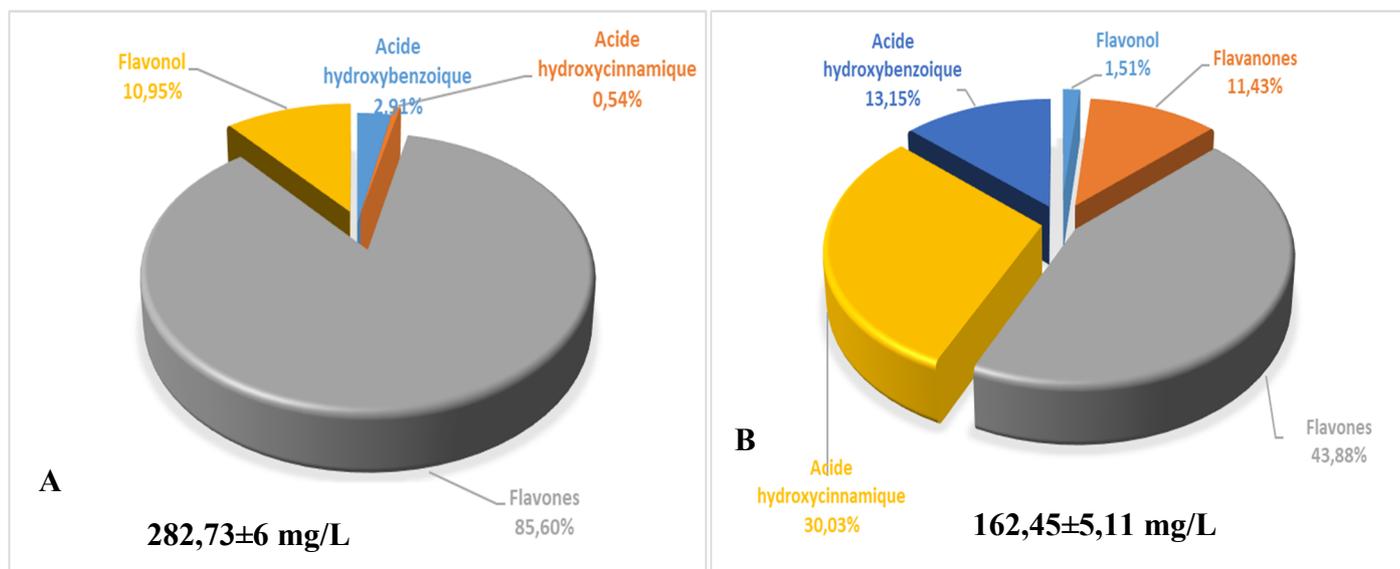


Figure 36 : Récapitulatif des différentes classes de composés phénoliques identifiées chez *C. odorata*. Pourcentage global des Acide hydroxy benzoïque ; Acide hydroxy cinnamique ; Flavones ; Flavonol ; Flavanones dans l'extrait hydro-éthanolique (A) et aqueux (B) de *C. odorata*. Quantités totales des composés phénoliques déterminées à partir de la spectrométrie de masse

III.3.2 Evaluation *in vivo* de l'efficacité des produits chimiques biologiques et extrait de plante sur la maladie de dépérissement lent (jaunissement)

Les tests ont été réalisés deux fois : de Novembre 2016 à Février 2017 et de juin 2017 à Novembre 2017. Différents produits biologiques (*T. asperellum* et *C. odorata*) et chimiques (Ridomil Gold® 66 WP, Scooter® EC) ont été testés *in vivo* sur la maladie de dépérissement lent du poivrier.

III.3.2.1 Caractéristiques climatiques

Les données climatiques mensuelles de la zone d'étude au moment de l'essai sont présentées dans le tableau XLV suivant :

Tableau XLIV : Données climatiques de la zone de Njombé pendant la période de l'essai

		Saison1			Saison2					
		Nov.	Dec.	Jan.	Juin	Juil.	Aout	Sept.	Oct.	Nov.
Pluviométrie	Nombre de jours de pluie	10	01	00	21	27	28	21	24	8
	Qté de pluie (mm)	87,1	01	00	406,5	369,9	435,7	377,9	354,5	40,5
Température (°C)	Max	31,7	32,8	33,9	30,7	29,7	29,4	30,2	31,2	31,4
	Min	22,9	22,6	23,4	22,5	22,7	22,7	22,6	22,3	23,0
	Moy	26,4	26,7	27,6	25,8	25,5	25,4	25,6	25,9	26,4
Humidité relative (%)	Max	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Min	66	53	50	71	73	75	70	66	68
	>90	16	13	12	17	18	18	17	16	15
	<60	0	3	4	0	0	0	0	0	0

Source : Base de données interne PHP (2018).

N.B. la différence observée entre le nombre de mois de la Saison 1 et la Saison 2 est due au fait que l'essai de la 1^{ère} période n'a pas été conduit jusqu'à la fin. De ce fait les données présentées sont celles des trois mois d'observations.

Le Tableau XLV montre que durant la Saison 2 il y a eu abondance de pluie comparée à la 1^{ère} période où les pluies étaient presque inexistantes. L'humidité relative et la hauteur des pluies étaient très élevées à la saison 2. Saison 1 allant de Novembre 2016 à Février 2017 correspond à la saison sèche et la Saison 2 allant de juin 2017 à Novembre de la même année correspond à la saison des pluies.

III.3.2.2 Caractéristiques physicochimiques du sol de chaque traitement

Le tableau XLVI, nous présente les caractéristiques du sol prélevé au cours de l'essai dans les différents pots.

Tableau XLV : Caractéristiques Physico- chimiques du sol utilisé pendant l'essai

Traitements	RI	SC	TA	CO	NE	T1	T2
Texture (%)							
Sable	13	12	15	13	12	12	11
Limon total	23	25	26	29	30	37	35
Argile	64	63	58	58	57	51	54
Classe texturale	/	/	/		/	/	/
Réaction du sol							
pH-H ₂ O	5,2	5,2	5,1	5,1	5,1	5,0	6,4
pH-KCL	4,2	4,1	4,0	4,1	4,0	4,1	5,4
CO (%)	3,8	2,1	3,2	3,8	2,7	3,8	3,8
MO(%)	6,6	3,6	5,5	6,6	4,7	5,6	6,6
N (mg/Kg)	2,2	2,3	2,0	2,1	2,4	2,2	2,3
NO ₃ ⁻ (mg/Kg)	4,5	4,2	5,0	4,2	5,0	4,5	4,5
NH ₄ ⁺ (mg/Kg)	29,7	28,	24,6	30,8	25,7	29,7	27,4
C/N	18	19	16	19	11	18	17
Cations échangeables (meq/100g)							
Calcium	8,1	8,5	7,4	7,51	6,9	7,7	7,7
Magnésium	1,4	1,4	2,3	1,7	3,4	2,0	3,8
Potassium	2,7	3,4	3,2	3,8	3,1	2,7	2,7
Sodium	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1
Somme des bases	12,3	13,4	13	13,1	13,4	12,5	14,2
Capacité d'échange cationique							
CEC pH7	20,7	22,7	22,8	25,5	19,6	23,7	21,8
Phosphore (ppm)							
Phosphore Bray II	47,6	40,1	39	37,6	41,1	39,7	18,4

RI (Ridomil Gold® 66 WP), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

Il ressort du tableau que la texture du sol utilisé ne change pas d'un traitement à l'autre. En considérant le triangle des textures on est en présence d'un sol argileux. Le pH H₂O est compris entre 5 et 6 ce qui classe le sol utilisé dans la catégorie de sol acide. Le sol est bien pourvu en MO avec un taux qui a varié entre 4 et 6,5. En comparant les sols ayant reçu les différents traitements avec celui du témoin non inoculé et non traité (T2) on remarque que les traitements non pas modifiés les caractéristiques physico-chimiques du sol au vu des valeurs obtenues.

III.3.2.3 Effets des différents traitements sur la viabilité des boutures

La viabilité des boutures a été examinée au 30^{ème} jour, au 60^{ème} jour et au 90^{ème} jours post semis et les résultats sont présentés dans le Tableau XLVII ci-dessous. On note que après 90 jours post semis pour les deux saisons, sur les 50 boutures de départ les traitements RI, SC, NE, et T1 ont perdu un peu plus de 50 % de leur bouture. Les traitements T2, TA, CO ont présenté les nombres de boutures viables les plus élevés au cours des deux saisons. La saison 2 a présenté un nombre plus élevé de bouture viable comparée à la saison 1.

Tableau XLVI : Viabilité des boutures après 30ème, 60ème, et 90ème jour après transplantation

*Traitements	Nbre de plants	Saison1/Nbre de plants viables			Saison 2/Nbre de plants viables		
		30 jours	60 jours	90 jours	30 jours	60 jours	90 jours
RI	50	38	28	18	41	29	25
SC	50	31	21	16	30	24	18
TA	50	46	43	37	46	42	41
CO	50	40	35	31	40	39	37
NE	50	31	25	21	35	30	24
T1	50	25	20	15	37	20	17
T2	50	48	47	40	47	44	42

*RI (Ridomil Gold® 66 WP), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

III.3.2.4 Effets des différents traitements sur les paramètres de croissance du poivrier

Les résultats sur l'effet des traitements des plants de poivrier sur les différents paramètres de croissance sont donnés dans le Tableau XLVIII et XLIX ci-dessous. On note qu'il y'a une différence significative entre les traitements pour tous les paramètres évalués. En effet les résultats du Tableau XLVIII ont permis de noter qu'après 90 jrs post semis au cours de la saison 1, les traitement TA et CO ont entraîné une augmentation du nombre de feuilles respectivement de 4 et 1 comparé au traitement témoin T1 inoculé et non traité. Une différence de 1,06 cm pour TA et 1,96 cm pour CO a été noté au niveau de la hauteur des plants comparé au témoin T1. La différence notée au niveau du diamètre du collet était de 0,66 mm et 0,29 mm respectivement pour TA et CO.

A la saison 2 après 90 jrs, des changements au niveau des différents paramètres croissance ont été notés. Une différence significative ($p < 0,05$) a été notée avec le traitement TA pour la hauteur moyenne du plant et le diamètre moyen du collet. Après 180 jrs post semis à la

saison 2, des augmentations au niveau des différents paramètres de croissance ont été observées. Les plants traités avec TA étaient 4 fois plus grand que les témoins T1, et ceux traités avec CO et RI étaient 2 fois plus grand que ceux de T1. Le nombre moyen de nœuds, le diamètre moyen du collet ont également subi des modifications suite aux différents traitements même si aucune différence significative n'a été observée entre ces traitements et le témoin T1. Le nombre moyen de racine primaire et la longueur moyenne de la racine principale ont été significativement plus élevés avec le traitement TA. Le chevelu racinaire était plus intense avec le traitement TA suivi des traitements avec CO et RI (Fig. 37A). Le poids moyen sec des racines et des feuilles est plus élevé avec le traitement TA. Des nécroses au niveau des principales racines ont été observées avec tous les traitements (Fig. 37B).

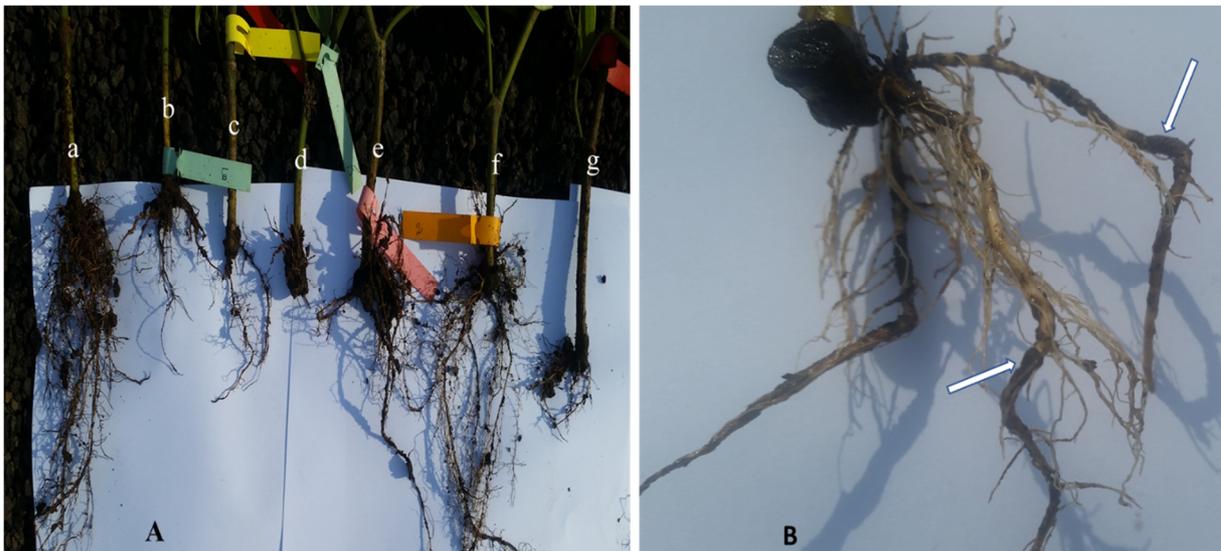


Figure 37 : Caractéristiques des racines à la fin du test : **A** : chevelu racinaire des plants de poivrier issus de différents traitements ; a : TA ; b : T2 ; c : T1 ; d : NE ; e : RI ; f : CO ; g : SC ; **B** : nécroses observées sur les racines des plants

RI (Ridomil Gold® 66 wp), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

Tableau XLVII : Variation des paramètres de croissance des plants de poivriers en fonction des traitements 90 jours post semis au cours de la saison 1 et 2

Traitement	Saison 1				Saison 2			
	90 jours				90 jours			
	Nbre Moy de feuilles	Hauteur Moy du plant (cm)	Nbre Moy de nœud	Dtre moy du collet (mm)	Nbre Moy de feuilles	Hauteur Moy du plant (cm)	Nbre Moy de nœud	Dtre Moy du collet (mm)
RI	3,3 ^{ab} ± 2,3	5,8 ^a ± 2,7	1,3 ^a ± 0,5	1,7 ^a ± 0,5	1,7 ^{ab} ± 0,9	4,3 ^a ± 2,9	2,8 ^c ± 0,4	1,7 ^a ± 0,3
SC	3,3 ^{ab} ± 2,9	6,2 ^b ± 3,1	1,6 ^{ab} ± 0,7	1,7 ^a ± 0,5	1,3 ^a ± 1,2	2,5 ^a ± 2,5	1,5 ^a ± 1,2	1,4 ^a ± 0,9
TA	6,7 ^c ± 1,7	7,0 ^b ± 1,8	2,1 ^b ± 0,7	2,4 ^b ± 0,4	2,8 ^b ± 1,3	8,4 ^b ± 2,7	2,5 ^b ± 0,9	3,2 ^b ± 0,4
CO	4,2 ^{bc} ± 2,2	7,9 ^b ± 2,9	2,1 ^b ± 0,7	2,1 ^{ab} ± 0,5	2,3 ^{ab} ± 1,2	4,7 ^a ± 2,1	1,8 ^{ab} ± 1,0	2,2 ^a ± 1,2
NE	1,1 ^a ± 0,9	2,5 ^a ± 2,3	1,2 ^a ± 0,7	1,9 ^{ab} ± 0,5	1,1 ^a ± 0,9	2,5 ^a ± 2,3	1,2 ^a ± 0,9	1,5 ^a ± 0,9
T1	2,9 ^{ab} ± 1,88	5,9 ^{ab} ± 2,9	1,4 ^a ± 0,8	1,8 ^a ± 0,4	1,8 ^{ab} ± 0,8	3,3 ^a ± 1,4	2,2 ^{abc} ± 0,6	1,8 ^a ± 0,3
T2	4,3 ^{bc} ± 3,7	6,7 ^b ± 3,8	1,5 ^{ab} ± 0,7	2,2 ^{ab} ± 0,4	2,3 ^{ab} ± 1,1	3,9 ^a ± 2,9	1,8 ^{abc} ± 0,6	2,1 ^a ± 0,8
Valeur de P	3,502*10 ⁻⁰⁵	0,00104	0,02326	0,0003367	0,003392	8,468*10 ⁻⁰⁷	6,781*10 ⁻⁰⁵	2,285*10 ⁻⁰⁶

Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5%. RI (Ridomil Gold® 66 wp), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

Tableau XLVIII : Variation des paramètres de croissance des plants de poivriers en fonction des traitements 180 jours post semis saison 2

Traitement	180 jours								
	Nbre Moy de feuilles	Hauteur Moy du plant (cm)	Nbre Moy de nœud	Dtre Moy du collet (mm)	Nbre Moy de racine p.	Long Moy de racine p. (cm)	Pds sec Moy racine (g)	Pds sec Moy feuilles (g)	Chevelu racinaire
RI	5,3 ^b ± 2,1	8,16 ^{ab} ± 2,4	3,9 ^b ± 0,9	2,2 ^a ± 0,4	2 ^a ± 1,4	8,9 ^a ± 4,5	0,03 ^a ± 0,1	0,5 ^b ± 0,2	++
SC	3,4 ^{ab} ± 1,4	5,71 ^{ab} ± 2,4	2,5 ^a ± 0,9	2,1 ^a ± 0,7	2 ^a ± 1,7	9,2 ^a ± 7,3	0,4 ^{ab} ± 0,6	0,2 ^{ab} ± 0,1	+
TA	11 ^c ± 3,9	19,7 ^c ± 7,4	5,8 ^c ± 1,9	3,3 ^b ± 0,5	4,3 ^b ± 1,5	20 ^b ± 5,3	0,5 ^b ± 0,3	1,6 ^c ± 0,7	++++
CO	5,8 ^b ± 2,0	9,8 ^b ± 3,3	3,6 ^{ab} ± 1,1	2,3 ^a ± 0,6	2,5 ^a ± 1,2	14,9 ^{ab} ± 8,7	0,4 ^{ab} ± 0,4	0,5 ^{ab} ± 0,3	++
NE	5 ^{ab} ± 2,6	7,0 ^{ab} ± 2,9	3,4 ^{ab} ± 1,3	2,0 ^a ± 0,8	1,4 ^a ± 0,9	7,3 ^a ± 6,3	0,1 ^{ab} ± 0,2	0,2 ^{ab} ± 0,1	+
T1	2,25 ^a ± 1,60	4,9 ^a ± 1,5	2,4 ^a ± 0,7	2 ^a ± 0,0	2,4 ^a ± 0,9	12,7 ^{ab} ± 8,3	0,4 ^{ab} ± 0,5	0,1 ^a ± 0,1	+
T2	5,8 ^b ± 1,9	10,3 ^b ± 3,5	4,3 ^b ± 1,1	2,1 ^a ± 0,5	2,8 ^{ab} ± 1,2	20,3 ^b ± 5,2	0,2 ^{ab} ± 0,1	0,5 ^b ± 0,2	++
Valeur de P	5,329*10 ⁻¹²	3,766*10 ⁻¹⁴	5,281*10 ⁻¹¹	6,126*10 ⁻⁰⁸	8,13*10 ⁻⁰⁵	2,167*10 ⁻⁰⁶	0,02195	< 2,2*10 ⁻¹⁶	

Les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5%.

III.3.2.5 Effets des différents traitements sur l'index de sévérité de la maladie (ISM) *in vivo*

La figure 38 ci-dessous présente l'effet des différents traitements sur l'index de sévérité de la maladie durant la saison 1 et la saison 2.

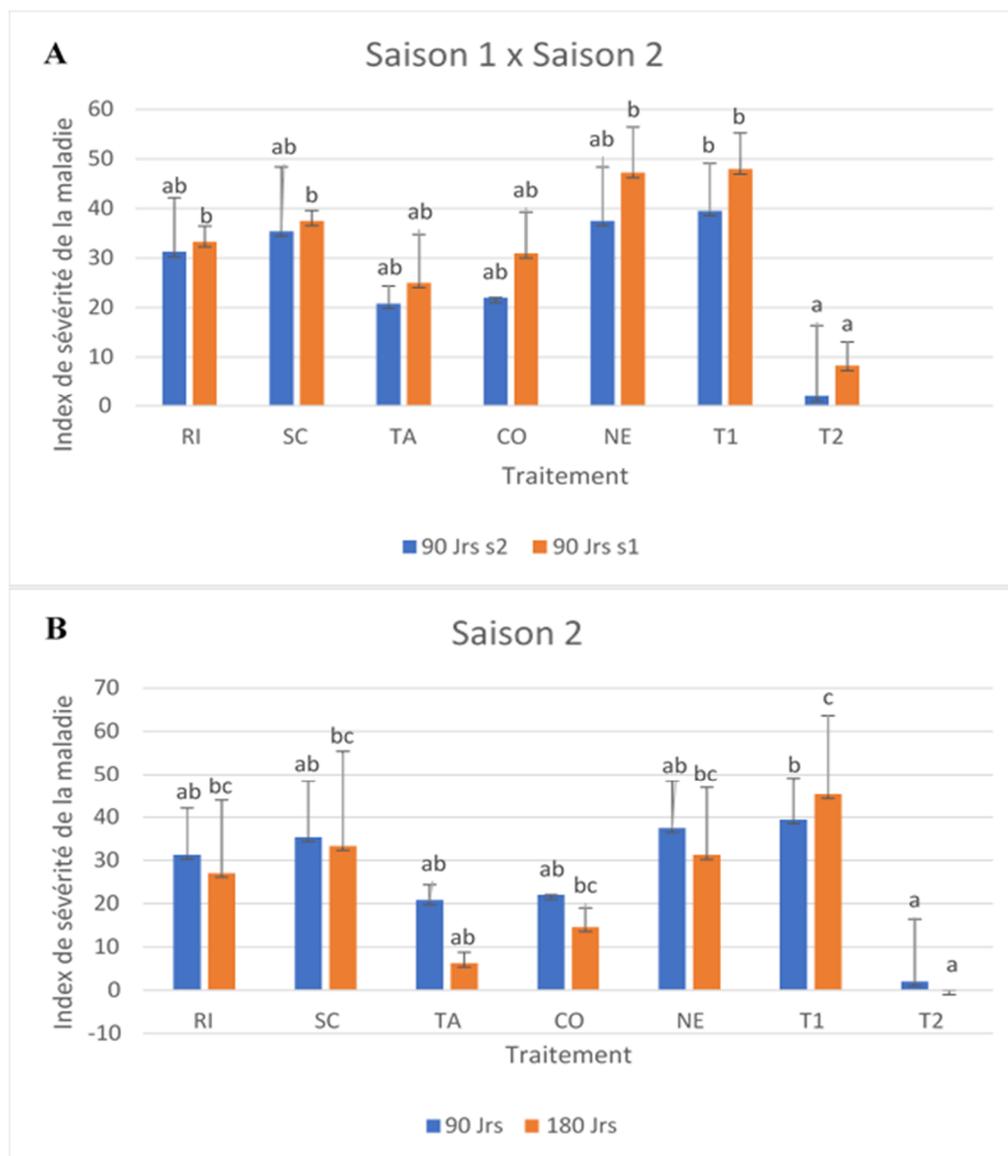


Figure 38 : Index de la sévérité de la maladie en fonction des traitements, de la saison et du nombre de jour post semis. **A** : 90 Jrs post semis saison 1 et saison 2 ; **B** : 90 Jrs et 180 Jrs post semis saison 2.

RI (Ridomil Gold® 66 wp), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

On remarque sur la figure 38A que quel que soit le traitement, l'index de sévérité de la maladie (ISM) est plus élevé pendant la saison 1 (90 jours) bien qu'aucune différence significative n'ait été notée ($p=0,204$) avec la saison 2 (90 jours). Le témoin T1 a présenté un index de sévérité plus élevé comparé aux différents traitements administrés aussi bien pendant la saison 1 que pendant la saison 2. L'ISM a varié de 8 à près de 48 % pendant la saison 1 et de 2 à 40 % pendant la saison 2. Les ISM les plus bas ont été observés avec les traitements TA et CO de 25 et 31% respectivement pendant la saison 1 et de 21 et 23 % pendant la saison 2. Les traitements RI, SC et NE ont présenté des ISM élevés.

La figure 38B présente les résultats de l'effet des différents traitements sur l'ISM à 90 et 180 jours durant la saison 2. On observe une variation au niveau de l'ISM pour chaque traitement. Une diminution variable de l'ISM a été notée chez tous les traitements excepté le traitement T1 où il a été observé une augmentation. Une réduction de la sévérité de 86,1 %, 67,2 %, 40,2 %, 31,8 %, 26,5 % a été notée avec les traitements TA, CO, RI, NE et SC respectivement.

III.3.2.6 Effet des traitements sur le profil enzymatique et métabolique des feuilles du poivrier

A la fin du test d'efficacité des différentes formulations utilisées pour contrôler la maladie du jaunissement, le profil enzymatique et métabolique des feuilles des plants de poivrier a été évalué. Les métabolites tels que les phénols totaux, les flavonoïdes, les protéines, les chlorophylles (A et B) et les caroténoïdes ont été dosés.

