

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE,
SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE

THE BIOTECHNOLOGY CENTER

LABORATOIRE DE PHYTOPROTECTION ET DE VALORISATION DES RESSOURCES GENETIQUES

LABORATORY OF PHYTOPROTECTION AND VALORIZATION OF GENETIC RESOURCES

**Formulation et effet d'un biopesticide à base d'*Azadirachta indica*,
de *Sida acuta*, de *Cymbopogon citratus* et d'extrait calcique sur la
résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) contre *Phytophthora
megakarya*, agent responsable de la pourriture brune du cacaoyer**

THESE

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

Spécialité : Biotechnologie et Développement

Par :

FOKA TATIEKAM Ebenezer

Matricule : 12R0134

Master en Biochimie

Sous la Codirection de :

Défunt Pr. BOUDJEKO Thaddée

Professeur

Université de Yaoundé I

Pr. EFFA Onomo Pierre

Maître de Conférences

Université de Yaoundé I

Pr. EWANE Cécile Annie

Maître de Conférences

Université de Yaoundé I



Année 2025

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE,
SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE

THE BIOTECHNOLOGY CENTER

LABORATOIRE DE PHYTOPROTECTION ET DE VALORISATION DES RESSOURCES GENETIQUES

LABORATORY OF PHYTOPROTECTION AND VALORIZATION OF GENETIC RESOURCES

**Formulation et effet d'un biopesticide à base d'*Azadirachta indica*,
de *Sida acuta*, de *Cymbopogon citratus* et d'extrait calcique sur la
résistance du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) contre *Phytophthora
megakarya*, agent responsable de la pourriture brune du cacaoyer**

THESE

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

Spécialité : Biotechnologie et Développement

Par :

FOKA TATIEKAM Ebenezer

Matricule : 12R0134

Master en Biochimie

Sous la Codirection de :

Défunt Pr. BOUDJEKO Thaddée

Professeur

Université de Yaoundé I

Pr. EFFA Onomo Pierre

Maître de Conférences

Université de Yaoundé I

Pr. EWANE Cécile Annie

Maître de Conférences

Université de Yaoundé I

Année 2025

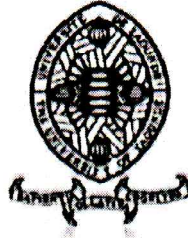
UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

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

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

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

POST-GRADUATE AND TRAINING
UNIT OF LIFE SCIENCES-HEALTH

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE DE DOCTORAT Ph. D

CERTIFICATE OF CORRECTION OF THE Ph. D THESIS

Nous, soussignés, membres du jury de la thèse de Doctorat/Ph. D en Biochimie intitulée « Effet d'une formulation biopesticide à base d'*Azadirachta indica*, de *Sida acuta*, de *Cymbopogon citratus* et d'extrait calcique sur la résistance du cacao (*Theobroma cacao* L.) contre *Phytophthora megakarya*, agent responsable de la pourriture brune du cacao» soutenue le vendredi 14 février 2025 à 10 h dans la salle de cours du Département des Energie Renouvelables de la Faculté des Sciences par Monsieur **FOKA TATIEKAM Ebenezer** (numéro d'enregistrement 12R0134), certifions par la présente que le candidat a effectué les corrections de la thèse susmentionnée telles que demandées par les examinateurs.

Nous sommes satisfaits des corrections apportées et recommandons que le doctorat/Ph.D soit décerné au candidat.

Yaoundé, le 26 février 2025

Superviseurs

EFFA ONOMO Pierre

EWANE Annie Cécile

Examineurs

AMBANG Zachée

NGUEFACK Julienne

NYASSE Salomon

Président du jury

MOUNDIPA FEWOU Paul


Chef de département

MOUNDIPA FEWOU Paul

Professeur

•• Entomologie - Toxicologie



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	

ANNÉE ACADEMIQUE 2024/2025
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION 16 janvier 2025

ADMINISTRATION

1. **DOYEN** : OWONO OWONO Luc Calvin, *Professeur*
2. **VICE-DOYEN / DPSAA** : NDJIGUI Paul-Désiré, *Professeur*
3. **VICE-DOYEN / DSSE** : NYEGUE Maximilienne Ascension,
Professeur
4. **VICE-DOYEN / DRC** : NOUNDJEU Pierre, *Maître de Conférences*
5. **Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Florentine
Marie Chantal, *Maître de Conférences*
6. **Chef Division des Affaires Académiques, de la Recherche et de la
Scolarité DAARS** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM,
Professeur

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (44)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1.	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2.	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3.	KANSCI Germain	Professeur	En poste
4.	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
5.	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	NGUEFACK Julienne	Professeur	En poste
7.	NJAYOU Frédéric Nico	Professeur	En poste
8.	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9.	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10.	BEBEE Fadimatou	Maître de Conférences	En poste
11.	BEBOY EDJENGUELE Sara N.	Maître de Conférences	En poste
12.	FONKOUA Martin	Maître de Conférences	En poste
13.	AKINDEH MBUH NJI	Maître de Conférences	En poste
14.	ATOGHO Barbara MMA	Maître de Conférences	En poste
15.	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
16.	BELINGA née NDOYE FOE F. M. C.	Maître de Conférences	<i>Chef DAF / FS</i>
17.	DAKOLE DABOY Charles	Maître de Conférences	En poste
18.	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Maître de Conférences	En poste
19.	DJUIDJE NGOUNOUE Marceline	Maître de Conférences	En poste
20.	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Maître de Conférences	En poste
21.	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	<i>VD/FS/Univ Ebwa</i>
22.	EWANE Cécile Annie	Maître de Conférences	En poste
23.	KENGNE NOUEMSI Anne Pascale	Maître de Conférences	En poste
24.	KOTUE TAPTUE Charles	Maître de Conférences	En poste
25.	LUNGA Paul KEILAH	Maître de Conférences	En poste
26.	MANANGA Marlyse Joséphine	Maître de Conférences	En poste

27.	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Maître de Conférences	En poste
28.	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	<i>Doyen FS / UDs</i>
29.	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
30.	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
31.	Palmer MASUMBE NETONGO	Maître de Conférences	En poste
32.	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Maître de Conférences	En poste
33.	TCHANA KOUATCHOVA Angèle	Maître de Conférences	En poste
34.	BAKWO BASSOGOG Christian Bernard	Chargé de Cours	En poste
35.	ELLA Fils Armand	Chargé de Cours	En poste
36.	EYENGA Eliane Flore	Chargée de Cours	En poste
37.	FOUPOUPOUOGNIGNI Yacouba	Chargé de Cours	En poste
38.	KOUOH ELOMBO Ferdinand	Chargé de Cours	En poste
39.	MADIESSE KEMGNE Eugenie Aimée	Chargée de Cours	En poste
40.	MANJIA NJIKAM Jacqueline	Chargée de Cours	En poste
41.	MBOUCHE FANMOE Marceline J.	Chargée de Cours	En poste
42.	OWONA AYISSI Vincent Brice	Chargé de Cours	En poste
43.	WILFRED ANGIE ABIA	Chargé de Cours	En poste
44.	WOGUIA Alice Louise	Chargée de Cours	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (50)

1.	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS/FS</i>
2.	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En poste
3.	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En poste
4.	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeure	<i>CD et Vice Doyen/FMSB/UYI</i>
5.	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6.	MEGNEKOU Rosette	Professeure	En poste
7.	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
8.	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9.	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
10.	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service / Coord.Progr./MINSANTE</i>

11.	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
12.	ALENE Désirée Chantal	Maître de Conférences	<i>Vice Doyen/ Uté Ebwa</i>
13.	ATSAMO Albert Donatien	Maître de Conférences	En poste
14.	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15.	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16.	GOUNOUE KAMKUMO Raceline épouse FOTSING	Maître de Conférences	En poste
17.	JATSA BOUKENG Hermine épse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18.	KANDEDA KAVAYE Antoine	Maître de Conférences	En poste
19.	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20.	MAHOB Raymond Joseph	Maître de Conférences	En poste
21.	MBENOUN MASSE Paul Serge	Maître de Conférences	En poste
22.	MOUNGANG Luciane Marlyse	Maître de Conférences	En poste
23.	NOAH EWOTI Olive Vivien	Maître de Conférences	En poste
24.	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
25.	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Maître de Conférences	En poste
26.	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
27.	NGUEMBOCK	Maître de Conférences	En poste
28.	TADU Zephyrin	Maître de Conférences	En poste
29.	TAMSA ARFAO Antoine	Maître de Conférences	En poste
30.	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
31.	YEDE	Maître de Conférences	En poste
32.	AMBADA NDZENGUE GEORGIA ELNA	Chargée de Cours	En poste
33.	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Chargé de Cours	En poste
34.	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
35.	FEUGANG YOUMSSI François	Chargé de Cours	En poste

36.	FOKAM Alvine Christelle Epse KENGNE	Chargée de Cours	En poste
37.	FOSSI TANKOUA Olivia Epse DJEUTCHOUANG SAYANG	Chargée de Cours	En poste
38.	GONWOUO NONO Legrand	Chargé de Cours	En poste
39.	KOGA MANG Dobarra	Chargé de Cours	En poste
40.	LEME BANOCK Lucie	Chargée de Cours	En poste
41.	MAPON NSANGO Indou	Chargé de Cours	En poste
42.	METCHI DONFACK Mireille Flaure EPSE GHOUMO	Chargée de Cours	En poste
43.	NDENGUE Jean De Matha	Chargé de Cours	En poste
44.	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
45.	NJUA Clarisse YAFI	Chargée de Cours	<i>Cheffe Div. U. Bamenda</i>
46.	NWANE Philippe Bienvenu	Chargé de Cours	En poste
47.	YOUNOUSSA LAME	Chargé de Cours	En poste
48.	ZEMO GAMO Franklin	Chargé de Cours	En poste
49.	KODJOM WANCHE Jacguy Joyce	Assistante	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (37)

1.	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	BIYE Elvire Hortense	Professeure	En poste
3.	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4.	MBOLO Marie	Professeure	En poste
5.	NDONGO BEKOLO	Professeur	En poste
6.	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7.	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8.	DJEUANI Astride Carole	Maître de Conférences	En poste
9.	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Maître de Conférences	En poste
10.	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12.	NGALLE Hermine BILLE	Maître de Conférences	En poste
13.	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	<i>CT/MINRESI</i>
14.	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
15.	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16.	ONANA Jean Michel	Maître de Conférences	En poste
17.	DIDA LONTSI Sylvere Landry	Chargé de Cours	En poste
18.	GONMADGE Christelle	Chargé de Cours	En poste

19.	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20.	MANGA NDJAGA JUDE	Chargé de Cours	En poste
21.	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargée de Cours	En poste
22.	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargée de Cours	En poste
23.	NSOM ZAMBO EPSE PIAL Annie Claude	Chargée de Cours	<i>En détachement/UNESCO MALI</i>
24.	GODSWILL NTSOMBOH NTSEFONG	Chargé de Cours	En poste
25.	KABELONG BANAHOU Louis- Paul-Roger	Chargé de Cours	En poste
26.	KONO Léon Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
27.	LIBALAH Moses BAKONCK	Chargé de Cours	En poste
28.	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Chargé de Cours	En poste
29.	TAEDOUNG Evariste Hermann	Chargé de Cours	En poste
30.	TEMEGNE NONO Carine	Chargée de Cours	En poste
31.	BOLIE Hubert	Assistant	En poste
33.	MACHE NKOUANDEU Pasma	Assistante	En poste
34.	MAFFO FOKOU Adèle	Assistante	En poste
35.	METSEBING Blondo-Pascal	Assistant	En poste
36.	NTONMEN YPNKEU Amandine Flore	Assistante	En poste
37.	ONANA EBODE Clotaire	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (28)

1.	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Mission PR</i>
2.	NANSEU NJIKI Charles Péguy	Professeur	En poste
3.	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
4.	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
5.	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Professeur	En poste
6.	NJOYA Dayirou	Professeur	En poste
7.	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
8.	EMADAK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
9.	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
10.	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
11.	KENNE DEDZO GUSTAVE	Maître de Conférences	En poste
12.	MBEY Jean Aimé	Maître de Conférences	En poste
13.	NDI Julius NSAMI	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>

14.	NEBAH Née NDOSIRI Bridget NDOYE	Maître de Conférences	<i>Sénatrice/SENAT</i>
15.	NYAMEN Linda Dyorisse	Maître de Conférences	En poste
16.	PABOUDAM GBAMBIE AWAWOU	Maître de Conférences	En poste
17.	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
18.	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Maître de Conférences	<i>Chef Service/ ENS Bertoua</i>
19.	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Maître de Conférences	En poste
20.	KOUOTOU DAOUDA	Maître de Conférences	En poste
21.	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
22.	NCHIMI NONO KATIA	Chargée de Cours	En poste
23.	NJANKWA NJABONG N. Eric	Chargé de Cours	En poste
24.	PATOUOSSA ISSOFA	Chargé de Cours	En poste
25.	SIEWE Jean Mermoz	Chargé de Cours	En Poste
26.	BOYOM TATCHEMO Franck W.	Assistant	En Poste
27.	DANTIO NGUELA Christian Brice	Assistant	En poste
28.	LEKENE NGOUATEU Reine	Assistant	En poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (33)

1	Alex de Théodore ATCHADE	Professeur	<i>DEPE/Univ. Bertoua</i>
2	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen/FSE/UIYI</i>
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de Département/UDS</i>
4	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Recteur UBertoua/ Chef de Département</i>
5	MBAZOA née DJAMA Céline	Professeur	En poste
6	MKOUNGA Pierre	Professeur	En poste
7	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
8	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Director/HTTTC/UBda</i>
8	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
10	KAMTO Eutrophe Le Doux	Maître de Conférences	En poste
11	KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
12	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
13	NGOMO Orléans	Maître de <conférences	En poste
14	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	<i>Chef de Cellule MINRESI</i>

15	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	<i>Chef Div./MINESUP</i>
16	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Dir ENS/Uté Bertoua</i>
17	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
18	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
19	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
20	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Maître de Conférences	En poste
21	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
22	MELONG RADIUS	Chargé de Cours	En poste
23	MESSI Angélique Nicolas	Chargé de Cours	En poste
24	MUNVERA MFIFEN Aristide	Chargé de Cours	En poste
25	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
26	NONO NONO Éric Carly	Chargé de Cours	En poste
27	OUETE NANTCHOUANG Judith Laure	Chargée de Cours	En poste
28	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
29	TCHAMGOUE Joseph	Chargé de Cours	En poste
30	TSAFFACK Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	TSAMO TONTSA Armelle	Chargée de Cours	En poste
32	TSEMEUGNE Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	NDOGO ETEME Olivier	Assistant	En poste
34	NGUEMDJO CHIMEZE Valery Wilfried	Assistant	En poste
6- DEPARTEMENT DES ENERGIES RENOUVELABLES (ER) (1)			
1.	BODO Bertrand	Professeur	<i>Chef de Département</i>

7- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (22)

1.	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef de Division des SI/MINESUP</i>
2.	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Inspecteur Général Académique/ MINESUP</i>
3.	NDOUNDAM René	Professeur	En poste
4.	ABESSOLO ALO'O Gislain	Maître de Conférences	<i>CTI/MINFOPRA</i>
5.	MELATAGIA YONTA Paulin	Maître de Conférences	En poste
6.	TSOPZE Norbert	Maître de Conférences	En poste

7.	AMINO HALIDOU	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
8.	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargée de Cours	En Poste
9.	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
10.	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
11.	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Chargé de Cours	En poste
12.	HAMZA Adamou	Chargé de Cours	En poste
13.	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Chargé de Cours	En poste
14.	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
15.	MESSI NGUELE Thomas	Chargé de Cours	<i>Chef de Département/Génie Info./U Ebolowa</i>
16.	MONTHÉ DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
17.	NZEKON NZEKO'O Armel Jacques	Chargé de Cours	En poste
	OLLE OLLE Daniel Claude Georges Delort	Chargé de Cours	<i>Directeur Adjoint ENSET Ebolowa</i>
18.	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
19.	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
20.	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	<i>Directeur CUTI</i>
21.	MAXWELL NDOGNKON MANGA	Assistant	En poste
22.	NDOM Francis Rollin	Assistant	En poste
23.	NGUIMEYA TSOFAK Baudoin	Assistant	En poste
24.	NKONDOCK. MI BAHANACK. N.	Assistant	En poste
8- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (34)			
1.	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	<i>Chef de Département/D. ENSPY</i>
2.	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
3.	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
4.	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	<i>Chef de Division/ENSPY</i>
5.	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
6.	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>VDRC/FS/UIYI</i>
7.	TAKAM SOH Patrice	Maître de Conférences	En poste
8.	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
9.	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

10.	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINEPAT</i>
11.	BOGSO ANTOINE Marie	Chargé de Cours	En poste
12.	BITYE MVONDO Esther	Chargé de Cours	En poste
13.	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
14.	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
15.	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
16.	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17.	KOKOMO AYISSI Eric Brice	Chargé de Cours	En poste (transfert de l'université de Douala)
18.	LOUMNGAM KAMGA Victor	Chargé de Cours	En poste
19.	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
20.	MBATAKOU Salomon Joseph	Chargé de Cours	En poste
21.	MENGUE MENGUE David Joël	Chargé de Cours	<i>Chef Dpt /ENS Université d'Ebolowa</i>
22.	MBIAKOP Hilaire George	Chargé de Cours	En poste
23.	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
24.	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
25.	OGADOA AMASSAYOGA	Chargée de Cours	En poste
26.	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	<i>En stage</i>
27.	TENKEU JEUFACK Yannick Léa	Chargé de Cours	En poste
28.	TCHEUTIA Daniel Duviol	Chargé de Cours	En poste
29.	TETSADJIO TCHILEPECK M. Eric.	Chargé de Cours	En poste
30.	EBODE ATANGANA Pie Désiré	Assistant	En poste
31.	FOKAM Jean Marcel	Assistant	En poste
32.	GUIDZAVAI KOUCHERE Albert	Assistant	En poste
33.	MAMA ASSANDJE Prosper	Assistant	En poste
34.	MANN MANYOMBE Martin Luther	Assistant	En poste
35.	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
36.	NYOUMBI DLEUNA Christelle	Assistant	En poste

9 - DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (24)

1.	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	KOUITCHEU MABEKU Epse KOUAM Laure Brigitte	Professeure	En poste
3.	MUNE MUNE Martin Alain	Professeur	En poste
4.	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeure	<i>Vice-Doyen / DSSE</i>
5.	RIWOM Sara Honorine	Professeure	En poste
6.	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Professeur	En poste

7.	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	<i>Doyen/FASA/UDs</i>
8.	BOUGNOM Blaise Pascal	Maître de Conférences	En poste
9.	NJIKI BIKOÏ Jacky	Maître de Conférences	En poste
10.	TCHIKOUA Roger	Maître de Conférences	<i>Chef de Service de la Scolarité</i>
11.	EHETH Jean Samuel	Chargé de Cours	En poste
12.	ESSONO Damien Marie	Chargé de Cours	En poste
13.	EZO'O MENGOU Fabrice Télésfor	Chargé de Cours	En poste
14.	LAMYE Glory MOH	Chargé de Cours	En poste
15.	MEYIN A EBONG Solange	Chargée de Cours	En poste
16.	MONI NDEDI Esther Del Florence	Chargée de Cours	<i>Cheffe de service/DAA C/UIYI</i>
17.	NKOUDOU ZE Nardis	Chargé de Cours	En poste
18.	NKOUÉ TONG Abraham	Chargé de Cours	En poste
19.	NGOUE NAM Romial Joël	Chargé de Cours	En poste
20.	NJAPNDOUNKE Bilkissou	Chargé de Cours	En poste
21.	TAMATCHO KWEYANG Blandine Pulchérie	Chargée de Cours	En poste
22.	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Chargée de Cours	En poste
23.	TOBOLBAÏ Richard	Chargé de Cours	En poste
24.	ZO'O EZO'O Fabrice Télésfor	Assistant	En poste
25.	MAYI Marie Paule Audrey	Assistante	En poste
10. DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PHY) (45)			
1.	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2.	BIYA MOTTO Frédéric	Professeur	<i>DG/HYDRO Mekin</i>
3.	DJUIDJE KENMOE ép. ALOYEM	Professeur	En poste
4.	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. Uté Ngaoundéré</i>
5.	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
6.	EYEBE FOU DA Jean sire	Professeur	En poste
7.	FEWO Serge Ibraïd	Professeur	En poste
8.	HONA Jacques	Professeur	En poste
9.	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
10.	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	<i>Chef de Département/Uni. Bertoua</i>
11.	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>

12.	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
13.	SAIDOU	Professeur	<i>Chef de centre/IRGM/MINR ESI</i>
14.	SIEWE SIEWE Martin	Professeur	En poste
15.	SIMO Elie	Professeur	En poste
16.	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen FS/Univ/Bda</i>
17.	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
18.	WOAFO Paul	Professeur	En poste
19.	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
20.	VONDOU Derbetini Appolinaire	Professeur	En poste
21.	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	<i>Cheffe de Div./ENSPY</i>
22.	FOUEJIO David	Maître de Conférences	<i>Chef Cell/MINADER</i>
23.	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24.	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Maître de Conférences	En poste
25.	MELI'I Joelle Larissa	Maître de Conférences	En poste
26.	MVOGO ALAIN	Maître de Conférences	En poste
27.	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
28.	WAKATA née BEYA Annie Sylvie	Maître de Conférences	<i>Secrétaire Générale /UYII</i>
29.	WOULACHE Rosalie Laure	Maître de Conférences	<i>Absente de son poste</i>
30.	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31.	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Chargé de Cours	En poste
32.	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
33.	DJIOTANG TCHOTCHOU Lucie Angennes	Chargée de Cours	En poste
34.	EDONGUE Hervais	Chargé de Cours	En poste
35.	KAMENI NEMATCHOUA Modeste	Chargé de Cours	En poste
36.	LAMARA Maurice	Chargé de Cours	En poste
37.	NGA ONGODO Dieudonné	Chargé de Cours	En poste
38.	OTTOU ABE Martin Thierry	Chargé de Cours	<i>Chef de Div./DIPD/UII</i>
39.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Chargé de Cours	En poste
40.	TCHAPET NJAFA Jean-Pierre	Chargé de Cours	<i>Chef Ser. Adj./FLASH/UII</i>
41.	TEYOU NGOUPO Ariel	Chargé de Cours	En poste

42.	TOGUEU MOTCHEYO Alain Bertrand	Chargé de Cours	En poste
43.	WANDJI NYAMSI William	Chargé de Cours	En poste
44.	ETEME Armand Sylvain	Assistant	En poste
45.	NGO MOUELLAS épouse LOTHIN	Assistante	En poste
46.	TCHODIMOU Carole	Assistant	En poste
47.	SOUFFO TAGUEU Merimé	Assistant	En poste

11- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (34)
--

1.	BISSO Dieudonné	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2.	EKOMANE Emile	Professeur	<i>Chef Div./Uté Ebolowa</i>
3.	GANNO Sylvestre	Professeur	En poste
4.	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Vice-Doyen /DPSAA</i>
5.	NGUEUTCHOUA Gabriel	Professeur	<i>CEA/MINRESI</i>
6.	NGOS III Simon	Professeur	En poste
7.	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8.	ONANA Vincent Laurent	Professeur	<i>Chef de Département/Uté. Eb.</i>
9.	YENE ATANGANA Joseph Q.	Professeur	<i>Chef Div. /MINTP</i>
10.	TCHOUANKOUE Jean Pierre	Professeur	En poste

11.	Elisé SABABA	Maitre Conférences	de En poste
12.	EYONG John TAKEM	Maître Conférences	de En poste
13.	FUH Calistus Gentry	Maître Conférences	de <i>Sec. D'Etat/MINMIDT(ai)</i>
14.	MAMDEM TAMTO Lionelle Estelle, épouse BITOM	Maitre Conférences	de En poste
15.	MBIDA YEM	Maître Conférences	de En poste
16.	MBESSE Cécile Olive	Maitre Conférences	de En poste
17.	METANG Victor	Maître Conférences	de En poste
18.	NGO BIDJECK Louise Marie	Maître Conférences	de En poste
19.	NJILAH Isaac KONFOR	Maître Conférences	de En poste
20.	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Maître Conférences	de En poste
21.	TCHAKOUNTE Jacqueline épse NUMBEM	Maître Conférences	de <i>Chef. Cell /MINRESI</i>

22.	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Maître de Conférences	En poste
23.	TEMGA Jean Pierre	Maître de Conférences	En poste
24.	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	DG/ART
25.	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
26.	KOAH NA LEBOGO Serge P.	Chargé de Cours	En poste
27.	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
28.	NGO'O ZE ARNAUD	Chargé de Cours	En poste
29.	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
30.	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
31.	TENE DJOUKAM Joëlle Flore, épouse KOUANKAP NONO	Chargée de Cours	En poste
32.	FEUMBA Roger	Chargé de Cours	En poste
33.	MBANGA NYOBE Jules	Chargé de Cours	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	de Chargés de Cours	de Assistants	Total
BCH	08 (01)	25 (15)	11 (05)	00 (00)	44 (21)
BPA	12 (02)	18 (06)	16 (06)	01 (01)	47 (15)
BPV	08 (02)	10 (03)	14 (06)	06 (03)	39 (14)
CI	06 (01)	14 (02)	05 (01)	03 (01)	28 (05)
CO	06 (01)	14 (05)	12 (03)	02 (00)	33 (09)
ER	01 (00)	/	/	/	01 (0)
IN	03 (00)	03 (00)	13 (01)	06 (00)	24 (01)
MAT	01 (00)	08 (00)	20 (01)	07 (01)	36 (02)
MIB	05 (03)	05 (01)	13 (06)	01 (01)	24 (11)
PHY	17 (01)	11 (04)	15 (01)	04 (02)	45 (08)
ST	10 (00)	14 (05)	09 (02)	00 (00)	33 (07)
Total	67 (11)	122 (41)	128 (32)	30 (09)	342 (88)

Soit un total de	360 (94) dont :
- Professeurs	67 (11)
- Maîtres de Conférences	122 (41)
- Chargés de Cours	128 (32)
- Assistants	30 (09)
() = Nombre de Femmes	94

ENSEIGNANTS SOUS CONTRAT DE COLLABORATION

1.	BELL JOSEPH MARTIN	547019U	17/06/1957	Sakbayeme	M	10/11/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
2.	DJOUFAC WOUMFO EMMANUEL	547069Z	09/01/1957	Ngaoundéré	M	04/05/1990	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
3.	FOMENA ABRAHAM	546778X	10/11/1958	Batcham	M	01/12/1986	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
4.	GHOUMU TIH RAPH	547004-K	23/12/1956	BAMBALANG	M	13/10/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
5.	KAMTCHOUING PIERRES	143299X	13/09/1955	Nkongsamba	M	01/10/1988	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
6.	NGADJUI TCHALEU BONAVENTURE	546959-G	15/09/1953	FONTSIGA	M	12/08/1982	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
7.	NGO BILONG ANASTASIE épouse TIH	546164-I	27/12/1955	MBANGA	F	28/07/2000	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	MC
8.	NKENGFACK EPHRAIM AUGUSTIN	546948-F	17/06/1955	YAOUNDE	M	01/09/1983	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION	PR
9.	NDIKONTAR MAURICE KOR	169784G	09/05/1958	Mbaa	M	10/01/1991	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION- EN COURS DE SIGNATURE	PR
10.	NJIOKOU FLOBERT	547321H	11/06/1958	Nkongsamba	M	03/05/1993	RETRAITE - CONTRAT DE COLLABORATION- EN COURS DE SIGNATURE	PR
11.	BENG NEE NINTCHOM PENLAP VERONIQUE	546643B	07/01/1957	Melong I	F	02/10/1992	RETRAITE- CONTRAT DE COLLABORATION	PR
12.	FOKOU ELIE	546725J	08/06/1957	Fiéla- Bamendjinda	M	01/04/1988	RETRAITE- CONTRAT DE COLLABORATION EN COURS DE FINALISATION	PR
13.	TCHOUANKEU JEAN CLAUDE	547295-E	06/01/1959	Douala	M	01/12/1989	RETRAITE- CONTRAT DE COLLABORATION EN COURS DE FINALISATION	PR
14.	BOYOMO ONANA						CONTRATS TRAITES LORS DU CONSEIL D'UNIVERSITE DU 12 JUILLET 2024	MC
15.	WANDJI JEAN	162242M	09/06/1958	Bangou	M			UYI
16.	YOUMBI EMMANUEL	547332Z	12/02/1959	Bangou	M	Bangou		PR
17.	NGODO MELINGUI JEAN	500475X	05/09/1958	Endoum		20/10/2005		MC
18.	KOFANE TIMOLEON CREPIN							PR
19.	NGAMENI EMMANUEL	547277-C	24/04/1959	Mbanga	M			PR
20.	BITOM DIEUDONNE	547050X	23/11/1958	Ambam	M			PR

DÉDICACE

À

Mes parents

TATTEKAM Innocent et WAZE DJOUASSU TAGNE Constance Désirée

REMERCIEMENTS

Ce document est le résultat de plusieurs années de labeur au cours desquelles j'ai bénéficié des grâces, de la protection, de la force, la patience et du courage du Dieu tout puissant. Parvenu au terme de ce travail, je tiens à remercier de tout cœur :

Le Pr. BOUDJEKO Thaddée de regretté mémoire, mon directeur de thèse, Professeur titulaire à l'Université de Yaoundé I et responsable du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Génétiques (LPVRG) du Centre de Biotechnologie (CBT) de l'Université de Yaoundé I, pour avoir dirigé et encadré ce travail avec un grand intérêt jusqu'à son dernier jour de vie, pour ses fructueux conseils, sa disponibilité et pour l'esprit de recherche qu'il a consolidé en moi.

Le Pr. EWANE Cécile Annie, Maître de conférences à l'Université de Yaoundé I, pour avoir encadré ce travail après le décès du Pr. Boudjeko Thaddée, ses fructueux conseils, sa collaboration scientifique et ses encouragements.

Le Pr. EFFA Oromo Pierre, Maître de conférences à l'Université de Yaoundé I, pour avoir encadré ce travail après le décès du Pr. Boudjeko Thaddée, ses fructueux conseils, sa collaboration scientifique et ses encouragements.

Le Pr. BEAULIEU Carole, Professeur titulaire et Doyenne de la Faculté des Sciences de l'Université de Sherbrooke (Canada), m'avoir accueilli, cosupervisé la troisième partie de ce travail, m'avoir permis de travailler dans l'agréable cadre de son laboratoire et ses encouragements.

Le Pr. BOUARAB KAMAL, Professeur titulaire de l'Université de Sherbrooke (Canada), pour avoir cosupervisé la troisième partie de ce travail, m'avoir permis de travailler dans l'agréable cadre de son laboratoire, ses fructueux conseils et sa disponibilité.

Le Pr. SADO KAMDEM Sylvain Leroy, Professeur titulaire à l'Université de Yaoundé I, pour ses encouragements et les remarques académiques constructives.

Le Pr. MBANYA Jean Claude et le Pr. DJOCGOUE Pierre François, Directeurs du CBT pendant la mise en œuvre de ces travaux, pour le support mis à notre disposition.

À Mitacs Globalink pour l'appui financier du travail à travers la bourse d'étude, qui a permis d'effectuer un stage de recherche à l'Université de Sherbrooke (Canada); pour tous les avantages et privilèges dont j'ai bénéficié en tant que boursier et membre de ladite organisation.

Au Centre SÈVE de l'Université de Sherbrooke de m'avoir octroyé la bourse d'étude FQRNT (Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies) et pour le plateau technique de pointe qui m'a permis de réaliser la majeure partie de mes travaux de recherche.

À tous les enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour les enseignements reçus tout au long de mon cursus universitaire lesquels m'ont été d'une grande utilité lors de la réalisation de ce travail.

Au Pr. ADAMOU du Laboratoire de Microbiologie des Sols du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, pour ses conseils et encouragements durant ces années.

À GONZALEZ-LAMOTHE Maria Rocio, TAHA ABD El Rahman, TAOUFIK El Alj, LERAT Sylvain, ZITOUNI Mina, de l'Université de Sherbrooke pour leurs aides durant les analyses de Biologie moléculaire et leurs encouragements.

À LOUNES Haroune, SABRINA Saibi, de l'Université de Sherbrooke pour leurs aides durant les analyses de Métabolomique et leurs encouragements.

À toute l'équipe dynamique du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Génétiques du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, en particulier Dr. DJUIDJE Péguy, Dr. MEDIASSE KENGNE Francine, Dr. TENE TAYO Martial, Dr. SIPPING Marius, DZELAMONYUY Dzelamonyuy and MAGNI PACHA Tatiana Flore et pour l'atmosphère chaleureuse durant ces années.

A ma famille, spécialement mes frères et Sœurs, ma grand-mère LELE Marie, mes feus grands-parents FOKA Adolph, DJOUASSI Jean et KONGNE Thérèse, pour l'atmosphère chaleureuse, conviviale et revigorante dans laquelle j'ai été pendant ces années.

Je remercie enfin toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	i
DÉDICACE.....	xvii
REMERCIEMENTS	xviii
SOMMAIRE	xx
RÉSUMÉ.....	xxiii
ABSTRACT	xxv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxvii
LISTE DES TABLEAUX	xxix
LISTE DES FIGURES	xxx
LISTE DES PHOTOS	xxxiv
LISTE DES ANNEXES	xxxvi
I. REVUE DE LITTÉRATURE	1
INTRODUCTION GENERALE.....	1
I.1. Généralités sur le cacao.....	5
I.1.1. Origine et distribution	5
I.1.2. Taxonomie et diversité génétique	5
I.1.3. Botanique	7
I.1.4. Importance	8
I.2. Contraintes liées à la culture du cacao	9
I.2.1. La pourriture brune des cabosses de cacaoyer	10
I.2.2. L'oomycète <i>Phytophthora megakarya</i>	11
I.3. Méthodes de lutte contre <i>Phytophthora megakarya</i>	14
I.3.1. Lutte agronomique	14
I.3.2. Lutte chimique	14
I.3.3. Lutte génétique.....	15
I.3.4. Lutte biologique	15
I.4. Mécanisme de défense chez les plantes	30
I.4.1. Mécanisme de défense chez le cacaoyer.....	36
II. MATERIEL ET METHODES	41
II.1. Matériel.....	41
II.1.1 Matériel végétal	41
II.1.2. Matériel organique.....	42
II.1.3. Matériel fongique	43

II.2. Méthodes	44
II.2.1. Extractions des intrants de la formulation biopesticide.....	44
II.2.2. Formulation	45
II.2.3. Détermination de l'effet de la bioformulation OBF' sur la production de plantules de cacaoyer.....	52
II.2.4. Évaluation de l'effet de la bioformulation OBF' sur les défenses des plants de cacaoyer.....	59
II.2.5. Évaluation de l'effet de la bioformulation OBF' sur les défenses des cabosses de cacaoyer.....	63
II.3. Analyse statistique	69
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	70
III.1. Résultats	70
III.1.1. Formulation du biopesticide.....	70
III.1.1.1. Extraits des intrants du biopesticide.....	70
III.1.1.2. Formulation du biopesticide.....	70
III.1.1.3. Caractéristiques des formulations BF, OBF et OBF'	77
III.1.1.4. Mécanisme d'action de la bioformulation OBF' sur <i>Phytophthora megakarya</i>	82
III.1.2. Effet de la bioformulation OBF' sur la production des plantules de cacaoyer	84
III.1.2.1. Phytotolérance de la bioformulation OBF' par la plante	84
III.1.2.2. Effet de la bioformulation OBF' sur la production des plantules de cacaoyer en serre	85
III.1.2.3. Effet de la bioformulation OBF' sur quelques marqueurs de croissance des plantules	89
III.1.2.4. Effet de la bioformulation OBF' sur la résistance des plantules de cacaoyer.....	93
III.1.3. Effet de la bioformulation OBF' sur les défenses du cacaoyer vis-à-vis de <i>Phytophthora megakarya</i> à partir des cabosses détachées.....	100
III.1.3.1. Effet de la bioformulation OBF' sur la sévérité de la pourriture des cabosses SNK10 et SNK413	100
III.1.3.2. Effet de la bioformulation OBF' sur l'expression des gènes de résistance des cabosses détachées des clones SNK10 et SNK413 contre <i>Phytophthora megakarya</i> ..	100
III.1.3.3. Effet de la bioformulation OBF' sur les métabolites non volatiles du péricarpe des cabosses détachées des clones SNK10 et comparaison à ceux du cacaoyer SNK413	111
III.2. Discussion	119
Formulation du biopesticide.....	119
Conclusion partielle 1.....	122
Effet de la bioformulation OBF' sur la production des plantules de cacaoyer	123
Conclusion partielle 2.....	126

Effet de la bioformulation OBF' sur les défenses du cacaoyer vis-à-vis de <i>Phytophthora megakarya</i> à partir des cabosses détachées	127
Conclusion partielle 3.....	132
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	133
Conclusion générale	133
Perspectives	134
BIBLIOGRAPHIE	135
ANNEXES	a

RÉSUMÉ

La culture du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) a une importance économique pour les pays producteurs. Elle est confrontée à de nombreuses contraintes telle que la forte pression parasitaire qui sévit dans les zones de production. L'oomycète *Phytophthora megakarya* est l'agent pathogène le plus dommageable du cacao en Afrique Centrale et de l'Ouest, occasionnant des pertes allant jusqu'à 80% de la production. Le sol est le foyer d'infection primaire de cet oomycète qui cause des pertes sévères en pépinières ainsi qu'en champ. L'usage des pesticides chimiques de synthèse permet de limiter les pertes en pépinière et en champ ; toutefois, il a des effets néfastes sur l'environnement, la qualité du cacao et la santé humaine. Dans l'optique de réduire l'utilisation de ces pesticides chimiques de synthèse, des alternatives à l'instar des biopesticides sont de plus en plus recherchées afin d'augmenter la production du cacao biologique qui a une meilleure qualité. Le but de ce travail est d'évaluer l'effet d'un biopesticide à base de neem, de l'herbe sida, de la citronnelle et des coquilles d'huître compte tenu de leur propriété individuelle, sur la croissance et la résistance du cacaoyer vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*. Ainsi, la formulation la plus stable et antifongique a été utilisée pour évaluer la tolérance des plants de cacao ainsi que le mode d'action de cette dernière sur *Phytophthora megakarya*. La meilleure dilution fongicide a été utilisée ensuite pour évaluer l'effet sur la croissance et la stimulation des défenses du cacaoyer. De ce fait, les paramètres agromorphologiques de croissance ainsi que les marqueurs de défense [teneur en phénols totaux, en flavonoïdes, en protéines et activité des enzymes β -1,3-glucanase, peroxydases (POX) et polyphénol-oxydases (PPO)] ont été quantifiés chez les plants. En outre, l'effet de la formulation sur la stimulation des voies de défense du cacaoyer médiée par l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'inhibition de la mort cellulaire des cabosses chez le clone sensible (SNK10) et le tolérant (SNK413) à *Phytophthora megakarya* a été étudiée par analyse transcriptomique grâce à la RT-qPCR. De plus, une analyse métabolomique de ces cabosses avant infection et après infection a été effectuée. De ces activités, il ressort une formulation nommée OBF' qui est une émulsion ayant 10,8% d'huile de Neem (Nh), 8,1% d'extrait aqueux du tourteau de neem (Nea), 8,1% d'extrait hydroalcoolique de l'herbe sida (Seth), 4,05% d'extrait calcique des coquilles d'huîtres (HCa), 1,35% d'oxyde de calcium (CaO), 21,6% de Tween80 (Tw) et 10% d'huile essentielle de citronnelle (CEO). À température ambiante, la formulation est stable et possède des micelles de diamètre $\leq 14,9$ nm, un pH de 5,2 et une conductivité de 95,25 mV. La formulation OBF' possède une activité dose dépendante sur les *phytos* ravageurs étudiés. En effet, elle inhibe totalement la croissance de *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*,

Phytophthora infestans et *Phytophthora megakarya* à 1% ; réduit la croissance de ceux-ci de 37,39% à 55,88% lorsqu'elle est utilisée à 0,1%. Cette formulation OBF' agit sur *Phytophthora megakarya* en inhibant sa synthèse des protéines de 60% et en inhibant l'activité des pompes ATPases-H⁺. La production des plantules de cacao avec OBF' stimule l'épanouissement des racines après prétraitement des fèves de 62,6% et augmente la surface foliaire chez les plants d'au moins 8,8% en 16 semaines. Cette augmentation des paramètres morphologiques est caractérisée par l'augmentation de la teneur en protéines et de l'acide indole acétique (AIA) dans les racines au 12^{ème} jour après le prétraitement des fèves comparativement au traitement chimique et au témoin négatif. De plus, elle augmente significativement la teneur en protéines et en chlorophylles totales de 0,9 à 15% en 16 semaines. Le prétraitement des feuilles de plants de cacaoyer avec OBF' avant inoculation avec les spores de *P. megakarya* réduit l'index de sévérité de 3,35 à 0,86. Cette réduction de la sévérité à *P. megakarya* est accompagnée par une augmentation de la teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et de l'activité des enzymes peroxydases, polyphénol-oxydases et β -1,3-glucanase dans les feuilles. Par ailleurs, le prétraitement des cabosses SNK10 et SNK413 avant l'infection à *P. megakarya* réduit la sévérité de 2,17 et 1,33 à 1 et 0,5 respectivement. Cette réduction de la sévérité est accompagnée par une augmentation significative de l'expression des gènes PR protéines chez le clone SNK413 traité à la formulation OBF'. Toutefois, cette augmentation est non significative chez le clone SNK10. Par ailleurs, cela entraîne une augmentation significative de l'expression des gènes de défense BII1, et du facteur de transcription WRKY chez les deux clones. Cependant, l'expression du gène AOS est significativement augmentée uniquement chez le clone SNK10 après application de la formulation. De plus, l'analyse métabolomique par LC-MS/MS du péricarpe des cabosses SNK413 et SNK10 dans diverses conditions a révélé la présence de 277 composés parmi lesquels la zeta-carotène qui est un précurseur responsable de la pigmentation rouge orangé du clone SNK10 ; l'ifosfamide qui pourrait être un marqueur des cabosses saines et non biofortifiées SNK10 et SNK413 ; la pterosine A qui pourrait être un marqueur du clone SNK10 ; l'hexose + hexose-deoxyhexose + C₂₀H₃₂ qui pourrait être un marqueur du clone SNK413 ; et de l'acide lyalosidique, de l'ormosanine et du ginsenoside Rh3 qui pourraient être des marqueurs de tolérance des clones SNK10 et SNK413 vis-à-vis de *P. megakarya*. Ces résultats montrent que la formulation OBF' est un bon candidat dans la production de cacao à base des substances biologiques et permet de pré-immuniser cette plante contre d'éventuelles attaques et améliore la qualité des plantules.

Mots clés : Cacaoyer, *Phytophthora megakarya*, biofongicide, stimulation de la défense, enzymes, RT-qPCR, métabolomique.

ABSTRACT

The cultivation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) has an economic importance for producing countries. Its culture is confronted with numerous constraints, such as the strong parasite pressure in the production areas. The oomycete *Phytophthora megakarya* is the most damaging pathogen of cocoa in Central and West Africa, causing losses of up to 80% of the production. The soil being the primary infection site of this oomycete, it inflicts severe losses in nurseries as well as in the field. The use of synthetic chemical pesticides allows to limit the losses in the nursery and in the field, but it has harmful effects on the environment, the quality of cocoa and human health. To reduce the use of these synthetic chemical pesticides, alternatives such as biopesticides are increasingly sought to increase the production of organic cocoa which has a better quality. The aim of this work was to evaluate the effect of Neem-based biopesticide, Sida weed, lemongrass and oyster shells considering their individual properties, on the growth of cocoa plants (SCA12*SNK16) and the resistance of cocoa (SNK10 and SNK413) against *Phytophthora megakarya*, in hybrid cocoa plants. Thus, the stability of the formulation tests was determined and the most stable and antifungal one was used to evaluate the tolerance of cocoa plants as well as the mode of action of the latter on *Phytophthora megakarya*. The dilution that did not cause any foliar damage and that kept its fungicidal effect was then used to evaluate the effect on the growth and the stimulation of the defenses of the hybrid SCA12*SNK16. Thus, agro-morphological growth parameters were recorded every 04 weeks for 12 weeks, followed by biochemical analysis of plant growth markers. Then, the defense markers [total phenol content, flavonoids, proteins, and activity of β -1,3-glucanase, peroxidases (POX) and Polyphenoloxidases (PPO) enzymes] were quantified in the plants. In addition, the effect of the formulation on the stimulation of cocoa defense pathways mediated by salicylic acid, jasmonic acid and inhibition of pod cell death in *Phytophthora megakarya* susceptible (SNK10) and tolerant (SNK413) clone was studied by transcriptomic analyse using RT-qPCR. Moreover, a metabolomic analysis of these pods before infection (SNK10 and SNK413) and after infection (SNK10) was performed. From these activities, a formulation named OBF' which is an emulsion having 10.8% Neem oil (Nh), 8.1% aqueous extract of Neem cake (Nea), 8, 1% hydroalcoholic extract of Sida grass (Seth), 4.05% calcium extract of oyster shells (HCa), 1.35% calcium oxide (CaO), 21.6% Tween80 (Tw) and 10% essential oil of Citronella (CEO). At room temperature, the formulation is stable and has micelles of diameter ≤ 14.9 nm, pH 5.2 and conductivity 95.25 mV. The OBF' formulation has a dose-dependent activity on the studied plant pests. Indeed, it totally inhibits the growth of *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* and

Phytophthora megakarya at 1%; reduces their growth from 37.39% to 55.88% when used at 0.1%. This OBF' formulation acts on *Phytophthora megakarya* by inhibiting its protein synthesis by 60% and by inhibiting the activity of ATP-H⁺ pumps. The production of SCA12*SNK16 cocoa seedlings with the 1% (v/v) formulation increases the agronomic parameters. Indeed, it stimulates root development after bean pre-treatment by 62.6% and increases leaf area in seedlings by at least 8.8% in 16 weeks. This increase in morphological parameters is characterized by the increase in protein content and indole acetic acid (IAA) in the roots on day 12 after bean pre-treatment compared to the chemical treatment and the negative control. In addition, it significantly increased protein and total chlorophyll content by 0.9-15% in 16 weeks. Pre-treatment of the leaves of SCA12*SNK16 cocoa plants before inoculation with *phytophthora megakarya* spores reduce the disease severity index by making the plants susceptible to the disease into highly resistant plants with severity indexes of 3.35 and 0.86 respectively. This reduction in disease severity goes with an increase in phenolic compound, flavonoid compounds, and peroxidase, polyphenol-oxidase, and β -1,3-glucanase enzyme activity in the tissue. Furthermore, the pre-treatment of detached cocoa pods susceptible (SNK10) and tolerant (SNK413) to *phytophthora megakarya* makes them resistant and highly resistant respectively with severity indexes of 1 and 0.5 for SNK10 and SNK413 clones. This reduction in disease severity is accompanied by a significant increase in the expression of PR protein genes in SNK413 treated with the OBF' formulation. But this increase is not significant in SNK10. In addition, there is a significant increase in the expression of the B11 defense genes, and the WRKY transcription factor. However, the AOS gene expression is significantly increased only in the SNK10 variety after application of the formulation. In addition, LC-MS/MS metabolomic analysis of SNK10 and SNK413 reveal the presence of 277 compounds, including zeta-carotene, which is a precursor of the reddish pigmentation of the SNK10 clone; ifosamide, which could be a marker of healthy pods; pteroin A which could be a marker of SNK10 clone; Hexose + Hexose-deoxyHexose + C₂₀H₃₂ which could be a marker of SNK413 clone; and Lyalosidic acid, Ormosanin and Ginsenoside Rh3 which could be markers of tolerance of SNK10 and SNK413 pods towards *phytophthora megakarya*. Thus, the application of the OBF' formulation stimulates the defense mechanisms in cocoa trees. These results show that the OBF' formulation is a good candidate in the production of cocoa based on biological substances and allow to pre-immunize this plant against possible attacks in the field and to improve the quality of the seeds.