➤ Teneur en chlorophylle A (Chla), Chlorophylle B (Chlb) et caroténoïdes dans les feuilles de plants de poivrier en pépinière

La figure 39 présente les teneurs en Chla, Chlb et caroténoïdes dans les feuilles des plants de poivrier traités. La teneur en Chla est plus élevée que celle de la Chlb et des caroténoïdes dans les feuilles des plants quel que soit le traitement appliqué. Les teneurs en Chla ont varié significativement d'un traitement à l'autre ($P<0,05$). Les traitements témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés) et traitement biologique TA (plants traités avec *T. asperellum*) ont présentés les teneurs les plus élevées en Chla respectivement $15,3 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ et $13,7 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$. Les plus faibles teneurs ont été enregistrées avec les traitements témoin T1 (Plants témoins non traités et inoculés) et chimique NE (plants traités avec nématicide) respectivement $5,2 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ et $6,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$. D'un point de vue général, les traitements

chimiques (RI, SC, NE) ont présenté des faibles teneurs en Chla comparées à celles obtenues avec les traitements biologiques (TA, CO). La teneur en Chla dans les feuilles du témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés) est environ trois fois plus élevée que celle avec le témoin T1. (Fig. 39)

La teneur en Chlb est plus élevée dans les feuilles des plants de poivrier du traitement biologique TA (plants traités avec *T. asperellum*) suivi de celle du traitement chimique SC (plants traités avec Scooter®EC) respectivement $1,4 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$ et $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$. Les plus faibles teneurs ont été enregistrées avec les traitements chimique NE (plants traités avec nématicide) suivi de celle du témoin T1 (Plants témoins non traités et inoculés) respectivement $0,4 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$ et $0,5 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$. La teneur en Chlb bien que plus élevée dans les feuilles du témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés), n'est pas significativement différente de celles trouvées dans les feuilles des plants de poivrier des traitements chimique RI (plants traités avec Ridomil Gold® plus 66 WP), et biologique CO (plants traités avec *C. odorata*). Les analyses statistiques ont montré que la teneur en Chlb varie significativement d'un traitement à l'autre ($P < 0,05$). (Fig. 39)

La teneur en caroténoïdes a significativement varié d'un traitement à l'autre ($P < 0,05$). La teneur en caroténoïdes a été plus élevée dans les feuilles de poivrier du témoin T2 suivie de celle du traitement biologique TA respectivement $6,2 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ et $5,2 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$. La teneur en caroténoïdes dans les feuilles des plants de poivrier du témoin T2 a été 2.5 fois plus élevée que celle présente dans les feuilles du témoin T1. Les plus faibles teneurs en caroténoïdes ont été obtenues avec les feuilles des plants de poivrier du traitement chimique NE suivie de celle du témoin T1 respectivement $2,3 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$ et $2,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$. Parmi les traitements biologiques, c'est le traitement TA qui a présenté une teneur en caroténoïdes plus élevée. Aucune différence significative n'a été notée entre la teneur en caroténoïdes dans les feuilles des plants traités avec CO et des traitements chimiques RI et SC. (Fig. 39)

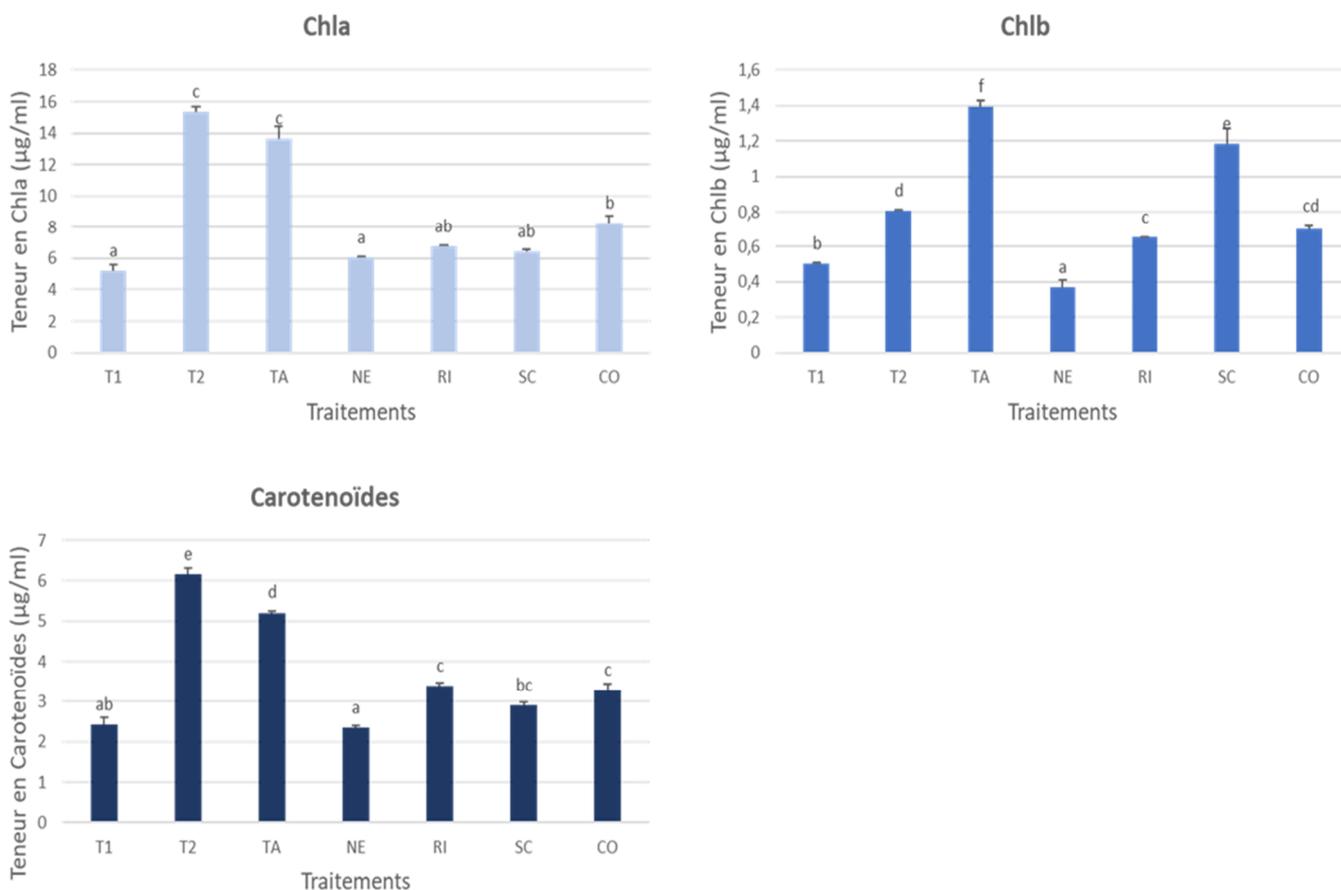


Figure 39 : Teneur en Chla, Chlb et en caroténoïdes (µg/mL) en fonction des traitements dans les feuilles de poivrier

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5%. RI (Ridomil Gold® 66 wp), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

➤ **Teneur en flavonoïdes, phénols totaux et protéines totales dans les feuilles des plants de poivrier.**

La teneur en flavonoïdes dans les feuilles des plants de poivrier a varié d'un traitement à l'autre. Les plus fortes valeurs ont été obtenues avec le traitement chimique RI (plants traités avec Ridomil Gold ®plus 66 WP), suivie de celle du traitement T1 (Plants témoins inoculés et non traités) respectivement $363,1 \pm 2,4$ µg/g de matière fraîche et $261 \pm 28,7$ µg/g de matière fraîche. Les teneurs en flavonoïdes dans les feuilles des plants des traitements biologique TA (plants traités avec *T. asperellum*) et CO (plants traités avec *C. odorata*) ne sont pas

significativement différentes, de même que les teneurs en flavonoïdes dans les feuilles des plants des traitements chimiques RI (plants traités avec Ridomil Gold® plus 66 WP) et SC (plants traités avec Scooter® EC). La teneur en flavonoïdes avec le témoin T1 (Plants témoins inoculés et non traités) est 1,7 fois plus élevée qu'avec le témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés). (Fig. 40)

Les analyses ont montré que la teneur en Phénols totaux dans les feuilles des plants de poivrier des différents traitements sont différentes ($P < 0,05$). La teneur élevée en phénols totaux a été obtenue dans les feuilles du traitement chimique RI (plants traités avec Ridomil Gold® plus 66 WP avec sol infesté), suivie par celle du témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés). La teneur en phénols totaux dans les feuilles traités avec les produits biologiques a été plus élevée avec le traitement CO (plants traités avec *C. odorata*) comparée au traitement TA (plants traités avec *T. asperellum*) bien qu'elles ne soient pas significativement différentes. La plus faible teneur a été obtenue avec le traitement chimique SC (plants traités avec Scooter® EC) $638,7 \pm 18,9$. (Fig. 40)

Les analyses ont montré que les teneurs en protéines totales dans les feuilles des plants des différents traitements sont différentes ($P < 0,05$). La teneur en protéines totales dans les feuilles des plants de poivriers du traitement chimique SC (plants traités avec Scooter® EC) a été plus élevée que celles des autres traitements. La teneur en protéines totales a été plus élevée avec le traitement biologique CO (plants traités avec *C. odorata*) comparée à celle du traitement biologique TA (plants traités avec *T. asperellum*) et à celle du traitement chimique RI (plants traités avec Ridomil Gold® plus 66 WP avec sol infesté) bien qu'aucune différence significative n'ait été notée entre elles. (Fig. 40)

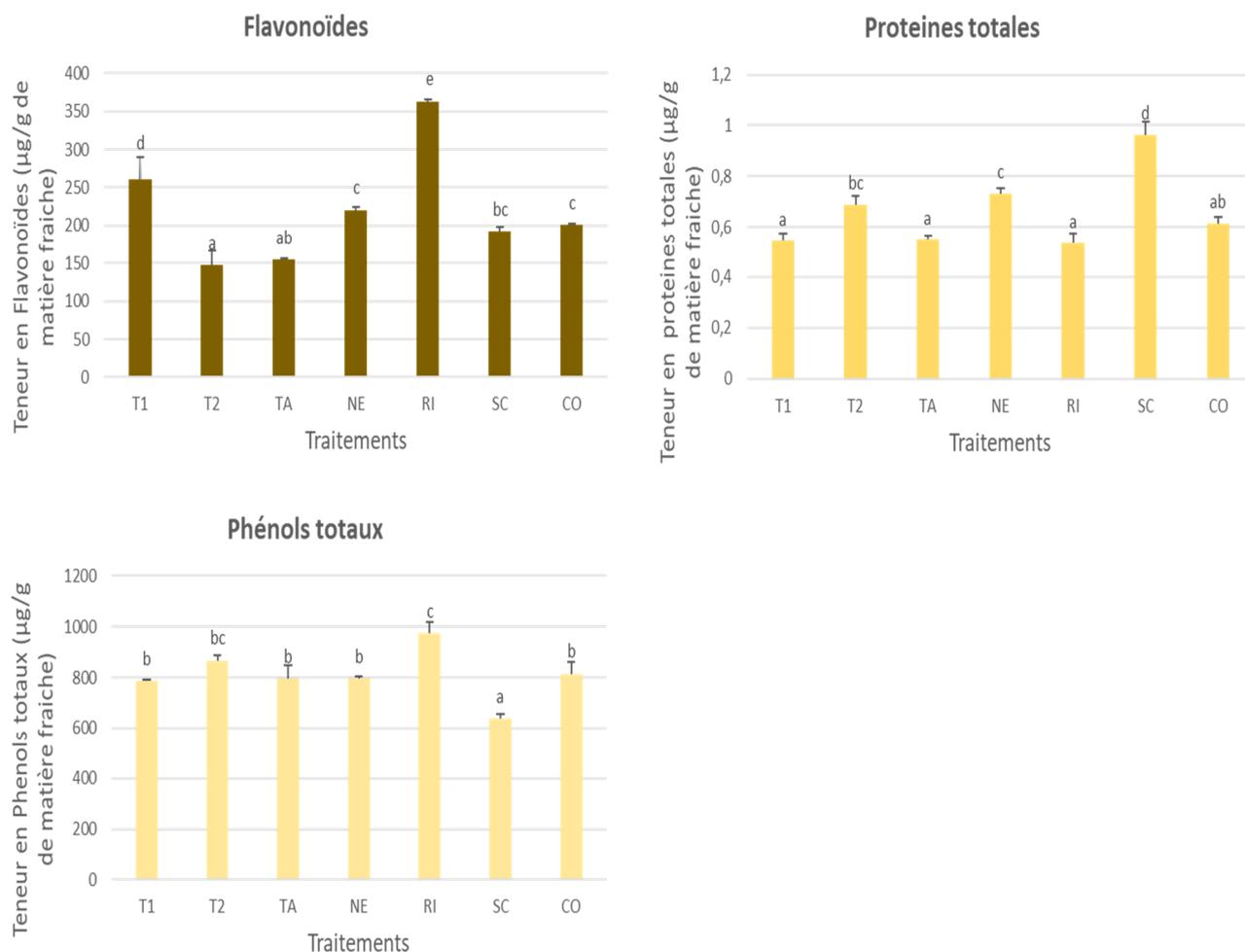


Figure 40 : La teneur en Flavonoïdes, en Phénols totaux et en Protéines en fonction des traitements sur les plants de poivrier.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5%. RI (Ridomil Gold® 66 wp), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

➤ **Activité de la Polyphénol oxydase (PPO) dans les feuilles des plants de poivrier.**

L'activité de la polyphénol oxydase a été plus élevée avec les traitements chimiques, notamment avec le traitement RI (plants traités avec Ridomil Gold® 66 WP) bien qu'elle ne soit pas significativement différente de celle avec le traitement NE (plants traités avec nématocide). La plus faible activité a été enregistrée avec le traitement biologique CO (plants traités avec *C. odorata*), suivie de celle avec traitement TA (plants traités avec *T. asperellum*). Entre les témoins T1 (Plants témoins non traités et inoculés) et T2 (plants témoins non traités

et non inoculés) aucune différence significative n'a été notée pour l'activité de la PPO bien que celle du témoin T2 soit un peu plus élevée. (Tableau L)

➤ **Activité de la Phénylalanine ammonia lyase (PAL) dans les feuilles des plants de poivrier.**

Une différence significative a été notée entre l'activité de la Phénylalanine ammonia lyase (PAL) des différents traitements ($P < 0,05$). L'activité la plus élevée a été notée avec le traitement biologique TA (plants traités avec *T. asperellum*), suivie de celle du témoin T1 (Plants témoins non traités et inoculés). L'activité de la PAL obtenue avec le témoin T1 est deux fois plus élevée que celle obtenue avec le témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés). Aucune différence significative n'a été notée au niveau de l'activité de la PAL entre le témoin T2, le traitement chimique SC (plants traités avec Scooter® EC) et le traitement biologique CO (plants traités avec *C. odorata*) qui a présenté la plus faible activité. (Tableau L).

➤ **Activité de la Gaïacol peroxydase (GPX) dans les feuilles des plants de poivrier.**

On note que l'activité de la Gaïacol peroxydase (GPX) a varié d'un traitement à l'autre. La plus grande activité de GPX a été notée avec le témoin T1 (Plants témoins non traités et inoculés) comparée à tous les différents traitements et elle était d'environ deux fois plus élevée que celle du témoin T2 (plants témoins non traités et non inoculés). Parmi les différents traitements (chimique et biologique), l'activité de GPX a été plus élevée avec le traitement chimique RI (plants traités avec Ridomil Gold® 66 WP) suivie de celle avec le traitement biologique TA (plants traités avec *T. asperellum*). La plus faible activité a été notée avec le traitement biologique SC (plants traités avec Scooter® EC) bien qu'elle ne soit pas significativement différente de celle obtenue avec le témoin T2 et le traitement biologique CO (plants traités avec *C. odorata*). (Tableau L)

Tableau XLIX : Variation de l'activité de la Gaïacol peroxydase (GPX), de la Phénylalanine ammonia lyase (PAL), et la Polyphénol oxydase (PPO) dans les feuilles de poivrier en fonction des traitements.

Traitements	Enzymes (DO/mn/g de protéine)		
	PPO	PAL	GPX
T1	0,058 ^b ± 0,003	0,353 ^d ± 0,008	0,129 ^e ± 0,011
T2	0,065 ^{bc} ± 0,000	0,169 ^a ± 0,015	0,065 ^{ab} ± 0,003
TA	0,056 ^b ± 0,007	0,3364 ^d ± 0,015	0,084 ^c ± 0,000
NE	0,084 ^{cd} ± 0,014	0,228 ^b ± 0,006	0,079 ^{bc} ± 0,002
RI	0,094 ^d ± 0,005	0,287 ^c ± 0,004	0,105 ^d ± 0,008
SC	0,068 ^{bc} ± 0,006	0,173 ^a ± 0,002	0,053 ^a ± 0,003
CO	0,029 ^a ± 0,006	0,157 ^a ± 0,006	0,067 ^{abc} ± 0,003

Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 5%. RI (Ridomil Gold® 66 wp), SC (Scooter® EC), TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*), T1 (témoin inoculé et non traité), T2 (témoin non inoculé et non traité), NE (nématocide)

III.3.2.7 Différentes corrélations entre la sévérité de la maladie et les paramètres de croissances et paramètres biochimiques

L'analyse des matrices de corrélation montre les différentes corrélations négatives entre les paramètres de croissances et la sévérité (Tableau LI). On note une corrélation négative et significative ($p < 0,05$) entre la sévérité et le nombre moyen de nœuds ($r = -0,83$), la sévérité et la longueur moyenne de la racine principale ($r = -0,79$). D'autres corrélations positives et significatives ($p < 0,05$) ont été notées entre quelques paramètres de croissances (Tableau LI).

Des corrélations négatives et significatives ont été notées entre les paramètres biochimiques et la sévérité de la maladie (Tableau LII). On a noté une corrélation négative et significative ($p < 0,05$) entre la sévérité et la teneur en Chla ($r = -0,92$), la sévérité et la teneur en caroténoïdes ($r = -0,90$). Une corrélation positive et significative ($p < 0,05$) a été notée entre la teneur en Chla et en caroténoïdes ($r = 0,98$), entre les activités de la PAL et GPX ($r = 0,85$).

Tableau L : Corrélations entre les différents paramètres de croissances et la sévérité de la maladie

	Sévérité	Nbre Moy de feuilles	Hauteur Moy du plant	Nbre Moy de nœuds	Dtre Moy du collet	Nbre Moy de racine p.	Long Moy de racine p	Pds sec Moy racine	Pds sec Moy feuilles
Sévérité	1								
Nbre Moy de feuilles	-0,723	1							
Hauteur Moy du plant	-0,702	0,982	1						
Nbre Moy de nœuds	-0,835	0,959	0,966	1					
Dtre Moy du collet	-0,505	0,907	0,934	0,821	1				
Nbre Moy de racine p.	-0,622	0,773	0,862	0,809	0,882	1			
Long Moy de racine p	-0,790	0,574	0,657	0,725	0,571	0,862	1		
Pds sec Moy racine	-0,174	0,220	0,294	0,170	0,534	0,656	0,550	1	
Pds sec Moy feuilles	-0,679	0,973	0,994	0,946	0,960	0,888	0,664	0,372	1

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

Tableau LI : Corrélations entre les paramètres biochimiques et la sévérité de la maladie

	Sévérité	PPO	PAL	GPX	ChLb	ChLa	Caroténoïdes	Flavonoïdes	Protéines totales	Phénols totaux
Sévérité	1									
PPO	0,293	1								
PAL	0,336	0,219	1							
GPX	0,521	0,218	0,850	1						
ChLb	-0,455	-0,241	0,022	-0,429	1					
ChLa	-0,929	-0,236	-0,133	-0,369	0,523	1				
Caroténoïdes	-0,903	-0,149	-0,118	-0,320	0,520	0,983	1			
Flavonoïdes	0,575	0,545	0,374	0,639	-0,502	-0,649	-0,536	1		
Protéines totales	0,147	0,111	-0,645	-0,720	0,229	-0,159	-0,172	-0,362	1	
Phénols totaux	-0,291	0,327	0,215	0,417	-0,388	0,203	0,283	0,540	-0,728	1

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

III.3.3 Discussion

Le but de cette partie était d'évaluer le potentiel antifongique *in vitro* et *in vivo* des produits chimiques utilisés par les planteurs, *Trichoderma asperellum* et les extraits de plantes contre *Phytophythium* sp.

Efficacité *in vitro* des différents produits testés

Les résultats de la confrontation directe entre les souches de *T. asperellum* et les isolats de *Phytophythium* sp. (PPP, PPK, PPF) ont montré que toutes les souches de *T. asperellum* possèdent un fort potentiel antagoniste selon le classement de Bell *et al.* (2012). Son classement est un système arbitraire et simplifié qui permet sur une échelle réduite de mesurer le degré du potentiel antagoniste des agents de lutte biologique. On remarque également que le potentiel antagoniste a varié d'une souche à l'autre selon l'isolat de *Phytophythium* sp. De nombreux travaux ont montré que le potentiel antagoniste des *Trichoderma* spp. peut varier en fonction du type de phytopathogènes auxquels il est confronté et également en fonction des différentes souches d'une même espèce de l'antagoniste (Steyaert *et al.*, 2003, Dubet *et al.*, 2007 ; Qualhato *et al.*, 2013). Tondje *et al.* (2007) ; Tchameni *et al.* (2017) ont obtenu des résultats similaires avec les mêmes souches de *T. asperellum* contre l'agent pathogène de la pourriture brune du cacao *Phytophthora megakarya*. Les résultats similaires ont également été observés avec Faheem Amin *et al.* (2010) qui ont montré une variabilité dans l'activité antagoniste de six isolats de *Trichoderma* spp. sur les propagules des agents pathogènes telluriques de la tomate (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*) et du haricot (*Sclerotinia sclerotiorum*). L'existence d'une différence génétique au sein des souches de l'agent antagoniste et également celui des isolats de l'agent pathogène pourrait expliquer cette variabilité (Steyaert *et al.*, 2003). L'inhibition de la croissance des isolats de *Phytophythium* sp. a été observé après leur contact avec les souches de *T. asperellum* qui ont continué de croître et de sporuler par-dessus ces derniers au point de complètement les faire disparaître quelques jours plus tard. On pourrait penser que les souches *T. asperellum* se sont nourries du mycélium des isolats de *Phytophythium* sp. Cette capacité se rapproche du mécanisme de mycoparasitisme décrit par Steyaert *et al.* en 2003. Parmi, les actions telles que l'antibiose, la compétition pour l'espace, le mycoparasitisme est considéré comme l'une des principales formes d'antagonisme impliquant un contact physique direct avec les hyphes de l'agent pathogène (Steyaert *et al.*, 2003). La croissance du mycoparasite vers le mycélium de l'agent pathogène, l'enroulement de son hyphe autour de celui de l'agent pathogène, la sécrétion des enzymes hydrolytiques pour la dégradation de la

paroi cellulaire de l'agent pathogène sont les principales étapes qui sous-tendent le mycoparasitisme. Les résultats similaires ont été obtenus avec *T. asperellum* contre *Phytophthora megakarya* agents pathogènes de la pourriture brune du cacao (Tondje *et al.*, 2007 a,b ; Deberdt *et al.*, 2008 ; Mbarga *et al.*, 2014) et contre *Pythium myriotylum* agent pathogène de la pourriture de macabo (Mbarga *et al.*, 2012) au Cameroun. De nombreux résultats ont montré que les *Trichoderma* ont un effet suppressif sur les maladies du sol (Chet et Baker, 1981 ; Ben Amira *et al.*, 2017 ; Ndoungue *et al.*, 2018).

Les fongicides Ridomil gold® 66 WP et Scooter® EC ont été dix fois plus efficaces que le Banko® plus et le Kocide® 2000 avec des inhibitions totales à partir de 100 µg/ mL. La variabilité d'activités observés au niveau de l'efficacité des différents produits chimiques testés *in vitro*, serait liée à leurs matières actives. En effet, le fongicide Banko® plus constitué de Carbendazime (100 g/l) et de Chlorothalonil (550 g/l) est un fongicide de contact et systémique régulièrement utilisé en culture Maraichère. Des études ont montré que le Banko® plus est moins efficace sur les Oomycètes comparés aux vrais champignons (Doumbouya *et al.*, 2012 ; Yao *et al.*, 2018). Les producteurs de poivre utilisent ce fongicide pour contrôler la maladie du dépérissement lent observé dans leurs plantations. Sachant que l'agent pathogène potentiel responsable du dépérissement lent serait un Oomycète on peut comprendre l'inefficacité du dit fongicide dans les plantations poivrières. Le fongicide Kocide® 2000 est un fongicide de contact essentiellement constitué d'hydroxyde de cuivre (300 g/kg) et utilisé en prévention contre un large spectre de champignons et de bactéries et également utilisé en prévention contre le mildiou. Ce fongicide est homologué pour le traitement des parties aériennes (Anonyme 9, 2020). Cependant, le dépérissement lent est une maladie transmise par le sol, or les pulvérisations effectuées par les producteurs étaient dirigées au niveau des feuilles ce qui pourrait expliquer le fait qu'ils n'aient pas obtenu de bons résultats. En changeant le mode d'application c'est-à-dire en optant pour une application des produits au niveau du sol on pourrait obtenir de meilleurs résultats. Le Ridomil Gold® 66 WP et Scooter® EC ont présenté une plus grande efficacité *in vitro* que les deux autres fongicides probablement à cause de la présence du métalaxyl-M dans leur composition chimique. En effet, Ces résultats sont en accord avec ceux de Radmer *et al.* (2017) qui ont montré que le métalaxyl-M a 100 µg/mL inhibe totalement la croissance mycélienne de *Pythium* et *Phytophytium* spp. agents pathogènes de la pourriture du soja. Le métalaxyl-M de la famille de phénylamides est connu comme étant très efficace contre les Oomycètes tels que *Phytophthora*, *Pythium*, *Pseudoperonospora* et *Peronospora* (Acta, 2005 dans Yao *et al.*, 2018). Ces deux fongicides sont indiqués pour le

traitement des maladies causées par les Oomycètes. Cependant, ils n'ont montré aucune efficacité dans les plantations poivrières de notre zone d'étude.

Le rendement d'extraction obtenu a varié d'une plante à l'autre et d'un solvant à l'autre. Ce qui corrobore le fait que les rendements d'extraction varient en fonction du végétal étudié, de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notamment leur polarité. L'effet inhibiteur des extraits hydroéthanoliques (EE) et aqueux (EA) de *C. odorata*, *P. amarus*, *C. benghalensis* à quatre différentes concentrations (1250 µg/mL, 2500 µg/mL, 5000 µg/mL, 10000 µg/mL), a été évalué afin de développer des méthodes plus simples de contrôle de la maladie du dépérissement lent du poivrier. Les extraits hydro éthanoliques et aqueux de toutes les plantes ont présenté des effets inhibiteurs variés sur les différents isolats de *Phytophthium* sp. De manière générale les extraits hydroéthanoliques de toutes les plantes utilisées ont présenté de meilleurs résultats que les extraits à l'eau. Des investigations dans le passé ont montré que les extraits éthanoliques sont plus actifs que les extraits à l'eau (Ngono Ngane *et al.*, 2005 ; Dakole *et al.*, 2016 ; Adeyemi *et al.*, 2018 ; Mekam *et al.*, 2019). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'éthanol étant un solvant organique favoriserait mieux la dissolution des composés organiques et ainsi permettrait d'extraire plus de composés actifs à activité antimicrobienne présentes dans les différentes plantes. Les données ont montré que les extraits hydro éthanoliques de toutes les plantes avaient une activité dose-dépendante sur tous les trois isolats de *Phytophthium* sp. (PPP, PPK, PPF) Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Mars *et al.* (2004) ; Adeyemi *et al.* (2018), qui ont montré que les concentrations plus élevées en substances antimicrobiennes présentaient une importante inhibition de la croissance des agents pathogènes. L'EE de *C. odorata* a été plus actif suivit de l'EE de *P. amarus* et l'EE de *C. benghalensis* a été moins actif. Des résultats similaires sur la forte activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *C. odorata* ont été démontrés par Ngono Ngane *et al.*, 2004 ; Hridhya et Kulandhaivel, 2017 ; Adeyemi *et al.*, 2018. La différence a également été observée au niveau de la nature de l'inhibition qui était fongicide pour *C. odorata* et fongistatique pour *P. amarus* bien que ce dernier ait eu une CI₅₀ plus basse que celle de *C. odorata* qui traduirait une plus grande toxicité. Cette forte inhibition observée avec l'EE de *C. odorata* serait probablement due à la présence en grande quantité des composés phytochimiques qui sont connus comme étant des agents antimicrobiens (Okwu et Josiah, 2006). Le criblage phytochimique a signalé la présence des alcaloïdes, des phénols, des flavonoïdes considérés comme antibactériens, antifongiques, nématocides, insecticides (Onaran et Yılar, 2012 ; Kordali *et al.*, 2013). En outre des stimulations de croissance mycélienne par les EA à 2500 µg/mL et

5000 µg/mL de *C. benghalensis* des isolats PPP et PPK de *Phytopythium* sp. ont été observées. Cette stimulation pourrait s'expliquer par la faible teneur de phénol contenu dans l'EA. Mohapotra *et al.* (2000) ont montré que de faibles concentrations en phénol (3-5µg/mL) favoriseraient la croissance normale des champignons et ne sont phytotoxiques que lorsque la concentration est élevée (20 µg/mL). De nombreuses études ont montré que les extraits aqueux pourraient stimuler la croissance mycélienne des champignons à de faibles concentrations (Galani *et al.*, 2013 ; Petchayo *et al.*, 2013 ; Dakole *et al.*, 2016). Une comparaison entre les grands groupes de composés phytochimiques a été réalisée entre les EE et les EA de *C. odorata* étant donné qu'elle a présenté un fort potentiel antifongique pour les trois isolats de *Phytopythium* sp. La différence d'activité entre ces deux extraits réside non seulement dans leurs compositions en composés phytochimiques mais également en teneurs des métabolites secondaires. En effet l'EE de *C. odorata* a été trois fois plus riche en phénols totaux, deux fois plus riche en tanins totaux. Sachant que les composés phénoliques sont les principaux composés responsables de l'activité antimicrobienne car ils présentent une forte activité biologique (Feeny, 1976 dans Salhi *et al.*, 2017). Les extraits de *C. odorata* ont déjà prouvé leur efficacité sur une large gamme d'agents pathogènes d'origine tellurique (Kra *et al.*, 2009 ; Khoa *et al.*, 2011).

Profil des composés phénoliques des extraits de *C. odorata*

A travers la LC-ESI/MS/MS, les résultats montrent que les différents extraits sont constitués de trois groupes de composés : les dérivés d'acide hydroxybenzoïque, acide hydroxycinnamique, et les flavonoïdes.

Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Le composé détecté au temps **9** a donné un ion précurseur ([M-H] – à m/z 329) et son MS² a montré un fragment majeur à m/z 167 correspondant au fragment acide vanillique et un fragment d'ion m/z 152 (- 15 Da perte d'un groupe méthyl). Ce composé a été caractérisé comme étant l'acide vanillique-O- hexoside en accord avec les données décrites par Jiang *et al.*, (2020) dans les fruits de groseilles. Le composé **9,7** a donné un ion précurseur à m/z 315 et les fragments ions à m/z 153 et m/z 109 suggérant l'existence d'un acide protocatéchique. Le fragment d'ion m/z 109 (-44 Da correspondant à la perte du groupe CO₂) et m/z 153 (-162 Da correspondant à la perte d'un hexoside). Ce composé a été caractérisé comme l'acide protocatéchique O-hexoside (Martini *et al.*, 2017 ; Mekam *et al.*, 2019). Le composé **10,1** a été caractérisé comme étant l'acide protocatéchique car son MS² à m/z 153 semblable au standard.

Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Le composé **10,1** a montré un ion moléculaire ($[M-H]^-$ m/z 341) et a présenté le fragment majeur à m/z 179 (-162 Da : correspondant à la perte d'un hexoside) et le fragment d'ion m/z 135 caractérisant la présence de l'acide caféique. Ce composé a été provisoirement identifié comme l'acide caféique hexoside (Clifford *et al.*, 2007 ; Martini *et al.*, 2017). Les composés **14** et **14,6** ont été caractérisés comme des isomères de l'acide coumaroyl férulique avec un ion pseudo moléculaire ($[M-H]^-$ m/z 357) donnant les ions prédominants à m/z 313 (-44 Da indiquant la perte d'un dioxyde de carbone), m/z 163 caractéristique de la présence de l'acide p- coumarique, m/z 193 traduisant la présence d'acide férulique, m/z 149 (-44 Da perte d'un groupe CO₂ de l'acide férulique), m/z 178 (-15 Da perte d'un groupe CH₃ de l'acide férulique), m/z 134 (-59 Da soit 44+15 de m/z 193 perte du dioxyde de carbone et d'un groupe méthyl) (Fabre *et al.*, 2001).

Les flavonols, les flavones, les flavanones

Une caractérisation de 19 flavones, 2 flavonols et 3 flavanones a été rendu possible par la technique LC-ESI-MS/MS. Ces trois différents flavonoïdes ont été détectés dans les feuilles de *C. odorata* par Phan *et al.* (2001) et Ikewuchi *et al.* (2013).

Les dérivés de l'apigénine

Les composés **11,6**, **12,2**, **12,3** ont révélé l'apparition du même ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 593) avec des fragments majeurs m/z 473 (-120 Da), m/z 503 (-90 Da) correspondant à un schéma de fragmentation d'hexoside lié au noyau par une liaison de type C-. Les ions m/z 353 (270+83), m/z 383 (270+113) indiquant la présence de l'apigénine lié à deux hexosides par la liaison C. ces composés ont été provisoirement identifié comme les isomères de l'apigénine-6-C-hexoside-8-C-hexoside (Ferrerres *et al.*, 2003 ; Gend *et al.*, 2016). Les composés **12,7**, **12,4** ont présenté un même ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 563). Les différents fragments d'ion obtenus étaient m/z 473 (-90Da), m/z 443 (120 Da) indiquant la perte d'un hexoside réuni par une liaison de type C- à un genine. Les fragments d'ions m/z 383, m/z 353 indiquent la présence d'un pentoside lié par le carbone (Waridel *et al.*, 2001). La présence de l'ion fragmenté m/z 503 (-60 Da) fait penser à la perte d'un pentoside (ferrerres *et al.*, 2007 ; Gend *et al.*, 2016). Ce composé a été identifié comme étant l'apigénine-C-hexoside-C-pentoside. En outre le composé **12,4** ayant généré un ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 415) et l'ion majeur m/z 269 (-146 Da perte d'une fraction Rhamnoside) et correspondant à l'apigénine. Ce composé a été identifié comme

l'apigénine-O-rhamnoside (Menkam *et al.*, 2019). Les composés **12,6**, **13,2**, présentant le même ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 533) et les fragments d'ion majeurs m/z 443 (-90 Da), m/z 473 (-60 Da) correspondant à la perte d'un pentoside lié par C. m/z 353 (270+83), m/z 383 (270+113) indiquant comme précédemment décrit la présence de l'apigénine lié par une liaison de type C- à deux hexosides. Ces composés ont été identifiés comme étant « Apigenin-6-C-pentoside-8-C-pentoside » (Gend *et al.*, 2016). Le composé **13,6** a ion moléculaire ($[M-H]^-$ m/z 431) a été identifié comme étant l'apigénine-C-hexoside. Le fragment d'ion majeur à m/z 311 (-120 Da), m/z 341 (-90 Da) correspondant à la perte d'un hexoside lié par une liaison de type C- à un genine (Gend *et al.*, 2016).

Dérivés de la luteoline

Le composé **11** à ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 609) avec ses fils d'ions : m/z 489 (-120 Da), m/z 399 (286+113), m/z 519 (-90 Da), m/z 369 (286+83). Les ions m/z 399 (286+113) et m/z 369 (286+83) correspondent à la présence de la genine lutéoline, et la fragmentation de deux hexosides liés par une liaison de type C. Ces données coïncident avec celles obtenues par Ferreres *et al.* (2003) qui permet d'identifier le composé comme étant « Luteolin-6-C-hexoside-8-C-hexoside ». Les composés **11,8**, **12,2** avaient été identifiés comme lutéonine-6-C-hexoside-8-C-hexoside et luteoline-O-hexoside-C-pentoside respectivement. Ils avaient le même ion ($[M-H]^-$ m/z 579) et les fragments d'ions majeurs à m/z 459 (-120 Da), m/z 489 (-90 Da) traduisant la perte d'hexoside lié par une liaison de type C-, m/z 399 (286+113), m/z 369 (286+83) rappelant la présence d'un genine de type lutéoline. Les ions fils supplémentaires pour le composé **12,2** à m/z 519 (-60 Da), m/z 417 (-162 Da) traduisaient la perte d'un pentoside de liaison de type C- et d'un hexoside de liaison type O- respectivement (Cavaliere *et al.*, 2005 ; Parveen *et al.*, 2014). Les composés **12,1**, **12,6** à ion ($[M-H]^-$ m/z 549) avec les fragments d'ion m/z 459 (-90 Da), m/z 489 (-60 Da) traduisant la perte de pentoside avec une liaison de type C-, et les ions m/z 369 et 399 caractéristiques de la lutéonine. Ces composés ont été identifiés comme luteoline-6-C-pentoside-8-C-pentoside. Les composés **12,7**, **14,2** à ion moléculaire ($[M-H]^-$ à m/z 447 et m/z 417 respectivement ont donné des fragments à m/z 327 et m/z 357. Des pertes de -120 Da, -90 Da ont été noté pour le composé **12,7** traduisant l'élimination d'un hexoside et des pertes de -90 Da, -60 Da obtenus pour le composé **14,2** correspondant à la perte d'un pentoside (Ferreres *et al.*, 2003). Ils ont été identifiés comme Luteoline-C-hexoside et Luteoline-C-pentoside. Les composés **13,8**, **14,1** identifiés respectivement comme étant la luteoline-3-O-rutinoside et la luteoline-3-O-hexoside ont présenté les ions moléculaires à ($[M-H]^-$ m/z 593) et ($[M-H]^-$ m/z 447). La fragmentation des ions moléculaires a donné l'ion majeur

à m/z 285 correspondant à la lutéonine. L'ion m/z 447 (- 162 Da correspondant à la perte d'un hexoside), m/z 285 (-146 Da perte d'un rutinoside).

Les flavonols et dérivés

Le composé **13,5** avec un ion moléculaire à ($[M-H]^-$ m/z 609) et son ion fils m/z 301 indique qu'il s'agit du « Quercetin-3-O-rutinoside » (Iwashina *et al.*, 2012). Le composé **14,7** a été identifié comme dérivé de Myricetine-3-O-(6'' galloyl) glycoside. Il a présenté comme ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 691) et des ions fils : m/z 335, m/z 631 (-60 Da), m/z 273 (- 44 Da perte de carboxylate), m/z 317 (myricétine)

Les flavanones et dérivés

Les composés **11,4**, **11,8** ont présenté le même ion pseudo moléculaire ($[M-H]^-$ m/z 433) et le fragment d'ion majeur à m/z 271 (-162 Da) correspondant à la perte d'un groupe hexoside. Ce composé a été identifié comme la naringenine-O-hexoside (Martini *et al.*, 2017). Le composé **17,1** à ion précurseur ($[M-H]^-$ m/z 417) qui correspond à la masse de la Liquiritine et la présence de l'ion fragmenté m/z 255 fait penser à un isomère de la liquiritine (Fan *et al.*, 2014 ; Zheng *et al.*, 2019).

Efficacité *in vivo* des différents produits testés

Le Ridomil Gold® 66 WP et Scooter® EC comme produits chimiques, *C. odorata* et *T. asperellum* PR11 comme produits biologiques sont les produits qui ont été testés en pépinières. Nous avons rajouté un troisième produit chimique un nématicide dans la mesure où nous avons isolé et identifié deux espèces de nématodes. Son implication dans l'essai nous a permis de voir ses effets sur la sévérité de la maladie. L'application des différents traitements au sol a entraîné une diminution variable de la sévérité de la maladie de même que l'amélioration de certains paramètres de croissance.

Le Ridomil Gold® 66 WP et Scooter® EC sont les principaux produits utilisés par les producteurs en champs pour contrôler la maladie du dépérissement lent. Testés en pépinière, une réduction de la sévérité de la maladie de 40,2 % avec Ridomil Gold® 66 WP et de 31,8 % avec Scooter® EC a été noté. Le choix de l'application au niveau du sol résulte du fait que le dépérissement lent des poivriers est une maladie d'origine tellurique. L'application des fongicides au niveau du sol pourrait réduire l'inoculum présent dans le sol et par ricochet réduire la sévérité de la maladie. Le métalaxyl M est connu comme étant l'un des meilleurs

fongicides systémiques contre les Oomycètes. Il est largement utilisé comme traitement du sol ou des semences pour lutter contre les maladies causées par *Pythium* et *Phytophthora* (Agris, 2005). Dans une étude en serre, Foster et Hausbeck (2010) ont démontré que l'arrosage du sol par les fongicides était plus efficace que les applications foliaires pour réduire le taux de mortalité du poivron causée par *P. capsici*. L'efficacité de cette méthode viendrait du contact accru entre le fongicide, le système racinaire et les propagules de l'agent pathogène. De nombreux facteurs peuvent néanmoins influencer sur l'efficacité des applications du sol, notamment la concentration du produit, la formulation, ainsi que les caractéristiques du sol, notamment la texture, l'humidité et la teneur en matière organique (Meyer et Hausbeck, 2013). Sachant que le métalaxyl-M pénètre rapidement la plante et s'y diffuse par voie ascendante, on pourrait penser qu'on aurait eu de meilleurs résultats si la grande partie de matière active était restée au niveau des racines de la plante. Parmi les deux fongicides, Ridomil Gold® 66 WP semble plus efficace que Scooter® EC probablement à cause de l'effet combiné du Métalaxyl-M et des ions cuivriques. L'application du nématicide a conduit à une légère réduction de la sévérité de la maladie. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que bien que les nématodes présents dans les sols des plantations de poivriers ne soient pas la principale cause de la maladie, ils pourraient tout de même y jouer un rôle. On note de plus en plus un changement de politique en ce qui concerne l'utilisation des pesticides conventionnels dans le contrôle des ravageurs et des maladies. La directive 1107/2009 vise à limiter le nombre de pesticides utilisés dans le contrôle des pestes. Les denrées alimentaires comme le poivre par exemple exportés vers les pays de l'union Européenne doivent se conformer à la réglementation communautaire en ce qui concerne les taux de résidus pesticides. De la directive 2009/128/CE vise à promouvoir une utilisation des pesticides compatibles avec le développement durable. Il privilégie l'utilisation des méthodes non chimiques comme par exemple les extraits de plantes, les microorganismes antagonistes (Anonyme 10, 2009).

Les traitements effectués avec *T. asperellum* PR11 (TA) et EE de *C. odorata* (CO) ont été les plus efficaces avec des réductions de 86,1 % et 67,2 % respectivement comparé au témoin inoculé T1. L'agent pathogène potentiel du dépérissement lent du poivrier dans la zone d'étude étant tellurique et s'attaquant aux racines de la plante, *T. asperellum* PR11 d'après les résultats obtenus pourraient être de bons candidats pour lutter contre cette maladie. Pour cela un amendement du sol dans les plantations de poivriers pourrait donner de bons résultats. Il a déjà été testé avec succès contre les *Pythium*, les *Phytophthora*, et les bactéries (Mbarga *et al.*, 2012 ; Ndoungue *et al.*, 2018 ; Konappa *et al.*, 2018). Des applications au sol du *T. asperellum*

PR11 autour des pieds de cacaoyer avait permis de réduire l'inoculum primaire de l'agent pathogène *Phytophthora megakarya* responsable de la pourriture brune du cacao (Ndoungue *et al.*, 2018). Le genre *Trichoderma* est un microorganisme largement distribué dans l'environnement naturel. Plusieurs isolats de *Trichoderma* ont été isolés des plantations poivriers de notre zone d'étude. En ajoutant de la matière organique dans les plantations ceci favoriserait la multiplication des saprophytes tels les *Trichoderma* et entraîner une diminution du taux des agents pathogènes. Ces résultats ont été obtenus par Anandaraj (1997) qui après avoir ajouté de la matière organique dans le sol à vue l'activité des saprophytes augmenter et le taux de *Phytophthora capsici* devenir indétectable. L'activité de *T. asperellum* PR11 pourrait être d'avantage booster une fois appliqué en champs si des amendements organiques étaient additionnés. *Trichoderma* spp. améliore la santé des plantes créant un environnement favorable pour son développement. Ils peuvent agir soit par antibiose, soit en compétition pour l'espace et les nutriments, ou bien en induisant la résistance chez la plante et en inactivant les enzymes sécrétées par les agents pathogènes (Harman, 2000 dans Kumar *et al.*, 2019). *Trichoderma* spp. améliore la santé des plantes en créant un environnement favorable à son développement et en produisant des métabolites secondaires qui agiraient comme régulateur de croissance des plantes (Cutler *et al.*, 1986). Nos résultats montrent que *T. asperellum* a stimulé les paramètres de croissance des plants de poivrier qui se sont traduit par une biomasse importante. Les parties aériennes comme racinaires ont été concernées. Ces résultats corroborent les résultats des travaux de Mouria *et al.* (2007) qui ont montré que l'ajout de *T. harzianum* dans le sol augmenterait la biomasse racinaire de la tomate de 270 à 325 %. Bakari (2016) a montré que l'ajout de *Trichoderma* dans le sol augmentait la taille et le poids sec des plants de tomate comparé au témoin. Halifu *et al.* (2019) ont montré que *T. harzianum* et *T. virens* augmentaient la biomasse des plantules de *Pinus sylvestris* var. *mongolica*. Sa capacité à détruire les agents pathogènes autour du plant de poivrier conduirait à l'amélioration de son état sanitaire et améliorerait sa croissance. L'extrait de plante *C. odorata* testé en pépinière a également réduit la sévérité de la maladie. L'efficacité observée pourrait être due à la stabilité des principes actifs dans le sol, sachant que c'est un milieu complexe siège de diverses interactions et de sécrétions qui modifient la composition et la structuration des micro populations et autres substances. Elle peut également être liée à la capacité des extraits de plantes à induire une résistance au niveau de la plante hôte ou plus probablement à son action inhibitrice vis-à-vis de l'agent pathogène présent dans le sol. Khoa *et al.* (2011) ont montré que l'extrait de *C. odorata* pouvait réduire de 68 % la longueur des lésions sur les gaines de riz dans les conditions contrôlées et semi automatiques. Par contre Koffi, 2013 a montré que l'extrait des feuilles de *C. odorata* n'a eu

aucun effet *in vivo* pour le contrôle de la pourriture des racines et/ou du collet des plantes de papayer bien qu'ayant présenté une certaine activité *in vitro*. Cette différence de résultats pourrait être liée à la composition en métabolites secondaires des extraits et à la nature de l'agent pathogène. Longtemps considéré comme mauvaise herbe, *C. odorata* est de plus en plus utilisé pour ses propriétés médicinales et comme source de nutriments pour les plantes d'intérêts. Par exemple Jamilah et Juniarti (2017) ont montré que les propriétés chimiques du sol ont été modifiées après l'application de *C. odorata*, un compost qui assure une fertilité optimale pour la culture du riz. Cette plante a également été utilisée pour désinfecter les sols (Tanhan *et al.*, 2011). *C. odorata* peut donc être appliqué dans les plantations de poivre de Penja de différentes manières. Elle peut être utilisée comme plante assainissant en biofumigation. C'est une technique qui pourrait être envisagée dans les plantations de poivre de Penja. En effets, certaines plantes sont capables de libérer des composés toxiques vis-à-vis des bio-agresseurs ciblés. Ces composés toxiques peuvent provenir soit des racines des plantes vivantes soit des plantes mortes en décomposition. Les plus connues sont les plantes appartenant aux familles des Alliacées, Astéracées et Brassicacées. Le pouvoir biofumigants des brassicacées n'est plus à démontré (Motisi, 2009 ; Nimisha et Nisha, 2019). Dans notre contexte, les plantes telles que les feuilles du margoussier (Neem), *C. odorata*, les choux pommés, *Tithonia diversifolia* peuvent être utilisées en paillis dans nos plantations. Disposés pendant la saison sèche au pieds des poivriers, dans les plantations de poivre de Penja, ces plantes permettraient non seulement d'éviter l'évapotranspiration qui fragilise le poivrier mais aussi d'apporter de la matière organique. Sachant qu'au retour des pluies, ces plantes une fois enfouies dans le sol pourront agir comme fumier en améliorant la production et comme plantes assainissantes en réduisant le taux des microorganismes pathogènes. *C. odorata* a déjà été testé comme paillis dans une plantation poivrière au Cambodge avec des résultats satisfaisants sur l'état phytosanitaire et le rendement des poivriers (Lietzenberge et Lip, 1961 cité par Anandaraj, 2000). Aucune différence significative n'a été observé entre les paramètres de croissance des plants traités avec *C. odorata* et ceux des plants témoin non inoculé T2. Mais une différence a été notée entre *C. odorata* et le témoin inoculé T1 au niveau du nombre de feuilles et du nombre nœuds à 90 jours post semis (saison 1) et à 180 jours post semis (saison 2) au niveau du nombre de feuille et de la hauteur des plants. Ceci traduit un effet stimulateur de croissance de l'extrait hydroéthanolique de *C. odorata*. Ces effets proviendraient de leur composition en polysaccharides qui pourrait contribuer à améliorer la capacité de rétention d'eau dans le sol.

Les analyses des propriétés physicochimiques du sol dans notre essai nous ont permis d'éliminer le facteur fertilité du sol comme l'une des causes du dépérissement lent. En effet, le désordre nutritionnel est considéré comme l'un des facteurs responsables de la maladie du jaunissement ou dépérissement lent observé chez les poivriers (Sarma *et al.*, 2010 ; Nguyen et Bui, 2011). Dans tous les traitements, nous avons une bonne quantité de matière organique capable d'assurer une bonne croissance des plantes. Aucun effet saison n'a été noté pour ce qui est de la sévérité de la maladie. En effet, quel que soit la saison de l'essai, l'arrosage des plants dépendait des jours de pluies. Pendant les mois de faible pluviosité, l'arrosage se faisait régulièrement pour pallier à l'effet d'évapotranspiration.

Au cours de l'étude réalisée, la viabilité des boutures a été évaluée en comptant le nombre de bouture ayant développé un ou plusieurs bourgeons. On a enregistré durant la saison 1 et 2 une perte de près de 50 % des boutures avec les traitements RI (Ridomil), SC (Scooter), NE (Nématicide) et le témoin inoculé T1. Les traitements TA (*T. asperellum*), CO (*C. odorata*) et le témoin non inoculé T2 ont montré moins de 30% de perte de bouture. Cette perte pourrait être liée soit au stress dû au bouturage soit à la diversité morphologique des plants dont sont issus les boutures utilisées. En effet, dans le cadre de ce travail, les boutures utilisées étaient un mélange de morphotype différent provenant de différentes plantations poivrières de la zone d'étude. Sachant qu'aucune caractérisation variétale n'a encore été effectuée sur les poivriers de la zone, la variabilité génétique des plants pourrait expliquer ce faible taux de réussite du bouturage. Les travaux de Rafitoharson, 2016 ont montré que la réussite du bouturage du poivrier sauvage de Madagascar (Le Tsiperifery) pouvait être influencée par le morphotype du poivrier ou par la provenance des boutures. De plus, les facteurs intrinsèques et le stade phénologique des plantes influencent la germination des plantes (Verheij, 2004). De même, la qualité phytosanitaire du substrat pourrait également avoir eu une influence sur le bourgeonnement des boutures, sachant que le substrat utilisé dans notre étude provenait des sols infestés. En effet, en cas de doute sur la qualité du substrat, il est conseillé de stériliser le sol ou d'appliquer des fongicides afin de le désinfecter (Sbay et Lamhamedi, 2015).

Les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes ont varié significativement d'un traitement à l'autre. La chlorophylle et les caroténoïdes sont de pigments d'apparence vert et orangé respectivement. Ils indiquent l'activité photosynthétique chez les plantes et sont responsables de la variation de la couleur du vert nuit au jaune (Larcher, 1995 cité par Jabeen *et al.*, 2017). Cette étude a montré que les plants ayant une sévérité de la maladie plus faible (principalement ceux traités avec les produits biologiques *T. asperellum* (TA) et *C. odorata*

(CO) et le témoin non inoculé T2) ont une teneur en chlorophylle a et en caroténoïdes plus élevée comparé aux plants issus des traitements chimiques Ridomil (RI), Scooter (SC) et ceux du témoin inoculé T1. Ces résultats montrent que même si visuellement les effets dû à *Phytophthium* sp. durant le test de pathogénicité n'était pas très concluant, la faible teneur en chlorophylle chez les plants témoins T1 en pépinière indique néanmoins qu'il y'a un effet au niveau de certains composés biochimiques de la plante. Généralement les plantes soumis à un stress abiotique ou biotique voient leur capacité photosynthétique réduite due aux dégâts faites au niveau du pathosystème et à d'autres processus cellulaires causés par les espèces d'oxygènes réactives (Torres *et al.*, 2006 ; Berger *et al.*, 2007b). Les résultats similaires ont été trouvés dans d'autres travaux notamment ceux sur le manioc infecté par la mosaïque où les feuilles des plantes saines avaient un taux de chlorophylles et de caroténoïdes plus élevés que ceux des feuilles malades (Zinga *et al.*, 2016). La teneur élevée en chlorophylles dans les feuilles des plants traités avec les produits biologiques serait liée à la stimulation de l'enzyme principale au centre de la biosynthèse de la chlorophylle (Khodary, 2004 dans Dakole *et al.*, 2016). La diminution du taux de chlorophylles chez les plantes à sévérité élevée serait liée à la compétition entre la plante et le microorganisme pour la principale source de carbone : le sucre. En effet, les micro-organismes ont besoin de carbone pour leur développement et la plante également en a besoin pour sa croissance, son développement et la mise en place des mécanismes de défense. Ainsi, une plante ne pouvant pas se nourrir correctement perd sa vigueur, la chlorophylle se dégrade et la plante devient vulnérable à l'attaque parasitaire (N'gonza *et al.*, 2016).

La teneur en flavonoïde est variable d'un traitement à l'autre. Néanmoins, on remarque qu'il est significativement plus élevé chez les plants témoins inoculés (T1) comparativement aux plants témoins non inoculés (T2). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques préexistants dans la plante avant tout stress abiotique ou biotique auquel la plante pourrait être soumis. En cas d'infection de la plante, certains de ces composés phénoliques voient leur métabolisme activé et leur teneur modifiée (Clériveret *et al.*, 1996). Le traitement chimique RI a présenté une teneur en flavonoïdes et en phénols totaux significativement plus élevée que partout ailleurs. Les composés phénoliques sont généralement associés aux réactions de défense passive ou active de la plante. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les traitements chimiques auraient eu un effet sur la synthèse de ces composés. En général, l'efficacité des fongicides dans le contrôle des maladies qui attaquent les plantes résulterait de leur action directe sur l'agent pathogène. Des spéculations sur l'induction de certaines réactions de défenses de la plante telles que la synthèse des phytoalexines, la formations des lésions

nécrotiques par les fongicides ont été mentionnées (Ward *et al.*, 1980 dans Molina *et al.*, 1998). Par exemple, la synthèse de la phytoalexine glyceolline présent dans le soja auraient été corrélée avec l'utilisation efficace du métalaxyl contre *Phytophthora* (Fisher et Hayes, 1982 ; Börner *et al.*, 1983). De Sousa *et al.* (2017) ont montré que le métalaxyl utilisé pour traiter les plants de morelle noire induisait une augmentation significative de la capacité antioxydante totale, les teneurs en polyphénols et flavonoïdes notamment dans les feuilles.

La teneur en protéine totale est significativement plus élevée dans les feuilles des plants non inoculés T2 par rapport aux feuilles des plants inoculés T1. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dakole, 2016 qui a montré que la teneur en protéine diminuait aussi bien dans les feuilles que dans les racines des plants de tomate inoculés avec *Fusarium oxysporum*.

Une variation des activités des enzymes à savoir la GPX (Gaïacol peroxydase), PPO (Polyphénol oxydase), PAL (Phénylalanine ammonia lyase) est relevée dans les feuilles des poivriers des différents traitements. Ces enzymes sont ubiquitaires dans de nombreuses plantes et seraient impliquées dans de nombreuses réactions physiologiques chez la plante. Les peroxydases par exemple participent entre autres à la protection des plantes contre les microorganismes, à la cicatrisation des tissus blessés (Pandey *et al.*, 2017). Elles sont aussi impliquées dans d'autres phénomènes physiologiques de la plante comme le catabolisme de l'auxine, l'oxydation des phénols, la lignification et la tubérisation des cellules (Quiroga *et al.*, 2000). Le guaiacol peroxydase (GPX) a présenté une activité plus élevée dans les feuilles du témoin inoculé T1. Ce résultat pourrait s'expliquer par le stress engendré par la présence de l'agent pathogène. En effet, la concentration des peroxydases varie en fonction du type tissulaire, l'âge de la plante, les conditions de stress abiotiques et biotiques (dépendant de l'agent pathogène impliqué) (Martinez, 1997). La polyphénol oxydase (PPO) joue également un rôle de défense des plantes contre les agents biotiques et abiotiques (Martinez et Whitaker, 1995). Son activité est plus élevée dans les feuilles des plants traités avec le Ridomil (RI). En effet, normalement présente chez la plante saine, le stress produit par l'inoculation pourrait expliquer sa forte activité sachant également que l'application des fongicides sont susceptibles de l'élever (Ward *et al.*, 1980 dans Molina *et al.*, 1998). L'activité de la PAL (Phénylalanine ammonia lyase) a été plus élevée dans les feuilles des plants traité avec le *T. asperellum* (TA) et le témoin inoculé (T1). L'augmentation de leur activité pourrait résulter de l'augmentation du taux des substances phénoliques qui participent aux réactions de défense de la plante hôte contre les agressions parasitaires voire *Phytophythium* sp. dans le cadre de notre étude.

Les mécanismes de résistances chez les plantes vis-à-vis des microorganismes potentiels peuvent être liés à la synthèse des métabolites primaire et secondaire agissant comme composés antimicrobiens (Hammond-Kosack et Jones, 1996). La discussion de nos résultats concernant la corrélation entre l'efficacité d'un traitement et la teneur d'un métabolite primaire ou secondaire ou à l'activité d'une enzyme impliquée dans la résistance de la plante est limitée. Les caractéristiques génétiques de la plante sont importantes dans le processus de résistance d'une plante face à un microorganisme. Sachant que nombres d'études ont montré que les plants résistants de *Piper* sp. produisaient plus de composés antimicrobiens que les plants sensibles (Vandana *et al.*, 2014 ; Erisléia-Meireles *et al.*, 2016). Une étude de la cinétique de l'activité ou de la teneur des différents métabolites et enzymes dosés dans notre étude aurait également permis de mieux expliquer le mécanisme de résistance des plants de poivrier. Ceci nous aurait permis d'affirmer si les différents traitements biologiques appliqués dans le contrôle de la maladie en pépinière possédaient des effets stimulateurs de défenses naturelles. Au vus de nos résultats il est difficile de dire si les différents métabolites secondaires dosés sont les principaux initiateurs de la résistance chez nos plantes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail donc l'objectif principal était d'identifier les agents pathogènes responsables des principales maladies du poivre de Penja, d'évaluer les traitements chimiques pratiqués par les producteurs et de proposer des solutions de lutte alternative qui incluent l'utilisation des extraits de plantes et des antagonistes. Les résultats suivants ont été obtenus :

- Deux principales maladies sont responsables des pertes de production enregistrées ces dernières années dans les plantations du poivre de Penja : la pourriture racinaire blanche (51 %) qui touche à la fois le tuteur et le poivrier et le dépérissement lent (42 %) encore appelée maladie du jaunissement foliaire qui touche principalement le poivrier ;
- *Armillaria camerunensis*, a été identifié et associé à la pourriture racinaire blanche comme étant l'agent pathogène ; *Phytophthium* sp. serait impliqué dans l'étiologie du dépérissement lent avec un impact du climat et probablement d'autres facteurs (biotique et/ou abiotique pas encore bien défini) ;
- Les produits chimiques et biologiques testés contre le dépérissement lent du poivrier ont montré des efficacités variables tant *in vitro* qu'*in vivo*.
 - Les produits chimiques à base de Métalaxyl M, l'extrait hydroéthanolique de *C. odorata* et toutes les souches de *T. asperellum* ont présentés une meilleure activité inhibitrice contre *Phytophthium* sp. *in vitro*.
 - L'activité inhibitrice de *C. odorata* serait liée selon son profil phénolique à la présence des acides hydroxybenzoïques, hydroxycinnamiques et des flavonoïdes (flavanol, flavanone, flavonol), composés à activité antimicrobienne ;
 - Les essais réalisés *in vivo* ont montré que ces différents produits réduisaient à des degrés variables la sévérité du dépérissement lent. *T. asperellum* avec un taux de réduction de 86 % et 67 % pour l'extrait hydroéthanolique de *C. odorata* sont les traitements qui ont fortement réduit la sévérité de la maladie.