Key words: Cocoa tree, *Phytophthora megakarya*, biofungicide, defense stimulation, enzymes, RT-qPCR, metabolomic.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abs:	Absorbance
ADNc:	Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire
ANOVA:	<i>Analysis of Variance</i>
ARN:	Acide Ribo Nucléique
BF:	<i>Best Formulation (without essential oil)</i>
BSA:	<i>Bovin Serum Albumin</i>
CaCO ₃ :	Carbonate de calcium
CaO:	Oxyde de calcium
Ca ²⁺ :	Ion calcium
Chit:	Chitinase
Chl a:	Chlorophylle a
Chl b:	Chlorophylle b
CP:	Composés phénoliques
CTAB:	<i>Cetyl trimethyl ammonium bromide</i>
DAMP:	<i>Damage/danger-associated molecular pattern</i>
DEPC:	Diethylpyrocarbonate
ddNTP:	Didésoxyribonucléotides triphosphate
dNTP:	Désoxyribonucléotides triphosphate
CEO:	<i>Citronella Essential oil</i>
EqBSA/mg:	Equivalent BSA/mg
ETI:	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
ETS:	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i>
HE	Huile essentielle
HCa:	Extrait calcique des coquilles d'huîtres
Glu:	Glucanase
LC-MS/MS:	<i>Liquid Chromatography complemented with Mass Spectrometry in tandem</i>
MAMP:	<i>Microbe-Associated Molecular Pattern</i>
MAPkinases:	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MF:	<i>Matière Fraiche</i>
Nea:	Neem extrait aqueux
Nh:	Neem Huile

OBF:	<i>Optimize Best Formulation (without essential oil)</i>
OBF':	<i>Optimize Best Formulation (with essential oil)</i>
PDA:	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PAMP:	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PM:	<i>Phytophthora megakarya</i>
POX:	<i>Peroxydase</i>
PPO:	<i>Polyphenoloxydase</i>
PR protéine:	<i>Proteins Related to pathogenesis</i>
PTI:	<i>PAMP Triggered Immunity</i>
P/V:	Poids par volume
qPCR:	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RLA.:	Résistance locale acquise
RLK:	<i>Receptor-Like protein Kinases</i>
ROS:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSA:	Résistance Systémique Acquise
RSI:	Résistance Systémique Induite
RT-PCR:	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SCa:	Scavina
SDS:	<i>Sodium DodecylSulfate</i>
Seth:	<i>Sida weed hydroalcoholic extract</i>
SNK:	Sélection Nkoemvone
Tc:	<i>Theobroma Cacao</i>
TF:	<i>Transcription Factor</i>
TN:	Témoin Négatif
TNS:	Terre Non Sterile
TP:	Témoin Positif
TS:	Terre Stérile
UE:	Unité Enzymatique
UPA:	Upper Amazonia
UV:	Ultra-Violet
V/V:	Volume par Volume
Δt :	Variation du temps

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques des variétés de cacao cultivées dans le monde.....	6
Tableau II: Les différentes maladies du cacaoyer dans le monde.....	10
Tableau III : Données de l'expérimentation quasi expérimentale.....	47
Tableau IV : Matrice des différents mélanges à partir des émulsions	48
Tableau V : Matrice des mélanges à partir des extraits des plantes	48
Tableau VI : Listes des couples d'amorces utilisées pour la RT-qPCR.....	67
Tableau VII : Influence des extraits sur la stabilité des mixtures de la matrice des mélanges.	74
Tableau VIII : Modèle de stabilité de la matrice des mélanges et ses paramètres.	74
Tableau IX : Influence des extraits sur l'inhibition fongique par les mixtures vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum</i>	76
Tableau X : Modèle de l'inhibition fongique par les mixtures de la matrice des mélanges vis- à-vis de <i>Fusarium oxysporum</i>	76
Tableau XI : Caractéristiques physiques des formulations BF, OBF et OBF'.	78
Tableau XII : Caractéristiques thermodynamiques des formulations BF, OBF et OBF'.	79
Tableau XIII : Effet des formulations BF, OBF et OBF' sur la croissance des champignons pathogènes.....	81
Tableau XIV : Effet des traitements sur les paramètres aériens des plants de cacaoyer à 16 semaines.	88
Tableau XV : Effet des traitements sur les paramètres morphologiques racinaires des plants de cacaoyer à 16 semaines.	88
Tableau XVI : Composés majoritaires communs aux lots de cabosses après analyse LC- MS/MS.	113
Tableau XVII : Composés majoritaires dans les lots de cabosses analysés par LC MS/MS.	114
Tableau XVIII : Les composés identifiés caractéristiques des traitements.....	116

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de Reproduction des <i>Phytophthora megakarya</i> (Mfegue, 2012).	12
Figure 2 : Interaction Oomycète- plante (Legavre et al., 2015).....	14
Figure 3 : Schéma représentant la PTI (<i>PAMP Triggered Immunity</i>). Le signal du pathogène (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Pattern) est reconnu au niveau de la cellule par les PRRs (Pattern Recognition Receptors), ce qui provoque le déclenchement d'une réponse immunitaire de type PTI (Pieterse et al., 2009).	32
Figure 4 : L'évolution du système immunitaire des plantes en réponse à l'adaptation du pouvoir infectieux des agents pathogènes, selon le modèle en zigzag (Jones et Dangl, 2006).	34
Figure 5 : Stabilité du premier groupe de l'étape quasi expérimentale de formulation en 48 h. A: stabilité dans le temps du premier groupe de l'étape quasi expérimentale de formulation; B: Stabilité à T=48 h du premier groupe de l'étape quasi expérimentale de formulation. No= huile de neem.	71
Figure 6 : Stabilité du deuxième et troisième groupe de l'étape de formulation quasi expérimentale. A: stabilité des essais de mélanges en absence de Se ; B: stabilité des essais de mélanges en absence de Ne. 1X, 6X, 8X, 1Y, 6Y, 8Y sont les codes des essais d'émulsions.	72
Figure 7 : Stabilité des mixtures de la matrice de mélange à quatre facteurs simplex-lattice design, 1C, 8X, 8Y, et 9C sont les émulsions utilisées comme facteurs pour obtenir les mixtures; A: Stabilité des mixtures; B: Comportement des facteurs dans le model linéaire. 73	73
Figure 8 : Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique de <i>Fusarium oxysporum</i> par les mixtures (20%) de la matrice de mélange à quatre facteurs simplex-lattice design. 1C, 8X, 8Y, et 9C sont les facteurs des mixtures. A : Inhibition de la croissance fongique de <i>Fusarium oxysporum</i> ; par les mixtures; B : Comportement des facteurs dans le model linéaire d'inhibition.	75
Figure 9 : Effet de l'oxyde de calcium (CaO) sur le pH (A) et la Conductivité (B) de la formulation BF.	78
Figure 10 : Mode d'action de la formulation OBF' vis-à-vis de <i>Phytophthora megakarya</i> : effet sur l'intégrité de la membrane de l'agent pathogène (A); effet sur la synthèse des protéines par le pathogène (B); effet sur les pompes ATPase-H ⁺ de l'agent pathogène (C). 83	83

Figure 11 : Phytotolérance de la formulation OBF' par les plants de cacaoyer après application foliaire sur des feuilles à différent stade de développement: effet sur les feuilles détachées au stade C de développement (A); effet sur les feuilles non détachées (B).....	85
Figure 12 : Effet de la formulation OBF' sur la germination (A) et de la levée (B) des fèves de cacao.	86
Figure 13 : Effet de la formulation OBF' sur la longueur des racines (A) et le nombre de racines secondaires (B) en 12 jours.....	87
Figure 14 : Effet de la formulation OBF' sur la teneur en (A) Acide Indole Acétique (AIA) et en (B) protéines racinaires au 12 ^{ème} jour.	89
Figure 15: Effet du traitement sur la teneur en chlorophylles dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16 ^{ème} semaine.....	90
Figure 16: Effet du traitement sur la teneur en protéines dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16 ^{ème} semaine.....	90
Figure 17: Effet du traitement sur la teneur en chlorophylle dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16 ^{ème} semaine.....	91
Figure 18: Effet du traitement sur l'activité des peroxydases dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16 ^{ème} semaine.....	92
Figure 19: Effet du traitement OBF' la teneur en sucres solubles dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16 ^{ème} semaine.....	92
Figure 20: Effet de la formulation OBF' sur l'index de sévérité à <i>P. megakarya</i> des feuilles détachées de cacaoyer.	93
Figure 21: Effet de la formulation OBF' sur la teneur en composés phénoliques avant et après inoculation des feuilles des plants de cacaoyer.	94
Figure 22: Effet de la formulation OBF' sur la teneur en flavonoïdes avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités.	95
Figure 23: Variation de la teneur en protéines avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.	96
Figure 24: Variation de l'activité de la β -1,3-glucanases avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.	97
Figure 25: Variation de l'activité des Peroxydases avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.	98
Figure 26: Variation de l'activité des polyphénol-oxydases avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.	99

Figure 27: Variation de l'index de sévérité à la pourriture brune causée par <i>P. megakarya</i> sur les cabosses de cacaoyer détachées des clones SNK10 et SNK413.....	100
Figure 28: Variation du rapport 260/280 des ARN totales obtenus des cabosses après extraction utilisant différents protocoles à base de CTAB.....	101
Figure 29: Variation du rapport 260/230 des ARN totales obtenues des cabosses après extraction utilisant différents protocoles à base de CTAB.....	102
Figure 30: Variation de la quantité d'ARN totales obtenues des cabosses après extraction utilisant différents protocoles à base de CTAB.....	102
Figure 31: Variation de l'expression relative du gène endo-1,3-beta-glucosidase (PR2) avant et après infection des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	104
Figure 32: Variation de l'expression relative du gène pathogenesis-related protein 1-like (PR1) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	104
Figure 33: Variation de l'expression relative du gène pathogenesis-related protein 4 (PR4) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	105
Figure 34: Variation de l'expression relative du gène endochitinase EP3 (PR8) avant et après infection des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	106
Figure 35: Variation de l'expression relative du gène allèle oxyde synthase 1 (TcAOS) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	107
Figure 36: Variation de l'expression relative du gène allèle oxyde cyclase 4 (TcAOC4) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	108
Figure 37: Variation de l'expression relative du gène Bax-inhibitor-1 (BI1) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	109
Figure 38: Variation de l'expression relative du facteur de transcription WRKY 70 (TcWRKY TF70 LOC18602206) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.....	110

Figure 39: Variation de l'expression relative du facteur de transcription WRKY 70 (TcWRKY TF70 LOC18587501) avant et après infection des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'	111
Figure 40 : Nombre de composés détecté par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).	112
Figure 41 : métabolites non volatils majoritaires communs aux différents lots de cabosses.	113
Figure 42 : Nombre de métabolites non volatiles identifiés qui caractérisent des différents traitements.	115

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Plant de cacaoyer du groupe Trinitario (Photo Foka, 2022).....	7
Photo 2 : Plant de cacaoyer sévèrement attaqué par <i>Phytophthora megakarya</i> (Photo Foka, 2021).....	10
Photo 3 : Prolifération de <i>P. Megakarya</i> sur une cabosse de cacao: cabosse saine inoculée de spores (A); développement de la nécrose cinq jours après inoculation (B); huit jours après infection, recouvrement complet de la cabosse par la nécrose (C); quatorze jours après infection, momification de la cabosse (D) (Photo Foka, 2017).	13
Photo 4 : Arbre de neem à Yaoundé (Photo Foka, 2022).....	18
Photo 5 : Plant d'herbe sida âgé de 4 mois (Photo Foka, 2022).	21
Photo 6 : Culture de citronnelle (Photo Foka, 2019).....	23
Photo 7 : Coquilles d'huîtres (Photo Foka, 2019).....	27
Photo 8 : Fruits de cacao ; A : fruits mûrs de SCA12xSNK16 ; B : chérelles de 8 semaines de SNK10 ; C : chérelles de 8 semaines de SNK413 (Photo Foka, 2019).....	41
Photo 9 : Graines de neem sèches ou en germination ? (Photo Foka, 2018).	41
Photo 10 : Plant d'herbe sida âgé de 4 mois (Photo Foka, 2022).....	42
Photo 11 : Pieds de citronnelle en champ (Photo Foka, 2019).	42
Photo 12 : Coquilles d'huître broyées grossièrement (Photo Foka, 2019).....	43
Photo 13 : Matériel fongique : (A) <i>Phytophthora megakarya</i> , (B) <i>Fusarium oxysporum</i> , (C) <i>Pythium myriotylum</i> , (D) <i>Phytophthora infestans</i> (Photo Foka, 2017).....	43
Photo 14 : Dommages sur les feuilles détachées au stade C : (A) pas de changement ; (B) Décoloration ; (C) Brulure. (Photo Foka, 2017).	52
Photo 15 : Dommages sur les feuilles non-détachées : (A) pas de changement ; (B) Brulure ; (C) déformation et décoloration; (D) Décoloration. (Photo Foka, 2017).....	53
Photo 16 : Traitement des fèves et suivi de l'émergence des radicules <i>in vitro</i> : (A) ecabossage ; (B) fèves demucilaginées ; (C) fèves tramées ; (D) fèves germées ayant quatorze jours. (Photo Foka, 2017).	54
Photo 17 : Suivi de la levée des plantules dans les substrats terre plus sable (2/3) stérile et non stérile : (A) fèves non levées ; (B) fèves levées. (Photo Foka, 2017).	55
Photo 18 : Effet des traitements sur la sévérité de l'inoculation à <i>P. megakarya</i> I : (A) feuille saine du témoin négatif non inoculé, (B) feuille avec la nécrose au point d'infection en forme de marbre du témoin négatif inoculé ; (C) Feuille avec des points de pénétration des spores fongiques de l'essai inoculé. (Photo Foka, 2017).	60

Photo 19 : Chérelles de cacao SNK 10 (A) et SNK413 (B) nettoyées. (Photo Foka, 2017)..64

Photo 20 : Effet des traitements sur les feuilles détachées au stade C de développement. A: OBF' à 10%, 1 mL/60 cm²; B: OBF' à 1%, 1 mL/60 cm²; C: OBF' à 1%, 0,2 mL/60 cm² ; D : TN (Photo Foka, 2019).....84

Photo 21 : Electrophorèse des ARN totales obtenue grâce à la méthode 7 et des produits de qPCR du gène de référence *acylporteur protéine*: (A) image du gel d'électrophorèse des ARN totales, (B) image du gel d'électrophorèse des produits de qPCR des ARNm , (C) image de l'amplification du gène de référence en utilisant les ADNc, (D) pic d'ébullition du gène amplifié par qPCR en utilisant les ADNc. 103

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des solutions	a
Annexe 2 : Préparation du milieu de culture.....	b
Annexe 3 : Courbes d'étalonnages	c
Annexe 4 : Traitement du sol	e
Annexe 6 : Courbes d'amplification et de fusion (<i>Melting curve</i>) des gènes par RT-qPCR ...	f
Annexe 7 : Etiquettes des biopesticides OBF ' et OBF	j
Annexe 8 : Liste des Publications issues de la thèse.....	k

I. REVUE DE LITTÉRATURE

INTRODUCTION GENERALE

L'agriculture durable contribue à la réduction des problèmes sanitaires, d'insécurité alimentaire et occupe une place importante dans le développement des économies nationales. Au Cameroun, les activités de ce secteur sont dominées par les innovations technologiques sur toute la chaîne de valeur agricole en promouvant la production durable des cultures de rente à l'instar du cacao.

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante pérenne originaire des forêts intertropicales humides d'Amérique du Sud, précisément des forêts méso-américaines et du bassin Amazonien (De Almeida et Valle, 2007). C'est une plante importante pour les pays consommateurs et producteurs. A ce jour, 5 à 6 millions de petits cultivateurs dans le monde travaillent dans des plantations de cacaoyer et font vivre environ 40 à 50 millions de personnes (Hütz-Adams et al., 2016). En effet, la production mondiale de cacao est estimée actuellement à 4,449 millions de tonnes dont 71,2% proviennent de l'Afrique. Le Cameroun occupe la quatrième place (après la Côte d'Ivoire, le Ghana et l'Équateur) avec une production de 300 000 tonnes en 2023 d'après l'*International cocoa organization* (ICCO, 2024). Sur le territoire, cette production représente plus de 18% des exportations totales et plus de 34% des exportations du secteur primaire, ce qui permet d'alléger la balance des échanges commerciaux du pays qui est déficitaire (Institut National De La Statistique, 2021). La chaîne de valeur semencière du cacao est une niche d'opportunité car elle est fortement déséquilibrée avec une offre annuelle moyenne de 5 à 6 millions de plants pour une demande de près de 20 millions de plants (Essingan, 2019).

Malgré l'importance du cacao, sa production fait face à plusieurs problèmes parmi lesquels la pourriture brune des cabosses causée par *Phytophthora megakarya* (Ondobo et al., 2013) et l'indisponibilité tant quantitative que qualitative des plantules (Essian, 2019). *Phytophthora megakarya* entraîne des pertes les plus importantes (50 à 80% de pertes) dans la culture du cacao à travers la pourriture brune qu'il provoque en champ et en pépinière (Ondobo et al., 2013). L'Oomycète *Phytophthora megakarya* est tellurique et le sol est le foyer d'infection primaire de *P. megakarya*. Ce dernier constitue un véritable vecteur d'infection des plants en pépinière ainsi que des cabosses en champ (Mfegue, 2012). Par ailleurs, au niveau des unités de production de plantules de cacaoyer, les terres de remplissage généralement utilisées

sont non stériles ou pas assainies. Ces terres sont très souvent prélevées dans les zones contaminées par *P. megakarya* et constituent ainsi des vecteurs de dissémination de *P. megakarya* au niveau des pépinières (Mfegue, 2012). Bien que les symptômes de la pourriture brune du cacaoyer et l'agent pathogène *P. megakarya* ont été bien caractérisés (Ali et al., 2017; Boudjeko et al., 2007; Simo et al., 2014), les connaissances liées aux mesures de contrôle de la pourriture brune du cacaoyer sont encore insuffisantes. En plus, aucune variété résistante de cacao n'a été jusqu'à présent développée.

Pour remédier aux pertes occasionnées par *P. megakarya* sur la cacaoculture la méthode de lutte chimique basée sur l'amendement des sols et/ou la vaporisation foliaire avec les fongicides chimiques de synthèse est la plus utilisée et la plus vulgarisée. Toutefois, leurs effets néfastes sur la santé des agriculteurs et sur l'environnement ne sont plus à démontrer. Il s'agit entre autres de leur effet indésirable sur l'écosystème et la santé des consommateurs (Alengebawy et al., 2021). La recherche s'oriente donc vers des stratégies de lutte basées sur un concept de durabilité impliquant l'utilisation des organismes vivants et/ou de leur dérivé qui sont biodégradables. Ainsi, pour remédier aux problèmes résultant de l'utilisation des pesticides de synthèse (Conway et al., 1988; Jamiołkowska, 2020; Stael et al., 2012; Téné et al., 2019), les biopesticides à base des microorganismes, de plantes pesticides et les éliciteurs se présentent comme une alternative prometteuse dans le contexte de l'Afrique (Tagne et al., 2018; Yarou et al., 2017; Ewané et al., 2020a).

Des études réalisées au Cameroun mettent en exergue les capacités de plusieurs stratégies susceptibles d'être utilisées dans un schéma de lutte biologique dans le contrôle de la pourriture brune du cacaoyer. Ainsi le traitement du sol avec la souche *Streptomyces cameroonensis* réduit significativement l'incidence de la pourriture brune chez les plants de cacaoyers et stimule la croissance ainsi que la synthèse accrue des marqueurs biochimiques de résistances (Dzelamonyuy et al., 2022). Par ailleurs, les souches des champignons tel que *Trichoderma asperellum* ont montré des activités antagonistes *in vivo* vis-à-vis de *P. megakarya* chez le cacaoyer en pépinière (Tchameni et al., 2017). Outre ces microorganismes, les extraits des plantes présentent un important potentiel dans le contrôle des maladies phytopathogènes (Ewané et al., 2019; Ewané et al., 2020a). De nombreuses plantes de la flore africaine disposent d'un énorme potentiel biocide sur des gammes de bioagresseurs. Au Cameroun, une trentaine de plantes ont été répertoriées (Tagne et al., 2018). Plusieurs travaux mettent en exergue l'implication des plantes pesticides dans le contrôle de plusieurs maladies parmi lesquels la pourriture brune du cacaoyer (Harni et al., 2020; Pohe et Agneroh, 2013). Par ailleurs, diverses

espèces de plantes pesticides peuvent être utilisées comme extraits de plantes ou en association pour le contrôle des bioagresseurs à l'instar du neem (Pohe et Agneroh, 2013; Shaila et al., 2016), de l'herbe sida (Damintoti et al., 2007; Nisha et al., 2017) et de la citronnelle (Fouelefack et al., 2024; Harni et al., 2020; Nguefack et al., 2013; Yarou et al., 2017).

En dehors des extraits de plantes, des travaux récents montrent que l'amendement du sol au chitosane et coquilles d'huîtres réduites pré-immunise les plantules de cacaoyer contre la pourriture brune des cabosses et réduit la sévérité de la maladie à *P. megakarya* (Arfaoui et al., 2016; Rab et al., 2017; Téné et al., 2017; Téné et al., 2019). Elle stimule la synthèse accrue des composés phénoliques tout comme le prétraitement foliaire des plants de tomate, de soja et de bananier favorise leur croissance et augmente l'expression de leurs gènes de défense (Arfaoui et al., 2016; Rab et al., 2017; Téné et al., 2017; Téné et al., 2019; Ewané et al., 2019).

Questions de recherche

- La formulation à base des extraits de Neem, de l'herbe Sida, de Citronnelle et de coquille d'huître possède-t-elle un effet fongicide sur *Phytophthora megakarya*, un des microorganismes responsables de la pourriture brune du cacaoyer ?
- La bioformulation à base des extraits de Neem, de l'herbe Sida, de Citronnelle et de coquilles d'huître permet-elle l'obtention des plantules de cacaoyers robustes vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* ?
- Le biofongicide à base des extraits de Neem, de l'herbe Sida, de Citronnelle et de coquilles d'huître induit-il l'expression précoce des gènes de défenses et des phytoalexines chez les fruits de cacaoyer ?

Hypothèses de recherche

- La formulation à base des extraits de Neem, de l'herbe Sida, de Citronnelle et de coquille d'huître ne possède pas un effet fongicide sur *Phytophthora megakarya*.
- La bioformulation à base des extraits de Neem, de l'herbe Sida, de Citronnelle et de coquilles d'huître ne permet-pas d'obtention des plantules de cacaoyers robustes vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*.
- Le biofongicide à base des extraits de Neem, de l'herbe Sida, de Citronnelle et de coquilles d'huître n'induit pas l'expression précoce des gènes de défenses et les phytoalexines chez les fruits de cacaoyer.

Objectif général

Dans l'optique de contribuer à la lutte contre l'agent pathogène *Phytophthora megakarya* responsable de la pourriture brune du cacaoyer par un moyen plus respectueux de l'environnement, le présent travail vise à formuler un biofongicide à base de neem, de l'herbe sida, de la citronnelle et des coquilles d'huître et d'évaluer son effet protecteur, stimulateur de croissance et du système de défense du cacaoyer traité avec une formulation.

Objectifs spécifiques

- formuler un biofongicide à base d'extraits de neem (huile, extrait aqueux), de sida (extrait hydro alcoolique), de citronnelle (huile essentielle) et d'extrait calcique des coquilles d'huître pour la protection du cacaoyer contre *Phytophthora megakarya* ;
- déterminer l'effet de la bioformulation sur la production des croissances et la résistance des plantules de cacaoyer SCA12*SNK16 vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* en serre ;
- déterminer l'effet de la bioformulation sur la résistance du péricarpe des fruits de cacaoyer détachés vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* à l'échelle transcriptomique et métabolomique en utilisant les clones SNK10 (sensible) et SNK413 (tolérant).

I.1. Généralités sur le cacao

I.1.1. Origine et distribution

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante pérenne originaire des forêts intertropicales humides d'Amérique du Sud, précisément des forêts méso-américaines et du bassin Amazonien (De Almeida et Valle, 2007). La domestication du cacaoyer a été faite par les Mayas et les Aztèques pour leurs fèves destinées à des usages multiples (monnaie d'échange, boisson reconstituante). Pour les Mayas, le chocolat était une boisson au cacao préparée avec de l'eau chaude et souvent aromatisée à la cannelle et au poivre. On l'appelait la "nourriture des dieux". Ensuite, les conquistadors arrivèrent en Amérique et exportaient les fèves vers l'Europe (Verna, 2013).

Le cacao est apparu en Europe en 1528, grâce au conquistador espagnol, faisant connaître les grands effets de la boisson préparée à partir des fèves (Montagna et al., 2019). Grâce à l'expansion rapide du commerce Européen, la culture du cacao s'est progressivement orientée des îles des Caraïbes, du Venezuela et de la Colombie vers le Sud en passant par l'Inde Orientale. Par ailleurs, au début du XIXe siècle, une série d'introductions a été réalisée par les Anglais au Sri Lanka à partir de Trinidad, par les Hollandais à Java et par les Allemands en Papouasie-Nouvelle-Guinée à partir de plusieurs régions d'Amérique Latine (Domori, 2015). C'est ainsi qu'avec la colonisation allemande, les premières cabosses entrent au Cameroun en 1892 et la culture du cacaoyer est initiée dans le pays.

I.1.2. Taxonomie et diversité génétique

La classification du cacaoyer est la suivante (Whitlock et al., 2001) :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Division :	Magnoliophytes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Malvales
Famille :	Malvaceae
Genre :	Theobroma
Espèce :	<i>Theobroma cacao</i> L.

Theobroma cacao L. est une espèce diploïde ($2n=20$) et son génome contient 430 millions de paires de bases. Il existe plusieurs variétés de cacaoyer souvent classifiées en trois grands groupes génétiques ou variétés, sur la base de leur morphologie et de leur origine. Ces

variétés qui sont Criollo, Forastero et Trinitario (Photo 1; Tableau I), ne reflètent plus actuellement la vraie dimension structurelle et la diversité génétique de cette espèce (Bartley, 2005).

Tableau I: Caractéristiques des variétés de cacao cultivées dans le monde.

Éléments de comparaison	Criollo	Forastero	Trinitario	Référence
Taux de production mondial	3% et précisément 0,001% ayant plus de 90% de pureté	92%	5%	Domori, 2015
Sensibilité aux maladies	Sensible	Tolérant	De Tolérant à sensible	ICCO, 2013
Nature de la Cabosse	Verte, allongée et pointue ; ensuite, jaune-orangée ou rougeâtre à maturité	Verte, ovoïde et lisse ; ensuite jaune à maturité	Verte ou rouge et ovale ou allongée ; ensuite, jaune ou rouge à maturité	ICCO, 2013; Domori, 2015
Nature du cotylédon frais	Blanc ou rosé et arôme très prononcé (fin) après fermentation et séchage	Violet et arôme peu prononcé (bulk) après fermentation et séchage	Violet arôme très prononcé (fin) après fermentation et séchage	ICCO, 2013; Domori, 2015

Au Cameroun, les Forastero et les Trinitario constituent les groupes les plus représentatifs avec environ 80 clones dont on peut citer :

- Les SNK (sélection de Nkoemvone) du groupe Trinitario;
- Les ICS (sélection de l'impérial College de Trinidad) du groupe Trinitario ;
- Les UF (sélection d'United Fruit) de Costa Rica du groupe Trinitario ;
- Les UPA (Upper Amazonia) du groupe de Forastero (Domori, 2015).

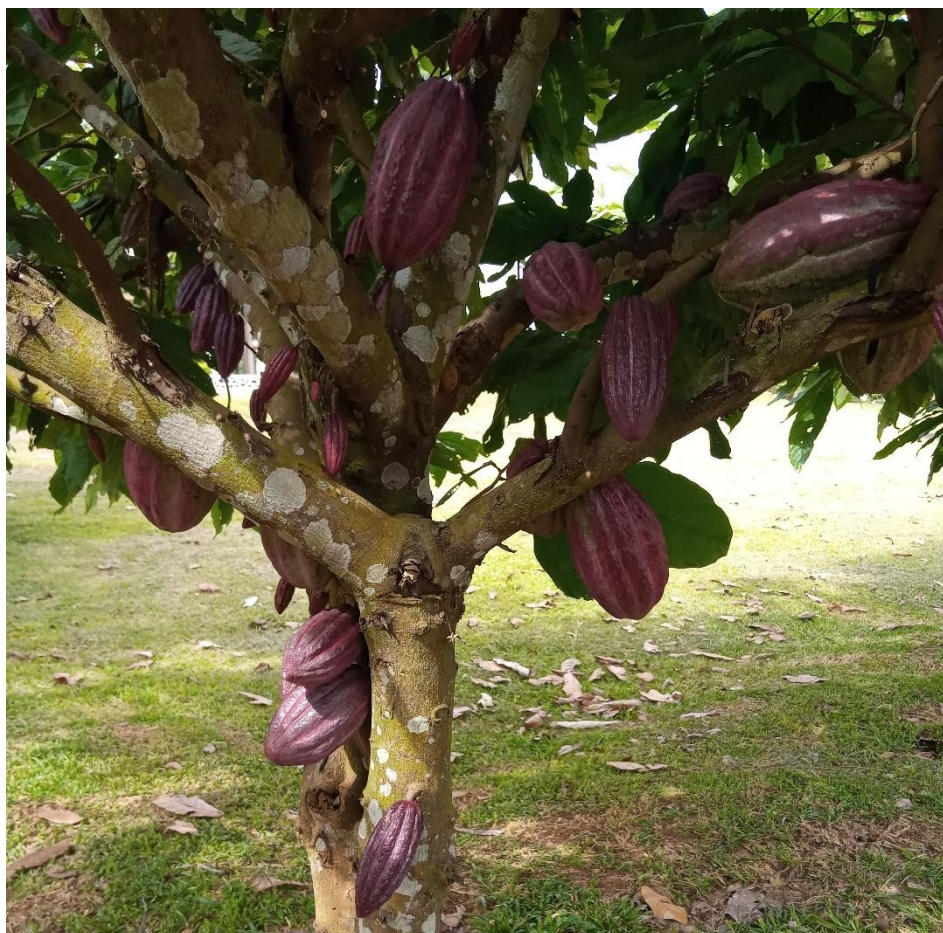


Photo 1: Plant de cacaoyer du groupe Trinitario (Photo Foka, 2022).

I.1.3. Botanique

Les plants de cacao réagissent bien aux températures relativement élevées (avec un maximum annuel de 30-32 °C et minimale de 18-21 °C), et une humidité relative généralement élevée, atteignant souvent 100 % pendant la journée et 70 à 80 % la nuit (Jagoret, 2011). L'habitat naturel du cacaoyer est la zone forestière pluviale tropicale. Toutes les espèces de cacao se rencontrent entre le 18° N et le 15° S parallèle, régions dans lesquelles les pluies sont intenses, la température et l'humidité sont élevées et l'ombre est dense (Domori, 2015).

La partie aérienne du cacaoyer se constitue à partir du tronc qui se développe d'abord en un axe vertical et la croissance en hauteur s'effectue par des poussées successives jusqu'à l'âge de 18 mois environ. La hauteur du cacaoyer est de 4 à 25 m (Jagoret, 2011).

Theobroma cacao est cauliflore, les inflorescences apparaissent sur des coussinets floraux, qui sont des renflements du tronc ou des branches (Swanson et *al.*, 2008). Les fleurs

de petite taille sont hermaphrodites. La fécondation est surtout croisée et la pollinisation est assurée par les insectes.

La fécondation d'une fleur de cacaoyer donne lieu à la formation du fruit du cacaoyer appelé chérelle. Les chérelles croissent puis deviennent des cabosses, toutefois, près de 90% d'entre elles peuvent également disparaître comme les fleurs avant l'âge de trois mois. Les cabosses atteignent la maturité 5 à 7 mois après la floraison selon les variétés. La cabosse est reliée à la plante par un pédoncule ligneux de 2 cm de long environ, sa forme et ses dimensions varient selon la variété de cacaoyer. Le fruit du cacaoyer est une baie indéhiscente et volumineuse, il peut contenir en moyenne 15 à 50 graines ou fèves de cacao enveloppées d'une pulpe mucilagineuse épaisse sucrée et acidulée, serrées les unes contre les autres en cinq rangées groupées autour du placenta central. C'est en partie grâce à ses fèves que le cacao a acquis sa renommée (Swanson et *al.*, 2008).

I.1.4. Importance

La culture du cacaoyer est destinée à l'industrie alimentaire (confiserie, pâtisserie, biscuiterie et principalement chocolaterie) et dans une moindre mesure aux industries cosmétique et pharmaceutique. La production de cacao est répartie entre les pays tropicaux d'Afrique, d'Asie, d'Océanie et d'Amérique latine. Au Cameroun, la production mobilise 600000 producteurs dispersés sur une superficie d'environ 400000 hectares principalement dans les régions du Sud-Ouest, Centre, Sud et l'Est du pays (Langrand, 2013).

La production mondiale de cacao est estimée actuellement à 4,449 millions de tonnes dont 71,2% proviennent de l'Afrique. Le premier pays producteur mondial de cacao est la Côte d'Ivoire avec une production de 1,8 millions de tonnes en 2023. Le Cameroun occupe la quatrième place (après la Côte d'Ivoire, le Ghana et l'Equateur) avec une production de 300000 tonnes en 2023 (ICCO, 2024), dont 80% de cette production est assurée par les petits planteurs. L'Accord de partenariat économique (Libre Échange) entre le Cameroun et UE pourrait contribuer à améliorer ou à empirer la balance commerciale du pays parce que le cacao représente plus de 18% des exportations et plus de 34% des exportations du secteur primaire, ce qui permet d'alléger la balance des échanges commerciaux du pays qui est déficitaire (Institut National De La Statistique, 2021).

L'agriculture biologique est un système de gestion de la production qui favorise la santé de l'agrosystème, y compris la biodiversité, les cycles biologiques et les activités biologiques des sols. Le cacao biologique est vendu plus cher que le cacao conventionnel. La demande de produits à base de cacao biologique est également en expansion, car les consommateurs sont de plus en plus préoccupés par la sécurité alimentaire et d'autres questions environnementales. Cependant, le marché du cacao biologique représente encore une très petite part du marché total du cacao, estimé à environ 3,5% de la production totale dans le monde et le Cameroun est l'un des faibles producteurs de ce dernier (AgenceBIO, 2021). Par ailleurs, en 2016 la production du Cameroun a été de 250000 tonnes, le pays a projeté atteindre 600 000 tonnes en 2020. Malgré les efforts du gouvernement pour atteindre ces objectifs, 300 000 tonnes de cacao ont été produits en 2023 (ICCO, 2024). Le déficit observé s'explique par les nombreuses contraintes de la cacaoculture.

I.2. Contraintes liées à la culture du cacao

La culture du cacaoyer est confrontée à de nombreuses contraintes qui entravent sa productivité telles que le vieillissement des vergers, les mauvaises pratiques culturales, l'insuffisance en qualité et en quantité de plantules productrices, le dérèglement climatique et surtout la forte pression parasitaire (Tableau II).

La semence est le premier maillon dans la chaîne de culture du cacaoyer. Le marché du matériel végétal de cacaoyer au Cameroun est un marché fort déséquilibré avec une offre annuelle et actuelle de 5 à 6 millions de plants pour une demande de près de 20 millions de plants. Ce déséquilibre est dû à la baisse de l'offre en matériel végétal au niveau des champs semenciers qui fournissent moins de 85 000 cabosses par an (Essingan, 2019). A cet effet les exploitants agricoles utilisent des plantules ayant des origines douteuses. De plus, les plantules à plant généralement obtenues sont produites avec les terres de remplissages parfois prélevées dans les zones contaminées par les agents pathogènes telluriques entraînant ainsi l'obtention des plantules de très mauvaises qualité (Ten Hoopen et Krauss, 2016).

Les pertes dues aux diverses maladies et ravageurs touchent environ 40% de la production mondiale et le cacaoyer est une plante particulièrement sensible aux maladies et ravageurs au cours de son développement (Ambang et *al.*, 2019; Coulibaly et *al.*, 2013; Ploetz, 2007).

Tableau II: Les différentes maladies du cacaoyer dans le monde.

Maladies	Agents pathogènes	Zones géographique
Cocoa swollen shoot	Swollen shoot virus transmis par les cochenilles	Afrique de l'Ouest
Balai de sorcière	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Caraïbes et Amérique du Sud
Moniliose	<i>Moniliophthora roreri</i>	Caraïbes et Amérique du Sud
Pourriture brune	<i>Phytophthora</i> spp.	Tous les pays producteurs
Chancre	Piqueur-suceurs (mirides et cochenilles)	Tous les pays producteurs
Die-back	Co-parasitisme champignons et mirides	Tous les pays producteurs

De ces agents pathogènes susmentionnés, celui qui retient notre attention est la pourriture brune, provoquée par *Phytophthora* sp., qui peut être favorisée par les piqûres d'insectes tel que les mirides.

I.2.1. La pourriture brune des cabosses de cacaoyer

Quatre principales espèces de *Phytophthora* sont reconnues responsables de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer. Il s'agit de *P. palmivora*, de *P. capsici*, de *P. citrophthora* et de *P. megakarya*). En Afrique, deux de ces espèces sont responsables de cette maladie (*P. palmivora* et *P. megakarya*). Au Cameroun, c'est *Phytophthora megakarya* qui est le plus représentatif et entraîne des pertes les plus importantes (50 à 80% de pertes) dans la culture du cacao à travers la pourriture brune (Photo 2) qu'il provoque (Ondobo et al., 2013).



Photo 2 : Plant de cacaoyer sévèrement attaqué par *Phytophthora megakarya* (Photo Foka, 2021).

I.2.2. L'oomycète *Phytophthora megakarya*

I.2.2.1. Origine, taxonomie et biologie de l'oomycète *Phytophthora megakarya*

L'Oomycète *Phytophthora megakarya* a été identifié et décrit pour la première fois au Nigeria par Brasier et Griffin en 1979 et serait venu d'un arbre hôte de la forêt locale avant d'atteindre le cacaoyer (Mfegue, 2012).

Les Oomycètes sont des organismes à croissance mycélienne, aquatiques et non chlorophyllien à l'instar du genre *Phytophthora*. Contrairement aux autres mycètes, ils ont une paroi riche en chitines, en glucanes et en celluloses (Ali et *al.*, 2017; Mfegue, 2012). Les *Phytophthora* comme *P. megakarya* sont des organismes à structure végétative diploïde pouvant se multiplier par voie sexuée ou asexuée. Il résulte de la reproduction asexuée (la plus fréquente dans les conditions naturel) les zoospores qui sont très pathogéniques (Nyassé et *al.*, 1995). Pendant les conditions favorables, la prolifération des sporanges est suivie par la libération des zoospores qui se déplacent dans l'eau par chimiotactisme vers les organes cibles durant une période variant de quelques minutes à quelques heures (en fonction des conditions climatiques) ou pendant une période plus longue par le vent et les insectes. Une fois sur le tissu cible, les zoospores s'enkystent et 30 minutes après, la germination commence et l'hyphe pénètre le tissu hôte en 48 heures dans des conditions favorables; ceci marque le point d'origine du parasitisme (Figure 1). Au cours de la reproduction sexuée, il se produit une fusion entre une anthéridie (gamète male) et une oogone (gamète femelle) conduisant aux oospores sphériques à parois épaisses. La multiplication sexuée permettrait la reproduction intraspécifique (Mfegue, 2012).

La taxonomie de *Phytophthora megakarya* décrite par Newhook et *al.* 1978) est la suivante :

Domaine :	Eucaryote
Règne :	Chromistae
Embranchement :	Thallophyte
Classe :	Oomycètes
Ordre :	Péronosporales
Famille :	Pythiaceae
Genre :	<i>Phytophthora</i>
Espèce :	<i>Phytophthora megakarya</i>

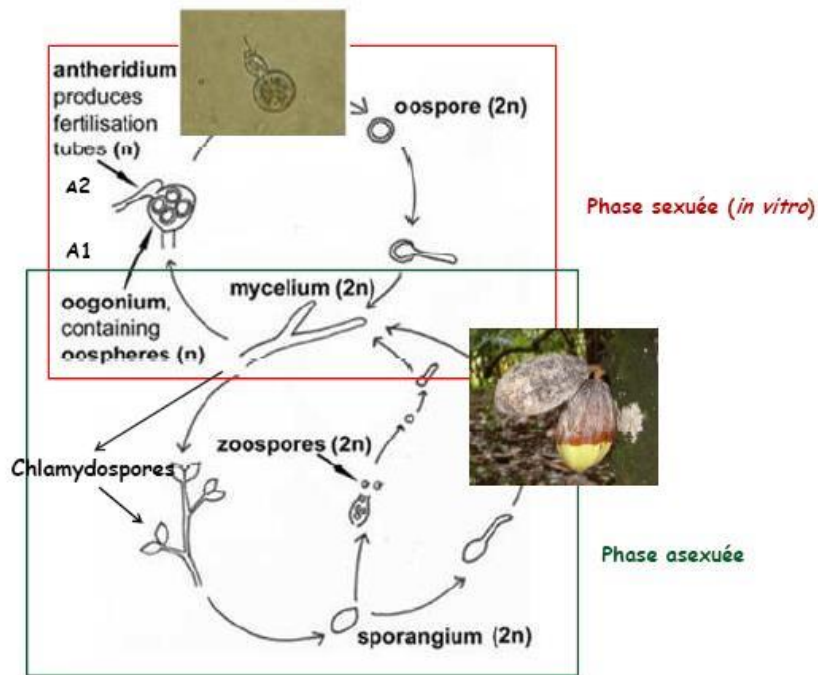


Figure 1 : Cycle de Reproduction des *Phytophthora megakarya* (Mfegue, 2012).

L'encadré vert représente la phase asexuée. La photographie montre des sporocystes (blanchâtres) couvrant les taches brunes à la surface des cabosses infectées. L'encadré rouge représente la phase sexuée du cycle. La photographie montre une oospore (Mfegue, 2012).

Un total de 12 plantations, établies en 2006 sur des terres exemptes de culture de cacaoyer depuis au moins 20 ans, ont été suivies de près sur une base hebdomadaire depuis juin 2009 par Aguilar et *al.* (2012). Vers la fin de 2009, les premières infections ont été observées dans trois plantations, avec une augmentation lente mais progressive du nombre de plantations, d'arbres et de cabosses affectés en 2010 et 2011. Les distributions spatiales et temporelles des infections semblent indiquer que de multiples introductions de *P. megakarya* ont eu lieu et que la dispersion par les humains joue un rôle important. De plus, la distribution spatiale n'est pas seulement une fonction du ou des mécanismes de dispersion mais dépend aussi d'autres facteurs tels que le microclimat et le génotype du cacaoyer (Aguilar et *al.*, 2012) mais aussi l'agroforesterie (Ambang et *al.*, 2019).

I.2.2.2. Parasitisme

L'infection du cacaoyer par *Phytophthora megakarya* se déroule en trois étapes (Legavre et *al.*, 2015). A la suite du contact avec la plante notamment la cabosse (Photo 3A), les zoospores émettent des tubes germinatifs qui traversent l'épiderme de façon passive (à travers les ouvertures naturelles) ou de manière active (lyse de la paroi cellulaire épidermique

grâce à l'action des hydrolases fongiques). La maladie commence par une petite tache marron-chocolat sur les cabosses ou taches nécrotiques à la surface de l'épiderme (sur le tronc, on a l'apparition d'un chancre sur l'écorce et d'une tache sur le bois) caractérisant l'invasion de la plante par le parasite (Photo 3B). En quelques jours, cette tache devient foncée et s'étend sur toute la cabosse (Photo 3C). En l'espace de 14 jours, la cabosse peut devenir complètement noire (Photo 3D). La surface de la cabosse se couvre aussi de moisissure jaune-blanc, semblable à la poudre de craie. Cette « poudre » est formée de milliers et même de millions de minuscules sporanges contenant les spores qui sont les germes de la maladie (Legavre et *al.*, 2015). La colonisation de l'hôte par *Phytophthora* est favorisée par des lésions infligées en partie par les ravageurs.



Photo 3 : Prolifération de *P. Megakarya* sur une cabosse de cacao: cabosse saine inoculée de spores (A); développement de la nécrose cinq jours après inoculation (B); huit jours après infection, recouvrement complet de la cabosse par la nécrose (C); quatorze jours après infection, momification de la cabosse (D) (Photo Foka, 2017).

Au cours de ce parasitisme, les *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (PAMP) de *P. megakarya* sont reconnus par les récepteurs des protéines kinases ('*Receptor-Like protein Kinases* : RLK') de la plante. Cette interaction *P. megakarya*-RLK va induire l'activation des voies de défense du cacaoyer. La cascade de signalisation est régulée par l'activité des phytohormones telles que l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'éthylène, l'acide gibbéréllique et l'auxine (Figure 2). Par ailleurs ces gènes précédemment exprimés codent pour le développement et la mobilisation de l'arsenal de substances défensives de la plante à l'instar des substances de défenses préexistantes (phytoanticipines), les phytoalexines et les protéines reliés à la pathogénèse (Legavre et *al.*, 2015).

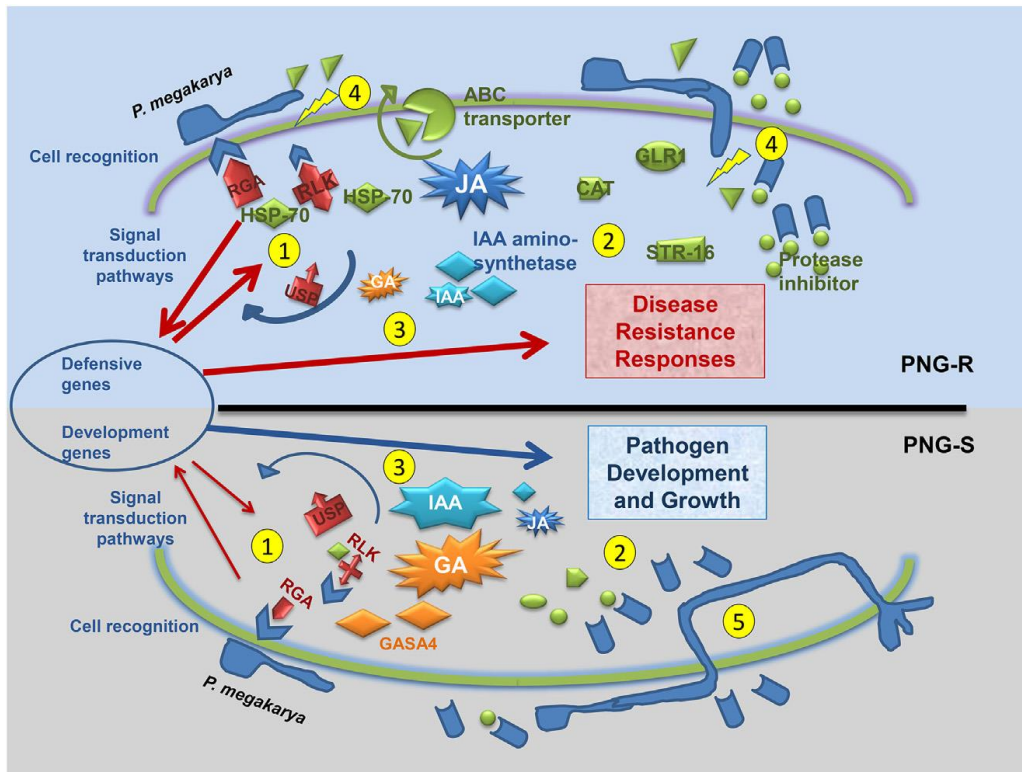


Figure 2 : Interaction Oomycète-plante (Legavre et al., 2015).

I.3. Méthodes de lutte contre *Phytophthora megakarya*

I.3.1. Lutte agronomique

La lutte agronomique regroupe l'ensemble des méthodes culturales permettant de créer des conditions défavorables au développement des ravageurs et des maladies parmi lesquelles l'élimination des cabosses infectées, la gestion de l'ombrage et de l'humidité des cacaoyères. En effet, les cabosses infectées sont des niches de développement des insectes et des champignons. Un ombrage excessif favorise le développement des maladies fongiques telle que la pourriture brune des cabosses (Babin et al., 2010).

Cette méthode a l'avantage d'être peu coûteuse, elle est toutefois également très pénible et son efficacité en champ reste limitée en condition de forte humidité. Cette méthode devrait être associée à d'autres stratégies de lutte.

I.3.2. Lutte chimique

En Afrique, les producteurs agricoles utilisent principalement des produits de synthèse pour limiter les dégâts des ravageurs et améliorer leur production. Ces produits ont l'avantage

d'agir sur un large spectre de bioagresseurs, permettant ainsi de maintenir une productivité suffisante (Yarou et *al.*, 2017).

La lutte chimique consiste en l'utilisation périodique des pesticides (fongicides) qui sont des agents chimiques capables de tuer ou d'inhiber le développement de l'agent pathogène. Cette méthode de lutte est la plus efficace. Il existe deux types de fongicides: les fongicides de contact qui restent à la surface de la plante où ils ont été appliqués et ne possèdent plus d'activité après infection. Les fongicides systémiques quant à eux, sont absorbés dans les tissus de la plante via la sève pour atteindre d'autres organes et peuvent exercer leur activité fongicide après infection. Par ailleurs, les pesticides peuvent être classés en fonction de leur cible (bactéricides, insecticides, fongicides, herbicides entre autres) ou en fonction de leur famille chimique (les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates, les triazines, les pyréthrynoïdes et les urées substituées). L'efficacité immédiate des pesticides de synthèse fait oublier aux producteurs les risques sanitaires et environnementaux associés à leur utilisation. Cependant, il a été mis en évidence que les pesticides chimiques ont des effets cancérigènes, neurotoxiques et perturbateurs des fonctions endocriniennes chez les animaux dus à leur longue durée de vie dans l'environnement (Deberdt et *al.*, 2008). De plus, la résistance des bioagresseurs est l'une des principales limites des pesticides de synthèse qui encourage le surdosage, menant à la pollution de l'environnement.

I.3.3. Lutte génétique

La lutte génétique ou variétale consiste à remplacer les variétés de cacaoyers traditionnellement cultivées par des variétés plus tolérantes aux attaques des agresseurs. Malgré son efficacité, elle ne présente qu'une résistance vis-à-vis d'un parasite plutôt qu'une résistance totale (Mpika et *al.*, 2009).

I.3.4. Lutte biologique

La lutte biologique repose sur l'utilisation d'organismes vivants, de leurs extraits ou de leurs dérivés pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des agents pathogènes et ravageurs sans avoir d'effets néfastes sur la plante. Elle regroupe la lutte à base de prédateurs et d'antagonistes naturels, la lutte à base des extraits de plantes et l'utilisation d'éliciteurs (organiques et inorganiques pour stimuler les défenses des plantes) qui sont toutes plus

respectueuses de l'environnement par rapport à la lutte chimique. Les antagonistes et les extraits des plantes agissent par le biais des molécules biopesticides.

Actuellement, les biopesticides représentent une petite part (5-6%) du marché mondial total de la protection des cultures, avec une valeur comprise entre 3 et 4 milliards de dollars (Ndolo et *al.*, 2019). Cela s'explique en partie par les efforts déployés par divers pays et régions pour mettre en œuvre des règles visant à adopter des produits écologiques pour l'agriculture. Certains produits prometteurs ont récemment été signalés, notamment des extraits de plantes, des produits de microorganismes, le composé alcaloïde oxymatine, des produits de fermentation des bactéries (Ndolo et *al.*, 2019). Pour remédier aux problèmes résultant de l'utilisation des pesticides chimiques, les biopesticides parmi lesquels les plantes pesticides, se présentent comme une alternative prometteuse.

En effet, les biopesticides sont des composés synthétisés naturellement par des végétaux, les microorganismes ou des animaux et qui exercent un effet inhibiteur et/ou létal sur les indésirables. Ils ont tout d'abord l'avantage d'être peu persistants dans l'environnement, (le plus souvent ils sont facilement dégradables par voie enzymatique) et sont peu coûteux (Regnault-Roger et Philogène, 2002). La littérature scientifique démontre que de nombreuses plantes de la flore africaine disposent d'un énorme potentiel biocide sur des bioagresseurs et au Cameroun, une trentaine de plantes ont été répertoriées (Tagne et *al.*, 2018). La plupart de ces plantes ne sont pas cultivées, telle que *A. indica*, espèce sans doute la plus utilisée comme plante pesticide. Mais, comme toute autre méthode de lutte, l'utilisation de plantes pesticides présente des avantages et des limites qui sont principalement leur stabilité et leur efficacité (Ndolo et *al.*, 2019). Par ailleurs, diverses espèces de plantes pesticides peuvent être utilisées comme extraits de plantes ou en association pour le contrôle des bioagresseurs (Yarou et *al.*, 2017).

L'utilisation en champs des pesticides et biopesticides peut être améliorée grâce à la nanotechnologie et à la micro-encapsulation, afin d'accroître leur stabilité, leurs effets résiduels et leur efficacité. La nanotechnologie est l'étude des matériaux à l'échelle nanométrique (≤ 1000 nm) appelés nanoparticules (NPs) présentant des propriétés physiques, chimiques et biologiques uniques et/ou nouvelles (Mustafa et *al.*, 2009). Ces nanoparticules ont des propriétés physiques flexibles avec un grand rapport surface/volume et une forte affinité pour les protéines. L'encapsulation de substances solides, liquides et gazeuses dans des microparticules de 1-1000 μm est largement utilisée dans les domaines de la médecine, de l'alimentation, de la cosmétologie, de l'agriculture et des matériaux avancés (Ndolo et *al.*,

2019). La micro-encapsulation garantit que le matériau central est complètement enrobé et isolé, et donc protégé, de l'environnement extérieur. Les produits de la nanobiotechnologie peuvent donc permettre une libération contrôlée des molécules au niveau du site d'action, minimisant ainsi les effets toxiques potentiels sur les organismes non ciblés et empêchant la dégradation de l'agent actif par les micro-organismes. Pour cette raison, les produits issus des nanotechnologies semblent avoir une toxicité réduite, une efficacité renforcée et une réduction des pertes dues à la dégradation physique (Ndolo et *al.*, 2019). L'utilisation de nanoparticules par exemple est efficace pour protéger l'huile de neem d'une dégradation rapide, permettant un effet prolongé sur les ravageurs ciblés. De plus, les nano-émulsions d'huile de neem extraites des graines de la plante ont réduit de manière significative le ravageur de stockage *Zabrotes subfasciatus*, signifiant ainsi l'activité biopesticide en même temps qu'elle permet une libération contrôlée (Da Costa et *al.*, 2014).