Les résultats du présent travail mettent en cause *Phytophthium* sp. comme l'un des agents pathogènes du dépérissement lent du poivrier et montrent que le contrôle par des moyens biologiques à travers *T. asperellum* et *C. odorata* est possible et envisageable.

Perspectives ci-dessous sont envisagées :

- Envisager les mêmes essais en pépinière sur des vitro plants de poivrier ;
- Envisager des essais en champs avec *T. asperellum* et *C. odorata* ;
- Développer et proposer un approche lutte intégrée prenant en compte les besoins environnemental, économique, cahier de charges IGPP ;
- Déterminer le mécanisme de résistance des plants de poivriers par le dosage des composés impliqués dans la résistance du *P. nigrum* aussi bien dans les feuilles que dans les racines des plants.

Les recommandations potentielles aux producteurs :

- Commander un diagnostic préalable avant l'usage de tout produit chimique ;
- Les traitements chimiques effectués avec le Ridomil Gold® 66 WP et le Scooter® EC doivent s'appliquer au niveau du sol ;
- Possibilité d'utiliser *C. odorata* comme paillis afin de réduire l'évaporation pendant la saison sèche

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbou, A. 2014. *Action d'antibiose des Pseudomonas spp fluorescents et Trichoderma harzianum contre le Fusarium f.sp oxysporum lycopersici In vitro*. Mémoire de Master 2 en Biologie des interactions Plantes-Microorganismes (Université Saad Dahlab De Blida 1. République Algérienne Démocratique Et Populaire), 98p.
- Abdoul, A.S., Housson, M., Akoulong, C.J. 2008. Diagnostic du système national de recherche et de vulgarisation agricoles du Cameroun et stratégie de renforcement des capacités pour la dissémination des connaissances et des technologies agricoles. FAO, 100p.
- Abdul-Baten, M.D., Li, M., Keiichi, M., Yasushi, I., Ziaur, R.M., Haruhisa, S., Koji, K. 2015. Two new species, *Phytophthium iriomotense* sp. nov. and *P. aichiense* sp. nov., isolated from river water and water purification sludge in Japan. *Mycology Progress*, 14(2):1-2.
- Adeyemi, A., Omotunlese, I.V., Oni, M.O. 2018. Phytochemical screening and antifungal activity of *Chromolaena odorata* extracts against isolate of *Phytophthora megakarya* using agar-well diffusion method. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 4 (1): 7-13.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th eds. Academic Press, USA. 922 p.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B.H., Farooq, S., Ali, M., Khan, M.A. 2012. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3): 1945-1953.
- Alabouvette, C., Cordier, C. 2018. Fertilité biologique des sols : des microorganismes utiles à la croissance des plantes. *Innovations Agronomiques*, 69: 61-70
- Anandaraj M., Sarma Y.R. 1995. Diseases of black pepper (*Piper nigrum* L.) and their management. *Journal of spices and aromatic crops*, 4 (1): 17-23.
- Anandaraj, M. 2000. Diseases of black pepper. In Ravindran P.N. (eds) *Black pepper, Piper nigrum*. Medicinal and Aromatic plants-industrial profiles, Hardwood Academic Publishers, The Netherlands, pp. 239-268.
- Anandaraj, M., Leela, N.K. 1996. Toxic effect of some plant extracts on *Phytophthora capsici*, the foot rot pathogen of black pepper. *Indian phytopathology*, 49 (2): 181-184.

- Andriantomanga, L.Z. 2011. *Étude des conditions d'émergence d'une certification en indication géographique sur le poivre vert de Madagascar*. Mémoire de fin d'études en vue du diplôme d'ingénieur agronome, Université d'Antananarivo, 155p.
- Anonyme, 2. 2016. Cameroun : le monde d'Afrique : le poivre de Penja, produit du terroir aux arômes « magiques ». http://www.lemonde.fr/afrique/article/2016/03/08/cameroun-le-poivre-de-penja-produit-du-terroir-aux-aromes-magiques_4878710_3212.html. Consulté le 27 Octobre 2017
- Anonyme, 3. 2009. eds. Memento de l'agronome. Editeur CIRAD, 1ere édition, Hors collection, 1692p.
- Anonyme, 4. 2017. proposal for new work on codex standard for black, white and green (BWG). http://ftp.fao.org/codex/meetings/CCSCH/ccsch1/DRAFT%20REPORT/DRAFT%20REP14-SCH_App_02-4e.pdf. Consulté le 1 juillet 2018
- Anonyme, 5. 2017. Annuaire statistique du Cameroun.
- Anonyme, 6. 2015. Le poivre de penja et le miel d'oku labellisés. <http://cameroon-info.net>. 2p.
- Anonyme, 7. 2016. Investir au Cameroun. <https://www.investiraucameroun.com/agro-industrie/2803-7249-cameroun-la-production-du-poivre-de-penja-a-atteint-300-tonnes-en-2015>. Consulté en juillet 2020
- Anonyme, 8. Andermatt biocontrol: TGro. <https://www.andermttbiocontrol.com/sites/products/biostimulants-bioinnoculants/t-gro.html>. Consulté le 1 juillet 2020
- Anonyme, 9. 2020. Kocide® 2000. Vigne - Arboriculture - Cultures légumières. https://www.certiseurope.fr/fileadmin/FR/Telechargements/Fiches_etiquettes/Kocide_2000_-_Fiche_Etiquette.pdf, 7p. Consulté le 5 Janvier 2021
- Anonyme, 10. 2009. Directive 2009/128/ce du parlement européen et du conseil du 21 octobre 2009. Journal Officiel de l'UE.I. 308/85. Consulté le 28 mars 2021
- Archana, C.P., Rajan, P.P. 2013. *In vitro* screening of Black pepper (*Piper nigrum L.*) cultivars collected from Malabar region of Kerala, India, against *Phytophthora capsici* Leonian emend, Alizedeh and Tsao. *International Journal of Applied Research and Studies*, 2 (5): 2278-9480.

- Awuah, R. 1994. *In vivo* use of extracts from *Ocimum gratissimum* and *Cymbopogon citratus* against *Phytophthora palmivora* causing black pod disease of cocoa. *Annals of Applied Biology*, 14 (1) : 173-178.
- Bahorun, T. 1997. Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass*, 83-94.
- Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., Pinkas, M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.
- Bala, K., Robideau, G.P., Lévesque, C.A., de Cook, A., Zoila, A., Abdul, L., Saleem, S., Ghaffar, A., Coffey, M. 2010. *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Fungal Planet* 49. *Persoonia*, 24: 137-137.
- Barari, H. 2016. Biocontrol of tomato fusarium wilt by *Trichoderma* species under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Cercetări Agronomice în Moldova*, 1(165) : 91-98.
- Bari, R., Jones, J.D.G. 2009. Role of plants hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69: 473-488.
- Bateman, R.P., Hidalgo, E., García, J., ten Hoopen, G.M., Krauss, U., Adonijah, V. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology*, 147: 129-138.
- Beernaert, F., Bitondo, D. 1991. Simple and practical methods to evaluate analytical data o soil profiles. soil science departement, Belgian cooperative-University of Dschang, 66p.
- Bell, D.K., Well,s H.D.,Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.
- Bellebchir, K. 2001. Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. (Master 2). Université Mentouri De Constantine. République Algérienne Démocratique et Populaire, 73p.

- Ben Amiraa, M., Lopez, D., Mohamed, A.T., Khouaja, A., Chaar, H., Fumanal, B., Gousset-Dupont, A., Bonhomme, L., Label, P., Goupil, P., Ribeiro, S., Pujade-Renaud, V., Julien, J.L., Auguin, D., Venisse, J.S. 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control*, 110: 70-78.
- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quadt-Hallman, A., Tuzun, S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, 112 : 919-929.
- Benhamou, N., Rey, P. 2012. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. *Phytoprotection*, 92 (1) : 24-35.
- Benitez, A.M.C., Machado, S., Machado, B. 2002. Sideróforos : uma resposta dos microorganismos. *Química Nova*, 25(6b) : 1155-1164.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7 : 249-260.
- Benjilali, B., Tantaoui-Elarakit, A., Ismaili-Alaoui, M., Ayadi, A. 1986. Méthode d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 20 : 155-167.
- Berger, S., Benediktyova, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L., Roitsch, T. 2007. Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58: 797-806.
- Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A., Sivakumar, M. 2005. *Chemistry of Natural Products*. Narosa publishing house, New Delhi, India, 840p.
- Bopda, A. 1993. Le secteur vivrier sud-camerounais face à la crise de l'économie cacaoyère. In : Travaux de l'Institut Géographique de Reims, n°83-84. Espaces africains en crise. Formes d'adaptation et de réorganisation, pp. 109-122.

- Borget, M. 1991. *Les plantes tropicales à épices. Collection le Technicien d'Agriculture Tropicale*, Maison neuve et la rose. Paris, 182p.
- Boudart, G., Lafitte, C., Barthe, J., Frasez, D., Esquerré-Tugayé, M. 1998. Differential elicitation of defense responses by pectic fragments in bean seedlings. *Planta*, 206(1): 86-94.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brandao, M., Krettli, L., Soares, C., Marinuzzi, H. 1997: Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens species* (Asteraceae) controlled with the presence of acetylene and flavonoids compounds. *Journal Ethnopharmacology*, 57: 131-138.
- Brigita, L., Mirko, P., Alenka, J. 2005: Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214-222.
- Bruneton, J. 1993. "*Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales*" (2e édition). Tec et Doc., Lavoisier, Paris, 915p.
- Calatayud, P.A., Desneux, N., Le gall, P. 2013. Caractéristiques chimiques des plantes. In Sauvion, N., Calatayud, P.A., Thiéry, D., Marion-Poll, F. (eds) *Interactions Insectes-Plantes*. Quae, IRD éditions, pp. 2017-228.
- Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Filbo, V.C., Yunes, R.A. 1998. A review of the plants of the genus *phyllanthus* : their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Medical Research Review* ,18(4): 225-258.
- Caron, J. 2002. Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi le 5 décembre 2002.
- Caron, J., Laverdière, L. 2006. Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement. Rapport de recherche (Projet PARDE # 3333.52.02.01), 80p.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A. 2005. Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by

- high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19: 3143-3158.
- Chakraborty, A.K., Rambhade S., Patil U.k. 2011. *Chromolaena odorata* (L.): An Overview. *Journal of Pharmacy Research*, 4(3): 573-576.
- Chet, I., Baker, R. 1981. Isolation and Biocontrol Potential of *Trichoderma hamatum* from Soil Naturally Suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 71: 286-290.
- Chikh, I., Rachem, L. 2017. Analyse microbiologique de quelques épices. Master II. Université mouloudmammeri de tizi ousou. République Democratique Algerienne et Populaire, 76 p.
- Christopher, D.J., Raj, T.S., Rani, S.U., Udhayakumar, R. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f sp. lycopersici. *Journal of Biopesticides*, 3: 158–162.
- Clériveret, A., Alami, I., Breton, F., Garcia, D., Sanier, C. 1996. Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes, *Acta Botanica Gallica*, 143(6) : 531-538.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N. 2005. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3821-3832.
- Coetzee, M.P.A., Brenda, D., Wingfield, B.P., Wingfield, M.J. 2005. Phylogenetic analyses of DNA sequences reveal species partitions amongst isolates of *Armillaria* from Africa. *Mycological Research*, 109 :1223-1234.
- Conway, W.S., Leverentz, B., Janisiewicz, W.J., Blodgett, A.B., Saftner, R.A., Camp, M.J. 2004. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 34(1): 11-20.
- Cowan, M.M 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*,4(12) : 564-582.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M., Claudius-Cole, B. 2010. Les nématodes des plantes : Un guide pratique des techniques de terrain et de laboratoire. Secrétariat SP-IPM, Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), Cotonou, Benin, 93p.

- Crouzet, J., Richard, H. 2009. Le monde des épices : poivre et clou de girofle. Antananarivo... Colloque GP3A/CIDEFA organisé au sein de l'Ecole supérieure des Sciences Agronomiques (ESSA) de l'Université d'Antananarivo (2 et 3 juillet 2009), 23p.
- Cutler, H.G., Cox, R.H., Crumley, F.G., Cole, P.D. 1986. 6-pentyl- α -pyrone from *Trichoderma harzianum* its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 2943-2945.
- Dade, H.A. 1927. 'Collar crack of cacao': *Armillaria mellea* (Vahl.) Fr. *Bulletin of Department of Agriculture Gold Coast*, 22p.
- Dakole, D.C., Nguetack, J., Dongmo, L.J.B., Galani, Y.J.H., Azah, U.R., Amvam, Z.P.H. 2016. Antifungal potential of essential oils, aqueous and ethanol extracts of thirteen plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary as major tomato pathogens in Cameroon. *International Journal of Current Science*, 19: 128-145.
- Damanhour, Z.A., Ahmad, A. 2014. A Review on Therapeutic Potential of *Piper nigrum* L. (Black Pepper): The King of Spices. *Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3): 1-6.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772-772.
- De Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad S., Lévesque C.A. 2015. *Phytophthora*: molecular phylogeny and systematics. *research article*, 34: 25-39.
- De Sousa, A., AbdElgawad, H., Asard, H., Pinto, A., Soares, C., Branco-Neves, S., Braga, T., Azenha, M., Selim, S., Al Jaouni, S., Fidalgo, F., Teixeira, J. 2017. Metalaxyl Effects on Antioxidant Defenses in Leaves and Roots of *Solanum nigrum* L. *Frontier in Plant Science*, 8: 1-13.
- De Waard, P.W.F. 1979. Yellow disease complex in black pepper on the Island of Bangka. Indonesie. *Journal of Plantation Crops*, 7: 42-49.
- Deberdt, P., Mfegue, V., Tondje, P.R., Bon, M.C., Ducamp, M., Hurard, C., Begoude, D., Ndoumbe-Nkeng, M., Hebbar, P., Cilas, C. 2008. Impact of environmental factors,

- chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biological Control*, 44: 149-159.
- Denman, S., Coetzee, M.P.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Crous, P.W. 2000. Armillaria root rot. A new disease of cut- flower proteas in South Africa. *Fynbos Research*, 33: 1-6.
- Derviş, S., Türkölmez, Ş., Çiftçi, O., Özer, G., Ulubaş Serçe, Ç., Dikilitas, M. 2020. *Phytophthora litorale*: A Novel Killer Pathogen of Plane (*Platanus orientalis*) Causing Canker Stain and Root and Collar Rot. *Plant Disease*, 104(10): 2642-2648.
- Dewick, P. M. 1995. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 12(6): 579-607.
- Divya, C.R., Sharada, M.S. 2014. Screening of *Piper nigrum* l. Varieties/cultivars against quick wilt caused by *Phytophthora capsici* Leon. Under greenhouse condition. *International Journal of Recent Scientific Research Research*, 5(11): 2028-2030.
- Djeugap Fovo, J., Fontem, D., Tapondjou, A. 2011. Efficacité in vitro et in vivo des extraits de plantes contre le mildiou (*Phytophthora infestans*) de la morelle noire. *International Journal of Biology and Chemical Science*, 5: 2205-2213.
- Doumbouya, M., Abo, K., Lepengue, A.N., Camara, B., Kanko, K., Aidara, D., Kone, D. 2012. Activités comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraichères en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 50: 3520-3532.
- Drenth, A., Sendall, B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*, version 1.0, CRC for *Tropical Plant Protection* Brisbane Australia, 42p.
- Drenth, A., Sendall, B. 2004. Economic Impact of *Phytophthora* Diseases in Southeast Asia. In : (eds) Drenth, A. et Guest, D. I. *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra, pp. 10-28.
- Dubey, S.C., Suresh, M., Singh, B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40: 118-127

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, E. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3) :350-356.
- Elkolli, M. 2017. *Structure et activités des substances naturelles : principes et applications*. Mémoire de Master II, Université Ferhat Abbas de Sétif, 65p.
- Enkerli, J., Felix, G., Boller, T. 1999. Elicitor activity of fungal xylanase does not depend on enzymatic activity. *Plant Physiology*, 121: 391-398.
- Ensiminger, K., Vamos – Vignyazo, E. 1995. Inactivation of polyphenol oxidase and depletion of O-dihydroxyphenol content during enzymatic browning of fruit tissue. *American Journal of Enology and Viticulture*, 12: 1-9.
- Erez, A. 1973. Possible Errors in Quantitative Determination of Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity by Spectrophotometric Methods.' *Plant Physiology*, 51: 409-411.
- Erisléia-Meireles, N., Luciana-Xavier, P., Alessandra-Ramos, R., JoséGuilherme, M.S., William-Setzer, N., Kelly-Da-Silva, J.R. 2016. Phenylpropanoids Produced by *Piper divaricatum*, A Resistant Species to Infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the Pathogenic Agent of Fusariosis in Black Pepper. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7(2): 1-6.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., Quetin-Leclercq J. J. 2001. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, 12: 707-715.
- Faheem, A., Razdan, V., Fayaz, M., Bhat, K., Parveez, S. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *In-vitro*. *Journal of Phytology*, 2: 34-37.
- Fan, R., Li, N., Jiang, X., Yuan, F., Gao, Y. 2014. HPLC–DAD–MS/MS identification and HPLC–ABTS+ on-line antioxidant activity evaluation of bioactive compounds in liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) extract. *European Food Research and Technology*, 240: 1035-1048.

- FAO, 2019. Standard operating procedure for soil organic carbon Walkley-Black method: Titration and colorimetric method. Global Soil Laboratory Network, 1: 1-25.
- FAOSTAT, 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Consulté le 5 novembre 2019
- FAOSTAT, 2022. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>. Consulté le 28 Février 2022
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., Nurnberger, T. 2002. NPP1, a *Phytophthora* associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. *Plant Journal*, 32: 375-390.
- Feng, H., Chen, J., Yu, Z., LI, K., Li, Z., Li, Y., Sun, Z., Wang, Y., Ye, W., Zheng, X. 2020. Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Pythium* and *Phytophthora* spp. associated with soybean in the Huang-Huai region of China. *Plant Pathology*, 69: 1083-1092.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Valentao, P., Tomas-Barberan, F.A. 2007. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161: 214-223.
- Ferreres, F., Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Ferreira, M.A. 2003. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, 14: 352-359
- Fielding, J.L., Hall, J.L. 1978. A Biochemical and Cytochemical Study of Peroxidase Activity in Roots of *Pisum sativum*: i. A comparison of dab-peroxidase and guaiacol-peroxidase with particular emphasis on the properties of cell wall activity. *Journal of Experimental Botany*, 29 (4): 969-981.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual. Review Phytopathology*, 9: 275-296.
- Fontem, A.D., Olanya, W., Tsopmben, G., Owona, M. 2005. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* isolates obtained from garden huckleberry, potato and tomato Cameroon. *Crops protection*, 24: 449-456.
- Ford, K.L., Henricot, B., Baumgartner, K., Bailey, A.M., Foster, G.D. 2016. A faster inoculation assay for *Armillaria* using herbaceous plants, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92: 39-47.

- Foster, J., Hausbeck, M. 2010. Managing Phytophthora Crown and Root Rot in Bell Pepper Using Fungicides and Host Resistance. *Plant Disease*, 94: 697-702.
- Gadekar, Y.P., Thomas, R., Anjaneyulu, A.S.R., Shinde, A.T., Pragati, H. 2006. Spices and their role in meat products. *A Review Beverage and Food World*, 33(7): 57-60.
- Galani, Y.J.H., Nguéfack, J., Dakole, D.C., Fotio, D., Petchayo, T.S., Fouelefack, F.R., Amvam Zollo, P.H. 2013. Antifungal potential and phytochemical analysis of extracts from seven Cameroonian plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2(5): 140-154.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19: 711-724.
- Gary J.S., Adnan Ismaiel, MCB., De Respinis, S., Petrini, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102 (4): 944-966.
- Geng, P., Sun, J., Zhang, M., Li, X., Harnly, J.M., Chen, P. 2016. Comprehensive characterization of C-glycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC-PDA-ESI/HRMSn and mass defect filtering. *Journal Mass Spectrom*, 51(10): 914-930.
- Gerhardt, C., GMBH & CO. KG, 2015. Compendium C. Gerhardt Analyse De L'azote : la Méthode De Johan Kjeldahl. www.gerhardt.de. 6p.
- Gloanec, C., Boita, R., Porphyre, V., Techer, K., Jahiel, M., Weil, M. 2010. Potentiel et conditions d'émergence d'Indications Géographiques IG sur les filières poivre et girofle de Madagascar. Rapport de mission Du 2 au 11 novembre 2010. 138p.
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., Bouarab, K. 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens: Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8) : 3400-3419.
- Grimaldi, J., Sadoux, F.S. 1961. Le poivrier. *Le Cameroun agricole pastoral et Forestier* (Douala), 48 : 25-31.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 809-812.

- Halifu, S., Deng, X., Song, X., Song, R. 2019. Effects of Two *Trichoderma* Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Annual Seedlings. *Forests*, 10(9): 1-17.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8(10): 1773-1791.
- Harbone, J. 1976. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. *Chapman and Hall*, London, 150p.
- Harborne, J.B., Herbert, B. 1995. Phytochemical Dictionary. In: Mauro Neves Muniz. 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) -anatoxine-a et la (±) -camptothécine. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I. Français. fftel-00129103f., 195p.
- Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Kredics, L. 2013. *Trichoderma* as a Human Pathogen. In book: *Trichoderma - Biology and Applications*. Edition: first. Chapter: 17 Trichoderma as a Human Pathogen. Publisher: CABI. Editors: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M., 280p.
- Heldt, H-W. 2005. *Plant Biochemistry*. 3rd edition, Elsevier Academic Press, 630p.
- Hennings, P. 1895. *Fungi Camerunnenses* I. Botanische Jahrbücher für 469 *Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 22: 72-111.
- Holliday, P., Mowat, W. P. 1963. Foot Rot of *Piper nigrum* L. (*Phytophthora palmivora*). *Phytopathological paper, Commonwealth Mycology Institute, Kew, U.K.*, 62p.
- Hridhya, V., Kulandhaivel, M. 2018. Antimicrobial Activity of *Chromolaena odorata* Against Selected Pyogenic Pathogens. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(7): 1001-1007.
- Ikewuchi, J.C., Ikewuchi, C.C., Ifeanacho, M.O. 2013. "Analysis of the Phytochemical Composition of the Leaves of *Chromolaena odorata* King and Robinson by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector". *Pacific Journal of Science and Technology*, 14(2): 360-378.
- IPC, 2016. World pepper industry: present status and future trend. Consulté le 24 Janvier 2017.

- IPC, 2022 : <http://www.ipcnet.org/book/?p=d&id=737&start=4&pc=>. Consulté le 28 Février 2022.
- Iriti, M., Faoro, F. 2007. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water-Air-and-Soil-Pollution*, 187(1): 285-301.
- Iwashina, T., Smirnov, S., Damdinsuren, O., Kondo, K. 2012. Flavonoids from *Reaumuria soongarica* (Tamaricaceae) in Mongolia. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B.*, 38: 189-195.
- Jabeen, A., Kiran, T.V., Subrahmanyam, D., Lakshmi, D.L., Bhagyanarayana, G., Krishnaveni, D. 2017. Variations in Chlorophyll and Carotenoid Contents in Tungro Infected Rice Plants. *Journal of Research and Development*, 5(1): 1-7.
- Jacob, J.J., Middepiats, W.C.T.1988. Fascicule de détermination des principaux nématodes phytoparasites au stéréoscope, cours de nématologie, Niamey, Niger, 175p.
- Jamilah, M., Juniarti, Y. 2017. *Chromolaena odorata* Compost Affected Soil Chemical and Rice Crop (*Oryza sativa* L.). *Agrotechnology*, 6(1): 1-6.
- Jiang, S., Zhao, X., Liu, C., Dong, Q., Mei, L., Chen, C., Shao, Y., Tao, Y., HuilanYue. 2020. Identification of phenolic compounds in fruits of *Ribes stenocarpum* Maxim. by UHPLC-QTOF/MS and their hypoglycemic effects in vitro and in vivo, *Food Chemistry*, 344: 1-38.
- Jones, J. D., Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- Khoa, N. D., Thuy, P. T. H., Thuy, T. T. T., Collinge, D. B., Jørgensen, H. J. L. 2011. Disease-reducing effect of *Chromolaena odorata* extract on sheath blight and other rice diseases. *Phytopathology*, 101 :231-240.
- Koch, R.A., Wilson, A.W., Séné, O., Henkel, T.W., Aime, C. 2017. Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster*. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1) : 1-16.
- Koffi N'dodo, B. C. 2013. *Pourriture de racines et/ou du collet du papayer (Carica papaya \ : Linn. Var. golden) en Côte d'Ivoire : caractérisation de l'agent : pathogène, évaluation des traitements chimiques et perspectives de lutte biologique*. Thèse de doctorat unique de l'Université Nangui Abrogoua, 231p.

- Konappa, N., Krishnamurthy, S., Nayaka Siddaiah, C., Siddapura Ramachandrappa, N., Chowdappa, S. 2018. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1): 1-11.
- Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Cavusoğlu, A., Ercisli, S. 2013. *In vitro* antifungal effect of essential oils from *Nepeta meyeri* benth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 23(2): 209-213.
- Kra, K.D., Diallo, H.A., Kouadio, Y.J. 2009. Activités antifongiques de l'extrait de *Chromolaena odorata* (L.) King & Robins sur deux isolats de *Fusarium oxysporum* (E.F. Sm.) responsables du jaunissement mortel des feuilles des bananiers. *Journal of Applied Biosciences*, 24: 1488-1496.
- KramLing, T.E., Singleton, V.L. 1969. An Estimate of the Nonflavonoid Phenols in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20: 86-92.
- Krauss, U., Bidwell, R., Ince, J. 1998. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. *Biological control*, 13: 111-119.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N.A., ten Hoopen, G.M., Holmes, K.A. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*), *Biological Control*, 54 (3): 230-240.
- Krief, S. 2003. *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées*. Sciences du Vivant [q-bio]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2003. Français. fftel-00006170f., 348p.
- Kubicek, C.P., Starr, T.L., Glass, N.L. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology*, 52: 427-445.
- Kumar, A., Patel, A., Singh, S.N., Tiwari, R.K. 2019. Effect of *Trichoderma* spp. in Plant Growth Promotion in Chilli. *International Journal Current Microbiologie Applied Science*, 8(3): 1574-1581.

- Kumar, C.A., Rambhade, S., Patil, U.K. 2001. *Chromolaena odorata* (L.): An Overview. *Journal of Pharmacy Research*, 4(3): 573-576.
- Kunkel, B.N., Brooks, D.M. 2002. Cross-talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 325-331.
- Lamb, C.J., Dixon, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual. Review. *Plant Physiology Molecular Biology of Plants*, 48: 251-275.
- Lau, E. 2019. *The studies of defence-related transcriptome and potential biocontrol strategies in black pepper (Piper nigrum L.)*. A thesis submitted to the Faculty of Engineering, Computing and Science, Swinburne University of Technology Sarawak Campus, Malaysia, 203p.
- Lee, T.Y., Mizubuti, E., Fry, W.E. 1999. Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetic of Biology*, 26: 118-130.
- Lepoivre, P. 2003. *Phytopathologie*. Editions De Boeck Paris ,427p.
- Li Destri Nicosia, M.G., Mosca, S., Mercurio, R., Schena, L. 2015. "Dieback of *Pinus nigra* Seedlings Caused by a Strain of *Trichoderma viride*". *Plant Disease*, 99 (1): 44-49.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. 1983. Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls a and b of Leaf Extracts in Different Solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591-592.
- Ma, W., Smigel, A., Tsai, Y-C., Braam, J., Berkowitz, G.A. 2008. Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiology*, 148: 818-828.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Sarni-Manchado, P. 2005. Les composés phénoliques dans la Plante : Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : *Les polyphénols en agroalimentaire*. Cheynier V., Sarni-Manchado P. (Ed.), Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 398p.
- Maistre, J. 1964. Les plantes à épices. Paris : Maisonneuve et Larose, (Techniques agricoles et productions tropicales, n°3), 289p.

- Mammooty, K.P., Koshy, A., Vijayaraghavan, R. 2008. Screening black pepper (*Piper nigrum* L.) varieties/cultivars against Phytophthora disease in the nursery. *Journal of Tropical Agriculture*, 46: 70-72.
- Maroua Ben, A. 2018. *Etude de la relation mycoparasitaire Trichoderma harzianum avec Fusarium solani chez l'Olivier ; Caractérisations moléculaires et fonctionnelles des aquaporines chez Trichoderma harzianum*. Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Carthage, 170p.
- Martin, D., Sieffermann, G. 1967. Le département du Mungo (Ouest-Cameroun) Étude des sols et de leur utilisation, 23p.
- Martinez, C. 1997. *Rôles des peroxydases dans la résistance du cotonnier à la Bactériose causée par xanthomona scampestiuspatho var Malvacearum*. Thèse de Doctorat Présentée à l'Université de Montpellier TI Sciences et Techniques du Languedoc, 162p.
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 195-200.
- Martini, S., Conte, A., Tagliazucchi, D. 2017. Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. *Food Research International*, 97: 15-26.
- Mayek-PÉrez, N., García-Espinosa, R., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J., Simpson, J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60: 185-195.
- Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2): 232-249.
- Mbarga, J.B., Begoude, B.A.D., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., Schiffers, B., Ewbank, W., Dedieu, L., Ten Hoopen G.M. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*, 77: 15-22.
- Mbarga, J.B., Ten Hoopen, G.M., Kuate, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M.E.L., Ambang Z., Akoa A., Tondje, P.R., Begoude, B.A.D. 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol

- agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, 36: 18-22.
- Mclean, K. 2001. *Biological control of onion white rot using Trichoderma harzianum*. Doctoral PhD Theses in Lincoln University, 214p.
- Meghwal, M., Goswami, T.K. 2012a. Chemical Composition, Nutritional, Medicinal And Functional Properties of Black Pepper: A Review. *Open Access Scientific Reports*; 1(2): 1-7.
- Meghwal, M., Goswami, T.K. 2012b. Nutritional Constituent of Black Pepper as Medicinal Molecules: A Review. *Open Access Scientific Reports*, 1(1): 1-7.
- Mekam, P.N., Martini, S., Nguetack, J., Tagliazucchi, D., Stefani, E. 2019. Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta* L. leaves showing antioxidant and antifungal properties. *South African Journal of Botany*, 127: 319-332.
- Mena, P., Cirilini, M., Tassotti, M., Herrlinger, K.A., Dall'Asta, C., Del Rio, D. 2016: Phytochemical profiling of flavonoids, phenolic acids, terpenoids, and volatile fraction of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Molecules*, 21(11): 1-15.
- Metomo, R. 2015. Filière poivre de Penja et Indication Géographique Protégée. http://eeas.europa.eu/archives/delegations/un_geneva/documents/press_corner/focus/penja.pdf. Consulté le 1 juillet 2020
- Meyer, M., Hausbeck, M. 2013. Using Soil-Applied Fungicides to Manage Phytophthora Crown and Root Rot on Summer Squash. *Plant Disease*, 97: 107-112.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA, 1-7p. <https://dl.acm.org/citation.cfm?id=2016785>. Consulté le 13 Novembre 2019.
- Mohammed, Z. 2006. *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen*. Mémoire magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- Mohandas, C., Ramana, K. V., 1987. Slow wilt disease of black pepper and its control. *Indian Cocoa, Arecanut Spices Journal*, 11(1): 10-11.

- Mohapotra, N.P., Pati, S.P., Ray, R. 2000. In vitro inhibition of *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) causing Java black rot in sweet potato by phenolic compounds. Mohapotra, N.P. & Pati, S.P. & Ray, Ramesh. *In vitro* inhibition of *Botryodiplodia theobromae* (Pat.) causing Java black rot in sweet potato by phenolic compounds. *Annals of Plant Protection Sciences*, 8: 106-109.
- Molina, A., Hunt, M.D., Ryals, J.A. 1998. Impaired Fungicide Activity in Plants Blocked in Disease Resistance Signal Transduction. *The Plant Cell*, 10: 1903-1914.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20: 6115-6116.
- Motisi, N. 2009. *Réguler les maladies d'origine tellurique par une culture intermédiaire de Brassicacées : mécanismes d'action et conditions d'expression dans une rotation betterave-blé*. *Sciences du Vivant* [q-bio]. Agrocampus Ouest; Université européenne de Bretagne. Français. fftel-02466694f., 198p.
- Mouria, B., Ouazzani-Touhami, A., Douira, A. 2007. Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection*, 88(3): 103-110.
- Muhammad, A., Tronsmo A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L.G., Héraud, C., Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*, 114: 691-701.
- Mujica, M.V., Granito, M., Soto, N. 2009. Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L. *Venezuela. Interciencia*, 34(9): 650-654.
- Muller, H.R.A. 1936. The Phytophthora foot rot of pepper (*Piper nigrum* L.) in Netherlands Indies. *Meded. Inst. Pl. Ziekt, Batavia*, 88: 1-72.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the century is upon us but much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59: 501-520.

- N'guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G. N., traoré, D., Aké-assi, L. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1): 1-15.
- Nambiar, K.K.N., Sarma, Y.R. 1977. Wilt diseases of black pepper. *Journal of Plantation Crops*, 5: 92-103.
- Nambiar, K.K.N., Sarma, Y.R. 1979. Factors associated with slow wilt of pepper. *Proc. Placrosym*. 11: 348-358.
- Nascimento, S.B., Lima, A.M., Borges, B.N., de Souza, C.R. 2015. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp piperis, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Genetic Molecular Resources*, 14(3): 7567-77.
- Neandris, D., Nicole, M., Geiger, J.P. 1987. Root Rot Diseases of Rubber Trees. *Plant Disease*, 71(4): 298-306.
- Nedspice, 2015. Pepper Crop Report. Summary of presentations at ASTA and ESA Annual Meeting with 6 months forward view until February 2016, 6p.
- Ngono Ngane, R.A., Etame, R., Ndifor, F., Biyiti, L., Zollo, P.H., Bouchet, P. 2006. Antifungal Activity of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson (Asteraceae) of Cameroon. *Chemotherapy*, 52: 103-106.
- Nguefack, J., Lekagne Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Amvam Zollo, P.H., Nkengfack, A.E. 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 151-156.
- Nguyen, T. T., Bui C. B. 2011. How to prevent the most serious diseases of black pepper (*Piper nigrum* L.) a case of Vietnam. IPC annual meeting in Lombok, Indonesia, 18p.
- Nimisha, A.M., Nisha, M.S. 2019. Effect of biofumigation for the management of nematodes in banana. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(5): 951-956.

- Nisar, A., Fazal, H., Abbasi, H., Farooq, S., Ali, M., Ali Khan, M. 2012. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3): S1945-S1953.
- Nusret, O., Newman, S.E. 2004. Biological Control with *Trichoderma* Spp. With Emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7: 478-484
- Nzenowo, E. 2017. Processus de mise en place de l'Indication Géographique Poivre de Penja. Séminaire sur les Indications Géographiques et l'Afrique. Maroc, Casablanca 13-14 Décembre 2017, 16p.
- Odebeyi, O. O., Sofowora, F. H. 1978. antimicrobial alkaloids from Nigeria chewing stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Medicine*, 36: 204-225.
- Okwu, D.E., Josiah, C. 2006. Evaluation of the Chemical Composition of Two Nigerian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 357-336.
- Omorusi, V.I., Eguavoen, O.I., Ogbebor, N.O., Bosah, B.O., Orumwense, K., Ijie, K. 2014. Control of White Root Rot Disease in Rubber Plantations in Nigeria. *International Journal of Microbiology and Immunology Research*, 3(4): 46-51.
- Onana, J.C. 2020. Femmes et accessibilité à la propriété foncière au Cameroun. Éditions universitaires européennes. 132p.
- Onaran, A., Yilar, M. 2012. Antifungal activity of *Trachystemon orientalis* L. aqueous extracts against plant pathogens. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 287-291.
- Orni, P.R., Shetu, H.J., Khan, T., Bin Rashed, S.S., Dash, P.R. 2018. A comprehensive review on *Commelina benghalensis* L. (commelinaceae). *International Journal of Pharmacognosy*, 5(10): 637-645.
- Otieno, W., Jeger, M., Termorshuizen, A. 2003. Effect of infesting soil with *Trichoderma harzianum* and amendment with coffee pulp on survival of *Armillaria*. *Biological Control*, 26: 293-301.
- Ouedraogo, E., hien, E. 2015. Effet d'un compost enrichi par des spores du clone *Trichoderma harzianum* (rifai) sur le rendement du niébé et du maïs sous abris au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3): 1330-1340.

- Pandey, D., Tripathi, N., Tripathi, R., Dixit, S. 1982. Fongitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89: 344-349.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y.K., Arora, S, Reddy, M.K. 2017. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science*, 8: 581-593.
- Parveen, I., Wilson, T., Threadgill, M.D., Luyten, J., Roberts, R.E., Robson, P.R.H., Donnison, I.S., Hauck, B., Winters, A.L. 2014. 'Screening for potential co-products in a *Miscanthus sinensis* mapping family by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Phytochemistry*, 105: 186-196.
- Peregrine, W.T.H., Ahmad, K.B. 1982. Brunei, a first annotated list of plant diseases and associated organisms. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Richmond, Surrey, England, 87p.
- Perrouin, D., Hubert, O., Blouin, G. 2014. Le poivre. Services espace vert et Environnement. Nantes, France, 24p.
- Petchayo, T.S., Nguéfack, J.G., Yamdeu, J.H., Fouelefack, F.R., Dakole, D.C., Fotio D., Amvam Zollo, P.H. 2013. Antifungal potential of extracts from four plants against *Acremonium apii* and *Colletotrichum dematium*, two major pathogens of celery (*Apium graveolens* L.) in Cameroon. *International Journal of Current Science*, 8: 115-124.
- Petchayo, T.S., Mfègue, V.C., Nguéfack, J., Tchotet, T.J.M., Begoude, B.A.D., Ducamp, M., Djeugap, J.F., Ten Hoopen, G.M. 2015. Penja pepper under threat in Cameroon! In: FEMS abstract. Maastricht: s.n., Congress of European Microbiologists (FEMS2015). 6, 2015-06-07/2015-06-11, Maastricht (Pays-Bas), pp. 2642-2643.
- Pham, J., 2007. *Piper nigrum* L. : *Aspects botaniques, chimiques et pharmacologiques*. Diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Nantes, Faculté des pharmacies, 84p.
- Phan, T.T., Wang, P. L., See, R.J. Grayer, S.Y., Chan, S.T. L. 2001. Phenolic Compounds of *Chromolaena odorata* Protect Cultured Skin Cells from Oxidative Damage: Implication for Cutaneous Wound Healing. *Biological and Pharmacology Bulletin*, 24(12): 1373-1379.

- Poovaiah, B.W., Reddy. A.S.N. 1993. Calcium and signal transduction in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12: 185-211.
- Prabhakaran Nair, K.P. 2004. The Agronomy and Economy of Black pepper (*Piper nigrum* L.) The King of Spices. *Advances in Agronomy*, 82: 271-389.
- Pugin, A., Allegre, M., Blanc, S., Courtois, C., Dahan, J., Vandelle, E., and Adrian, M., Bentéjac, M., Bourque, S., Chiltz, A., Daire, X., Garcia-Brugger, A., Héloir, M-C, Klinguer, A., Poinssot, B., Trouche, E., Trouvelot, S., Wendehenne, D. 2005. Les mécanismes de défense chez les plantes. *Sciences de la Nature-Agronomie*. In : Revue Annuelle de la Recherche à l'Université de Bourgogne. Fortier, J.C., Truchetetn F., Mordant, C. (Eds). UB Sciences, pp. 50-55.
- Qualhato, T.F., Lopes, F.A., Steindorff, A.S., Brandão, R.S., Jesuino, R.S., Ulhoa, C.J. 2013. Mycoparasitism studies of Trichoderma species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35(9): 1461-1468.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F. J., de Forchetti, S. M., Tigier, H., & Valpuesta, V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant physiology*, 122(4): 1119-1127.
- Radmer, L., Anderson, G., Malvick, D.M., Kurle, J.E., Rendahl, A., Mallik, A. 2017. *Pythium*, *Phytophthora*, and *Phytophthora* spp. Associated with Soybean in Minnesota, Their Relative Aggressiveness on Soybean and Corn, and Their Sensitivity to Seed Treatment Fungicides. *Plant Disease*, 101(1): 62-72.
- Rafitoharson, N.M. E. 2016. *Définition et mise en place d'un protocole de multiplication du Tsiperifery (Piper sp.) à Beforona en vue de sa domestication*. Mémoire de Master, Université d'Antananarivo Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques Mention Foresterie et Environnement, 92p.
- Rajalakshmy, V.K., Jayarathnam, K. 2000. Root diseases and non- microbial maladies. In: *Natural Rubber: Agro-management and crop processing* (Eds). P.J George and C. Kuruville Jacob) Rubber Research Institute of India, Kohayam, Kerala, India, pp. 309-336.

- Ramachandran, N., Sarma, Y.R., Anandaraj, M. 1991. Management of phytophthora infection in black pepper (*Piper nigrum L.*). In: *Diseases of Black Pepper*. Sarma, Y R., Premkumar, T (eds.). National Research Centre for Spices, Calicut, pp. 158-174.
- Ramana, K.V., Mohandas, C. 1987. Plant-parasitic nematodes associated with black pepper (*Piper nigrum L.*) in Kerela. *Indian Journal of Nematology*, 17: 62-66.
- Ramana, K.V., Mohandas, C., Eapen, S.J. 1994. Plant parasitic nematodes and slow decline disease of black pepper. National Research Center for Spices. *Technical Bulletin*, 21p.
- Ramana, K.V., Santhosh, J.E. 2000. Nematode induced diseases of black pepper. In: Ravindran P.N., (ed): *Black pepper, Piper nigrum. Medicinal and Aromatic plants-industrial profiles*, Hardwood Academic Publishers, The Netherlands, pp. 269-288.
- Ramana, K.V., Sarma, Y.R., Mohandas, C. 1991. Slow decline of black pepper (*Piper nigrum L.*) and role of plant parasitic nematodes and *Phytophthora capsici* in the disease complex. *Journal of Plantation Crops*, 29: 85-89.
- Ramana, K.V., Sarma, Y.R., Mohandas, C. 1992. Slow decline disease of black pepper (*Piper nigrum*) and role of plant parasitic nematodes and *Phytophthora capsici* in the disease complex. *Journal of Plantation Crops*, 20: 65-68.
- Ratsimbazafy, A. 1995. *Perspectives de production de poivre biologique (Piper nigrum L.) dans la région du Sambirano* ; Mémoire de fin d'étude Dép. Agriculture ; Etablissement d'Enseignement Supérieur des Sciences Agronomiques ; Université d'Antananarivo ; Antananarivo, 104p.
- Ravindra, H., Sehgal, M., Manu, T.G., Murali, R., Latha, M., Narasimhamurthy, H.B. 2014. Incidence of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in black pepper in Karnataka. *Journal of Entomology and Nematology*, 6: 51-55.
- Ravindran, P.N. 2000. Black pepper, *Piper nigrum*. Medicinal and Aromatic plants-industrial profiles, Hardwood Academic Publishers, The Netherlands, 553p.
- Rishbeth, J. 1980. Armillaria on cacao in Sao Tome. *Tropical Agriculture*, 57: 155-165.
- Robinson, G.W. 1922. A new method for the mechanical analysis of soils and other dispersions. *Journal of Agricultural Science*, 12(3): 306-321.

- Roquebert, M.F. 1996. Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4èmes Rencontres en Toxicologie, Paris, pp. 13-15.
- Roux, J., Coetzee, M.P.A. 2016. Armillaria root rot of *Theobroma cacao*. In: Bailey BA, Meinhardt LW (eds) Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters. Springer, New York, pp. 429-447.
- Roux, J., Mbenoun, M., Misse, C., Coetzee, M.P.A., Begoude, D.A., Wingfield, M.J. 2012. Molecular identification of Armillaria isolates associated with root-rot disease of cacao in Cameroon. 17th International Cocoa Research Congress (COPAL). 15-20 Oct. Yaoundé, Cameroon
- Sadananda, A.K. 2000. Agronomy and Nutrition of black pepper. In: Ravindran P.N., (ed): *Black pepper, Piper nigrum. Medicinal and Aromatic plants-industrial profiles*, Hardwood Academic Publishers, The Netherlands, pp. 163-223.
- Sadanandan, A.K. 1993. Potassium in soils growing black pepper (*Piper nigrum* L) and response of applied potash. In: "Potassium for Plantation Crops", (Eds) Mahatim Singh and M.K, Mishra. Potash Research Institute of India, Gurgaon, Haryana. pp. 75-88.
- Salhi, N.A., Saghir, S., Terzi, V., Brahmi, I., Ghedairi, N., Bissati, S. 2017. Antifungal Activity of Aqueous Extracts of Some Dominant Algerian Medicinal Plants. *BioMed Research International*, 1: 1-6.
- Samuels, G.J. 2006. Trichoderma: Systematic, the Sexual State, and Ecology, 96: 195-206.
- Samuels, G.J., 2004. Trichoderma in biological control: A taxonomist reports. *Biocontrol News and Information*, 25(1): 1-16.
- Samuels, G.J., Dodd, S., Castlebury, L., Petrini, O. 2002. Trichoderma Species Associated with the Green Mold Epidemic of Commercially Grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170.
- Sarma, Y.R., Anandaraj, M. 1995. Diseases of black pepper (*Piper nigrum* L.) and their management. *Journal of Spices and Aromatic Crop*, 4(1): 17-23.
- Sarma, Y.R., Manohara, D., Premkumar, T., Eapen, S.J. 2010. Diseases and insects' pests of black pepper (*Piper nigrum* L.). Lina Building, Jakarta, 116p.

- Sarma, Y.R., Ramachandra, N., Anandaraj, M. 1991. Black pepper diseases in India. In diseases of black pepper. Proceedings of International pepper community workshop on black pepper disease. Goa, India (Eds., Sarma, Y.R. and Premkumar, T.). National Research Centre for Spices, Calicut, Kerala, India, pp. 55-101.
- Sasikumar, B., George, J.K. 1992. Direct single node propagation of black pepper. *Journal of Plantation Crops*, 20: 165-167.
- Sasikumar, B., Thankamani, C.K., Srinivasan, V., Devasahayam, S., Eapen, S.J., Kumar, A., Zachariah, T J. 2009. Black pepper. *Niseema Printers & Publishers*, Kochi, 26p.
- Sbay, H., Lamhamedi, M.S. 2015. Guide pratique de multiplication végétative des espèces forestières et agroforestières : techniques de valorisation et de conservation des espèces à usage multiples face aux changements climatiques en Afrique du Nord. Royaume du Maroc, Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte contre la Désertification, *Centre de Recherche Forestière*, 124p.
- Scott, R.W. 2010. Guide sur la culture du poivre de penja, 1: 1-56.
- Sell, C.S. 2003. A fragrant introduction to terpenoid chemistry UK. *The royal society of chemistry*, 410p.
- Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K., Nejat, N. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*, 78: 160-169.
- Shashidhara, S., Lokesh, M.S., Lingaraju, S., Palakshappa, M.G. 2005. *In vitro* Evaluation of Microbial Antagonists, Botanicals and Fungicides Against *Phytophthora capsici* Leon. The Causal Agent of Foot Rot of Black Pepper. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 21: 527-531.
- Silayoi, I. 1987. Black pepper diseases. *AGRIS*, 7(2): 81-91.
- Silvestro, D., Michalak, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12: 335-337.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

- Sitepu D., Mustika, I. 2000. Diseases of black pepper and their management in Indonesia. In: Ravindran PN (ed) *Black pepper, Piper nigrum. Medicinal and aromatic plants— industrial profiles*, vol 13. Black pepper, *Piper nigrum*. Harwood, Amsterdam, pp. 297-305.
- Sitepu, D., Kasim, R.1991. Black pepper disease in Indonesia and their control strategy. In Sarma, Y.R and Premkumar, T. eds., Diseases of black pepper. *National Research Centre of Spice, Calicut*, India, pp. 13-28.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-2690.
- Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y., Stewart, A. 2003. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4): 281-291.
- Stinzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Weidemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B. 1993. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75: 687-706.
- Subila, K.P., Suseela Bhai, R. 2020. *Pythium deliense*, a pathogen causing yellowing and wilt of black pepper in India. *New Disease Reports*, 42(1): 6-6
- Sys, C., Van Ranst, E., Debaveye, I.J. 1991. Land evaluation, part 1: Principles in land evaluation and crop production calculation. General Administration for Development Cooperation, 280p.
- Tabasum, S., Khare, S., Jain, K. 2016. Spectrophotometric quantification of total phenolic, flavonoid, and alkaloid contents of *abrus precatorius* l. Seeds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2): 371-374.
- Takimoto, S. 1941. *Annual review of Phytopathology Society of Japan*, 11(2): 89-91.
- Takooree, H., Aumeeruddy, M.Z., Rengasamy, K.R.R., Venugopala, K.N., Jeewon, R., Zengin, G., Mahomoodally, M.F. 2019. A systematic review on black pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 59: 210-243.

- Tanhan, P., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Chaiyarat, R., Upatham, S. 2011. Effects of soil amendments and EDTA on lead uptake by *Chromolaena odorata*: Greenhouse and Field Trial Experiments. *International Journal of Phytoremediation.*, 13: 897-911.
- Tano, M.A. 2012. *Crise cacaoyère and stratégies des producteurs de la sous-préfecture de Meadji au sud-ouest ivoirien*. Thèse de doctorat, Université Toulouse le Mirail-Toulouse II, 263p.
- Tarafdar, J., Marschner, H. 1994. Efficiency of VAM hyphae in utilisation of organic phosphorus by wheat plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 40: 593-600.
- Tchameni, S.N., Sameza, L.M., O'donovan, A., Fokom, R., Mangaptche Ngonkeu, E.L., Nana, L.W., 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*, 8(2): 84-92.
- Tchotet Tchoumi, J.M., Coetzee, M.P.A., Vivas, M., Rajchenberg, M., Roux, J. 2017. Wood-rotting basidiomycetes associated with declining native trees in timber-harvesting compartments of the Garden Route National Park of South Africa. *Austral Ecology*, 42(8): 947-963.
- Ten Hoopen, G.M. 2007. *Monitoring mycoparasites on the fructoplane of cocoa (Theobroma cacao L.)*. PhD. Thesis. Royal Holloway University of London, 243p.
- Thangaselvabal, T., Gailce Leo Justin, C., Leelamathi, M. 2008. Black pepper (*Piper nigrum* L.) 'the king of spices' - A review. *Agricultural Review*, 29(2): 89-98.
- Theis, T., Stahl, U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Science*, 61: 437-455.
- Thierry, 2017. Le poivre de Penja. <http://lasagatnt.com/le-poivre-de-penja/> consulté le 1 juillet 2020.
- Thomas, L., Rajeev, P. 2015. Black pepper. ICAR- *Indian Institute of Spices Research*, Kozhikode, 24p.
- Thomidis, T., Exadaktylou, E. 2012. Effectiveness of cyproconazole to control *Armillaria* root rot of apple, walnut and kiwifruit. *Crop Protection*, 36: 49-51.

- Thuy, T.T.T., Yen, N.T., Tuyet, N.T.A., Te, L.L., De Waele, D. 2012. Plant parasitic nematodes and yellowing of leaves associated with black pepper plants in Vietnam, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 45(10): 1183-1200.
- Tondje, P.R., Begoude, B.A.D., Samuels, G. J., Hebbar, P. K., Foko, J. 2005. Biological control of the cacao black pod disease causative agent *Phytophthora megakarya* with *Trichoderma asperellum*.. In: Proceedings of the 14th International Cocoa Research Conference. 13-18October 2003 Accra (Ghana), pp. 677-682.
- Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widmer, T., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D., Hebbar, K.P. 2007a. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control*, 43: 202-212.
- Tondje, P.R., Roberts, D., Begoude, B.D., Nyemb, T., Ndoumbe, M., Bon, M.C., Samuels, G.J., Hebbar, P.K., Bateman, R., Fontem, D., Weise S. 2007b. On farm evaluation of biological control potential of some native isolates of *Trichoderma asperellum* on *Phytophthora megakarya*, the causative agent of cacao black pod disease in Cameroon. *Biological control of fungal and bacterial plant pathogens*, 30(6): 405-410.
- Torres, M.A., Jones, J.D., Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141: 373-378.
- Touzé, A. 1979. Les moyens de défense des plantes contre les microorganismes parasites, Bulletin de la Société Botanique de France. *Actualités Botaniques*, 126(4) : 103-110.
- Uyi, O.O., Ekhatior, F., Ikuenobe, C.E., Borokini, T.I., Aigbokhan, E.I., Egbon, I.N., Adebayo, A.R., Igbinsosa, I.B., Okeke, C.O., Igbinsosa, E.O., Omokhua, G.A. 2014. *Chromolaena odorata* invasion in Nigeria: A case for coordinated *biological control* *Management of Biological Invasions*, 5(4): 377-393.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology*, 44: 135-162.
- Vandana, V.V., Suseela Bhai, R., Shamina, A. 2014. Biochemical defense responses of black pepper (*Piper nigrum* L.) lines to *Phytophthora capsica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 88: 18-27.

- Verheij, E.W.M., Lovenstein, H. 2004. A nurseryman and his trees; the work of John Maurice. *Agrospecial* No.1, AGROMISA, Wageningen, Pays-Bas, 43p.
- Verma, S., Sharma, H., Garg, M. 2014. *Phyllanthus Amarus*: A Review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(2): 18-22.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T., Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of Pythium and Phytophthora species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98: 410-422.
- Voegele, R.T., Hahn, M., Mendgen, K. 2009. The Uredinales: Cytology, Biochemistry, and molecular biology. *In Plant Relationships*, 2: 69-98.
- Waghunde, R. 2016. Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. *African journal of agricultural research*, 11: 1952-1960.
- Wahid, P. 1976. Studies on yellows disease in black pepper on the Island of Bangka. *Pember. L.P.T.I.*, 21: 64-79.
- Wang, S., Hu, T., Zhang, F., Forrer, H.R., Cao, K. 2007. Screening for plant extracts to control potato late blight. *Frontiers of Agriculture in China*, 1: 43-46.
- Waridel, P., Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hobby, K.R., Major, H.J., Hostettmann, K. 2001. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 926: 29-41.
- Whipps, J. M. 1997. Developments in biological control of soil borne plant pathogens. In Screening of antagonistic bacteria for biological control of nursery wilt of black pepper (*Piper nigrum*). *Microbiological. Research*, 158: 91-97.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Ed) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.
- Williams, T. H., Liu, P. S. W. 1976. A host list of plant diseases in Sabah, Malaysia. A host list of plant diseases in Sabah, Malaysia. Wallingford, UK: *CAB International*, 67p.

- Woo, S.L., Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 107-130.
- Worrall, J.J. 1991. Media for selective isolation of hymenomycetes. *Mycologia*, 83: 296-302.
- Worrall, J.J. 2004. Armillaria root disease. *The Plant Health Instructor*. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalbasidio/pdlessons/Pages/Armillaria.aspx>. consulté le 9 juillet 2016
- Wrather, J.A., Koenning, S.R. 2006. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology*, 38 : 173-180.
- Wright, L. 2020. *Le poivre, de l'épice au médicament*. Thèse de Doctorat PhD Université de Toulouse III. Paul Sabatier, 116p.
- Wuyts, N., De waele, D., Swennen, R., 2006. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* grandr naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 308-314.
- Xia, Y., Luo, H., Liu, J.P., Glud, C. 2011. Phyllanthus species for chronic hepatitis B virus infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4: 1-10.
- Yao, K.P., Wahounou, J., Diallo, H. 2018. Evaluation de l'efficacité des fongicides au laboratoire contre *Corynespora cassiicola*, agent causal de la maladie « Corynespora Leaf Fall » de l'hévéa en Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 14(18): 340-351.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kalpunik, Y., Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microélément concentrations and increased growth of cucumber plant. *Plant Soil*, 235: 235-242.
- Yogesh, M.S., Mokshapathy, S. 2013. Production and Export Performance of Black Pepper. *International Journal of Humanities and Social Science Invention*, 2(4): 36-44.
- Yusuf, Y. 2006. *Trends Food Sciences Technology*, 17: 64-71.