I.3.4.1. Généralités sur le neem

Origine et distribution

Le neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) appelé aussi margousier ou lilas des Indes est un arbre originaire de l'Inde. Le margousier est originaire de l'est de l'Inde et de la Birmanie et se développe beaucoup en Asie du Sud-Est (SEA) et en Afrique de l'Ouest. Il est cultivé au Pakistan, en Malaisie péninsulaire, à Singapour, aux Philippines et en Australie (Hashmat et *al.*, 2012) et des plantations de neem à petite échelle existent en Europe et aux Etats-Unis d'Amérique (Kumar et Navaratnam, 2013). Ainsi, il a été probablement introduit en Afrique par des immigrants en provenance du continent Indien.

L'adaptation du neem à des conditions pédoclimatiques difficiles font de lui un candidat de choix dans la lutte contre la déforestation, l'érosion et pour la stabilisation des sols (Photo 4).



Photo 4 : Arbre de neem à Yaoundé (Photo Foka, 2022).

Taxonomie et botanique

Le neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) est une espèce du genre *Azadirachta*, de la famille des Méliacées, des Rutinae et de l'ordre des Rurales (Nishan et Subramanian, 2014; Pankaj et *al.*, 2011).

Le neem mesure de 12 à 18 mètres de haut et sa circonférence peut atteindre 1,8 à 2,4 mètres. La branche du neem est dense, elle peut atteindre 10 cm de long et a une couleur brun foncé. Les feuilles sont composées, comprennent 9 à 15 folioles de couleur vert foncé, mesurent jusqu'à 30 cm de long (Bempah et *al.*, 2011), et ont des stigmates à 3 lobes ainsi que des drupes à graines (Jafari et *al.*, 2013). Elle est une plante à fleurs qui produit des fleurs à l'âge de 3-5 ans (Bempah et *al.*, 2011) avec des fleurs de 4-7 mm de longueur et 6-10 mm de largeur (Sultana et *al.*, 2011). La fleur a une odeur de jasmin et est de couleur blanche (Bempah et *al.*, 2011). Ses fruits en grappes qui vont du jaune verdâtre au vert sont lisses et en forme d'olive, de 2 cm de long avec des noyaux blancs et quand il est mûr, il est capable de produire 50 kg de fruits qui fournissent 30 kg d'amandes par an (Bempah et *al.*, 2011).

Importance

L'arbre de neem est capable de s'adapter à des conditions drastiques de sécheresse (Bempah et *al.*, 2011; Sultana et *al.*, 2011). Outre l'ombrage, l'arbre de neem sert à produire le charbon de bois et le bois de charpente mais, ce sont sans aucun doute ses propriétés remarquables qui nous viennent de la médecine traditionnelle qui font du neem un arbre très convoité.

Les extraits des différentes parties de l'arbre possèdent, selon les thérapeutes traditionnels, de nombreuses activités biologiques telles qu'anti-inflammatoire, anti-tumorale, immunostimulante, bactéricide, antiulcéreux, antidiabétique; mais, les plus reconnues sont leur effet insecticide et d'inappétence sur les insectes. En milieu rural, les agriculteurs indiens ont utilisé depuis des siècles les feuilles et les graines de neem pour lutter contre les ravageurs des cultures. De plus l'huile de neem possède également des propriétés hydratantes, régénérantes et restructurantes qui la rendent efficace pour traiter les problèmes de peau et les infections cutanées. Les activités des extraits de neem sont attribuées à la présence dans différentes parties de la plante de plusieurs composés de la famille des terpénoïdes et particulièrement la sous famille des limonoïdes qui ont fait l'objet du plus grand nombre de travaux (Pankaj et *al.*, 2011).

L'extrait brut primaire qui est obtenu à partir de l'huile des amandes de graines de Neem contient certains tétranortriterpènes; ce sont : la nimbine, la nimbinine, la nimbidinine, le nimbolide et l'acide nimbidique. La nimbidine et le nimbidate de sodium présentent une activité anti-inflammatoire dans l'arthrite induite par le formol chez les rats et a des effets antiulcéreux, antihistaminiques en bloquant le récepteur H₂. La nimbidine présente une activité spermicide chez les humains et les rats. Elle présente également une activité antifongique contre *Tinea rubrum* et *Mycobacterium Tuberculosis*. Le nimbolide possède une activité antipaludique contre *plasmodium falciparum* et une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus coagulase*, tandis que la Gedunin présente également une activité antifongique et antipaludique (Kumar et *al.*, 2010).

L'azadirachtine, est un tétranortriterpénoïde qui perturbe la mue, inhibent la croissance et provoquent des malformations des larves de certains insectes. De façon générale, on estime que l'azadirachtine possède une activité biologique 2 à 3 fois supérieure à celle des autres limonoïdes contenus dans le neem (Champagne et *al.*, 1992) et se retrouve en fortes proportions dans les amandes des graines de neem (elle représente environ 0,098 à 0,35% du poids des graines). L'azadirachtine a une structure moléculaire proche des ecdysones, hormones de mue chez l'insecte. Elle inhibe la libération des ecdysones de la glande prothoracique, réduit la croissance des larves d'insecte, stimule les chimiorécepteurs des cellules spécifiques qui agissent comme des agents de dissuasion et bloque l'arrivée des phagostimulants dans les cellules réceptrices. Cependant, à cause du mode d'action par ingestion des limonoïdes non volatiles, il semble que cette pénétration soit nécessaire pour entraîner la mort. Ainsi, l'huile de neem par l'intermédiaire de ces composés volatiles confère aux formulations un effet répulsif et permettrait d'éviter le développement des résistances. De plus, en plus de son activité

insecticide, l'huile de neem est considérée comme un photostabilisateur de l'azadirachtine et a un effet antifongique vis-à-vis de *P. megakarya* (Lesueur, 2006; Pohe et Agneroh, 2013).

L'extrait éthanolique des feuilles de *A. indica* est plus efficace contre *Rhizopus* et *Aspergillus* par rapport à l'extrait aqueux de feuilles (Mondall et al., 2009). Toutefois, l'extrait aqueux et éthanolique de feuilles de neem se sont avérés efficaces contre *Candida albicans* aux concentrations de 15% et 7,5% et la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été de 7,5 %. De plus, les graines de neem ont présenté une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et l'extrait à l'hexane a été plus actif que celui aqueux sur ces agents pathogènes (Vashist et Jindal, 2012). Par ailleurs, les extraits de neem ont des activités anti contraceptive et hépatoprotective.

Le tourteau de neem quant à lui est un résidu de l'extraction de l'huile de margousier de la graine qui peut être utilisé comme biofertilisant, car il possède de la matière organique, de l'azote, du phosphore, du potassium, du Calcium et du Magnésium (Nishan et al., 2014). L'effet fertilisant des feuilles de neem sur le maïs a présenté des valeurs plus élevées de hauteur des plantes, du diamètre au collet et de la surface foliaire par rapport au témoin négatif (Moyin-Jesu, 2012). De plus, les conditions chimiques du sol (matière organique, azote, phosphore, potassium, calcium et magnésium) ont été améliorées par les feuilles de neem additionnées à la cendre par rapport au fumier de volaille et à l'application individuelle des feuilles de neem et de cendres de bois (Moyin-Jesu, 2012).

Fort de son potentiel, des formulations destinées à la protection des plantes sont développées à travers le monde. C'est le cas de Azamax® par UPL Brasil (Campinas, SP, Brésil) ; Fortune Aza3%ECR® par Fortune Biotech (USA) ; OzoNeem Oil R® par Ozone Biotech (Inde).

I.3.4.2. Généralités sur l'herbe sida

Origine et distribution

La plante sida (*Sida acuta* Burn. F.) est une herbe annuelle dressée. Elle est une mauvaise herbe qui fréquemment domine les pâturages améliorés, les terrains abandonnés, les bords de route (Mann et al., 2003). La plante est indigène au Mexique et en Amérique centrale, mais s'est répandue dans les régions tropicales et subtropicales (Holm et al., 1977). Elle est une mauvaise herbe fréquente en Afrique centrale et de l'ouest. Au Cameroun, elle pousse en

abondance dans les champs cultivés, les terrains vagues et les bordures de route, où il est appelé "sengh" dans la partie occidentale du pays (Photo 5) et son nom commun est sida.



Photo 5 : Plant d'herbe sida âgé de 4 mois (Photo Foka, 2022).

Taxonomie et botanique

Sida appartient à l'espèce *Sida acuta*, au genre Sida, à la famille des Malvacée, à l'ordre des Malvales, à la classe des Dicotylédonées, à la division des Angiospermes et au royaume des Plantae (Tcheghebe et *al.*, 2017).

Son écorce est lisse, verdâtre, sa racine est mince, longue, cylindrique et très rugueuse ; ses feuilles sont lancéolées, presque glabres, ses pédoncules sont égaux aux pétioles, ses graines sont lisses et noires ; ses fleurs sont jaunes, solitaires ou en paires. Une fois que la plante s'établit, elle est très compétitive, refusant des sites aux autres plantes. La plante peut être propagée à la fois par des graines et des boutures de tige.

Importance

La plante entière de *Sida acuta* est largement utilisée dans la médecine traditionnelle. Dans les connaissances traditionnelles indiennes des plantes médicinales, elle est rapportée comme ayant de nombreuses activités biologiques telles qu'antimicrobienne, anthelminthique, antiémétique, diurétique, aphrodisiaque, stomachique, diaphorétique, antipyrétique et cicatrisant (Damintoti et *al.*, 2007; Tcheghebe et *al.*, 2017). La racine de *S. acuta* est largement utilisée comme stomachique, diaphorétique et antipyrétique. Toutes les parties de cet arbre, y

compris les feuilles, l'écorce, la racine, les graines et la fleur sont utilisées dans la médecine folklorique (Mohideen et *al.*, 2002).

Dans la médecine traditionnelle, la plante est souvent utilisée pour traiter des maladies telles que la fièvre, les maux de tête, les maladies de la peau, la diarrhée et la dysenterie. En se référant aux connaissances traditionnelles, des études ont été réalisées pour confirmer les activités que la plante est censée exercer *in vivo*. Les propriétés pharmacologiques de cette plante impliquent les activités antiplasmodiales, antimicrobiennes, antioxydantes, ainsi que les activités cytotoxiques et insecticides. Certaines études ont abouti à l'isolement de composés uniques, tandis que d'autres ont simplement démontré l'activité des extraits bruts (Mabeku et *al.*, 2011).

Les alcaloïdes de l'espèce *Sida acuta* ont une bonne activité antimicrobienne contre les microorganismes. Dans le test de diffusion en puits d'agar, les diamètres d'inhibition les plus élevés ont été obtenus avec les bactéries Gram-positives (Karou et *al.*, 2005). L'essai de microdilution en bouillon a donné des valeurs de concentration inhibitrice minimale allant de 16 à 400 µg/mL et des valeurs de concentration bactéricide minimale allant de 80 à 400 µg/mL. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse de ces mêmes alcaloïdes a permis l'identification de la cryptolépine et de la quindoline comme les principaux composants.

La cryptolépine présente un large éventail de propriétés biologiques, notamment hypotensives et antipyrétiques, antimuscariniques, antibactériennes et anti-inflammatoires (Bonjean et *al.*, 1998). Elle possède également une puissante activité *in vitro* contre *P. falciparum*, la principale espèce de parasite responsable du paludisme. Le mécanisme d'action de ce produit antipaludéen reste peu clair. Ce produit antipaludique a au moins deux effets indépendants qui peuvent conduire ensemble à une activité puissante. Premièrement, il se comporte comme un intercalateur d'ADN (Bonjean et *al.*, 1998). Deuxièmement, il peut agir comme la chloroquine en inhibant la détoxification d'hème dans les globules rouges (Wright et *al.*, 2001). Cette hypothèse est étayée par une étude de microscopie fluorescente qui a suggéré que la cryptolépine s'accumule dans des structures parasitaires qui peuvent correspondre au noyau du parasite (Arzel et *al.*, 2001).

La cryptolépine semble exercer son action cytotoxique via l'inhibition de la synthèse de l'ADN et la stabilisation de la topoisomérase II-ADN, complexes covalents (Damintoti et *al.*,

2007). Dans une étude menée pour élucider la puissance et le mode de liaison à l'ADN de la cryptolépine et de deux autres alcaloïdes par spectroscopie, il a été constaté que l'alcaloïde se lie étroitement à l'ADN et se comporte comme un agent intercalant typique (Dassonneville et *al.*, 2000). Il stabilise donc le complexe covalent topoisomérase II-ADN et stimule la coupure de l'ADN par la topoisomérase II, toutefois, le médicament ne présente pas de préférence pour la coupure d'une base spécifique.

I.3.4.3. Généralités sur la citronnelle

Origine et distribution

La citronnelle (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) encore appelée lemon grass, herbe citron, verveine des Indes, hierba limon, zacate de limón, xiang mao ou Fipagrass, est identifiée localement par plus de 28 noms vernaculaires de différents pays du monde. Elle est une herbacée à longue feuille linéaire originaire d'Asie notamment d'Inde, d'Indochine, d'Indonésie et de Malaisie (Oladeji et *al.*, 2019; Ross, 2005).

La citronnelle est retrouvée en Afrique et en Amérique (Photo 6), mais elle est largement cultivée dans les régions tempérées et tropicales du monde (Oladeji et *al.*, 2019). Elle est utilisée comme plante aromatique, tant grâce à ses tiges que grâce à ses feuilles, qui présente un goût prononcé et caractéristique de citron. La citronnelle est aujourd'hui très cultivée dans les zones tropicales et subtropicales notamment en Asie, en Amérique Centrale, en Amérique du Sud ainsi qu'en Afrique.



Photo 6 : Culture de citronnelle (Photo Foka, 2019).

Taxonomie et Botanique

Cymbopogon citratus est l'une des espèces les plus connues du genre *Cymbopogon*. Le genre *Cymbopogon* compte près de 55 espèces parmi lesquelles l'espèce très répandue est *Cymbopogon citratus*. Le genre *Cymbopogon* est un important producteur d'huile essentielle. Il regroupe les herbes monocotylédones de la famille des Poaceae (Gramineae) et comprend environ 180 espèces, sous-espèces, variétés et sous-variétés qui sont largement distribuées dans les régions tempérées et tropicales du monde (Bertea et *al.*, 2003).

Cymbopogon citratus est propagé au moyen de divisions de racines. La touffe d'une plante mature est divisée en un certain nombre de rhizome ayant des racines et débarrassée de ses feuilles. Le sol doit être bien ameubli par un labourage avant la plantation. Des trous de 20 cm de profondeur sont creusés et les plants sont plantés à environ 50 cm les uns des autres, en rangées espacées d'environ 90 cm. Ainsi, 15.000 à 20.000 segments peuvent être plantés/ha. Un à quatre segments sont plantés dans chaque trou selon la fertilité du sol. Les trous de plantation sont légèrement remplis de terre pour faciliter le développement d'un bon système racinaire. Une pépinière de 100 m² permet d'obtenir suffisamment de segments de racines pour planter 1 ha, avec deux segments de racines par trou de plantation. *C. citratus* pousse dans un climat tropical. Il pousse sur des sols pauvres et est plus résistant à la sécheresse. Cependant, il s'épanouit sur une grande variété de sols allant de la terre riche à la latérite pauvre et un climat chaud et humide avec beaucoup de soleil et des températures de 24-27 °C. Il pousse le mieux à des altitudes allant du niveau de la mer à 1200 m et préfère des précipitations annuelles de 200-250 cm. Dans les régions où les précipitations sont abondantes, la plante peut être récoltée plus régulièrement au cours de l'année. Toutefois, en cas de précipitations prolongées, la plantation sur les crêtes peut être suggérée (Oladeji et *al.*, 2019).

C. citratus est une grande herbe vivace à croissance rapide avec des touffes de feuilles au parfum de citron provenant des rhizomes annulés et peu ramifiés. Elle atteint une hauteur de 1 m, une largeur de 5-10 mm et possède des feuilles vertes bleutées distinctes qui ne produisent pas de graines. Cependant, elle possède de nombreuses tiges bulbeuses qui augmentent la taille de la touffe au fur et à mesure de la croissance de la plante. Les feuilles sont longues, glabres, vert glauque, linéaires, s'effilant vers le haut et le long des bords, avec une ligule très courte et des gaines serrées à la base, étroites et se séparant à l'extrémité distale. Les inflorescences sont nodulaires avec des racèmes de spirelets par paires et sous-tendues par des spathes d'environ 1 m de long avec des pédoncules de 30-60 cm de long (Oladeji et *al.*, 2019 ; Ross, 2005).

Importance

De nombreuses études ont été menées dans le but d'élargir la connaissance des composants chimiques volatils et non volatils de *C. citratus* du fait de ses nombreuses applications ethno-pharmacologiques. Ces études ont révélé que la composition chimique des huiles essentielles et des extraits de *C. citratus* varie en fonction de l'origine géographique. Les principales substances isolées de la plante sont les terpénoïdes (citral, geraniol, myrcène, geraniol, citronellol, cymbopogonol, cymbopogone), les phénols et flavonoïdes tels que l'apiginin, le kaempferol, l'acide caféique, le catéchol, l'hydroquinone et l'elomicine (Chisowa et al., 1998; Negrelle et al., 2007; Oladeji et al., 2019).

La citronnelle est une plante aromatique et un condiment qui est traditionnellement sollicitée en phytothérapie, dans l'alimentation ainsi qu'en cosmétique à travers le monde à l'état de feuille et également sous forme d'huile essentielle. Il est intéressant d'utiliser son huile essentielle (HE) pour conserver des aliments (Ekpenyong et Ernest, 2017). Bien que plusieurs espèces soient peu connues et étudiées, certaines espèces du genre auraient été utilisées dans la médecine traditionnelle, tandis que d'autres, connues pour être riches en huiles volatiles, ont des applications dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et de la santé. Dans les industries des cosmétiques, des produits pharmaceutiques et de la parfumerie (Avoseh et al., 2015; Jeong et al., 2009). L'HE de *Cymbopogon citratus* contient le citral (71,297%), la myrcène (19,034%), la 4,5-époxy-carène (2,780 %), le linalol (1,713%), le (S)-cis-verbénol (1,110 %), et l'undécane-2-one (1,001%).

L'HE de *Cymbopogon citratus* a montré une grande capacité à piéger les radicaux DPPH⁺ (environ 68% à 8 mg/mL) ainsi, elle est douée d'activité antioxydante (Uchida et al., 2017). Par ailleurs, elle est efficace sur les lignées cellulaires prostatiques LNCaP (IC₅₀ = 6,36 µg/mL) et PC-3 (IC₅₀ = 32,1 µg/mL) et sur les lignées cellulaires de glioblastome (SF-767 (IC₅₀ = 45,13) µg/mL) et SF-763 (IC₅₀ = 172,05 µg/mL) donc, possède un effet cytotoxique sur ces cellules (Bayala et al., 2018). L'activité de l'HE de *Cymbopogon citratus* est statistiquement égale à celle de son principal composant, le citral.

L'application topique de l'HE de *Cymbopogon citratus* à des doses de 5 et 10 µL sur l'oreille réduit de manière significative l'œdème aigu de l'oreille induit par l'huile de croton chez 62,5 et 75% des souris, respectivement. De plus, l'analyse histologique a clairement confirmé que l'HE de la citronnelle inhibe la réponse inflammatoire cutanée dans les modèles animaux (Boukhatem et al., 2014), lui conférant ainsi un effet anti-inflammatoire.

L'HE de *Cymbopogon citratus* (10 mg/kg de masse fraîche) et le géraniol (3 mg/kg), mais pas le citral (100 mg/kg), accélèrent le processus de guérison gastrique de 34,52 et 80,57%, par rapport au groupe ulcéré à l'acide acétique traité avec véhicule ($36,04 \pm 1,03 \text{ mm}^2$). Ces effets de guérison sont confirmés histologiquement par la contraction de la base de l'ulcère et par l'amélioration de la coloration de la mucine dans les tranches du site de l'ulcère de souris traitées avec de l'HE de *Cymbopogon citratus* ou du géraniol. Cette huile essentielle et le citral à 100 µg/mL inhibent l'activité H⁺ /K⁺ - ATPase de 28,26 et 44,36%, tandis que le géraniol ne change pas ce paramètre. Ensemble, ces résultats confirment les effets gastro protecteurs de cette huile essentielle (Venzon et al., 2018).

Il a été montré par Fouelefack et al. (2024) que l'huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et ses fractions ont des activités antifongiques contre *Bipolaris oryzae* et *Fusarium moniliforme*, respectivement responsables des maladies chez le riz (*Oryza sativa* L); en soulignant les interactions plausibles qui peuvent exister entre les constituants d'une huile essentielle pour une activité biologique donnée. Par ailleurs, Nguéfack et al. (2013) ont montré que les extraits d'huile essentielle et de solvant de *C. citrinus* et de *C. citratus* ont un potentiel en tant qu'agents de lutte contre la tache brune et d'autres maladies fongiques transmises par les semences dans le riz, tant en agriculture conventionnelle qu'en agriculture biologique.

L'extrait de citronnelle et l'HE ont le potentiel de contrôler la croissance de *Listeria monocytogènes* dans les produits de surimi de fruits de mer avec un effet négatif minimal sur les caractéristiques organoleptiques du produit et peuvent donc éventuellement être utilisés comme conservateur alimentaire naturel (Ramroop et Neetoo, 2018).

De plus, l'huile de *Cymbopogon citratus* a un bon potentiel pour être utilisée comme agent antifongique et anti-biofilm contre *Candida tropicalis* présentant un risque grave d'infections cutanées (Sahal et al., 2020). Elle est fongistatique à 0,29 µL/ ml et présente une large fongitoxicité contre d'autres champignons de pourriture des fruits. L'huile essentielle (HE) de *Cymbopogon citratus* inhibe complètement la croissance et la sécrétion de mycotoxines (AFB1 et OTA) des souches aflatoxigènes et ochratoxigéniques d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus ochraceus* à 0,8 µL/mL. L'application de 200 et 300 µL de celle-ci sur 1 kg de raisins stockés montre une amélioration de la durée de conservation jusqu'à dix jours et elle n'a aucun effet phytotoxique sur les fruits. Ainsi, l'HE de *Cymbopogon citratus* pourrait être une alternative naturelle au fongicide commercial pour lutter contre les champignons pourris des fruits (Sonker et al., 2014).

I.3.4.4. L'extrait calcique des coquilles d'huîtres

Généralité sur les huîtres

Les huîtres (*Crassostrea* spp.) sont des mollusques vivants en milieu aquatique appartenant à la famille des *Ostreidae*. Leur corps, typique des gastéropodes, est recouvert d'une épaisse couche de coquille. La croissance pondérale des huîtres correspond surtout à celle de leur coquille (Thierry, 2004).

Elle peut représenter, en fonction des saisons, 50 à 75% du poids de l'animal (Xing et al., 2013). Au Cameroun le bassin de production des coquilles d'huîtres se trouve dans la ville de Mouanko (Département de la Sanaga maritime). Les coquilles d'huîtres sont disponibles durant toute l'année. Les prix oscillent en fonction des saisons entre 6 000 F CFA et 12 000 F CFA pour un sac de 100 kg. De plus les coquilles d'huîtres sont présentes dans plusieurs provenderies localisés dans les régions propices à l'élevage au Cameroun (Photo 7).



Photo 7 : Coquilles d'huîtres (Photo Foka, 2019).

Les coquilles d'huîtres sont composées principalement de carbonate de calcium (95 à 98%) et de chitine (2 à 5%). Cependant, des travaux sur la caractérisation des coquilles d'huîtres montre qu'elles contiennent du carbonate de calcium, du potassium, du phosphore, du magnésium, du silicium, du fer, du sodium et du zinc dans des proportions variantes selon les espèces (Lee et al., 2008; Shen et al., 2017; Xing et al., 2001). Les études ont également montré que le chauffage des poudres de coquilles à 1050 °C entraîne la transformation du carbonate de calcium en oxyde de calcium (Xing et al., 2013). Par ailleurs, le CaCO_3 , peut être transformé en milieux acide (HCl) en chlorure de calcium (CaCl_2).

Les coquilles d'huîtres sont des substances organiques non toxiques et biodégradables ayant montré un potentiel antimicrobien vis-à-vis de plusieurs microorganismes parmi lesquels *Phytophthora megakarya* (Shen et al., 2017; Xing et al., 2001). Les coquilles d'huîtres et les poudres de coquilles d'huîtres chauffées possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes (Xing et al., 2013). Par ailleurs plusieurs travaux démontrent la capacité des coquilles d'huîtres à modifier la flore microbienne du sol et à exercer un contrôle sur le métabolisme de plusieurs genres microbiens à l'instar des actinobactéries et des champignons mycorhiziens à arbuscules (Lee et al., 2008; Shen et al., 2017).

Généralités sur le calcium

Le calcium est l'élément chimique de numéro atomique 20 et de symbole Ca. C'est un métal alcalinoterreux gris-blanc et assez dur qui ne se trouve pas à l'état libre (corps pur) dans la nature. Le calcium est un solide paramagnétique ayant un point de fusion de 842 °C et un point d'ébullition de 1484 °C.

Le calcium, le magnésium et le sulfure sont les trois nutriments secondaires des plantes. Comme les nutriments primaires, ces éléments sont importants pour le bon développement des plantes. Cependant, ils sont nécessaires à faible quantité. Un déficit en calcium entraîne une malformation des jeunes racines et des jeunes feuilles parce que l'ion Ca^{2+} sous la forme de pectate de calcium participe à la stabilisation de la paroi cellulaire. De plus, il intervient dans certaines voies de transduction intra cellulaire des signaux, permettant ainsi la coordination des fonctions cellulaires. En effet, le calcium est un messager important de la signalisation cellulaire et son activité est plus stimulée en réponse aux stress de diverses origines (Rab et al., 2017).