- Zachariah, T.J., Safeer, A.L., Jayarajan, K., Leela, N.K., Vipin, T. M., Saji, K.V., Shiva, K.N., Parthasarathy, V.A., Mammooty, K.P. 2010. Correlation of metabolites in the leaf and berries of selected black pepper varieties. *Scientia Horticulturae*, 123(3): 418-422.
- Zheng Zhang, Z., Tang, Y., Yu, B., Ying, J., Wu, B., Wu, J., Zhao, J., Chen, Z., Xu, J., Tang, C. 2019. Chemical composition database establishment and metabolite profiling analysis of Yangyin qingfei decoction. *Biomedical Chromatography*, 33(9): 1-13.
- Zinga, I., Chiroleu, F., Valam, Z.A., Ballot, C.S.A., Harimalala, M., Kosh, K.E., Yandia, P.S., Silla, S., Reynaud, B., Lefeuvre, P., Lett, J.M., Dintinger, J. 2016. Evaluation of cassava cultivars for resistance to cassava mosaic disease and yield potential in Central African Republic. *Journal of Phytopathology*, 164(11-12): 913-923.
- Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion of Immunology*. 20(1): 10-16.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, 428: 764-767.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques physiques des sols cinq zones inclus dans l'aire géographique

Caractéristiques physiques	Manjo / Nlohé	Loum	Njombé Penja	Tombel	Mbanga-mombo
Pluviométrie moyenne annuelle	3 500 mm	3 500 mm	3 500 mm	3 000 mm	2 800 mm
Altitude	390 m – 579 m	300 m – 350 m	150 – 200 m	400 – 500 m	140 m – 150 m
Température moyenne annuelle	25°C	26° C	28 ° C	26°C	28°C
Taux d'humidité	61%	70%	70%	65%	79%
Types de sols		Sols ferrallitiques typiques	Sols peu évolués sud Sols peu évolués nord	Sols peu évolués sud	Sols ferrallitiques typiques

Source : Données météorologiques CARBAP Njombé : Novembre 2011 et étude pédologique des sols du Moungo : par BACHELIER et al. (1956)

Annexe 2 : Fiche d'enquête auprès des pipériculteurs de l'aire géographique poivre de Penja

QUESTIONNAIRE

SECTION 1: INFORMATIONS GENERALES

S00Q0 NUMERO QUESTIONNAIRE : _____

1: EQUIPE DE COLLECTE ET D'EXPLOITATION

S11Q01	NOM ENQUETEUR: _____
S11Q02	NOM SUPERVISEUR: _____
S11Q03	DATE DE L'ENQUETE: _____
S11Q04	NOM AGENT DE SAISIE: _____
S11Q05	DATE DE SAISIE: _____

2: CARACTERISATION DE LA ZONE DE PRODUCTION ET IDENTIFICATION DE L'ENQUETE

S12Q01	Région : _____	
S12Q02	Département: _____	
S12Q03	Arrondissement/commune rurale: _____	
S12Q04	Village: _____	
S12Q05	Appartenez-vous à une Coopérative / Organisation Paysanne 1=Oui ; 2=Non	<i>Si Non allez à S12Q09</i>
S12Q06	Si oui laquelle ? _____	
S12Q07	Quels sont les services rendus par cette Coopérative / Organisation Paysanne ? _____	
S12Q08	Si non, pourquoi _____	
S12Q09	Nombre moyen annuel de jours de pluie (10 dernières années) _____ Quantité moyenne annuelle de pluie (mm) (10 dernières années) _____ Périodes de pluie (mois) _____	

	NB : Données à fournir par le Chef de Poste Agricole ou le Délégué d'Agriculture de la localité	
S12Q10	Nom du chef d'exploitation (CE): _____	
S12Q11	Nom du répondeur (si autre que le CE) _____	
S12Q12	Relation du répondeur avec le CE _____	
S12Q13	Sexe du CE: 1=Masculin 2=Féminin	<i>Encercler le code de la réponse correspondante</i>
S12Q14	Age du CE): _____	en années révolues
S12Q15	Niveau d'instruction du CE: 1=Aucun; 2=Primaire; 3=Secondaire 1 ^{er} cycle; 4= Secondaire 2 nd cycle; 5= Supérieur; 6=Autre (préciser) _____	<i>Encercler le code de la réponse correspondante</i>
S12Q16	Situation matrimoniale: 1= Marié(e); 2=Célibataire; 3=Divorcé(e); 4=Veuf (ve)	
S12Q17	Nombre d'enfants du CE _____	

SECTION II. INFORMATIONS GENERALES SUR L'EXPLOITATION

S2Q01	Nombre de plantations poivrières : _____ Quelle est la superficie totale de vos plantations de poivriers _____ Nombre autres plantations que le poivrier: _____																															
S2Q02	Quelle est votre principale activité? 1=Agriculture; 2=Pisciculture; 3=Pêche; 4=Artisanat; 5=Elevage; 6=Commerce; 7=Salarie; 8=Aucune; 9=Autre (préciser) _____																															
S2Q03	Quelles sont vos activités secondaires? 1=Agriculture; 2=Pisciculture; 3=Pêche; 4=Artisanat; 5=Elevage; 6=Commerce; 7=Salarie; 8=Aucune; 9=Autre (préciser) _____	<i>Encercler le code de la réponse correspondante (possibilité réponses multiples)</i>																														
S2Q04	Quelles sont vos principales sources de revenus et quel en est le pourcentage par rapport au revenu total ? <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Source de revenus</th> <th>Oui/Non</th> <th>% Revenu total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Poivre</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Autres produits agricoles</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Produits animaux</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Produits halieutiques</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Produits de l'artisanat</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Salaire/Pension</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Aides</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Petit commerce</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Autre (préciser)</td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Source de revenus	Oui/Non	% Revenu total	Poivre			Autres produits agricoles			Produits animaux			Produits halieutiques			Produits de l'artisanat			Salaire/Pension			Aides			Petit commerce			Autre (préciser)			
Source de revenus	Oui/Non	% Revenu total																														
Poivre																																
Autres produits agricoles																																
Produits animaux																																
Produits halieutiques																																
Produits de l'artisanat																																
Salaire/Pension																																
Aides																																
Petit commerce																																
Autre (préciser)																																
S2Q05	Possédez-vous les biens et équipements suivants ? <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Equipements</th> <th>Oui/Non</th> <th>Nombre</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Tracteur</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Voiture</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Moto</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Réfrigérateur</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Gazinière</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Téléviseur</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Téléphone</td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Equipements	Oui/Non	Nombre	Tracteur			Voiture			Moto			Réfrigérateur			Gazinière			Téléviseur			Téléphone									
Equipements	Oui/Non	Nombre																														
Tracteur																																
Voiture																																
Moto																																
Réfrigérateur																																
Gazinière																																
Téléviseur																																
Téléphone																																
S2Q07	Appréciation relative de la richesse par l'enquêteur 1=Très pauvre; 2=Pauvre; 3=Moyen; 4=Riche; 5=Très riche																															

S2Q08	Combien de personnes (membres de votre ménage et autres) travaillent dans votre plantation de poivre ?				
	Groupe d'âges	Masculin		Féminin	
		Temps plein	Temps partiel	Temps plein	Temps partiel
	Moins de 18 ans				
Plus de 18 ans					

SECTION III. INFORMATIONS SPECIFIQUES CONCERNANT LE POIVRE

III.1 Identification des parcelles de poivriers (la plus grande parcelle si vous en avez plusieurs)

S31 Q01	S31Q 03	S31 Q04	S31 Q05	S31 Q06	S31Q0 7	S31Q0 8	S31Q 09	S31Q 10	S31Q11		S31Q12		S31Q 13
N° parcelle	Zone de production IGPP	Superficie (ha)	Cultures présentes dans la	Age de plantation	Mode d'acquisition ¹	Gestioinaire de la parcelle ²	Rendement annuel (kg /ha)	Précédents culturaux	Fertilisants utilisés <i>indiquer type³ et qté en kg</i>		Pesticide appliqué durant la saison passée <i>indiquer type⁴ et qté en kg</i>		Remarques

¹ Titulaire : 1= achat; 2= location; 3= héritage; 4= don; 5= terre familiale; 6= autre (spécifier)

² Exploitant: 1= soi même; 2= conjoint (e); 3= les deux, 4= membre de la famille; 5= étranger au ménage; 6= «50-50»; 7= autre (spécifier)

³ Fertilisants: 0= rien; 1= fumier; 2= compost; 3= biomasse; 4= DAP; 5= urée; 6= NPK (spécifier ratios); 4= autre (spécifier)

⁴ Pesticides utilisés: 0= rien; 1= fongicide; 2= herbicide; 3= insecticide; 4= autre (spécifier)

III.2 Matériel végétal

S32Q01	Produisez-vous vous-mêmes vos plants ? 1=Oui ; 2=Non	
S32Q02	Comment obtenez-vous le matériel végétal? 1=Bouturage en pépinière; 2=Bouturage direct en champ; 3=Semis en pépinière; 4=Semis direct en champ	
S32Q03	Si bouturage, quelle partie de la plante ? 1=tige rampante; 2=tige grimpante; 3=tige retombante; 4=tige de branche; 5=n'importe laquelle	
S32Q04	Longueur de la bouture ? 1=un nœud ; 2=deux nœuds; 3=trois nœuds; 4=quatre nœuds; 5=cinq nœuds ; 6=autres	
S32Q05	Quel substrat utilisez-vous ? 1=terreau ordinaire; 2=autre (spécifier) _____	
S32Q06	Quel est le taux de réussite du bouturage ? 1=< 25%; 2=< 50%; 3=50-75% ; 4=> 75% ; 5=Autre	
S32Q06	Si semis, quelle est le "type" la graine ? 1=vert ; 2=jaune ; 3=rouge; 4=noir; 5=blanc ; 6=autre	
S32Q07	Quel est le taux de réussite du semis ? 1=< 25%; 2=< 50%; 3=50-75% ; 4=> 75% ; 5=Autre	
S32Q08	Combien de variétés distinguez-vous dans votre champ ? _____	
S32Q09	Les variétés ont-elles de noms ? 1=oui; 2=non	

S32Q010	Si oui, lesquelles ?.....	
S32Q011	Si non, comment les distinguez-vous ? 1=morphologie foliaire; 2=grossueur des graines; 3=longueur des grappes; 4=densité des graines/grappe ; 5=période de floraison ou de récolte ; 6=port ou architecture du plant; sensibilité aux maladies ; 7=sensibilité à la sécheresse ; 8=autre	<i>Possibilité de Réponses multiples</i>

III.3 Description du site

S33Q01	Topographie : 1=en pente; 2=plat ; 3=monticule; 4=autre	
S33Q02	Historique : 1=recru de forêt; 2=jachère ; 3=autre (préciser) _____	
S33Q03	Description du sol : 1=sols noirs ; 2=présence de la pouzzolane ; 3=argilo-sableux ; 4=présence de blocs pierreux ; 5=autres	
S33Q04	Système de culture : 1=culture pure; 2=association culturale	
S33Q05	Si association, quelles sont les plantes associées ? 1=plantain; 2=papayers ; 3=macabo; 4=autres	
S33Q06	Mode de tuteurage : 1=tuteurs morts ; 2=tuteurs vivants	
S33Q07	Si tuteurs morts, quel matériel ? 1=béton armé; 2=bois mort ; 3=cornière métallique; 4=autre _____	
S33Q08	Si tuteurs vivants, quelles espèces ? _____	

III.4 Conduite en champ

S34Q01	Ecartements entre les plants ? En ligne _____ ; En colonne _____ .	
S34Q02	Mois de plantation _____	
S34Q03	Chronologie de mise en place : 1=tuteur avant poivrier ? ; 2=poivrier avant tuteur ? ; 3=les deux au même moment	
S34Q04	Position relative des deux espèces ? 1=en contact ; 2=espacées;	
S34Q05	Nombre de poivrier/tuteur _____	
S34Q06	Age du poivrier lors de la mise en terre (mois) : _____	
S34Q07	Dimensions du tuteur : 1=longueur(<1m ; 1m ; 1,5m ; 2m) _____ ; 2=grossueur(petit ; moyen ; gros)	
S34Q08	Taux de survie des poivriers après leur mise en place: 1=<25% ; 2=<50% ; 3=>50% ; 4=> 75% ; 5=autre _____	
S34Q09	Taux de survie des tuteurs après leur mise en place: 1=<25% ; 2=<50% ; 3=>50% ; 4=> 75% ; 5=autre _____	
S34Q10	Taux de survie durant la première saison sèche du Poivrier : 1=<25% ; 2=<50% ; 3=>50% ; 4=> 75% ; 5=autre _____	
S34Q11	Taux de survie durant la première saison sèche du Tuteur : 1=<25% ; 2=<50% ; 3=>50% ; 4=> 75% ; 5=autre _____	
S34Q12	Pratiques de réduction des mortalités du Poivrier : 1=variété ; 2=traitement chimique; 3=arrosage ; 4=aucune ; 5=autre _____	

S34Q13	Pratiques de réduction des mortalités du Tuteur : 1=maturité du tuteur ; 2=traitement chimique ; 3=stockage ; 4=période de coupe ; 5=aucune ; 6=autre _____	
S34Q14	Pratique satisfaisante sur poivrier ? 1=Oui ; 2=Non	
S34Q15	Pratique satisfaisante sur tuteur ? 1=Oui ; 2=Non	

S3.5 Evaluation des charges de gestion de la parcelle principale (si vous en avez plusieurs)

S35Q01	Sources de financement de vos activités ? 1= Tontine 2= Banque 3= Economies personnelles 4= Autres (spécifier).....	
--------	--	--

S35Q02	S35Q03	S35Q04	S35Q05	S35Q06	S35Q07	S35Q08	S35Q09	S35Q10
Opération culturale	Nbre de passage	Période	Nbre de jour/passage	Nbre heure moyen/jour	Nbre personne MOF	Nbre personne MOS	Coût MOS (FCFA)	Remarque

MOF : Main d'œuvre familiale ; MOS : Main d'œuvre salariale

S3.6 Evaluation de la production dans la parcelle principale (si vous en avez plusieurs)

S36Q01	S36Q02	S36Q03	S36Q04		S36Q05
Type de poivre	Qté autoconsommée et/ou donnée	Qté vendue	Unité de mesure /Equivalent en unité standard		PU (FCFA)/UML
			UML	Equivalent (kg)	

S3.7 Identification des bioagresseurs sur poivrier dans la parcelle principale (si vous en avez plusieurs)

S37Q01	S37Q02	S37Q03	S37Q04	S37Q05	S37Q06	S37Q07
Maladie/Ravageur	Symptômes	Méthode de contrôle	Produits utilisés et dose	Fréquence d'application	Méthode d'application	Justification du choix de lutte

S3.8 Identification des bioagresseurs sur tuteur dans la parcelle principale (si vous en avez plusieurs)

S38Q02	S38Q03	S38Q04	S38Q05	S38Q06	S38Q07	S38Q08
Maladie/Ravageur	Symptômes	Méthode de contrôle	Produits utilisés et dose	Fréquence d'application	Méthode d'application	Justification du choix de lutte

Annexe 4 : Nombre de producteurs enquêtés

Départements	Zone de production	Nombre de producteur	Nombre d'Homme	Nombre de Femme
Moungo	Njombé-Penja	29	29	0
	Loum-Manjo	17	16	1
Koupe-Manengoumba	Tombel	25	22	3
	Total	71	67	4

Annexe 4 : Nombre de producteur membre de l'IGPP par zone de production et par sexe

Régions	Départements	Zone de production	Nombre de producteur	Nombre d'Homme	Nombre de Femme
Littoral	Moungo	Penja	59	54	5
		Njombé et Mbanga	16	16	0
		Loum et Manjo	29	27	2
Sud-Ouest	Koupé-Manengoumba	Tombel	54	50	4

Annexe 5 : Préparation des milieux de culture**Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)**

Le PDA est le milieu usuel de culture pour la plupart des champignons. Il contient de la pomme de terre, du sucre sous forme de dextrose et de la gélose (Agar). Il est préparé selon la procédure suivante :

- Peser 39g de poudre de PDA dans un erlenmeyer de 1,5 -2 l ;
- Ajouter 1 litre d'eau distillée ;
- Mettre au bain-marie (100°C) pour faciliter la dissolution de la gélose ;
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15mn à une pression de 1,2 bar
- Laisser refroidi jusqu'à 55°C pour éviter la condensation de vapeur.

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

- Extrait de malt 20 g
- Peptone 1 g
- Glucose 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 ml

Milieu de culture Eau gélose

Ce milieu n'est pas riche en éléments nutritifs et est utilisé pour les isolements. Pour le préparer on suit la procédure suivante:

- Peser 15 g de gélose Agarose (Difco) dans un erlenmeyer de 1,5-2 litres;
- Ajouter 1 litre d'eau distillée;
- Mettre au bain-marie (100°C) pour faciliter la dissolution de la gélose ;
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15mn à une pression de 1,2 bar
- Laisser refroidi jusqu'à 55°C pour éviter la condensation de vapeur.

Milieu V8 agar brut

- Peser 15g de gélose Agarose (Difco) dans un erlenmeyer de 1,5-2 litres ;
- Ajouter 200ml de jus V8 ;
- Peser et ajouter 3g de carbonate de Calcium (CaCO₃) ;
- Ajouter 1ml d'eau distillée.

Préparation des solutions PARPH :

Milieu de culture PARPH

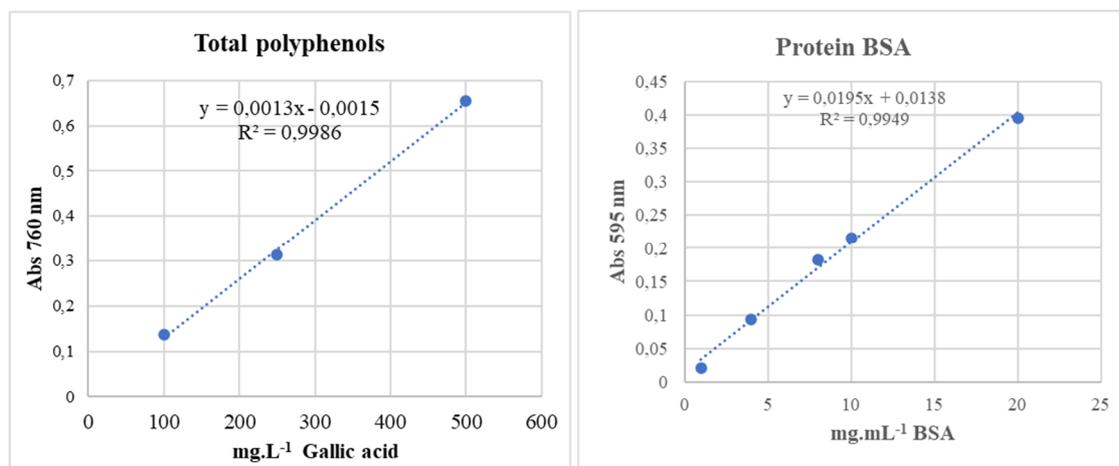
Ce milieu n'est pas riche en éléments nutritifs et est utilisé pour les isolements. Pour le préparer on suit la procédure suivante :

- Peser 15 g de gélose Agarose (Difco) dans un erlenmeyer de 1,5-2 litres ;
- Ajouter 1 litre d'eau distillée ;
- Mettre au bain-marie (100°C) pour faciliter la dissolution de la gélose ;
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15mn à une pression de 1,2 bar
- Laisser refroidi jusqu'à 55°C pour éviter la condensation de vapeur ;

Ajouter une solution d'antibiotique prépare comme présenté ci-dessous:

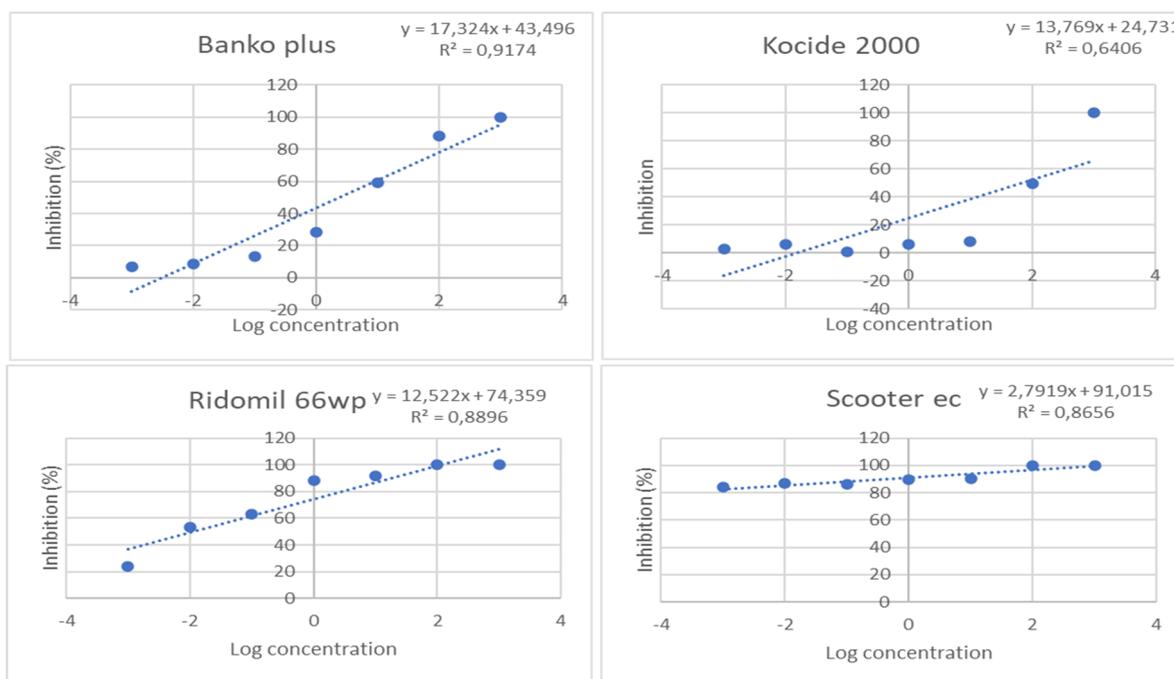
Antibiotiques	Stock (mg/ml)	Quantité (ml) à ajouter à 1l de milieu	Concentration finale (µg/ml)
Pimaricine	25	0,4	10
Ampicilline	100	2,5	250
Rifampicine	10	1	10
PCNB	Pas soluble	100mg poudre	
Hymexazol	50	0,5	25

Annexe 6 : Courbe d'étalonnage standard

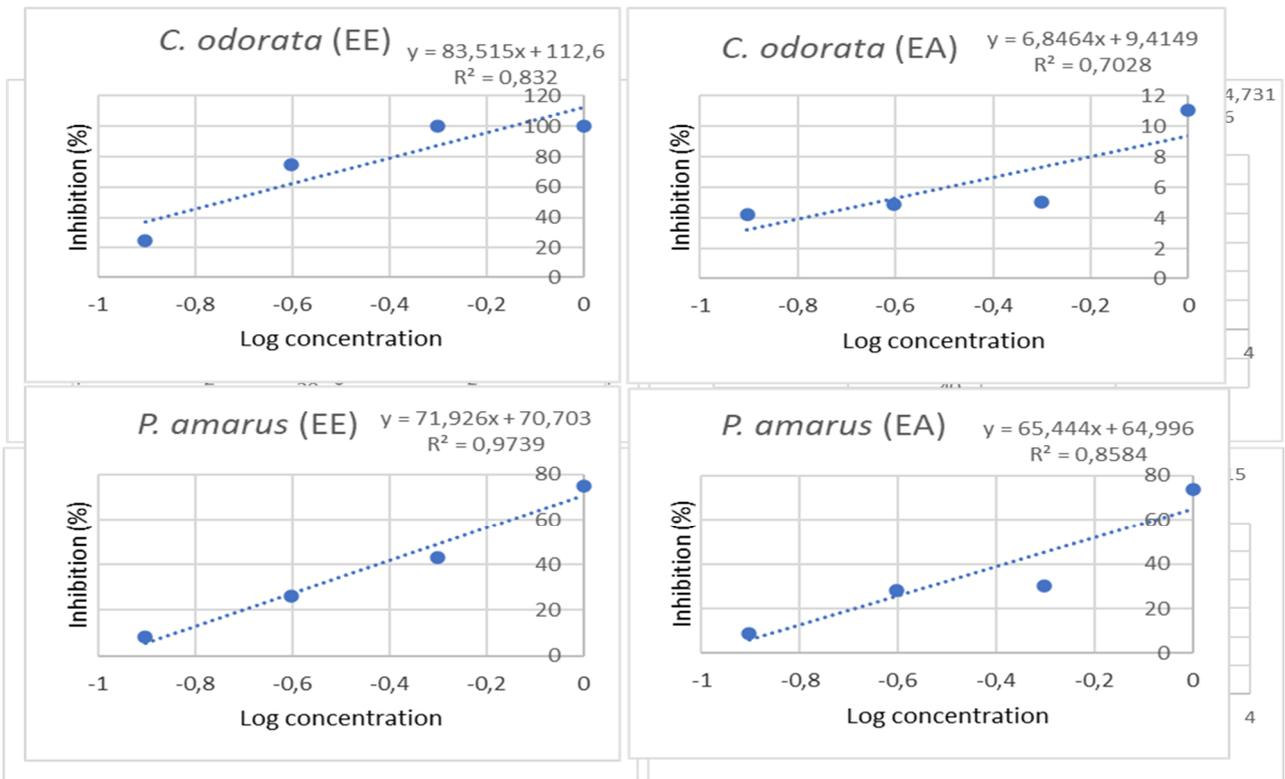


Annexe 7 : Régression linéaire : inhibition mycélienne de *Phytophthium* en fonction du logarithme des concentrations

Isolats PPK (fongicides)

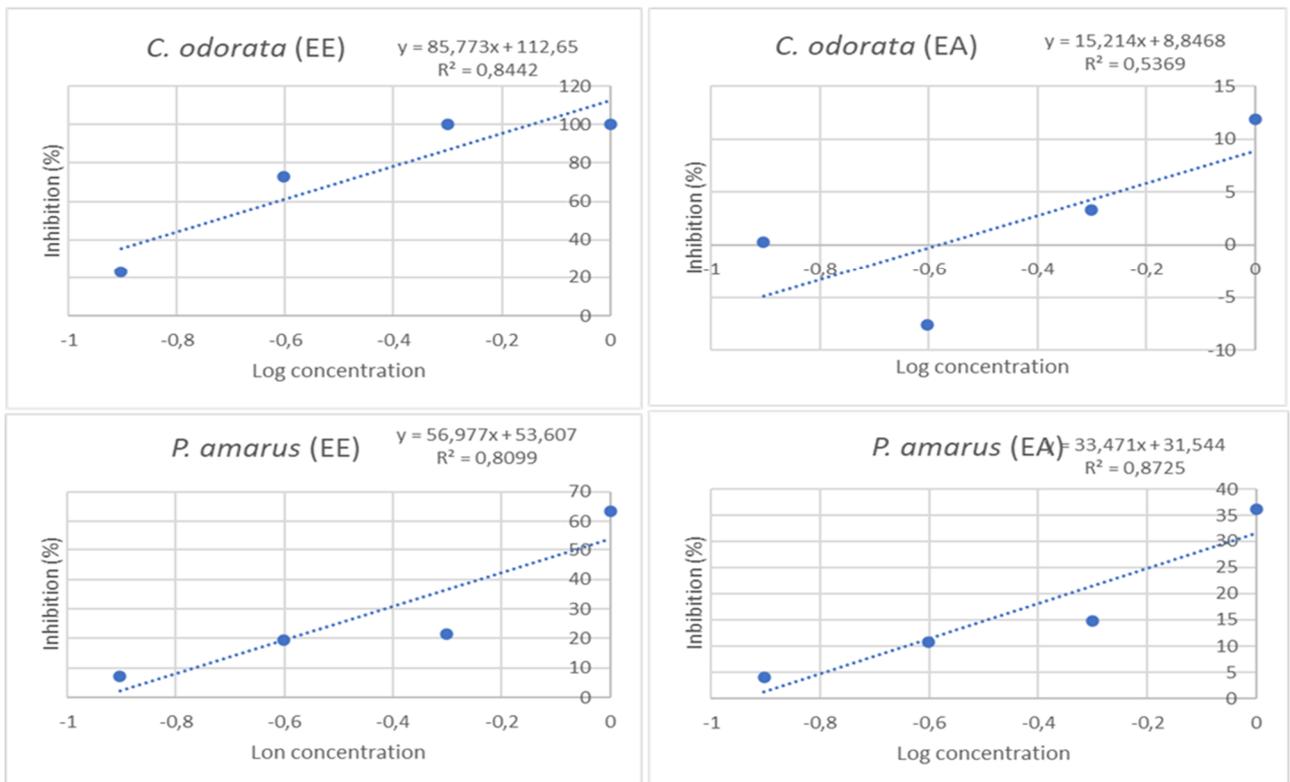


Extraits de plantes (*C. odorata* et *P. amarus*)

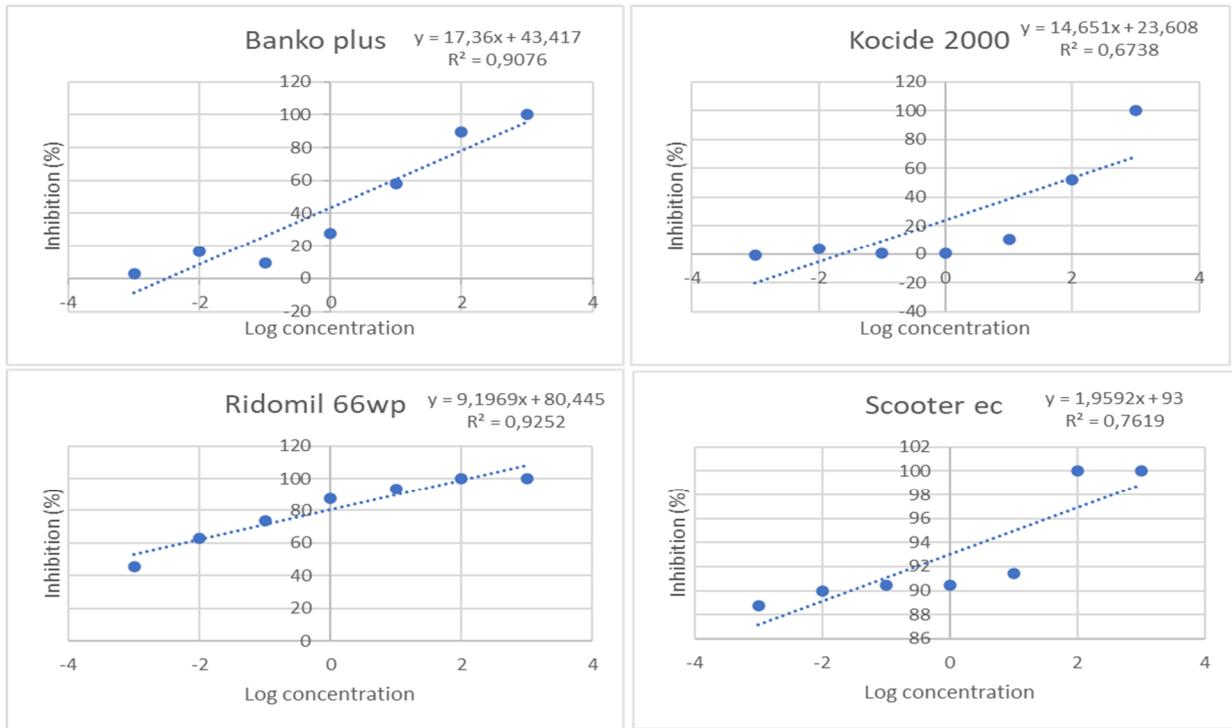


Isolats PPF (fongicides)

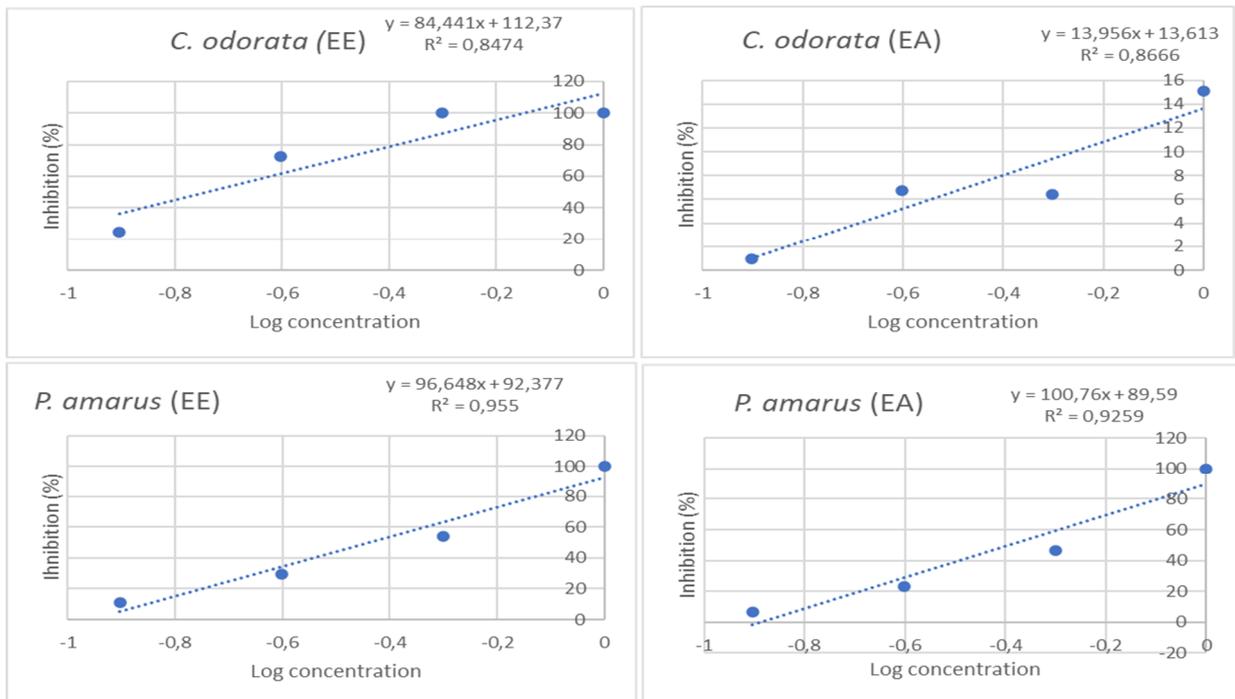
Extraits de plantes (*C. odorata* ; *P. amarus*)



Isolats PPP (fongicides)



Extrats de plantes (*C. odorata* ; *P. amarus*)



Annexe 8 : Moyenne des données climatiques et degré moyen de jaunissement des plantations dans les différentes zones d'observation

Tombel Mois/Année	Température (°C)			Quantité de pluies (mm)/mois	Sévérité (%)	Index moyen de Jaunissement/Mois
	Maximale	Minimale	Moyenne			
Octobre 2013	31,4	21,9	25,7	388,0	38,73	2
Novembre 2013	31,5	22,3	26,0	52,9	44,63	2
Décembre 2013	32,3	21,6	25,9	99,5	46,33	2
Janvier 2014	34,3	22,2	27,0	0,0	60,28	3
Février 2014	34,3	22,9	27,5	87,9	56,10	3
Mars 2014	33,5	22,6	26,9	119,7	53,05	2
Avril 2014	32,8	22,4	26,6	276,1	43,93	2
Mai 2014	32,9	22,8	26,8	385,5	42,19	2
Juin 2014	31,6	22,5	26,1	241,8	35,43	2
Juillet 2014	28,4	22,5	24,8	424,7	38,40	2
Août 2014	28,4	22,1	24,6	653,2	35,41	1
Septembre 2014	30,3	22,2	25,4	464,0	34,36	2
Octobre 2014	31,5	22,3	26,0	290,0	32,48	1
Novembre 2014	32,3	22,4	26,4	123,0	35,51	2
Décembre 2014	33,6	22,3	26,8	3,5	50,60	2
Janvier 2015	34,6	21,5	26,7	8,2	63,02	2
Février 2015	34,3	23,3	27,7	102,5	63,44	2
Mars 2015	33,4	22,7	27,0	109,5	65,33	2
Avril 2015	33,5	22,6	26,9	191,0	55,92	2
Mai 2015	33,0	22,5	26,7	407,0	46,31	2
Juin 2015	30,1	22,6	25,6	378,5	41,72	2
Juillet 2015	28,7	22,6	25,0	397,8	42,01	2
Août 2015	29,4	22,9	25,5	430,8	33,32	1
Septembre 2015	31,1	22,5	26,0	420,4	39,17	1
Octobre 2015	32,0	22,3	26,2	435,5	35,67	2
Novembre 2015	33,3	22,8	27,0	121,7	40,68	2
Décembre 2015	34,3	21,9	26,9	6,5	58,24	2
Janvier 2016	35,2	22,2	27,4	0,0	78,06	3
Février 2016	36,4	23,7	28,8	1,7	90,08	3
Mars 2016	34,2	23,8	28,0	132,5	80,00	3
Avril 2016	34,1	23,1	27,5	250,3	47,50	2
Mai 2016	33,5	23,1	27,3	217,1	47,50	2
Juin 2016	31,7	22,3	26,1	327,3	50,00	2
Juillet 2016	31,1	22,2	25,7	313,3	35,00	2
Août 2016	30,4	22,5	25,7	495,5	50,65	2
Septembre 2016	31,8	22,3	26,1	229,2	50,65	2

Njombe-Penja Mois/année ²	Température (°C)	Quantité de pluies (mm)/mois	Sévérité (%)	Index moyen de ¹ Jaunissement/Mois
--	------------------	---------------------------------	--------------	--

	Maximale	Minimal	Moyenne			
	e					
Octobre 2013	31,5	22,2	25,9	709,1	42,04	2
Novembre 2013	31,7	22,4	26,1	118,0	52,60	2
Décembre 2013	32,2	21,6	25,9	233,6	53,99	2
Janvier 2014	34,0	22,2	26,9	0,0	61,92	3
Février 2014	34,6	22,9	27,6	29,5	66,88	3
Mars 2014	33,4	22,9	26,9	233,3	49,85	2
Avril 2014	32,9	22,4	26,5	492,3	43,56	2
Mai 2014	33,1	22,8	26,9	783,1	40,66	2
Juin 2014	31,9	22,6	26,3	689,2	40,88	2
Juillet 2014	28,3	22,3	24,7	734,0	37,73	2
Août 2014	28,4	22,2	24,7	1 161,3	33,73	1
Septembre 2014	30,3	22,2	25,5	811,7	38,73	2
Octobre 2014	31,5	22,3	26,0	546,5	39,42	2
Novembre 2014	32,2	22,4	26,3	234,7	42,35	2
Décembre 2014	33,3	22,3	26,7	21,7	57,38	3
Janvier 2015	34,3	21,3	26,5	6,7	68,90	3
Février 2015	34,2	23,3	27,7	259,2	68,25	3
Mars 2015	33,2	22,9	27,0	318,8	60,34	3
Avril 2015	33,2	22,6	26,8	345,0	56,89	3
Mai 2015	32,7	22,4	26,5	744,4	39,90	2
Juin 2015	29,9	22,7	25,6	718,5	42,76	2
Juillet 2015	28,5	22,7	25,0	1 081,7	42,39	2
Août 2015	29,3	22,8	25,4	836,2	32,32	1
Septembre 2015	31,2	22,5	26,0	1 025,3	37,70	2
Octobre 2015	31,7	22,1	26,0	820,5	39,51	2
Novembre 2015	32,9	22,8	26,8	197,7	40,74	2
Décembre 2015	34,2	22,0	26,9	3,6	64,21	3
Janvier 2016	35,0	22,5	27,5	0,0	78,44	3
Février 2016	36,2	23,9	28,8	0,0	87,32	4
Mars 2016	33,8	23,8	27,8	382,6	75,82	3
Avril 2016	33,6	22,9	27,2	448,9	42,78	2
Mai 2016	33,1	23,3	27,2	547,0	35,03	2
Juin 2016	31,7	22,3	26,0	730,3	39,98	2
Juillet 2016	30,7	22,5	25,8	682,5	44,39	2
Août 2016	30,1	22,7	25,7	851,7	47,48	2
Septembre 2016	31,3	22,7	26,1	696,5	48,02	2

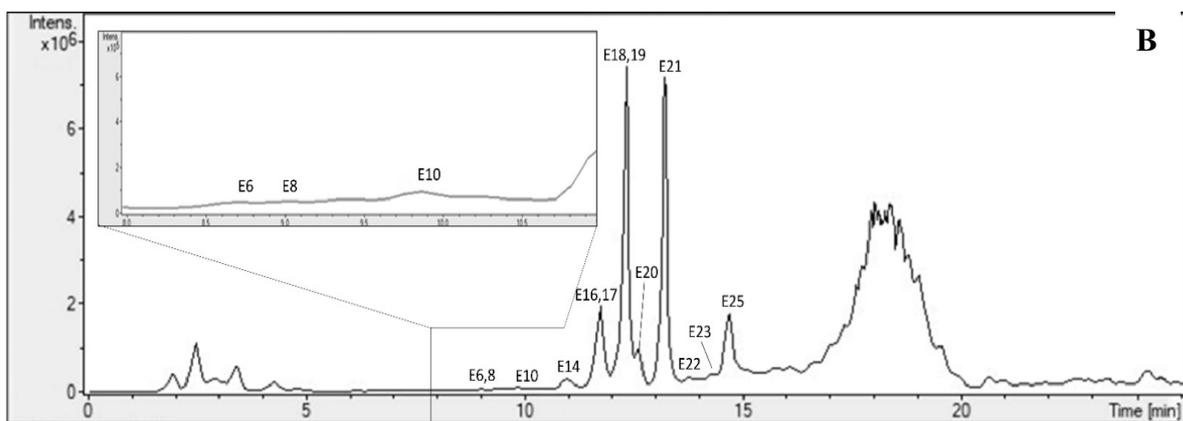
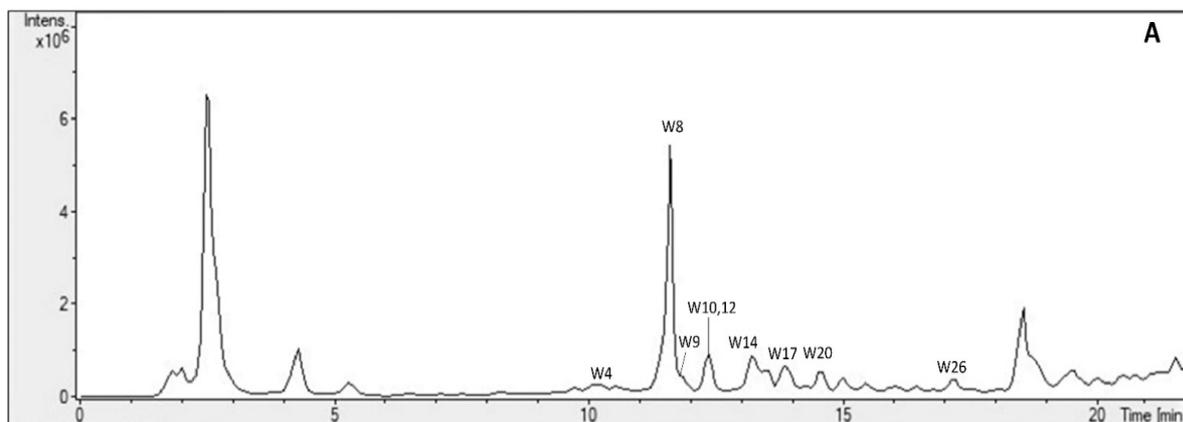
Loum-Manjo	Température (°C)			Quantité de pluies (mm)/mois	Sévérité (%)	Degrée moyen de Jaunissement/Mois
	Maximale	Minimale	Moyenne			
Mois/année ²						
Octobre 2013	29,8	21,1	24,6	423,0	34,72	2
Novembre 2013	30,2	21,7	25,1	94,4	53,65	2
Décembre 2013	30,3	21,1	24,8	30,4	56,13	2
Janvier 2014	32,4	21,7	26,0	29,5	67,50	3

Février 2014	32,6	22,3	26,4	30,8	62,83	3
Mars 2014	32,1	22,2	26,2	137,0	53,83	2
Avril 2014	31,5	21,7	25,6	333,5	43,50	2
Mai 2014	31,5	21,9	25,7	339,3	35,33	2
Juin 2014	30,1	21,8	25,1	272,7	39,67	2
Juillet 2014	27,0	21,8	23,9	461,8	37,00	2
Août 2014	27,3	21,6	23,9	620,0	36,00	2
Septembre 2014	28,9	21,6	24,5	443,6	39,00	2
Octobre 2014	30,1	21,8	25,1	322,6	39,77	2
Novembre 2014	30,5	21,4	25,1	181,1	35,60	1
Décembre 2014	31,3	21,7	25,5	40,2	50,00	2
Janvier 2015	32,6	20,8	25,5	16,8	62,07	3
Février 2015	32,5	22,8	26,7	112,5	60,89	2
Mars 2015	32,3	22,9	26,7	234,8	58,33	2
Avril 2015	31,6	21,8	25,8	183,8	46,55	2
Mai 2015	31,6	21,9	25,8	317,6	36,29	1
Juin 2015	28,1	21,9	24,4	658,2	35,78	1
Juillet 2015	27,2	21,8	23,9	722,2	33,60	1
Août 2015	27,6	21,8	24,2	626,1	25,00	1
Septembre 2015	29,6	21,5	24,8	322,5	27,56	1
Octobre 2015	30,1	21,4	24,9	336,8	27,51	1
Novembre 2015	31,0	21,8	25,5	134,5	29,36	1
Décembre 2015	32,2	21,0	25,4	7,0	57,25	2
Janvier 2016	32,9	21,5	26,0	0,0	81,88	3
Février 2016	34,0	22,7	27,2	25,5	81,99	3
Mars 2016	31,9	23,0	26,6	150,9	75,48	3
Avril 2016	31,7	22,0	25,9	220,7	37,12	2
Mai 2016	31,5	22,3	26,0	285,1	25,69	1
Juin 2016	29,8	21,5	24,8	338,2	37,12	2
Juillet 2016	29,1	21,4	24,5	443,6	33,33	1
Août 2016	28,5	21,6	24,3	489,4	33,33	1
Septembre 2016	29,4	21,4	24,6	287,0	33,33	1

¹l'Index de jaunissement correspond à la moyenne des notes obtenues dans les différentes plantations de la zone

²la période : différents mois d'observation allant d'octobre 2013 à Septembre 2016

Annexe 9 : Spectre de masse des composés d'extrait aqueux (A) et d'extrait hydroéthanolique (B) de *C. odorata*





Armillaria root rot threatens Cameroon's Penja pepper (*Piper nigrum* L.)

Sandrine Petchayo Tigang^{1,2} · James Michel Tchotet Tchoumi³ · Jolanda Roux⁴ · Julienne Nguefack¹ · Aime Didier Begoude Boyogueno² · Michael Mbenoun² · Crescence Virginie Mfegue² · Salomon Nyassé² · Michel Ndoumbé Nkeng^{2,5} · Gerben Martijn ten Hoopen^{2,6}

Received: 15 November 2019 / Accepted: 27 April 2020 / Published online: 27 May 2020

© Sociedade Brasileira de Fitopatologia 2020

Abstract

Penja pepper (*Piper nigrum*) produced in Cameroon has long been recognized for its exceptional organoleptic quality. The pepper vine is grown using a support tree (*Spondias mombin*) in Cameroon. A root disease is associated with plant deaths in both plants. The disease symptoms are characterized by collar cracking and gummosis and the disease was tentatively identified as *Armillaria* root rot. In this work the extent of the problem was characterized by surveying 35 farms in Cameroon. Samples were taken from diseased support trees and pepper vines. Support trees exhibiting typical symptoms were found in approximately one third of the surveyed farms. In these farms, disease incidence and Pepper vine mortality ranged from 1.3 to 50% and 1.2 to 87.7%, respectively. Analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region (ITS) locus suggested that the isolates collected from *S. mombin* and *P. nigrum* are most likely, which is a first for both hosts, represented by *Armillaria camerunensis* (Henn.) Volk & Burdsall, a fungus previously associated with declining cacao trees in Cameroon. Given the increasing demand for Penja pepper and the great damaging potential of this root rot, research on management strategies should be prioritized.

Keywords *Armillaria camerunensis* · Disease incidence · Molecular identification · Slow decline · Support tree

✉ Sandrine Petchayo Tigang
ptsandy2000@gmail.com

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, P.O. box 812 Yaoundé, Cameroon

² Institute for Agricultural Research for Development (IRAD), P.O. box 2067 Yaoundé, Cameroon

³ Department of Biochemistry, Genetics and Microbiology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria 0028, South Africa

⁴ Department of Plant and Soil Sciences, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria 0028, South Africa

⁵ Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (CARBAP), B.P. 832, DoualaBonanjo, Cameroon

⁶ CIRAD, UPR Bioagresseurs, St. Augustine, Trinidad and Tobago. Bioagresseurs, Univ. Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

Introduction

The pepper vine (*Piper nigrum*) is a tropical perennial crop, native to India, which belongs to the Piperaceae family (Ravindran 2000). It is cultivated in several countries including Brazil, Indonesia and Vietnam which are the world's largest producers of pepper (Faostat 2017). According to the International Pepper Community (IPC 2017) pepper is the “King of spices” since it is the most consumed and marketed spice in the world. Besides its popular use in cuisine and seasoning, the spice has shown medicinal attributes. Pepper can help relieve viral respiratory ailments such as flu and colds, as well as digestive problems such as constipation, flatulence and colic (Meghwal and Goswami 2012; Ahmad et al. 2012).

Black pepper was introduced to Cameroon in the 1930s and although the exact origin of first introduction is unknown, the first vines were introduced into Cameroon by the Germans, and later by French Planters and the Cameroon Development Corporation (CDC). They brought in cultivars from Cambodia, the Democratic Republic of Congo (DRC) (at the time the Belgian Congo) and India. It is the descendants

of this miscellany of cultivars that are now grown in Cameroon.

The pepper produced in Cameroon has long been recognized by connoisseurs to be among the world's best, owing to its outstanding organoleptic attributes. This exceptional quality has earned Penja black pepper the first sub-Saharan protected geographical indication (GI) label in September 2013 by the African Intellectual Property Organization (OAPI), further boosting its reputation. Although Cameroonian production remains marginal (<0.02% of global production) (Faostat 2017), it has increased over the past few years by over a factor of 10, as pepper attracts increasing interest from local farmers, stimulated by the GI label for Penja pepper and a concomitant price increase from \$4.2 before the GI to \$23.6 USD per kg in 2015. Prices oscillated between \$20.20 and \$23.6 US dollars between 2016 and 2018.

As is the case for any intensively propagated crop, diseases and pests are a major constraint limiting black pepper productivity. Numerous pests and diseases have been reported to affect pepper vines; some of which are well known to cause severe losses, e.g. *Phytophthora* foot rot caused by *Phytophthora capsici* Leonian, (Ravindran 2000; Truong et al. 2008), blackberry disease caused by *Colletotrichum* species (Keuh 1990), and slow decline (or yellow disease) which can result from various pathogens and complexes of biotic and abiotic stressors (Ramana and Santhosh 2000). In Cameroon, as cultivation of pepper is intensifying so is the pressure of phytosanitary problems. In recent years especially, there has been a growing concern among farmers about the losses associated with diseases, which in some cases have resulted in up to 50% mortality in certain pepper plantations. The “Plantations du Haut Penja” (PHP) organization, the biggest pepper producer in Cameroon, saw its production area reduced from 40 to 21 ha because of disease pressure (Mbodiam 2019). According to preliminary assessments, these losses are most likely associated with a range of biotic and abiotic stressors that remain to be resolved (Petchayo et al. 2015).

In Cameroon, a disease affects the pepper's support tree, *Spondias mombin* L (hog plum), a native of the Americas and West-Indies. The support tree is critical for pepper cultivation as it provides a structure for optimum growth and productivity of pepper plants (Ravindran 2000). The disease affecting *S. mombin* is characterized by collar cracking, gummosis and the presence of white fungal mycelial fans beneath the bark, which are all typical symptoms of *Armillaria* root rot (Fig. 1c, d). A preliminary investigation indicated that like the support tree, the pepper vine was also susceptible to this disease (Petchayo et al. 2015). However, further studies are needed to support the development of effective management strategies. The aim of this study was therefore two-fold: 1) to elucidate the cause of the disease by means of DNA sequence analyses and; 2) to assess the incidence of root rot in Penja Pepper farms across the certified geographic area using field surveys.

Materials and methods

Field observations and sample collection

The Penja pepper production basin lies within the fourth agro-ecological zone, as defined by the Institute of Agricultural Research for Development (IRAD) of Cameroon. This region straddles the Littoral and South-West administrative regions of the country. It features a tropical rain forest as native vegetation cover and a subequatorial climate type, characterized by 2500–4000 mm annual rainfall, 22–29 °C mean temperatures and 61–90% relative humidity.

Field observations for root rot and sample collection were carried out in May–June 2016, on a total of 35 farms, selected from the database of the association of Penja pepper producers (Penja Pepper Geographical Indication Group, IGPP for its abbreviation in French) and based on farmer's indications whether the disease was present or not. Farms were distributed over the districts of Penja-Njombe ($n = 14$; N4° 38. 799' E9° 40. 331'), Loum ($n = 7$; N4° 42. 140' E9° 46. 318') in the Littoral region, and Tombel ($n = 13$; N4° 39. 685' E9° 36. 853') in the South-West region. Each plantation was surveyed to determine the prevalence of the disease. Two transects, perpendicular to each other, were laid out in the center of each pepper field. Each transect was 28 m long and included three rows of pepper plants planted together with support trees (*S. mombin*) at 2 × 2 m spacing. Thus, a maximum of 81 pepper vines and support trees were examined and a sanitary status was assigned to vines and support trees separately, either healthy, diseased, or dead/absent (absence of a support tree or vine was assumed to be due to the death of the plant). Potential differences per district and plantation age group (3–6, 7–10 and > 10 yrs. of age) were analyzed using arcsin-transformed percentage disease incidence data for support trees and mortality incidence for vine trees with the appropriate generalized linear model in XLSTAT v. 2019.4.1.

Eleven symptomatic vine/support tree combinations were randomly sampled in one farm per district. Infected samples were collected from roots, collar and trunk of pepper and support trees (Fig. 1a–f) following a purposive stratified random sampling technique. All samples were placed in paper bags, duly labeled and brought back to the laboratory for further analyses. Additional information regarding age of the plantation, associated crops and previous land use was also collected.

Isolation of pathogen

Isolation of suspected *Armillaria* cultures from infected plant materials was performed as described by Tchotet Tchoumi et al. (2017). Small pieces (2–3 mm³) of woody tissue were taken from the advancing edge of lesions and were surface sterilized in 7% sodium hypochlorite for 90 s, then rinsed twice in sterile distilled water and dried using sterile tissue paper. These

Fig. 1 Disease symptoms in pepper plantations in the Penja region of Cameroon, (a) support trees (*S. mombin*) most of which are devoid of pepper vines; (b) a dead pepper vine, reminiscent of slow decline; (c) gum exuding from the base of a dying support tree; (d) white mycelial fans underneath the bark of support tree; (e) basal stem cracking of black pepper; (f) white mycelium underneath the root bark of *P. nigrum*; (g) Morphological characteristics *in vitro* of *Armillaria* isolate



sterilized plant materials were plated onto Basidiomycete selective medium, made up of 2% Malt Extract Agar (MEA) supplemented with 2 mg/L benomyl, 2 mg/L dichloran and 0.01 g/L streptomycin sulphate (Worrall 1991). Plates were incubated at ambient temperature (25 ± 2 °C) in the dark for two weeks, and pure cultures were obtained from these by transferring rhizomorph tips onto new MEA plates, which were also maintained at ambient temperature.

DNA extraction, amplifications and phylogenetic analysis

Mycelium from pure cultures was harvested, freeze-dried and ground to a fine powder using a cell disruptor machine (Retsch GmbH, Germany). Genomic DNA was extracted using the CTAB protocol as described by Möller et al. (1992). Prior to

amplifications, the initial DNA concentrations were adjusted to 100 ng/ μ L using a Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). PCR amplifications targeted the ITS regions (ITS1, ITS2), including the 5.8S subunit of the ribosomal DNA and was done using the primer pair ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). PCR and sequencing reaction mixtures and reaction conditions were the same as outlined in Tchotet Tchoumi et al. (2017). DNA sequencing was done at the sequencing facility of the University of Pretoria. The CLC Main Workbench v.7.6.1 package was used to edit bidirectional-sequencing reads and to assemble contigs. The ITS sequences were subsequently queried against the global fungal DNA sequence database in the GenBank nucleotide database using the NCBI BLASTn search tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A

dataset of *Armillaria* ITS sequences was assembled, comprising representatives from the different localities and hosts (*P. nigrum* and *S. mombin*) targeted by this study, the sequences obtained by Roux et al. (2012) on cacao (*Theobroma cacao*) in Cameroon, as well as all BLASTn hits in GenBank with $\geq 97\%$ sequence identity. Sequences representing *A. hinnulea* were included in the dataset as outgroups (Table 1). The dataset was submitted to multiple sequence alignment with the online program MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) prior to phylogenetic analysis based on Maximum likelihood (ML) criterion using RaxML (Stamatakis 2006) in raxmlGUI 1.3 (Silvestro and Michalak 2012). The analysis used 10 parallel runs and 1000 bootstrap replications and applied the GTR + G model of sequence evolution determined as best fit under the Akaike Information Criterion (AIC) using JModeltest v2.1.6 (Darriba et al. 2012; Miller et al. 2010).

Pathogenicity test

A pathogenicity test was conducted using six-month old *Piper nigrum* plants obtained from cuttings and kept under natural conditions, and two *Armillaria* isolates (CMW44956 and CMW45278). Two inoculation methods were used: soil inoculation and artificial wounding modified from Ford et al. (2017).

For the soil inoculation technique four mycelial agar plugs of the same size, overgrown with the respective *Armillaria* isolates, were mixed with the soil of each pot containing pepper plants. In the wound inoculation study 5×5 mm agar plugs containing three-week-old mycelium from each isolate were inserted into a wound made on the collar of each plant. A total of seven pepper seedlings per fungal isolate were inoculated for each inoculation technique. Seven plants were inoculated with sterile agar plugs to represent the controls. Plants were maintained for four months, with daily watering. At the beginning and over the course of the experiment, several growth parameters were evaluated, such as number of leaves, max plant length and mortality. At the end of the experiment, plants were collected and leaf and root dry weight data were collected. Changes in plant height and leaf area were determined, as well as lesion length, measured from the center of the inoculation point, between the beginning and end of the experiment. The general health status of the roots was also determined. Treatment effects were evaluated by fitting a one-way Anova model in XLSTAT v.2019.4.1.

Results

Field observations

The average plantation age of the 35 surveyed farms was around 8 years (3 to 15 years) (Table 2). From a total of

2832 inspected vine/support tree combinations (three support trees were absent), 157 (5.5%) of the support trees were visibly affected and showed symptoms of collar cracking and gummosis. The percentage of affected support trees ranged from zero to more than 50% between farms (Table 2). There was no significant effect of districts ($P = 0.501$). In the Tombel district, 7 out of 13 farms (53.8%) were affected and disease incidence in affected farms ranged from 1.2 to 22.2%. In the Njombe-Penja district 3 out of 13 farms (23.1%) were affected and disease incidence in affected farms ranged from 1.2% to 50.6%. Finally, in the district of Loum 2 out of 9 farms (22.2%) showed symptoms with disease incidences of 3.7% and 45.7%. Some surveyed farms ($n = 13$) had no support trees affected by the disease even though the owners indicated that the disease was present (Table 2). On the surveyed farms for which the farmers had indicated the absence of the disease, the disease was indeed absent. This discrepancy between farmer indications and transect data is partially due to the fact that the transect was laid out in the middle of the plot, where in certain cases indeed no diseased trees were present, although diseased trees were sometimes present outside of the transect area. The transect area was put in the middle of the plot to avoid edge effects for certain other parameters measured.

With regard to the pepper vines, a total of 515 out of 2832 support trees (18.2%) (Table 2) were devoid of vines. In other words, on average a fifth of any plantation was unproductive. Contrary to “*Armillaria*” incidence, all farms had a certain level of pepper vine mortality, however, once again there were no marked differences between the three districts ($P = 0.123$). Pepper vine mortality was often associated with yellowing of the vine before subsequent desiccation. Unfortunately, the etiology of yellowing disease in Penja pepper remains to be resolved. Biotic stressors such as nematodes, *Phytophthora* and *Pythium* species as well as *Fusarium solani* (f. sp. *piperis*) might be involved (Cardoso and Albuquerque 1979; Ramana et al. 1987; Anandaraj et al. 1996; Shahnazi et al. 2012). Although nematodes, *Pythium/Phytophythium* spp. and *Fusarium*, have been found in these pepper plantations (data not shown), it has not been possible to unequivocally link these to the slow decline of pepper vines. Correct identification of these organisms, like for *Armillaria* here, will be a first step. Recent advances allowing the correct determination of e.g. the presence of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (Costa et al. 2017) will be useful in this respect.

For both support tree and pepper vine, disease was not related to plantation age ($P = 0.208$, $P = 0.958$, respectively). This might indicate that the problems/pathogen(s) afflicting support trees and/or pepper vines were already present at the time of plantation establishment or arrived very shortly after.

Pathogen identification

All sampled diseased plants presented similar symptoms, such as cracking of the bark and wood (Fig. 1c, e) and presence of

Table 1 Isolates used in the phylogenetic analysis

Species	Strain*	Host	Geographical origin	GenBank accession numbers (ITS)	Reference
<i>Armillaria camerunensis</i>	TH 9926	Dead wood	Cameroon	KU170951	Koch et al. 2017
<i>A. camerunensis</i>	TH DJA 91	<i>Gilbertiodendron dewevrei</i>	Cameroon	KU170952	Koch et al. 2017
<i>Armillaria</i> sp.	CMW34125	<i>T. cacao</i>	Cameroon (B)	MG254549	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW36819	<i>T. cacao</i>	Cameroon (N)	MG254551	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW36820	<i>T. cacao</i>	Cameroon (N)	MG254552	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW36821	<i>T. cacao</i>	Cameroon (K)	MG254553	Roux et al. 2012
<i>Armillaria</i> sp.	CMW43766	<i>Spondias mombin</i>	Cameroon (P)	MG182003	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44921	<i>S. mombin</i>	Cameroon (P)	MG182004	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44922	<i>S. mombin</i>	Cameroon (P)	MG182005	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44923	<i>S. mombin</i>	Cameroon (P)	MG182006	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44924	<i>S. mombin</i>	Cameroon (P)	MG182007	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44927	<i>S. mombin</i>	Cameroon (L)	MG182008	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW44956	<i>Piper nigrum</i>	Cameroon (Njombe)	MG182009	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW45278	<i>Piper nigrum</i>	Cameroon (P)	MG182010	This study
<i>Armillaria</i> sp.	CMW45281	<i>S. mombin</i>	Cameroon (Njombe)	MG182011	This study
<i>A. fuscipes</i>	CMW10165	<i>Prunus persica</i>	Zimbabwe	AY882966	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW2717	<i>Pinus elliottii</i>	South Africa	AY882971	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW2740	<i>Pinus patula</i>	South Africa	AY882970	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW3164	<i>Pelargonium asperum</i>	La Reunion	AY882975	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4871	<i>Widdringtonia whytei</i>	Malawi	AY882976	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4873	<i>Indigenous shrub</i>	Malawi	AY882977	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4874	<i>Araucaria cunninghamii</i>	Zimbabwe	AY882967	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4949	<i>Pinus elliottii</i>	Tanzania	AY882978	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4950	<i>Pinus strobes</i>	Tanzania	AY882979	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW4953	<i>Pelargonium asperum</i>	La reunion	AY882974	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW5844	<i>Pinus patula</i>	Ethiopia	AY882969	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW5846	<i>Pinus patula</i>	Ethiopia	AY882968	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW7184	<i>Cypress</i> sp.	Kenya	AY882973	Coetzee et al. 2005
<i>A. fuscipes</i>	CMW7187	<i>Camellia sinensis</i>	Kenya	AY882972	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW3173	<i>Tectona grandis</i>	Zambia	AY882981	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW4455	<i>Camellia sinensis</i>	Zimbabwe	AY882985	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW4456	<i>Brachystegia utilis</i>	Zimbabwe	AY882984	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW3152	Unknown	Cameroon	AY882980	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW10115	<i>Acacia albida</i>	Zimbabwe	AY882983	Coetzee et al. 2005
<i>Armillaria</i> sp.	CMW10116	<i>Newtonia buchananii</i>	Zimbabwe	AY882982	Coetzee et al. 2005
<i>A. hinnulea</i>	NZFS22376	Unkown	New Zealand	EU734746	Unpublished
<i>A. hinnulea</i>	NZFS2394	Unkown	New Zealand	EU734745	Unpublished

B: Bokito; L: Loum; N: Ngat; P: Penja

*Strain in bold were collected during this study

white fungal mycelial mats beneath the bark (Fig. 1d, e, f). Gum exudation was only observed on support trees (Fig 1c). All isolates collected had the typical culture morphology of *Armillaria* species, such as the presence of abundant rhizomorph growth (Fig. 1g).

PCR amplification and sequencing of isolates yielded ITS amplicons ranging in size from 616 to 618 bp, and showing high (99%) sequence identity with *Armillaria* isolates obtained previously from declining *Theobroma cacao* trees in Cameroon (Roux et al. 2012) and *Tectona grandis* in

Table 2 Armillaria root rot incidence at three localities in Cameroon

District	Plantation	Farmer obs. ¹	Armillaria Incidence (%) ²	Pepper vine Mortality (%) ³	Age (yrs.)	Associated crops	Previous land use
Tombel	T1	+	3.4	27.2	9	<i>Prunus africana</i> , <i>Persea americana</i> , <i>Cola acuminata</i>	<i>Coffea</i> sp.
	T2	+	30.0	87.7	3	None	<i>Coffea</i> sp., <i>T. cacao</i>
	T3	+	4.4	16	3	<i>P. africana</i> , <i>P. americana</i> , <i>C. acuminata</i>	<i>Coffea</i> sp.
	T4	+	17.2	21	15	<i>T. cacao</i> , <i>Dioscorea alata</i>	<i>Coffea</i> sp., <i>A. comosus</i>
	T5	+	1.3	1.2	7	<i>T. cacao</i>	Native forest
	T6	+	33.3	33.3	15	<i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i>
	T7	+	28.6	56.8	7	<i>T. cacao</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i>
	T8	–	–	21	10	<i>T. cacao</i> , <i>D. alata</i>	None
	T9	+	–	22.2	5	<i>Ananas comosus</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>Coffea</i> sp.
	T10	–	–	3.7	5	<i>Musa</i> sp.	None
	T11	+	–	67.6	10	<i>T. cacao</i> , <i>D. alata</i>	<i>T. cacao</i>
	T12	–	–	19.8	4	<i>T. cacao</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i> , <i>Coffea</i> sp.
	T13	+	–	4.9	8	<i>T. cacao</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>Coffea</i> sp.
Njombe- Penja	N1	+	1.3	3.7	10	<i>Citrus sinensis</i> , <i>C. acuminata</i>	<i>T. cacao</i>
	N2	+	5.5	32.1	11	None	<i>T. cacao</i>
	N3	+	51.9	3.7	12	None	Native forest, <i>Musa</i> sp.
	N4	+	–	6.2	7	None	<i>T. cacao</i>
	N5	+	–	38.3	8	Fruit trees	<i>T. cacao</i>
	N6	+	–	6.2	25	<i>Musa</i> sp., <i>D. alata</i>	<i>C. acuminata</i> , <i>T. cacao</i>
	N7	+	–	9.9	10	None	<i>T. cacao</i>
	N8	+	–	18.5	n.d.	<i>Musa</i> sp.	Forest trees
	N9	–	–	8.6	8	<i>Musa</i> sp.	<i>C. papaya</i> , <i>A. comosus</i>
	N10	+	–	32.1	7	<i>C. acuminata</i> , <i>Musa</i> sp.	<i>T. cacao</i> , <i>C. acuminata</i>
	N11	–	–	6.2	3	<i>Carica papaya</i> , <i>A. comosus</i>	<i>Carica papaya</i>
	N12	+	–	2.5	6	None	<i>A. comosus</i>
	N13	+	–	8.6	6	<i>Musa</i> sp., <i>C. papaya</i>	<i>Musa</i> sp.
Loum	L1	+	4.5	18.5	4	None	<i>T. cacao</i>
	L2	+	64.9	28.4	6	None	<i>T. cacao</i>
	L3	–	–	7.4	16	<i>C. papaya</i>	<i>T. cacao</i>
	L4	+	–	4.9	5	None	<i>Coffea</i> sp., <i>Manihot esculenta</i>
	L5	–	–	9.8	10	<i>Musa</i> sp.	<i>Zea mays</i> , <i>Musa</i> sp.
	L6	–	–	39.5	17	<i>Musa</i> sp., <i>D. alata</i>	<i>Musa</i> sp.
	L7	–	–	2.5	8	None	<i>T. cacao</i>
	L8	+	–	18.5	8	None	<i>Coffea</i> sp.
	L9	–	–	29.6	11	None	<i>Musa</i> sp.

¹ ± presence or absence of the disease in the plantation according to the farmer

² Armillaria incidence based on transect data, – = absence of Armillaria incidence within the transect

³ Pepper vine mortality based on transect data

n.d. = not determined

Zambia (Coetzee et al. 2005). In the ML based phylogram, the *Armillaria* isolates from Penja pepper fields grouped together, with strong bootstrap support (86%), into a single phylogenetic clade, alongside the type *A. camerunensis*, as

well as isolates associated with cacao root rot in Cameroon. This clade also included isolates from diverse host plants in Zambia and Zimbabwe (Fig. 2). The *A. camerunensis* clade is sister to another clade

representing *A. fuscipes*, which is well supported by a strong bootstrap value of 99%.

Pathogenicity test

The pathogenicity test showed no significant differences between treatments with regard to changes in plant height or leaf surface area nor for root and leaf dry weight at the end of the assay (P -values >0.2), although on some uprooted pepper plants what seemed like necrotic root lesions were observed. However, a significant difference ($P = 0.018$, $df = 2$, $F = 4.97$) was observed with regard to lesion length from the point of collar inoculation. Control plants had no lesion development, yet pepper seedlings infected by the pepper isolate had an average lesion size of 4.5 mm and those infected by the *S. mombin* isolate on average of 7.1 mm which was significantly different from the control. Certain plants presented yellowing, unfortunately, re-isolation efforts from wounds and necrotic roots were unsuccessful. Care has to be taken when interpreting these results. Pepper cuttings take several months before developing a root system and initially grow very slow. This, combined with the difficulty of *Armillaria* pathogenicity assays and the relatively short duration of the trial (4 months) may be the reason that no effects, other than the presence of lesions were observed.

Discussion

The ITS based phylogenetic tree clearly shows how the *Armillaria* isolates from the Penja pepper fields grouped together into a single phylogenetic clade alongside the type *A. camerunensis* and isolates from Cameroon associated with cacao root rot. This clade is sister to another clade representing *A. fuscipes* (Fig. 2). This result is similar to those of Coetzee et al. (2005) who, relying on ITS and IGS1 based phylogenies, split *A. fuscipes sensu lato* (s. l.), at the time considered a single specific entity, into two distinctive sister species. One species represented *A. fuscipes sensu stricto* (s. s.), and included isolates from South Africa, Zimbabwe, Kenya, and La Reunion. The second species, to which the Penja isolates appear to belong to, represented an undescribed species and included isolates from Cameroon, Zambia, and Zimbabwe. When Roux et al. (2012) used IGS1 phylogeny to identify *Armillaria* isolates associated with cacao root rot in Cameroon; they concluded that these isolates were conspecific with the unnamed second clade of *A. fuscipes* s. l. This clade was later described as *A. camerunensis* by Koch et al. (2017). Unlike with the ITS as seen in this study, the phylogenetic tree based on IGS1 shows substantial sub-structuring in the *A. camerunensis* clade in Cameroon (Roux et al. 2012), which could be indicative of a high genetic diversity and possibly cryptic speciation in this species. Although two other

Armillaria species have in the past been reported from Cameroon, including *A. elegans* and *A. heimii* (*A. fuscipes*) (Hennings 1895; Roux et al. 2012; Koch et al. 2017), DNA sequence studies have to date only recovered *A. camerunensis* in the country.

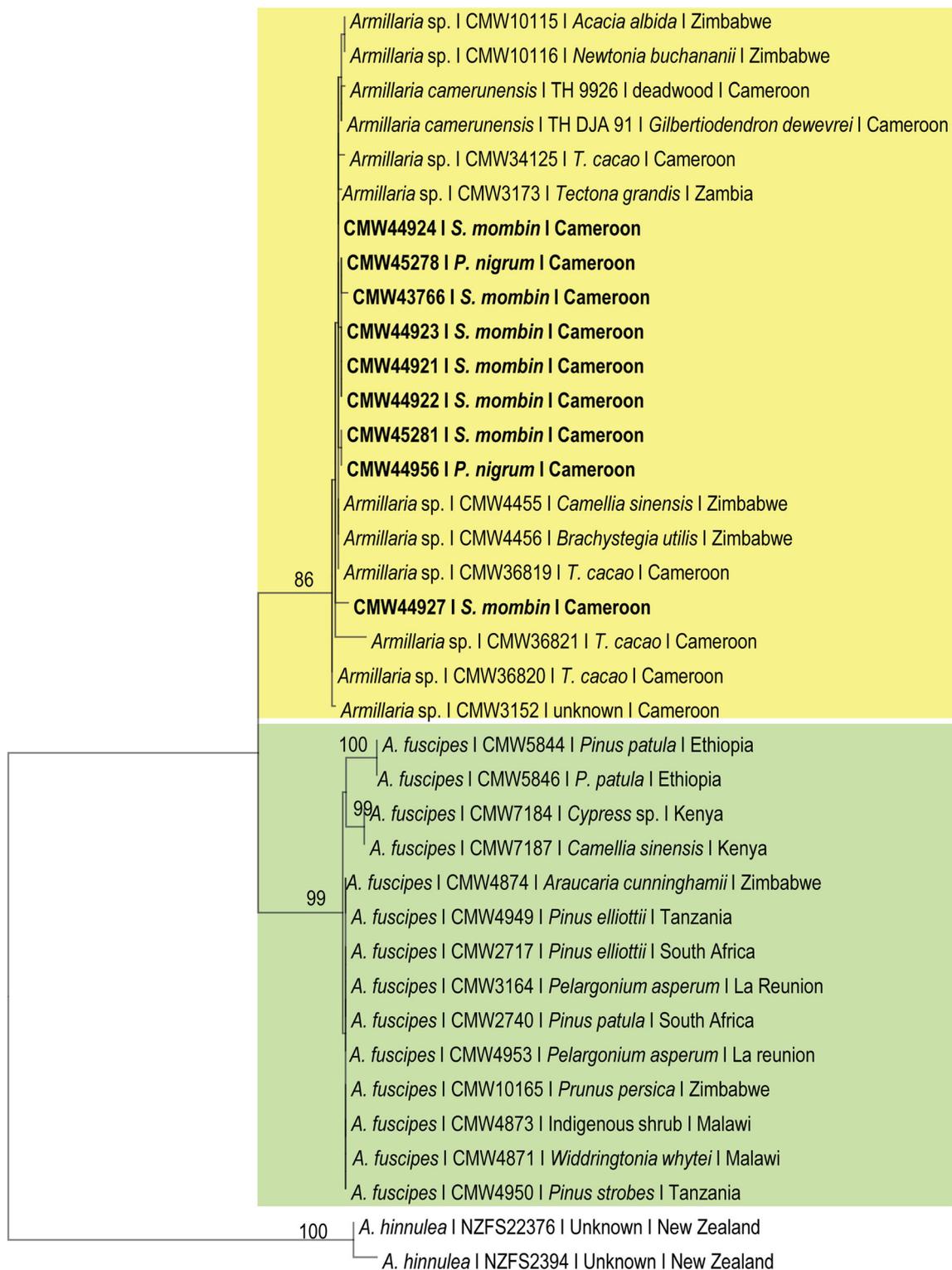
Many of the farms had previously grown, or were still growing, crops like cacao, *Coffea* spp. or fruit trees such as *Citrus* species, avocado (*Persea americana*), African plum (*Dacryodes edulis*) or cola nut (*Cola nitida*), next to or associated with the pepper (Table 2). Certain plots contained forest trees or remnants (stumps) thereof. Many of these are potential hosts for *Armillaria* (Roux and Coetzee 2016), which would explain the presence of the pathogen. *Armillaria* has been reported in Cameroon as early as 1892 (Hennings 1895) and has been found on cocoa in Cameroon, apparently as early as 1907 (Roux and Coetzee 2016), as well as in several other West African countries such as Sao Tomé, Togo and Ghana (Dade 1927; Rishbeth 1980; Roux and Coetzee 2016).

Since *Armillaria* spp. may survive decades in stumps and roots in the soils (Roux and Coetzee 2016), preparation of the terrain where a pepper plantation is to be established is key. Generally speaking, this disease spreads *via* root to root contact between infected and healthy plants, or through rhizomorphs or by mycelium present in the soil (Denman et al. 2000). Thus, manual removal of potentially infected plant material such as stumps and their root systems before establishment of the pepper plantation is recommended. Soil fumigation and soil inoculation with antagonistic fungi (*e.g.* Otieno et al. 2003) could further help to prepare a terrain. However, the efficacy of these methods is certainly not a hundred percent.

Once the disease is present, trenching is often used to prevent spread (Worrall 2004). This is only successful if the trench is dug well beyond the last affected trees. In one farmer's field in the Njombe-Penja district they tried this approach, which unfortunately did not seem to be very successful. This was either because the trench was dug too close to the area that was visibly affected or, since the affected area was on a slope, there was a downward movement of infectious propagules that was not stopped by the trench.

Many Penja pepper farmers use fungicides to control the disease cause by *A. camerunensis*, as this is the principal means they are comfortable with and knowledgeable about when it comes to pest and disease control. Unfortunately, chemical control is not very efficient in controlling *Armillaria* root rot (Thomidis and Exadaktylou 2012; Roux and Coetzee 2016).

Since the disease was more prevalent and more clearly visible on *S. mombin* than on pepper vines, we hypothesize that generally speaking the disease spreads through direct root contact from *S. mombin* to *P. nigrum*. If so, potentially using a different support tree not affected by *Armillaria* could solve the problem. Otherwise, support systems such as metal or



H
0.005

Fig. 2 Maximum Likelihood (ML) tree inferred from the ITS region showing the phylogenetic position of isolates obtained from *Piper nigrum* and *Spondias mombin* (in bold) from Cameroon. The tree was

rooted with sequences of *Armillaria hinnulea* (KX618553 and KX618555). Bootstrap values $\geq 70\%$ from 1000 replicates are displayed at the nodes

concrete poles could be considered, although this would require an investment out of reach of most farmers. However, since a few pepper vines with clear *Armillaria* disease symptoms were observed attached to seemingly healthy support trees, this raises the question whether the disease can spread from *P. nigrum* to *S. mombin*. Ultimately, it seems that both species are potential hosts of this *Armillaria* sp.

Based on the results presented here, it is clear that *Armillaria* root rot, caused by *A. camerunensis*, is one of the main phytosanitary problems of Penja pepper cultivation, causing considerable economic impact. Familiarization of farmers with the causal agent and appropriate control methods are urgently needed to ensure sustained production of highly valued Penja Pepper. This is the first report of *Armillaria* root rot of *S. mombin* and *P. nigrum* globally.

Acknowledgements The authors would like to thank the Penja Pepper Geographical Indication Group (IGPP) producers, in particular René Claude Metomo Elogo (President of Association) and Emmanuel Nzenowo (Executive Secretary) for allowing database and field access. We also thank Fokou Rodrigue, Diazem Clovis, Tocké, Ngonga Florian, and Njonkam Ferdinand, agricultural technicians who assisted in the surveys. Funding and resources were provided by CIRAD, IRAD, the University of Pretoria and through the “Debt reduction-development contract (C2D) France Cameroon” Poivre de Penja project. The authors were free to publish any or all results originating from their work.

Author contributions Conceptualization: Petchayo TS, M Ndoumbé Nkeng, GM ten Hoopen; Methodology: Petchayo TS, JM Tchotet Tchoumi, M Ndoumbé Nkeng, GM ten Hoopen; Investigation: Petchayo TS, JM Tchotet Tchoumi, M. Mbenoun, GM ten Hoopen; Formal analysis: Petchayo TS, JM Tchotet Tchoumi, J Roux, M Mbenoun, M Ndoumbé Nkeng, GM ten Hoopen; Resources: J Roux, GM ten Hoopen; Funding acquisition: CV Mfegue, GM ten Hoopen; Project administration: S Nyassé; Supervision: J Nguefack, BAD Begoude, GM ten Hoopen; Writing original draft: Petchayo TS, GM ten Hoopen; Manuscript revision: Petchayo TS, GM ten Hoopen, M Mbenoun, JM Tchotet Tchoumi, J Roux. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- Ahmad N, Fazal H, Abbasi H, Farooq S, Ali M, Ali Khan M (2012) Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:S1945–S1953
- Anandaraj M, Ramana KV, Sarma YR (1996) Sequential inoculation of *Phytophthora capsici*, *Radopholus similis* and *Meloidogyne incognita* in causing slow decline of black pepper. *Indian Phytopathology* 49:297–299
- Cardoso DE, Albuquerque FC (1979) Podridão radicular e tombamento de plântulas de pimenta-do-reino em videira causada por *Pythium splendens*. *Fitopatologia Brasileira* 4:17–23
- Coetzee MPA, Brenda D, Wingfield BP, Wingfield MJ (2005) Phylogenetic analyses of DNA sequences reveal species partitions amongst isolates of *Armillaria* from Africa. *Mycological Research* 109:1223–1234
- Costa SS, Moreira GM, Pfenning LH (2017) Development of a PCR protocol for the identification and detection of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* from soil and roots of black pepper (*Piper nigrum*). *Tropical Plant Pathology* 42:55–59
- Dade HA (1927) ‘Collar crack of cacao’: *Armillaria mellea* (Vahl.) Fr. *Bulletin of Department of Agriculture Gold Coast*. No. 5. 22p
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772
- Denman S, Coetzee MPA, Wingfield BD, Wingfield MJ, Crous PW (2000) *Armillaria* root rot. A new disease of cut-flower proteas in South Africa. *Fynbos Research* 33:1–6
- Faostat (2017) <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (last Accessed 5/11/2019)
- Ford KL, Henricot B, Baumgartner K, Bailey AM, Foster GD (2017) A faster inoculation assay for *Armillaria* using herbaceous plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 92:39–47
- Hennings P (1895) *Fungi camerunenses* I. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 22:72–111
- IPC (2017) http://www.ipcnet.org/index_n.php (last Accessed 5/11/2019)
- Keuh TK (1990) Major diseases of black pepper and their management. *Planter, Kuala Lumpur* 66:59–69
- Koch RA, Wilson AW, Séné O, Henkel TW, Aime C (2017) Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster*. *BMC Evolutionary Biology* 17:33
- Mbodi BR (2019) Investir au Cameroun : agriculture, l’avenir du poivre de Penja en peril à cause des bioagresseurs qui détruisent les plantations. Consulted on August 23, 2019 [on line] URL <https://www.investiraucameroun.com>
- Meghwal M, Goswami TK (2012) Chemical composition nutritional, medical and functional properties of black pepper: a review. 1: 172. <https://doi.org/10.4172/scientificreports.172>
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1–8 <https://dl.acm.org/citation.cfm?id=2016785> (last Accessed 13/11/2019)
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20:6115–6116
- Otieno W, Jeger M, Termorshuizen A (2003) Effect of infesting soil with *Trichoderma harzianum* and amendment with coffee pulp on survival of *Armillaria*. *Biological Control* 26:293–301
- Petchayo TS, Mfegue VC, Nguefack J, Tchotet TJM, Begoude BAD, Ducamp M, Djeugap JF, Ten Hoopen GM (2015) Penja pepper under threat in Cameroon! Poster Presented at the 6th Congress of European microbiologists (FEMS 2015) 7–11 June 2015 in Maastricht, the Netherlands
- Ramana KV, Santhosh JE (2000) Nematode induced diseases of black pepper. In: Ravindran PN (ed) *Black pepper, Piper nigrum*. CRC Press, Amsterdam, pp 269–288
- Ramana KV, Mohandas C, Balakrishnan R (1987) Role of plant parasitic nematodes in the slow wilt disease complex of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Kerala. *Indian Journal of Nematology* 17:225–230
- Ravindran PN (2000) *Black pepper, Piper nigrum* L. CRC Press, Amsterdam, p 526
- Rishbeth J (1980) *Armillaria* on cacao in Sao Tome. *Tropical Agriculture* 57:155–165
- Roux J, Coetzee MPA (2016) *Armillaria* root rot of *Theobroma cacao*. In: Bailey BA, Meinhardt LW (eds) *Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 429–447.

- Roux J, Mbenoun M, Misse C, Coetzee MPA, Begoude DA, Wingfield MJ (2012) Molecular identification of *Armillaria* isolates associated with root-rot disease of cacao in Cameroon. 17th international Cocoa Research Congress (COPAL). 15–20 Oct. Yaoundé, Cameroon
- Shahnazi S, Meon S, Vadamalai G, Ahmad K, Nejat N (2012) Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology* 78:160–169
- Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms, Diversity and Evolution* 12:335–337
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690
- Tchotet Tchoumi JM, Coetzee MPA, Vivas M, Rajchenberg M, Roux J (2017) Wood-rotting basidiomycetes associated with declining native trees in timber-harvesting compartments of the garden route National Park of South Africa. *Austral Ecology* 42:947–963
- Thomidis T, Exadaktylou E (2012) Effectiveness of cyproconazole to control *Armillaria* root rot of apple, walnut and kiwifruit. *Crop Protection* 36:49–51
- Truong NV, Burgess LW, Liew ECY (2008) Prevalence and aetiology of *Phytophthora* foot rot of black pepper in Vietnam. *Australasian Plant Pathology* 37:431
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315–322
- Worrall JJ (1991) Media for selective isolation of hymenomycetes. *Mycologia* 83:296–202
- Worrall JJ (2004) *Armillaria* root disease. The Plant Health Instructor. American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2004-0706-01>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.