Après l'étape initiale de reconnaissance entre la plante et l'agent pathogène avirulent, les premiers événements consistent en des perturbations membranaires, sous la forme de transferts d'ions entre compartiments distincts et avec l'extérieur de la cellule. Ces flux d'ions ont pour principal effet de conduire à une augmentation de la teneur en calcium. Ces ions Ca^{2+} , messagers secondaires typiques des mécanismes de la transmission des signaux, semblent relayer le signal initial à travers l'activation de protéines kinases, qui à leur tour initieraient les cascades de phosphorylations responsables du déclenchement des processus de défense (Xing et al., 2001). La réponse hypersensible (HR) fait partie de ces réactions de défense. Elle est caractérisée par la mort cellulaire programmée (PCD) au site d'infection et la restriction de la croissance et de la progression de l'agent pathogène. Cette HR est associée à la poussée

oxydative (oxydative burst) et peut mener à l'activation de gènes codant pour les protéines PR (Ren et *al.*, 2002).

L'application de sels de Ca^{2+} sur l'épiderme des fruits semblent jouer un rôle important dans la réduction des altérations physiologiques post-récolte (Conway et *al.*, 1988). Il a été proposé que l'application de sels de Ca^{2+} augmente la teneur totale en calcium des fruits ainsi que les liaisons calciques de la paroi cellulaire, par des liaisons croisées de pectines, ce qui augmente leur résistance aux enzymes de dégradation des parois cellulaires des champignons (Conway et *al.*, 1988). De Plus, le traitement de la fraise au calcium retarde légèrement le mûrissement des fruits, mais améliore la résistance aux attaques fongiques sans nuire à l'aspect extérieur (Lara et *al.*, 2004). En effet, l'application de calcium a permis de conserver des niveaux plus élevés de pectines liées ioniquement et a contribué à maintenir l'intégrité structurelle des parois cellulaires, probablement en raison du dépôt de calcium dans les polysaccharides de pectine.

Vu le fort potentiel de ce microélément, des formules à base de celui-ci ont vu le jour à l'instar de Calcium P3® (engrais foliaire 5%) par OMEX Agriculture Inc Canada.

I.3.4.5. Généralités sur les formulations des biopesticides

Les formulations découlent de la mise ensemble d'au moins deux éléments. Elles peuvent être des poudres ou des fluides, des émulsions ou des suspensions pour les composés bioactifs lipophiles et/ou les composés bioactifs hydrophiles.

L'émulsion est un système dispersé contenant au moins deux phases liquides non miscibles. Différents mécanismes de déstabilisation des suspensions et des émulsions ont été rapportés notamment la sédimentation, la floculation, la coalescence, le mûrissement d'Ostwald et le crémage; ce qui tend à réduire l'utilisation des émulsions et des suspensions (Namasivayam et *al.*, 2017). Par ailleurs, il existe des nano-émulsions qui sont des émulsions dont la taille des gouttelettes est égale ou inférieure à 1000 nm alors que les microémulsions ou émulsions sont celles dont la taille est inférieure à 1000 μm (Namasivayam et *al.*, 2017). Les nano-émulsions ont de nombreuses applications dans le domaine de la médecine comme agents d'administration de médicaments, dans le secteur alimentaire et dans l'agriculture (Mustafa et *al.*, 2009). Les bioformulations à base de plantes ayant des gouttelettes ou des particules plus petites permettent

d'augmenter la bioactivité des composés en augmentant la surface d'échange avec les tissus et contribue grandement à la gestion des parasites (Namasivayam et *al.*, 2017).

L'utilisation de biopesticides d'origine végétale a connu depuis une trentaine d'années parallèlement à la chimie verte ou dite des substances naturelles un nouvel engouement. Plus de 30 espèces végétales dotées de propriétés insecticides, fongicides et/ou bactéricides ont été répertoriées comme utiles pour la protection des plantes (Tagne et *al.*, 2018). Ces végétaux ont fait l'objet de nombreuses études et ont permis la mise sur pied des formulations brevetées pour la protection des plantes ; c'est le cas du neem et de la citronnelle (Lesueur, 2006).

Les composés utilisés en lutte biotechnologique appartiennent généralement à l'une des trois grandes classes chimiques que sont les terpénoïdes, les composés phénoliques et les alcaloïdes. L'action de ces composés naturels n'est pas spécifique et leur effet sur les agents pathogènes est polyvalent. Les composés bioactifs naturels utilisés dans la protection des plantes tuent les agents pathogènes (effet fongicide) ou limitent leur développement (effet fongistatique), ainsi qu'induisent des réactions de défense des plantes en tant qu'éliciteurs (Sharma et Malik, 2012).

I.4. Mécanisme de défense chez les plantes

Les végétaux pour se protéger des agressions extérieures causées par leur environnement ont des défenses physiques et chimiques (phytoanticipines) préformées empêchant les agents pathogènes de pénétrer les tissus de l'hôte et se nourrir. Ces ravageurs peuvent être nécrotrophes (tuent leur hôte et se nourrissent de son contenu) ou biotrophes (ont besoin d'un hôte vivant pour se nourrir et compléter leur cycle de développement).

Au cours de toutes interactions plante-agent pathogène, trois étapes sont à considérer de la reconnaissance du parasite à la synthèse des molécules de défense en passant par la transduction des signaux visant à induire des réactions de défense. Ces différents stades créent un environnement défavorable à l'invasion du parasite. Deux situations différentes sont donc à considérer : (1) la relation hôte où un parasite peut contaminer un hôte et s'y développer et (2) la relation non-hôte caractérisée par l'incompatibilité entre tous les génotypes d'une espèce végétale donnée et tous les biotypes ou isolats d'un agent pathogène déterminé. La relation hôte est quant à elle une relation où, pour une espèce végétale particulière, l'interaction avec un parasite déterminé aboutit parfois à une incompatibilité (plante résistante) et parfois, à une

compatibilité plus ou moins marquée selon les génotypes (plante sensible ou tolérante) (Dihazi et al., 2012). La première réponse visible connue dans les interactions entre des organismes végétaux et des agents pathogènes au point d'infection est une mort des cellules locales (nécrose).

Chaque molécule/composé qui déclenche le mécanisme de défense dans une plante est appelé éliciteur. À la suite de l'interaction d'un éliciteur avec un récepteur de la cellule sur laquelle il agit, un stimulus métabolique, appelé "signal", est créé, du fait de la possibilité de son mouvement intracellulaire, ainsi qu'intercellulaire et systémique. Les plantes pulvérisées avec ces composés réagissent rapidement : les récepteurs membranaires des cellules végétales se lient aux molécules élicitrices, induisent une résistance locale et génèrent ensuite une réponse moléculaire de la plante. Les éliciteurs sont classifiés comme physiques ou chimiques, biotiques ou abiotiques, complexes ou définis, selon leur origine et leur structure moléculaire (Jamiołkowska, 2020).

Les éliciteurs dérivés de microbes étrangers sont appelés molécules de type MAMP (*microbe-associated molecular pattern*) et ceux dérivés d'organismes pathogènes, molécules de type PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*). L'activation de l'immunité basale peut également faire intervenir des molécules issues des cellules de la plante attaquée, libérées pour donner suite à une attaque phytopathogène, ou produites en cas de stress (Figure 3). Ces molécules sont appelées DAMP (*damage/danger-associated molecular pattern*) (Boller et Biol., 2009). La perception des molécules MAMP/PAMP et DAMP est médiée par des protéines réceptrices situées dans la membrane plasmique, généralement appelées " PRR " (*pattern recognition receptors*) (Ranf, 2017), qui reconnaissent un motif moléculaire particulier (signature) d'une molécule étrangère ou propre. La reconnaissance de cette signature permet le déclenchement d'une réponse immunitaire rapide : la PTI (*PAMP-Triggered Immunity*).

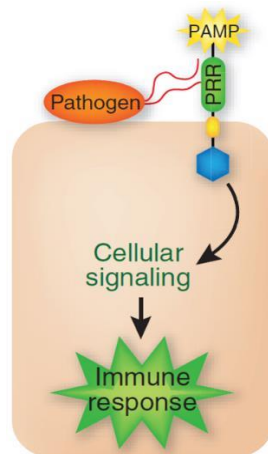


Figure 3 : Schéma représentant la PTI (*PAMP Triggered Immunity*). Le signal du pathogène (PAMP, Pathogen-Associated Molecular Pattern) est reconnu au niveau de la cellule par les PRRs (Pattern Recognition Receptors), ce qui provoque le déclenchement d'une réponse immunitaire de type PTI (Pieterse et al., 2009).

Dans la pratique agricole, le traitement des plantes par des éliciteurs en l'absence des agents pathogènes virulents provoque l'apparition de MAMP. Les molécules MAMP/PAMP ou DAMP liées au récepteur membranaire, activent des voies de signalisation intracellulaires qui déclenchent un large éventail de réponses de défense dans la plante. On parle alors d'amorçage ou « Priming » ou d'immunité locale déclenchée par les PAMPs (PTI). Ainsi, l'immunité activée dans les stratégies de défense par les molécules MAMP/PAMP et DAMP constitue la première ligne de défense locale, grâce à laquelle la plante peut non seulement contrer les infections, mais aussi combattre activement les organismes pathogènes émergents, souvent résistants aux pesticides chimiques. Par conséquent, l'amorçage est défini comme l'état physiologique des plantes conduisant à une activation plus rapide et plus forte des réponses de défense aux stress biotiques et abiotiques ultérieurs (Jamiołkowska, 2020). Cette réaction de défense vise à restreindre la croissance de l'intrus et peut conduire à une résistance systémique induite (RSI) ou une résistance systémique acquise (RSA), rendant la plante moins sensible à une attaque pathogène ultérieure. Les défenses des plantes peuvent être divisées en trois phases de réponses.

Les réponses primaires sont localisées au niveau des cellules en contact avec l'agent pathogène. Elles se manifestent par la mort programmée de celles-ci. C'est la réaction d'hypersensibilité dont le but est de retarder l'invasion microbienne afin de favoriser la mise en place d'autres mécanismes de défense. En effet, la réaction d'hypersensibilité se caractérise par une réaction nécrotique qui se manifeste précocement chez des plantes résistantes. La HR

début par un burst oxydatif caractérisé par une production importante de formes actives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS). Ce mécanisme permet à la plante de limiter la progression de l'agent pathogène car ces composés sont toxiques. Les ROS et en particulier l'oxyde nitrique, semble jouer aussi un rôle de signalisation chez les végétaux et déclencher l'activation d'autres réponses de défense (Méteignier, 2015). Ceci est efficace contre les biotropes mais pas contre les nécrotropes.

Les réponses secondaires sont induites dans les cellules adjacentes entourant le site initial de l'infection, en réponse aux molécules signales, les éliciteurs libérés par des cellules en état de mort cellulaire. On parle ainsi d'une résistance locale acquise (R.L.A.). Celle-ci se manifeste généralement autour de la zone où la RH s'est produite. C'est une zone particulière où la mise en place de la résistance est très forte (Sansregret, 2016). Dans ce halo en hyperactivité, les cellules subissent de profonds changements tant métaboliques que structuraux. Elles synthétisent et accumulent un grand nombre de métabolites à potentiel antimicrobien (Méteignier, 2015), à l'instar des phytoalexines. Ces cellules autour de la nécrose subissent également un épaississement de la paroi par incorporation de nouveaux composés structuraux tels la lignine et la callose, par incrustation de composés phénoliques et par dépôts de glycoprotéines riches en hydroxyproline (Benhamou et Picard, 1999). En résumé, les réponses secondaires se caractérisent par la production de nouvelles armes chimiques après la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante.

Les réponses tertiaires ne sont pas localisées. Elles se manifestent au niveau des parties non infectées de la plante, souvent éloignées des sites d'attaque et induisent une résistance systémique acquise (Mauch-Mani et *al.*, 2017). Celle-ci consiste en l'activation d'un certain nombre de gènes qui permettent l'induction et le maintien d'un état de résistance de la plante entière contre un large spectre d'agents pathogènes. Ce type de résistance, plus tardive et moins intense, met la plante dans un état de veille permanent qui la rend prompt à réagir contre toute nouvelle attaque. Ce phénomène est connu sous le nom d'immunité physiologique acquise ou résistance induite. Elle se manifeste par l'accumulation de diverses molécules de défense, à distance des sites infectieux, à l'instar des protéines de stress, des phytoalexines, des composés structuraux et des inhibiteurs de protéases (Benhamou et Picard, 1999).

Le modèle en zigzag (Figure 4) a été proposé pour expliquer les stratégies utilisées par les plantes et les agents pathogènes dans leur course à l'armement au cours du processus d'évolution des espèces (Jones et Dangl, 2006).

Au cours de ces réponses primaires, deux phases sont à discerner. La phase 1 au cours de laquelle le système de perception de la plante (PRR) va être capable de reconnaître les PAMPs. Il y a alors mise en place d'une défense basale ou immunité déclenchée par les PAMPs (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*). Par ailleurs, au cours de la phase 2 : L'agent pathogène va développer des effecteurs (étoiles violettes) sécrétés dans les cellules végétales où ils vont bloquer l'établissement de la PTI. Il y a alors développement de la maladie ou sensibilité déclenchée par les effecteurs (ETS, *Effector-Triggered Susceptibility*).

Au cours des réponses secondaires, trois phases sont à discerner. Phase 3 où la plante met à profit ses protéines R de résistance, capables de reconnaître spécifiquement certains effecteurs. Il y a alors établissement d'un second niveau de défense plus élevé ou immunité déclenchée par les effecteurs (ETI, *Effector-Triggered Immunity*). Par ailleurs, au cours de la phase 4, l'agent pathogène ayant diversifié son panel d'effecteurs dont certains (triangles verts) sont capables de cibler les réponses de l'ETI va aboutir de nouveau à la maladie (ETS). En outre, au cours de la phase 5, la plante développe de nouvelles protéines R afin de cibler les nouveaux effecteurs, et redevenir résistantes en déclenchant les réponses de l'ETI (Figure 4). Cette phase 5 conduit la plante aux réponses tertiaires.

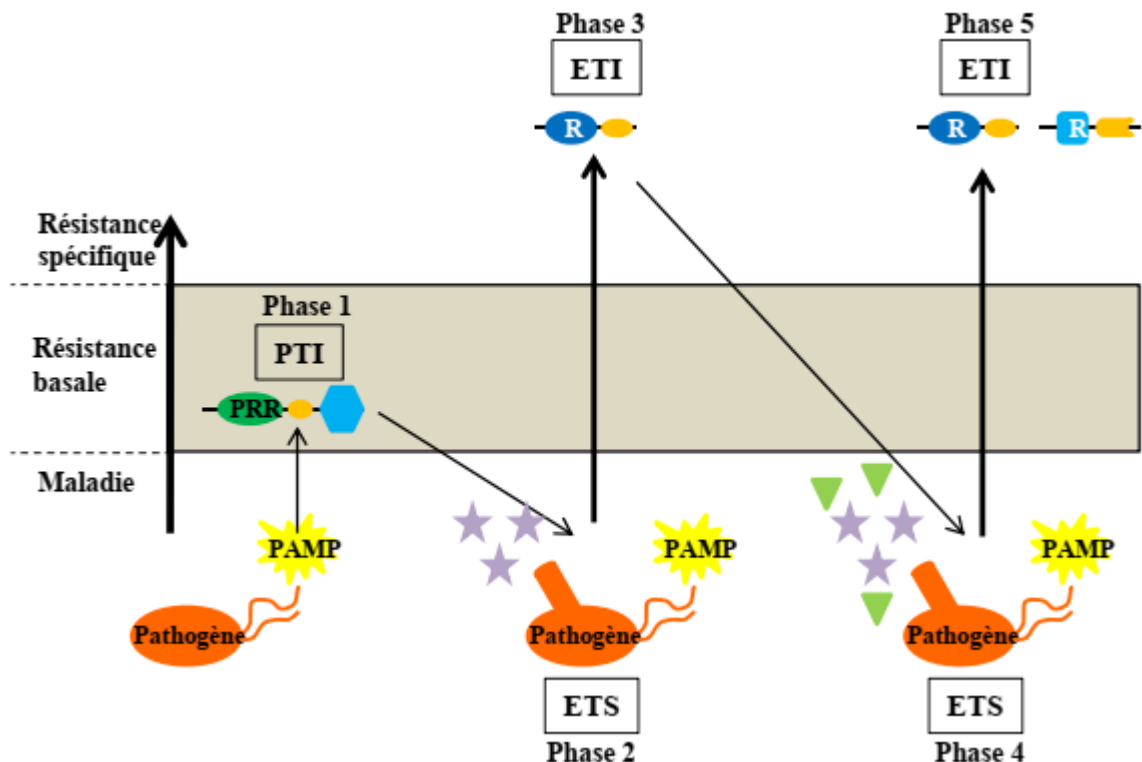


Figure 4 : L'évolution du système immunitaire des plantes en réponse à l'adaptation du pouvoir infectieux des agents pathogènes, selon le modèle en zigzag (Jones et Dangl, 2006).

La mort cellulaire programmée (PCD) joue un rôle clé dans les réponses des plantes aux agents pathogènes, déterminant le succès de l'infection en fonction du mode de vie de l'agent pathogène et du participant à l'interaction qui déclenche la mort cellulaire. Le rôle du gène Baxinhibitor-1 (BI-1) de l'orge (HvBI-1) a été étudié en détail dans l'interaction avec le champignon biotrophe *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Bgh), l'agent causal de l'oïdium de l'orge. HvBI-1 a été considéré comme un facteur de susceptibilité potentiel, car sa surexpression transitoire ou stable a favorisé la pénétration de Bgh dans les cellules épidermiques de l'hôte et le développement consécutif de pustules (Babaeizad et al., 2008; Eichmann et al., 2010). Cependant, lorsque HvBI-1 a été exprimée dans des carottes sensibles au *B. cinerea* nécrotrophe, elle a médié la résistance contre la mort cellulaire foliaire induite par le champignon (Imani et al., 2006). De plus, lorsque les mêmes lignées transgéniques de carotte ont été inoculées avec le pathogène hémibiotrophique *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*), les symptômes racinaires et la sporulation fongique ont été réduits (Imani et al., 2006). L'expression stable d'une protéine fluorescente verte (GFP)-HvBI-1 dans les feuilles de l'orge a limité le développement du *Fusarium graminearum* nécrotrophe, réduisant la sévérité de l'infection (Babaeizad et al., 2008). Dans ces cas, l'amélioration de la résistance aux agents pathogènes nécrotrophes ou hémibiotrophes par l'introduction de HvBI-1 a été associée à une réduction de la colonisation. Par conséquent, la surexpression de BI-1 semble faciliter la colonisation par les biotrophes, mais limite la colonisation par les nécrotrophes et les hémibiotrophes. En effet, les lignées transformées de tomate exprimant le gène cacao Baxinhibitor-1 (TcBI-1) ont une résistance accrue aux agents pathogènes nécrotrophes de la tomate *S. sclerotiorum*, *Sm. rolfsii* et *B. cinerea* (Scotton et al., 2017). Par conséquent, leurs données indiquent que l'expression constitutive de TcBI-1 module les réactions de mort cellulaire, avec une résistance accrue aux agents pathogènes nécrotrophes dans les feuilles des plantes transgéniques de tomate 'Micro-Tom' (MT) ce qui corrobore la fonction de TcBI-1 dans les réactions de mort cellulaire.

Le basidiomycète hémibiotrophique *Moniliophthora perniciosa* est l'agent causal de la maladie du balai de sorcière du cacao, une contrainte sérieuse pour la production en Amérique du Sud et dans les Caraïbes. Récemment, l'expression d'un gène anti-apoptotique du cacao affectant l'incidence et la sévérité de l'infection par *M. perniciosa* en utilisant la tomate 'Micro-Tom' (MT) comme modèle a été évaluée (Scotton et al., 2017). Après inoculation avec *M. perniciosa*, les lignées transformantes TcBI-1 ont montré une réduction significative de l'incidence de la maladie par rapport à MT. La surexpression de TcBI-1 semble affecter la

capacité des spores en cours de germination à pénétrer dans les tissus sensibles, restaurant une partie de la résistance non-hôte de MT contre le biotype S de *M. pernicioso* (Scotton et al., 2017).

I.4.1. Mécanisme de défense chez le cacaoyer

I.4.1.1. Interaction hôte agent pathogène

Chez le cacaoyer, au cours du parasitisme des fongiques parmi lesquels *P. megakarya*, les PMAP sont reconnus par les récepteurs des protéines kinases (“Receptor-Like protein Kinases : RLK”) de la plante. Cette interaction *P. megakarya*-RLK va induire l’activation des voies de signalisation cellulaire du cacaoyer qui conduira à l’activation des facteurs de transcription et l’expression des gènes de défenses (Ali et al., 2017; Téné et al., 2017; Zhang et al., 2015).

Cette reconnaissance stimule la transduction du signal dans les cellules végétales, ce qui active la transcription de gènes de défense. Dans un second temps, la signalisation de l’agent pathogène est relayée par des phytohormones, qui mettent en œuvre les mécanismes de résistance systémique acquise et de résistance systémique induite. La cascade de signalisation est régulée par l’activité des phytohormones telles que l’acide jasmonique, l’acide salicylique, l’éthylène, l’acide gibbérellique et l’auxine (Legavre et al., 2015).

I.4.1.2. Marqueurs moléculaires et enzymatiques de la défense du cacaoyer

Parmi les gènes exprimés par le clone tolérant du cacaoyer pendant la première heure post-inoculation, Tc09_g013630 code une protéine de choc thermique d’une taille de 70 kDa (HSP-70). Les expériences de q-PCR ont également révélé un autre gène, Tc01_g030410, avec une induction courte et forte à 8 h après l’inoculation dans PNG-R. En revanche, Tc01_g030410 n’a jamais été exprimé dans PNG-S. Ce gène codait pour un transporteur ABC, une protéine transmembranaire, appartenant à une grande famille génique et présente dans tous les organismes (Legavre et al., 2015). Chez les plantes, les transporteurs ABC sont décrits, entre autres, comme étant impliqués dans la sécrétion d’antifongiques (Kang et al., 2011). De plus, la plupart de ces gènes codant pour les transporteurs ABC sont également induits par l’acide jasmonique, une phytohormone impliquée dans les réponses de défense locales et systémiques aux attaques des agents pathogènes (Santino et al., 2013). La stimulation précoce de l’expression des gènes des transporteurs ABC du cacao dans PNG-R, afin de sécréter des

métabolites secondaires antifongiques et de neutraliser l'agent pathogène au site d'inoculation, pourrait expliquer une partie de la résistance (Legavre et *al.*, 2015).

L'analyse à l'échelle du génome de la famille des TF WRKY du cacao, l'identification d'un ensemble complet et non redondant de gènes WRKY de cette espèce (localisation chromosomique, analyses phylogénétiques et de motifs pour des études génomiques comparatives ultérieures) ont été récemment rapportées (Silva Monteiro et *al.*, 2017). De plus, l'expression des gènes WRKY dans les cacaoyers infectés (ou non) par le champignon pathogène *M. perniciosa* a également été étudiée. Parmi les 61 protéines TcWRKY identifiées, certaines (WRKY28, WRKY40, WRKY54 et WRKY70) ont été potentiellement impliquées dans la réponse du cacao à *M. perniciosa* et peuvent être considérées comme de bons candidats pour des analyses fonctionnelles ultérieures ou pour la gestion de la maladie. Le gène TcWRKY40 a montré une forte abondance de transcription dans la variété de cacao sensible. Chez *Arabidopsis* des études ont montré que les TFs WRKY18, WRKY40 et WRKY60 sont induits par les agents pathogènes et la surexpression constitutive de ces gènes y a augmenté sa susceptibilité à *B. cinerea* (Xu et *al.*, 2006). De plus, la surexpression de WRKY40 dans des plantes transgéniques de *Populus trichocarpa* a conféré une forte sensibilité au champignon hémibiotrophique *Dothiorella gregaria* Sacc, indiquant que PtrWRKY40 joue un rôle négatif dans la résistance à ce champignon héli-biotrophe chez le peuplier (Karim et *al.*, 2015). Le knock-out d'OsWRKY28 par insertion d'ADN-T a conduit à une augmentation de deux fois la résistance à un champignon compatible de la pyriculariose du riz, et ce phénotype a été accompagné d'une expression accrue de plusieurs gènes liés à la défense (Delteil et *al.*, 2012). De même, d'autres auteurs ont montré que la surexpression de OsWRKY28 a entraîné une sensibilité accrue au champignon de la pyriculariose du riz *Magnaporthe oryzae* et une diminution de l'accumulation de PR-5 (Chujo et *al.*, 2013).

La coopération des gènes AtWRKY54 et AtWRKY70 en réponse à des stress biotiques et abiotiques a été rapporté par plusieurs travaux (Besseau et *al.*, 2012; Li et *al.*, 2013) indiquant leurs effets régulateurs positifs de la défense des plantes et comme régulateurs négatifs de la biosynthèse de l'acide salicylique (SA) et de la sénescence (Li et *al.*, 2013), mais ne sont pas sensibles à des signaux tels que les ROS (Besseau et *al.*, 2012). La TF WRKY70 TF a été identifiée comme un intégrateur dans le dialogue entre l'acide salicylique (AS) et l'acide jasmonique (AJ), deux hormones ayant une fonction bien définie dans la régulation de la réponse de défense des plantes (Shim et *al.*, 2013). En général, l'AS est généralement associé à la réponse de défense contre les agents pathogènes biotrophes, tandis que l'AJ a une fonction

dans les réponses de défense contre les herbivores et les nécrophages (Shim *et al.*, 2013). Il serait intéressant d'établir le rôle de ces facteurs de transcription dans l'interaction entre *T. cacao* et *P. megakarya*.

L'hypothèse selon laquelle l'interaction entre *T. cacao* et *M. perniciosus* (pathogène) active la défense médiée par l'AJ et les marqueurs génétiques associés a été identifiée en utilisant les génotypes tolérants et sensibles traités avec l'hormone (Litholdo *et al.*, 2015). L'accumulation des transcrits des gènes a par conséquent révélé que TcAOS, TcOPR3 et TcAOC qui codent des enzymes clé de la voie AJ sont induits par le traitement.

Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal. Ils sont soit libres, soit liés aux glucides (glucose, rhamnose, mannose, galactose) et localisés dans les vacuoles. Ce sont des substances connues pour leur potentiel antifongique et antimicrobien (Boudjeko *et al.*, 2007; Ewané *et al.*, 2012 ; Simo *et al.*, 2014). Les principales classes de composés phénoliques sont : les phénols simples (catéchol, résorcinol), les acides hydrobenzoïques (acide salicylique, acide gallique), les acides hydroxycinnamiques (acides feruliques), les flavonoïdes, les hydroxycoumarines, les lignanes et les polyflavanes. Ces composés jouent un rôle important dans le métabolisme, mais aussi dans la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques (Dicko *et al.*, 2006; Ewané *et al.*, 2020b).

L'implication des différentes classes des composés phénoliques comme des marqueurs de résistance dans l'interaction *T. cacao* avec *P. megakarya* à l'instar des isoflavones, des composés dérivés de la lutéoline, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et les proanthocyanidines a été démontrée par plusieurs auteurs (Boudjeko *et al.*, 2007; Manga *et al.*, 2018). Ils peuvent agir comme phytoanticipines (phénols constitutifs), phytoalexines (phénols induits), barrières structurales (précurseurs de la synthèse de la lignine) et/ou activateurs de l'expression des gènes de défense (acide salicylique). A cet effet plusieurs gènes sont impliqués dans la régulation de l'expression des composés phénoliques parmi lesquels le gène TcMYBPA. Par ailleurs, l'existence d'une corrélation directe entre le degré de résistance du cacaoyer contre la pourriture brune et la teneur élevée en composé phénolique flavonoïdes (sinapoylcholine dimère isomère I, pro-anthocyanidine), en isoflavones (Genisteine 4',7-O-diglucosidemethylmalonylated, Quercetine 3-o-glucoside-7-orhamnoside,) et en flavonols

(Isorhamnetin 3-glucoside-7-rhamnoside) avant et après infection a été démontrée (Effa et *al.*, 2016; Manga et *al.*, 2018; Téné et *al.*, 2017; 2019).

Les polyphénol-oxydases (PPO)

Les polyphénol-oxydases (PPO) sont un groupe d'enzymes d'oxydoréduction cuivrées qui catalysent deux réactions à savoir l'hydroxylation des mono-phénols en o-diphénols et l'oxydation des o-diphénols en quinones. Les quinones sont toxiques pour les agents pathogènes. Ces dernières se polymérisent spontanément pour donner la lignine. L'augmentation de l'activité des PPO peut résulter de l'augmentation du taux de substances phénoliques qui participent aux réactions de défense de l'hôte. Par leur capacité à produire les quinones, les PPO font partie des armes défensives des plantes vis-à-vis des agents pathogènes à l'instar du cacaoyer dans la résistance contre la pourriture brune (Effa et *al.*, 2016; Ondobo et *al.*, 2013).

En effet, l'activité PPO répond à la production des espèces oxygénées réactives qui sont produites en excès et est souvent soutenue par d'autres peroxydases (Ondobo et *al.*, 2013). L'application foliaire des stimulateurs de défense chez le cacaoyer induit l'accumulation des ROS, l'activité PPO ainsi que les produits de la peroxydation lipidique qui jouent un rôle important dans la réaction d'hypersensibilité. Les PPO sont aussi les tyrosinases et des catéchol oxydases présents chez les végétaux, qui produisent le peroxyde d'hydrogène toxique pour les plantes. Les polyphénol-oxydases et les peroxydases présentent des actions synergiques et complémentaires au cours du processus du développement et des réactions de défense chez les plantes. Elles contribuent à la lignification des cellules tout en participant à l'édification des barrières structurales pour empêcher la progression de l'agent pathogène (Zhang et *al.*, 2015).

Les PR protéines

La transduction des signaux de défense aboutit à la surexpression des gènes de défense qui inhibent le développement de l'agent pathogène. Ils sont généralement regroupés sous l'appellation de protéines liées à la pathogenèse (*PR proteins*). Des 17 familles de protéines PR, le cacaoyer possède 15 d'entre elles mais toutes ne sont pas régulées dans l'interaction de la plante avec l'agent pathogène *P. megakarya* (Ali et *al.*, 2017) . Nous pouvons ainsi citer les

peroxydases, les chitinases et les glucanases qui sont mis en avant dans cette interaction (Ali et al., 2017; Téné et al., 2017; Zhang et al., 2015).

Les peroxydases ou PR-9 sont des enzymes susceptibles de catalyser des réactions d'oxydations de divers substrats (composés phénoliques) en des produits toxiques pour l'agent pathogène en utilisant le peroxyde d'hydrogène et aussi, interviennent dans le renforcement de la paroi végétale en favorisant l'établissement des liaisons entre ses différents composants. Après application foliaire des stimulateurs de défense chez le cacaoyer, il a l'induction de l'accumulation des ROS ainsi que des produits de la peroxydation lipidique qui jouent un rôle important dans la réaction d'hypersensibilité (Zhang et al., 2015).

Les B-1,3-glucanases (PR-2) tout comme les chitinases (PR-3 regroupant les Chitinases de type I, II, IV, V, VI, et VII) peuvent bloquer la croissance des hyphes et elles libèrent les éliciteurs des champignons qui à leur tour induisent la biosynthèse des gènes de défense chez l'hôte. Ceci se fait grâce aux actions de ces enzymes sur la paroi fongique et principalement sur la liaison entre C1 et C2 de deux monomères consécutifs de N- acétyl -Dglucosamine de la molécule de chitine pour les chitinases et la liaison β -1,3-glucosidique des β -1,3-glucanes pour les glucanases. Lorsque les plantes sont infectées par l'agent pathogène, leur teneur augmente exponentiellement de manière locale ou systémique. (Ali et al., 2017; Téné et al., 2017). Après application foliaire des stimulateurs de défense chez le cacaoyer, il a une expression accrue des gènes codant pour la β -1,3-endoglucanase basic (isoforme vacuolaire), l'endochitinase (PR3P) et l'endochitinase PR4 (PR3Q) (Zhang et al., 2015).

Au-delà de la réaction de défense locale, l'activation des PR protéines distants participent à la résistance systémique acquise. En opposition à la résistance systémique acquise qui est associée à la protection contre des agents pathogènes biotrophes et dépend de l'acide salicylique (SA), la résistance systémique induite est associée à la protection contre des agents pathogènes nécrotrophes et intervient également dans l'établissement de la réponse systémique induite. Ce processus se déroule suite à la perception de bactéries non pathogènes (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*), regroupées sous le terme de *Plant Promoting Growth Rhizobacteria* (Pieterse et al., 2009). Cependant, il arrive que l'arsenal de défense soit insuffisant pour stopper les bioagresseurs d'où la nécessité d'une action externe pour protéger les plantes vulnérables.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Les fruits de cacao hybrides SCA12xSNK16 (Photo 8A) et les clones SNK10 (Photo 8B) et SNK413 (Photo 8C) qui ont été utilisés provenaient du parc à bois du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé 1, à Nkolbisson (région du centre Cameroun).



Photo 8 : Fruits de cacao ; A : fruits mûrs de SCA12xSNK16 ; B : chérelles de 8 semaines de SNK10 ; C : chérelles de 8 semaines de SNK413 (Photo Foka, 2019).

Le matériel végétal qui a été utilisé pour la formulation du biopesticide a été constitué de :

- Graines séchées et décortiquées de neem (Photo 9), provenant de la région de l'Extrême Nord du Cameroun, précisément dans la ville de Maroua.



Photo 9 : Graines de neem sèches ou en germination ? (Photo Foka, 2018).

- L'herbe sida (Photo 10), provenant de la région du Centre du Cameroun, précisément de Yaoundé.



Photo 10 : Plant d'herbe sida âgé de 4 mois (Photo Foka, 2022).

- La citronnelle (Photo 11), provenant de la région du Centre du Cameroun, précisément de Mfou.



Photo 11 : Pieds de citronnelle en champ (Photo Foka, 2019).

II.1.2. Matériel organique

Le matériel organique qui a été utilisé pour la formulation du biopesticide a été constitué des coquilles d'huîtres (Photo 12), provenant de la région du Littoral du Cameroun, précisément dans la ville de Mouanko.



Photo 12 : Coquilles d’huître broyées grossièrement (Photo Foka, 2019).

II.1.3. Matériel fongique

Les souches de *Phytophthora megakarya*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, et *Phytophthora infestans* qui ont été utilisées provenaient de la banque des souches du Laboratoire de Phytoprotection et de Valorisation des Ressources Génétiques (Centre de Biotechnologie de Nkolbisson) dans la ville de Yaoundé (Photo 13).

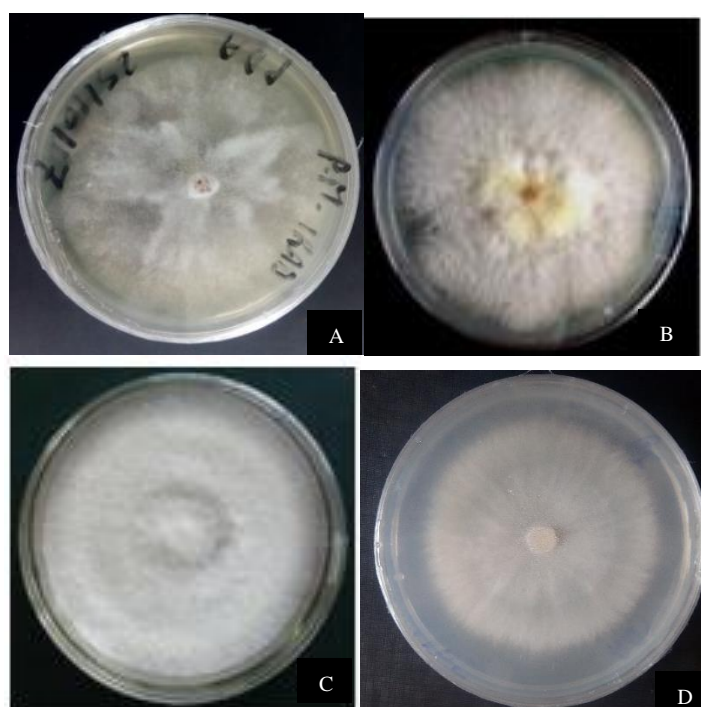


Photo 13 : Matériel fongique : (A) *Phytophthora megakarya*, (B) *Fusarium oxysporum*, (C) *Pythium myriotylum*, (D) *Phytophthora infestans* (Photo Foka, 2017).

II.2. Méthodes

II.2.1. Extractions des intrants de la formulation biopesticide

- Extractions des intrants contenus dans les amandes de neem

L'huile de neem (Nh) et l'extrait aqueux de tourteau de neem (Nea) ont été obtenus d'après le protocole modifié de Lesueur (2006). En effet, 1 kg d'amandes de graines de neem a été broyé avec un blinder électrique. La poudre obtenue a été mise sous pression manuelle en présence de 100 mL d'eau distillée. L'huile a été obtenue par pétrissage de la pâte, sur un plateau incliné de 30° par rapport à l'horizontal pour favoriser l'écoulement de celle-ci. Nh a été stockée dans un flacon opaque à température ambiante pour des utilisations ultérieures.

Le tourteau obtenu précédemment a servi de substrat pour l'extraction solide /liquide par infusion dans l'eau distillée. En effet, 500 g de tourteau d'amande de neem a été introduit dans un réacteur opaque de 10 L, ensuite 1500 mL d'eau distillée chauffée à 50 °C ont été introduits dans le réacteur. Le milieu a été homogénéisé et laissé reposer pendant 3 h. Le surnageant du milieu a été récupéré par filtration à l'aide du papier filtre N°4. L'extraction a été infusée trois fois pour maximiser l'extraction. Le filtrat a été séché à 45 °C et stocké dans un flacon opaque pour des utilisations ultérieures.

- Extraction de l'intrant contenu dans l'herbe sida

L'extrait hydroalcoolique a été obtenu d'après le protocole modifié de Kuate et *al.* (2011). En effet la plante a été séchée et 100 g de poudre ont été extraits par infusion dans 1,5 L d'une solution hydroalcoolique (éthanol à 30%) pendant vingt-quatre heures. Le filtrat a été récupéré par filtration puis, séché à 80 °C et stocké dans un flacon opaque pour des utilisations ultérieures.

- Extraction de l'intrant contenu dans les coquilles d'huîtres

Le calcium de la formulation provenant des coquilles d'huître a été obtenu d'après le protocole modifié de Gaonkar et Innovative (2016). En effet, 1 Kg de coquilles d'huître a été lavé à l'eau du robinet, séché pendant 24 heures à température ambiante. Ces coquilles ont été séchées à l'étuve à 200 °C pendant trois heures et broyées après refroidissement. La poudre obtenue a été dissoute dans du HCl concentré dans les proportions 1/10 (m/V). Le surnageant a été récupéré par filtration, séché à l'étuve à 115 °C et stocké dans un flacon en attente d'utilisation ultérieure.

- Extraction de l'intrant contenue dans la citronnelle

L'huile essentielle de citronnelle (CEO) a été obtenue d'après le protocole de Tchoumboungang et *al.* (2009) par hydrodistillation utilisant un dispositif de type Clevenger. En effet, 0,5 kg de citronnelle fraîche a été introduit dans un ballon et immergée avec de l'eau. Ce mélange a été ensuite porté à 80 °C. Les vapeurs hétérogènes ont été condensées dans la partie de refroidissement et se sont déposées dans un compartiment, permettant ainsi l'obtention de deux phases. L'huile essentielle a été recueillie grâce à la différence de densité et filtrée sur une colonne de sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau résiduelles. L'huile essentielle ainsi obtenue a été conservée dans un flacon opaque à 4 °C. Le rendement d'extraction a été exprimé en pourcentage et calculé par rapport au poids du matériel végétal frais avant extraction selon la formule :

$$\text{Rdt HE} = \frac{VHE}{MVF} \times 100$$

Rdt HE: Rendement en huile essentielle (%); VHE: Volume d'huile essentielle (ml)
MVF: Masse de matériel végétal frais (g)

II.2.2. Formulation

La formulation a été effectuée en trois étapes successives.

II.2.2.1. Première étape de la formulation

Les essais de formulation de cette étape ont été basés sur une matrice quasi expérimentale en absence de CEO. Les éléments utilisés dans des proportions variables ont été Nh, Tween 80 (Tw), Nea et Seth tandis que le HCa a été celui utilisé dans une proportion constante (Tableau III). Les proportions (v/v) de Nh ont été 6%, 9% et 12%; celle du Tw ont été 0%, 1%, 3%, 6%, 9%, 12%, 18%, 21% et 24%; la teneur (m/v) en Nea et Seth ont été 0%, 9% et 18%; et celle de HCa a été 6%. Cette matrice quasi expérimentale a été groupée en trois parties comme suit :

- Variation de Nh et l'émulsifiant Tween 80 (Tw) tandis que les quantités de Nea, Seth et HCa ont été constantes ;
- Variation uniquement de la quantité de Tween 80 en absence de Seth tandis que les composantes Nh et HCa ont été constantes ;
- Variation uniquement de la quantité de Tween 80 en absence de Nea tandis que les composantes Seth et HCa ont été constantes (Table III).

Les émulsions ont été obtenues par mélange de la fraction aqueuse homogène, au Tw et au Nh avant homogénéisation pendant une minute.

La stabilité des micelles formées a été évaluée en observant pendant 48 h l'émulsion obtenue dans le tube à essai hermétiquement fermé à 25 °C. Après ce temps d'observation, la stabilité de chaque essai a été déterminée en utilisant l'échelle qui suit :

- 0%= Flocculation d'huile >>> Très instable;
- 25%= laiteux et flocculation d'huile >>> Instable;
- 50%= laiteux et flocculation d'huile et de crème >>> Peu stable;
- 75%= laiteux et flocculation de crème >>> Stable;
- 100%= laiteux >>> Très stable.

Grâce aux résultats de la première étape de formulation les essais 1C, 9C, 8X et 8Y ont été exploités pour réaliser la seconde étape de formulation.

II.2.2.2. Deuxième étape de la formulation

La sélection des meilleures proportions de Tw, Nea et Seth permettant d'obtenir une formulation stable et active a été faite sur la base d'une matrice de mélange Simplex-lattice à quatre facteurs (Tableau IV). La deuxième étape de formulation a été effectuée en utilisant les essais de formulation 1C, 8X, 8Y et 9C de l'étape de formulation précédente (Tableau IV). Les quantités de Tw, Nea et Seth ont été variables tandis que celles de Nh et HCa ont été constantes (Tableau V).

La stabilité des mélanges de la Simplex-lattice a été notée après 48 h et leur activité antifongique (inhibition du développement mycélien de *Fusarium oxysporum*) à 20% ont été déterminées. Le pourcentage d'inhibition (% I) de la croissance a été calculé pour chaque concentration utilisant la formule ci-dessous (Pandey *et al.*, 1982).

$$\%I = (\text{diamètre de croissance du contrôle} - \text{diamètre de croissance du traitement}) \div \text{diamètre de croissance du contrôle} \times 100$$

La stabilité et l'activité des mixtures ont été utilisées pour les modélisations en fonction des composantes du mélange 1C, 8X, 8Y et 9C grâce au logiciel « STATISTICA 10 ».

Tableau III : Données de l'expérimentation quasi expérimentale.

Codes des essais	Nh (v/v %)	Tw (v/v %)	Nea (m/v %)	Seth (m/v %)	HCa (m/v %)
1A	6	0	9	9	6
2A	6	1	9	9	6
3A	6	3	9	9	6
4A	6	6	9	9	6
5A	6	9	9	9	6
6A	6	12	9	9	6
7A	6	18	9	9	6
8A	6	21	9	9	6
9A	6	24	9	9	6
1B	9	0	9	9	6
2B	9	1	9	9	6
3B	9	3	9	9	6
4B	9	6	9	9	6
5B	9	9	9	9	6
6B	9	12	9	9	6
7B	9	18	9	9	6
8B	9	21	9	9	6
9B	9	24	9	9	6
1C	12	0	9	9	6
2C	12	1	9	9	6
3C	12	3	9	9	6
4C	12	6	9	9	6
5C	12	9	9	9	6
6C	12	12	9	9	6
7C	12	18	9	9	6
8C	12	21	9	9	6
9C	12	24	9	9	6
1X	12	0	18	0	6
6X	12	12	18	0	6
8X	12	21	18	0	6
1Y	12	0	0	18	6
6Y	12	12	0	18	6
8Y	12	21	0	18	6

Tw: Tween 80; Nea: extrait aqueux du tourteau de neem; Seth: extrait hydroalcoolique de l'herbe sida; Nh: huile de neem; HCa: extrait calcique.

Tableau IV : Matrice des différents mélanges à partir des émulsions

Intrants	Mixtures														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1C (mL)	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.625	0.125	0.125	0.125	0.25
8X (mL)	0	1	0	0	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0.125	0.625	0.125	0.125	0.25
8Y (mL)	0	0	1	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0.215	0.125	0.625	0.125	0.25
9C (mL)	0	0	0	1	0	0	0.5	0	0.5	0.5	0.125	0.125	0.125	0.625	0.25

Tableau V : Matrice des mélanges à partir des extraits des plantes

B Éléments	Mixtures														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tw (v/v)	0	21	21	24	10.5	10.5	12	21	22.5	22.5	8.25	18.75	18.75	20.25	16.5
Nea (v/v)	9	18	0	9	13.5	4.5	9	9	13.5	4.5	9	13.5	13.5	13.5	9
Seth (m/v)	9	0	18	9	4.5	13.5	9	9	4.5	13.5	9	13.5	13.5	13.5	9
Nh (m/v)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
HCa (m/v)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tw: Tween 80; Nea: extrait aqueux du tourteau de neem; Seth: extrait hydroalcoolique de l'herbe Sida; Nh: Huile de neem; HCa: extrait calcique.

Sur la base des modèles de stabilité et d'activité vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, la mixture 4 (émulsion 9C ou BF), a été sélectionnée pour la détermination de ses caractéristiques.

Le diamètre des micelles a été déterminé au microscope photonique au grossissement 400x et 1000x à l'aide de l'hématimètre de Neubaur.

Évaluation de la stabilité thermodynamique de l'émulsion BF

Le pH et la conductivité de BF ont été déterminés grâce au pH-mètre au préalable avant la détermination de sa stabilité thermodynamique.

La stabilité thermodynamique de la BF a été évaluée en utilisant le protocole modifié de Dhivya et al. (2019), qui consiste à observer l'effet de la gravité et/ou de la température sur la stabilité. En effet, BF a été centrifugée d'une part à 1 000 g et 10 000 g pendant 30 minutes à 25 °C pour observer la séparation des phases. D'autre part, la BF a été mise au bain-marie pendant 6 h puis à température ambiante pendant 18 h ; le cycle étant répété trois fois avant observation de la séparation des phases.

II.2.2.3. Troisième étape de la formulation

Cette étape de formulation a consisté à corriger le pH de la formulation BF précédente et à améliorer l'activité antimicrobienne de celle-ci. Au cours de cette phase la BF a été optimisée en OBF par correction du pH à l'aide de l'oxide de calcium (CaO) dans les proportions 0% ; 15%, 16,67%, 25% et 33,33% (m/m). De plus, l'effet de divers procédés de production sur les micelles a été évalué et celle permettant d'obtenir celles-ci sans coalescence a été retenue pour obtenir OBF. Ces procédés ont été :

- Tw + Nh, homogénéisation ; ajout de la phase aqueuse (ayant Nea, Seth, HCa et CaO), homogénéisation pendant 10 min.

Les autres procédés entraînaient la coalescence et elles consistaient à :

- phase aqueuse (ayant Nea, Seth, HCa et CaO) ; ajout de Tw et Nh puis, homogénéisation pendant 10 min.
- phase aqueuse (ayant Nea, Seth, HCa et CaO) ; ajout de Tw et homogénéisation ; ajout de Nh et homogénéisation pendant 10 min.

La formulation OBF a été optimisée en OBF' par substitution de 1/10 de celle-ci par l'huile essentielle de citronnelle (CEO) et homogénéisation du mélange.

Les diamètres des micelles de OBF et OBF' ont été déterminés au microscope photonique au grossissement 400x et 1 000x à l'aide de l'hématimètre de Neubeaur.

Évaluation de la stabilité thermodynamique de OBF et OBF'

La stabilité thermodynamique de OBF et OBF' a été évaluée en utilisant le protocole modifié de Dhivya et *al.* (2019) décrit précédemment.

II.2.2.4. Évaluation de l'effet antifongique *in vitro* des émulsions BF, OBF et OBF'

L'activité antifongique des émulsions BF, OBF et OBF' a été évaluée sur quatre agents pathogènes fongiques (*Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* et *Phytophthora megakarya*) d'après le protocole de Scorzoni et *al.* (2007). En effet, les activités des émulsions BF et OBF aux concentrations 20% et 10% (v/v), ont été déterminées par culture de ces agents pathogènes fongiques en boites de Pétri (8,5 cm de diamètre) sur milieu PDA. Chaque concentration a été évaluée en triplicata. Par ailleurs, l'émulsion OBF' a été évaluée au

concentrations 10%, 1% et 0,1%. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés comme précédemment décrit.

II.2.2.5. Exploration des potentiels mécanismes d'action de la bioformulation OBF' vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*

II.2.2.5.1. Mesure de l'activité de la bioformulation OBF' sur l'intégrité de la membrane

L'effet lytique de la bioformulation a été évalué d'après le protocole modifié de Limsuwan et Voravuthikunchai (2013). En effet, les zoospores produites sur cabosse en sept jours ont été utilisées pour préparer la suspension des spores (1 000 cellules/mL dans de l'eau physiologique). Les milieux ayant 1% (1CMI) et 2% (2CMI) de OBF' ont été préparés avec la suspension des spores. Le contrôle a été constitué de spores sans OBF'. Les mélanges obtenus ont été incubés à 26 °C sous agitation. Les absorbances ont été mesurées à 620 nm contre la solution saline au temps 0h, 3h, 6h, 9h et 24h.

II.2.2.5.2. Effet de la bioformulation OBF' sur la synthèse des protéines

L'effet de la bioformulation OBF' sur la synthèse des protéines a été déterminé d'après le protocole décrit par Kalia *et al.* (2009). Pour la mise en œuvre, dans trois tubes contenant chacun 9 mL de PDB, 0,5 mL de la suspension des spores (1 000 cellule/mL) a été introduit. OBF' a été ensuite ajoutée pour avoir 1CMI, 2CMI et un volume total de 10 mL. Dans le milieu contrôle, OBF' a été remplacé par de l'eau physiologique. Les tubes ont été incubés à une température de 26 °C avec une rotation de 80 tours/minute. Les mycéliums ont été récupérés après 24 h d'incubation par centrifugation à 4 000 g pendant 6 min. Les mycéliums obtenus ont été pesés et mélangés avec le tampon d'extraction (tampon tris-maleate 10 mM, pH 7,2) en raison de 40 mg de mycélium pour 500 µL de tampon. Après dix minutes d'homogénéisation, une centrifugation à 4000 g pendant 4 min a permis de récupérer le surnageant contenant les protéines. Les teneurs en protéines ont été déterminées selon la méthode de Bradford (1976).

Principe

La méthode décrite par Bradford, (1976) permet de déterminer la concentration des protéines grâce à la réaction colorimétrique entre les protéines et le réactif de Bradford (bleu de Coomassie G250) de coloration brun clair. En effet, en présence des protéines, le bleu de Coomassie G250 réagit avec les résidus hydrophobes d'acides aminés des protéines induisant ainsi un changement de coloration du milieu réactionnel qui vire au bleu absorbant à 595 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des résidus protéiques dans le milieu.

Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, ont été introduits successivement : 10 µL d'extrait, 490 µL d'eau distillée et 500 µL de réactif de Bradford. Le mélange a été incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 15 min et la densité optique (D.O) a été mesurée à 595 nm à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV- 1605, UV-visible), contre un contrôle (blanc) dans lequel l'extrait a été remplacé par de l'eau distillée. Pour chaque extrait, l'expérience a été réalisée en tripliqué et les concentrations en protéines présentes ont été exprimées en µg en équivalence de BSA/g de matière fraîche (MF) en référence à une extrapolation sur la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons en utilisant le BSA (*Bovine Serum Albumine*) à 0,1 mg/mL.

II.2.2.5.3. Effet de la bioformulation sur les pompes ATPases-H⁺ de *P. megakarya*

L'évaluation de l'effet inhibiteur de la bioformulation sur les pompes à protons a été faite par le suivi du pH du milieu de la suspension des spores d'après le protocole modifié de Manavathu *et al.* (2001).

Principe

Ce protocole est basé sur l'inhibition de l'acidification du milieu en présence d'extrait ayant un effet inhibiteur sur le fonctionnement des pompes ATPases-H⁺ par ajout du glucose dans le milieu réactionnel.

Mode opératoire

La mise en œuvre de cette activité a été effectuée avec une suspension des spores 1 000 cellules/mL ayant 3 h dans le PDB. Après 24 h d'incubation à 26 °C sous agitation au shaker incubateur, la suspension a été centrifugée à 3 000 tr/min pendant 30 min à 4 °C. Le culot a été lavé à l'eau distillée puis au KCl 50mM et re-suspendu dans 50 mL de KCL 50 mM. La suspension a été ensuite conservée à 4 °C pendant 18 h et le pH a été ajusté à 6,4 par ajout de HCL et de NaOH au besoin. Pour la suite, 9 mL de cette suspension ont été préparés en utilisant 8 mL de celle-ci et ajout de OBF' et H₂O pour obtenir les concentrations 0%, 0,5% 1% et 2%. L'acidification du milieu a été déclenchée par l'ajout de 1 mL d'une solution de glucose 20%. Les pH des milieux ont été mesurés toutes les 15 minutes pendant 1h15 min. Le contrôle négatif a été celui ayant 0% de OBF'.

II.2.3. Détermination de l'effet de la bioformulation OBF' sur la production de plantules de cacaoyer

II.2.3.1. Effet phytotoxique de la bioformulation OBF' sur le cacaoyer

La sensibilité des plants de cacaoyer vis-à-vis de la bioformulation OBF' a été évaluée d'après le protocole modifié de Zhang *et al.* (2015) sur feuilles détachées et non-détachées.

Effet phytotoxique de la bioformulation OBF' sur les feuilles détachées

La tolérance de la formulation par les feuilles détachées de cacaoyer de l'hybride SCA12xSNK413 a été déterminée sur les feuilles détachées au stage C de développement. Ces feuilles ont été détachées et réparties en 4 lots (TN, OBF'10%, OBF'1%, OBF'0,1%) de six feuilles par traitement, dans des plateaux tapissés de papier absorbant humidifié. 1 000 μ L et 200 μ L de chaque traitement ont été appliqués par 60 cm² de feuille pendant trois jours successifs grâce au spray. Les feuilles détachées ont été imbibées avec la formulation diluée au 1/5^e (OBF'10%), au 1/10^e (OBF'1%), 1/100^e (OBF'0,1%) et à l'eau distillée (TN). Ensuite, les signes de stress (brûlures et décolorations, déformation) ont été relevés sept jours après application (Photo 14). L'expérimentation a été réalisée trois fois successives.

L'échelle de scores de stress suivante a été utilisée :

- 0= pas de changement >>> non toxique ;
- 1= déformation >>> très peu toxique ;
- 2= décoloration >>> peu toxique ;
- 3= décoloration plus brûlure >>> modérément toxique ;
- 4= brûlure >>> très toxique.



Photo 14 : Dommage sur les feuilles détache au stade C : (A) pas de changement ; (B) Décoloration ; (C) Brulure. (Photo Foka, 2017).

Effet phytotoxique de la bioformulation OBF' sur les feuilles non-détachées

Les plantules ayant les feuilles à des étapes de développement différentes (A, B, C, D) ont été réparties en 4 lots (TN, OBF'20%, OBF'10%, OBF'1%) pour le test sur les feuilles non détachées. Ces feuilles, ont été traitées avec la formulation diluée au 1/5^e (OBF'20%), 1/10^e (OBF'10%) et 1/100^e (OBF'1%) pendant 3 jours successifs. Deux volumes de solution (1 000 µL et 200 µL par 60 cm²) ont été appliqués sur les feuilles par jour à l'aide d'un spray. Ensuite, l'observation des signes de stress a été effectuée sur sept jours après application des traitements (Photo 15).

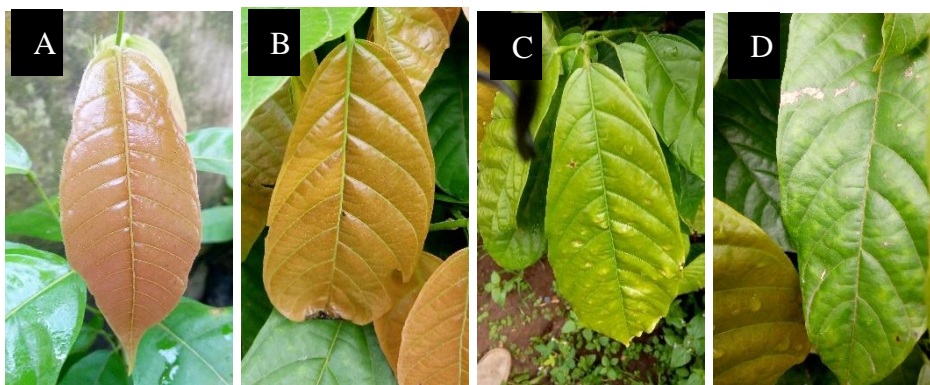


Photo 15 : Dommage sur les feuilles non-détachées : (A) pas de changement ; (B) Brûlure ; (C) déformation et décoloration; (D) Décoloration. (Photo Foka, 2017).

II.2.3.2. Évaluation de l'effet de la bioformulation OBF' sur la croissance des plantules de cacaoyer en serre

Détermination de l'effet de la bioformulation OBF' sur la germination et la levée des fèves fraîches de cacao

L'effet de la formulation sur la germination des fèves a été déterminé par le suivi de l'émergence de la radicule de la fève. En effet, les fèves de cacao issues des cabosses matures et mûres de l'hybride SCA12xSNK16 ont été démucilaginées. Le mucilage des fèves a été enlevé par lavage des fèves fraîches avec du sable fin et rinçage à l'eau, puis à l'eau distillée. Ces fèves fraîches ont été réparties en trois lots de 30 fèves et ont été trempées pendant 24 h dans les traitements d'eau (TN), de fongicide chimique à base de Diméthomorph (120g/kg) et d'oxyde de cuivre (600 g/kg) à 0,33% (TP) et de formulation OBF' à 1% (OBF'). Au bout de ce temps, l'excédent de la solution de traitement a été retiré et le nombre de fèves dont la radicule avait émergé, a été dénombré pendant 7 jours. L'expérimentation a été réalisée trois fois. Le pourcentage de germination des fèves par traitement a été calculé en utilisant la formule ci-dessous :

$$\% \text{Emergence} = \frac{\text{Nombre de fèves à radicule émergé}}{\text{Nombre total de fèves}} \times 100$$

L'effet de la formulation sur le développement racinaire au cours de la levée a été déterminé par le suivi de l'élongation racinaire après l'apparition de la radicule sur 14 jours dans une enceinte bien humidifiée. Par ailleurs, la masse fraîche de ces racines a été déterminée au 14^{ème} jour (Photo 16 D). Ensuite, le dosage de la teneur en protéines et en acide indole acétique (AIA) dans ces racines a été effectué d'après les protocoles de Bradford (1976) et de Bano et Musarrat (2003) respectivement.



Photo 16 : Traitement des fèves et suivi de l'émergence des radicules *in vitro* : (A) ecabossage ; (B) fèves demucilaginées ; (C) fèves tramées ; (D) fèves germées ayant quatorze jours. (Photo Foka, 2017).

L'extraction des protéines racinaires a été effectuée d'après le protocole modifié de Téné et *al.* (2017). En effet, 0.1 g de racine a été broyé à 4 °C dans 1 mL de tampon tris-maléate (10 mM, pH 7.2). Après broyage, le broyat a été homogénéisé pendant 10 min à 4°C et centrifugé pendant 25 min à 10000 g à 4°C à l'aide de la centrifugeuse « Beckmann-Coulter microfuge 20 R ». Le surnageant a été recueilli et conservé tandis que le résidu a été resuspendu dans 0,5 mL de tampon et centrifugé de nouveau à 10 000 g pendant 25 min à 4 °C. Le mélange des surnageants obtenus a constitué l'extrait protéique qui a été utilisé pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976) décrite précédemment.

L'extraction de l'acide indole acétique des racines a été effectuée dans l'acétate d'éthyle. En effet, 0.1 g de racine a été broyé à 4 °C dans 1 mL d'acétate d'éthyle. L'ensemble a été homogénéisé pendant 5 min à 4 °C et centrifugé pendant 5 min à 10 000 g à 4 °C. Le surnageant obtenu a constitué l'extrait qui a été utilisé pour le dosage de l'AIA selon la méthode de Bano et Musarrat (2003) utilisant le réactif de Salkowsky. Ainsi, 250 µL d'extrait ont été introduits dans un tube à essai contenant 0,5 mL du réactif de Salkowsky et 0,75 mL d'éthanol 95%. L'ensemble a été incubé à l'obscurité pendant 25 min. l'absorbance du mélange a été déterminée au spectrophotomètre à 530 nm contre le blanc où l'extrait est remplacé par l'acétate d'éthyle. Pour chaque extrait, l'expérience a été réalisée deux autres fois et les teneurs en AIA ont été exprimées en mg/g de matière fraîche (MF) en équivalence de AIA. La courbe

d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons en utilisant l'AIA à 2 mg/mL.

L'effet de la formulation sur la levée (émergence du substrat de production) des fèves ayant germé *in vitro* a été déterminé en utilisant un dispositif randomisé ayant 6 groupes de sachets contenant le mélange terre (2/3) et sable (1/3). En effet, les fèves germées issues des trois traitements (eau, fongicide chimique à 0,33% et formulation OBF' à 1%) ont été introduites dans les substrats stériles et non stériles repartis en six groupes (trois groupes stériles et trois autres non stériles). Les sachets ayant les plants émergés à 0,5 cm au-dessus du sol ont été considérés comme levés (Photo 17). Le dispositif expérimental complètement randomisé en serre a été réparti comme ci-dessous et chaque lot a été constitué de 26 sachets.

- ❖ Le lot Témoin Négatif stérile contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans de l'eau distillée (TS+TN) ;
- ❖ Le lot Témoin Positif stérile contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans le fongicide chimique à 0,33% (TS+TP) ;
- ❖ Le lot Essai stérile contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans la bioformulation OBF' à 1% (TS+OBF') ;
- ❖ Le lot Témoin Négatif non stérile contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans de l'eau distillée (TNS+TN) ;
- ❖ Le lot Témoin Positif non stérile contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans le fongicide chimique à 0,33% (TNS+TP) ;
- ❖ Le lot Essai non stérile contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans la bioformulation OBF' à 1% (TNS+OBF').

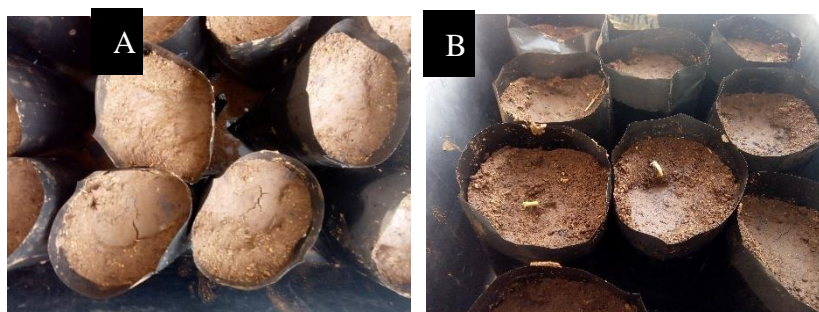


Photo 17 : Suivi de la levée des plantules dans les substrats terre plus sable (2/3) stérile et non stérile : (A) fèves non levées ; (B) fèves levées. (Photo Foka, 2017).

Détermination de l'effet de la bioformulation OBF' sur la croissance des plantules de cacaoyer

L'effet de la bioformulation sur la croissance des fèves germées et levées a été déterminé en utilisant un dispositif randomisé ayant 9 groupes de sachets. En effet, les fèves levées issues du dispositif expérimental de levée, ont été réparties en groupes non-infectés et infectés. Le dispositif expérimental du suivi de la croissance des plants a été complètement randomisé en serre et a été constitué de 9 groupes dont les six groupes précédents plus les trois groupes suivants :

- ❖ Le lot Témoin Négatif stérile infecté contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans de l'eau distillée (TS+PM+TN) ;
- ❖ Le lot Témoin Positif stérile infecté contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans le fongicide chimique à 0,33% (TS+PM+TP) ;
- ❖ Le lot Essai stérile infecté contenant le sol stérile et les fèves ayant germé dans la bio formulation OBF' à 1% (TS+PM+OBF').

L'inoculation des trois substrats ci-dessus a été faite à l'aide de la suspension des spores de *P. megakarya* (1.5×10^6 spore/mL), 10 mL/ pot, quatre semaines après la mise en culture des fèves.

Les plants des neuf groupes du dispositif expérimental ont été suivis régulièrement et arrosés tous les deux jours en serre pendant 16 semaines. Les plants des lots ayant les substrats stériles infectés ont été infectés trois semaines après la levée. A partir de la quatrième semaine, les plants ont été traités par application foliaire toutes les deux semaines avec 20 mL ($3.3 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) de formulation par lot tandis que les paramètres agronomiques (longueur et largeur des feuilles, hauteur de la tige) ont été pris toutes les quatre semaines. La surface foliaire a été calculée d'après la formule de Shi et al. (2019) ci-dessous :

$$\text{Surface foliaire} = (3.14/4) \text{ longueur} \times \text{largeur de la feuille}$$

Au bout du quatrième mois, six plants ont été sacrifiés dans chaque lot pour la prise des masses racines (poids frais et poids sec). En effet, les plants ont été enlevés des sachets et débarrassés de leur terre ; puis s'en est suivi le prélèvement des racines à 1 cm au-dessus de la dernière racine secondaire. Les racines ainsi obtenues ont été rincées à l'eau et essorées avant la prise du poids frais. Le poids sec a été mesuré après séchage des racines à 45 °C à l'étuve jusqu'à poids constant.

Détermination de l'effet de la bioformulation OBF' sur quelques marqueurs de croissance des plantules

➤ Sucres solubles

Les sucres solubles ont été extraits par décoction dans l'éthanol et quantifiés d'après le protocole décrit par Saha et Brewer (1994). En effet, 0.25 g de matériel biologique a été broyé dans 1 mL d'éthanol 80% puis chauffé à 60 °C pendant 10 min et centrifugé à 1 000 g pendant 5 min à 25 °C. Le résidu est extrait de nouveau en utilisant 2 mL d'éthanol 80% et centrifugé à 1 000 g pendant 10 min. L'ensemble constitue l'extrait brut contenant les sucres solubles totaux.

Principe

La méthode pour quantifier les sucres extraits est basée sur la propriété qu'ont les phénols à réagir avec les pentoses et les hexoses en milieu acide concentré. En effet, après addition d'acide sulfurique concentré dans un mélange sucre-phénol, la chaleur provoquée rompt les liaisons glycosidiques et favorise la formation des dérivés furfuraliques. Ces dérivés se condensent avec les phénols pour former un complexe jaune.

Mode opératoire

Le dosage des sucres solubles a été effectué en introduisant dans chaque tube:

- 25 µL d'extrait brut;
- 0,5 mL de phénol 5 % (P/V);
- 2,5 mL H₂SO₄ concentré.

Le mélange a été homogénéisé et incubé pendant 30 min à la température ambiante. La densité optique du complexe formé a été lue à 490 nm contre un blanc dans lequel l'extrait alcoolique a été remplacé par l'alcool 80%. La courbe d'étalonnage a été obtenue à partir d'une solution de glucose à 1 mg/L. Les teneurs en sucres solubles totaux sont exprimées en mg/g de matière fraîche.

➤ Protéines solubles

L'extraction des protéines a été réalisée selon le protocole modifié de Pirovani et *al.* (2008). En effet, 1 g de matériel végétal a été broyé à 4 °C dans 5 mL de tampon tris-maleate (10 mM, pH 7,2). Après broyage, le broyat a été homogénéisé pendant 2 min à 4 °C et le broyat a été centrifugé pendant 25 min à 10 000 g à 4 °C à l'aide de la centrifugeuse « Beckmann-Coulter microfuge 20 R ». Le surnageant a été recueilli et conservé tandis que le résidu a été resuspendu dans 3 mL de tampon et centrifugé de nouveau à 10 000 g pendant 20 min à 4 °C.

Le mélange des surnageants obtenus constitue l'extrait protéique qui a été conservé à -20 °C pour des utilisations ultérieures.

Le dosage des protéines totales dans les extraits obtenus a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976) décrit précédemment.

➤ **Chlorophylles**

L'extraction de la chlorophylle a été effectuée suivant le protocole modifié de Zinga et *al.* (2016). Les extraits chlorophylliens ont été obtenus par broyage des feuilles dans du mélange sable bicarbonate de calcium. En effet, 0,5 g de feuille a été broyé dans une pincée de sable et une pincée de bicarbonate de calcium. Le broyat a été introduit dans 3 mL d'éthanol 90°. Le mélange a été homogénéisé au vortex pendant 1 min et centrifugé à 10 000 g pendant 5 min. le surnageant a été récupéré et le culot a été resuspendu dans 2 mL d'éthanol, homogénéisé au vortex pendant 1 min et centrifugé. Les surnageants ont été mélangés et ont constitué l'extrait chlorophyllien. La teneur en chlorophylle a été déterminée au spectrophotomètre à 645 nm et 663 nm, contre l'éthanol. Les teneurs en chlorophylle A, B et totales ont été calculées en utilisant les formules de Lichtenthaler et Wellburn (1983) ci-dessous :

$$\text{Chl A} = 12,21(\text{Abs } 663) - 2,81(\text{Abs } 645) \text{ mg/mL}$$

$$\text{Chl B} = 22,13(\text{Abs } 645) - 5,03(\text{Abs } 663) \text{ mg/mL}$$

$$\text{Chl Totales} = \text{Chl A} + \text{Chl B} \text{ mg/mL}$$

Où Chl A= Chlorophylle A ; Chl B= chlorophylle B ; Chl T= Chlorophylle totale ; Abs= absorbance.

➤ **Peroxydases**

La détermination des activités peroxydasiques dans les extraits protéiques obtenues précédemment a été réalisée selon le protocole modifié de Baaziz et *al.* (1994).

Principe

Il repose sur l'oxydation du gaiacol par les peroxydases en tétragaïacol en présence de H₂O₂ d'après l'équation suivante :



Mode opératoire

Le milieu réactionnel a été constitué de 925 µL de tampon Tris-Maléate (10 mM, pH 7,2 et 0,2% de gaïacol), 25 µL d'extrait protéique, 50 µL de H₂O₂ 10%. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 3 min. L'activité a été mesurée en suivant la formation du tétragaïacol à 470 nm à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV-1605, UV-visible) contre le blanc, où l'extrait a été remplacé par de l'eau distillée. L'activité enzymatique a été exprimée en unité enzymatique par gramme de matière fraîche (Abs à 470 nm/min/g de matière fraîche) et calculée selon la formule ci-dessous :

$$AE = \Delta Abs / (\Delta t * MF)$$

Avec : Abs=Absorbance ;

t= temps ;

MF= masse de la matière fraîche ;

Δ= variation.

II.2.4. Évaluation de l'effet de la bioformulation OBF' sur les défenses des plants de cacaoyer

II.2.4.1. Inoculation et évaluation de la sévérité de la maladie sur feuilles détachées des plants SCA12xSNK16

Le degré de résistance des plants a été évalué sur des feuilles détachées et disques de feuilles d'après le protocole de Nyassé *et al.* (1995) par mesure de la sévérité de l'infection de ceux-ci. En effet, les feuilles au stade de développement C, issues des différents traitements précédents ont été collectées à 12 semaines et réparties aléatoirement en deux groupes (groupe des feuilles infectées et le groupe des feuilles non infectées). Une partie de chaque groupe et de chaque traitement a été utilisée pour produire des disques de feuilles de 1,5 cm de diamètre. Les groupes des feuilles et des disques de feuilles infectés ont été inoculés avec 20 µL de la suspension des spores de *P. megakarya* (1x10⁶ spores/ml), sur la face inférieure des feuilles et des disques de feuilles. L'eau distillée stérile a été utilisée pour le groupe non infecté. Les feuilles ainsi traitées ont été incubées dans une enceinte obscure à 26 ± 2° C pendant 6 jours.

La sévérité de la maladie à *P. megakarya* a été interprétée grâce à l'échèle de score de Nyassé *et al.* (1995) indiqué ci-dessous :

0 = pas de symptômes ;

1 = point de pénétration observé au site d'inoculation ;

2 = point de connections ;

3 = aspect nécrotique réticulé ;

4 = aspect nécrotique en forme de marbre ;

5 = nécrose extrême.

L'analyse de la sévérité à *P. megakarya* a été faite après le calcul et l'analyse des moyennes de chaque traitement grâce à la formule suivante :

$$I_s = \frac{\sum \text{des valeurs des différent symptome du traitement} \times \text{Nombre de site}}{d \times \text{inoculation du}}$$

L'intensité (index) de l'infection a été évaluée d'après l'échelle de Paulin et *al.* (2008) regroupée dans les intervalles ci-dessous :

0 < Index ≤ 1: très résistante

1 < Index ≤ 2: résistante

2 < Index ≤ 2,5: moyennement résistante

2,5 < Index ≤ 3.5 : susceptible

Index > 3,5: très susceptible

Les feuilles détachées (infectées et non infectées) ainsi obtenues ont constitué nos échantillons pour les extractions et les dosages quantitatifs des marqueurs de résistance biochimique. L'échantillon des feuilles infectées a été collecté à 2 cm de la zone infectée (Photo18).



Photo 18 : Effet des traitements sur la sévérité de l'inoculation à *P. megakarya* : (A) feuille saine du témoin négatif non inoculé, (B) feuille avec la nécrose au point d'infection en forme de marbre du témoin négatif inoculé ; (C) Feuille avec des point de pénétration des spores fongiques de l'essai inoculé. (Photo Foka, 2017).

II.2.4.2. Détermination de l'effet de la bio formulation OBF' sur les marqueurs solubles de défense des feuilles du cacaoyer SCA12xSNK16 :

Extraction et dosage des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques solubles totaux a été effectuée selon le protocole modifié de Boudjeko *et al.* (2007). En effet, 0.5 g de matériel végétal a été broyé à 4 °C dans 2,5 mL de méthanol 80% (v/v). L'homogénat a été centrifugé à 10 000 g pendant 5 min à température ambiante à l'aide du « Beckmann-Coulter microfuge 20 R centrifuge ». Le surnageant a été récupéré et le culot suspendu dans 1,5 mL de méthanol 80%. Une autre centrifugation s'en est suivie. Les surnageants récupérés ont été mélangés et la solution obtenue a constitué l'extrait de composés phénoliques totaux qui a été conservé à -20 °C pour usage ultérieure.

La quantification des composés phénoliques solubles totaux a été déterminée d'après le protocole décrit par Marigo (1973) utilisant le réactif de Folin-ciocalteu.

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu qui est un acide fort constitué d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit en milieu alcalin et à chaud lors de l'oxydation des composés phénoliques en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) dont l'absorbance à 760 nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présente dans l'extrait.

Mode opératoire

10 µL d'extrait, 500 µL d'eau distillée, 75 µL de réactif Folin-ciocalteu, et 500 µL Na_2CO_3 à 20% ont été introduits successivement dans un tube à essai. Le mélange obtenu a été incubé au bain-Marie à 40 °C pendant 30 min et l'intensité de la coloration bleue a été mesurée au spectrophotomètre (Shimadzu UV-1605, UV-visible) à 760 nm contre un blanc dans lequel l'extrait a été remplacé par l'eau distillée. Pour chaque extrait trois répétitions ont été réalisées. La teneur en composés phénoliques a été exprimée en µg/g de matière fraîche (MF) en référence à la courbe établie avec l'acide gallique (0,1 mg/mL).

Dosage quantitatif des flavonoïdes

La quantité de flavonoïdes a été déterminée à partir de l'extrait phénoliques, selon le protocole modifié de Kramling et Singleton (1969) utilisant le formaldéhyde et le réactif de Folin-ciocalteu.

Principe

En milieu acide (2 µL HCL 50%), le formaldéhyde (2 µL, 8 mg/l) se fixe aux molécules flavonoïdes, il en résulte la formation en solution de complexes qui précipitent du fait de leur fort poids moléculaire. Le dosage des composés non-flavonoïdes est réalisé dans le surnageant par la méthode de Marigo (1973). La teneur en flavonoïdes est obtenue par la différence entre les phénols totaux et les non-flavonoïdes.

Mode opératoire

Le milieu réactionnel a été constitué de 400 µL d'extrait phénolique, 200 µL HCL (50%) et 200 µL de formaldéhyde (8mg/L). Le milieu a été incubé 15 min à 4 °C, centrifugé pendant 5 min à 3 000 g et le surnageant a été récupéré. Il s'en est suivi le dosage des non-flavonoïdes dans le surnageant par la méthode de Marigo et *al.* (1973) décrit plus haut. La teneur en flavonoïdes est déterminée selon la formule :

$$\mathbf{T_{flavonoïdes} = T_{phénol\ totaux} - T_{non-flavonoïdes}}$$

Extraction et dosage des protéines

L'extraction et le dosage des protéines ont été respectivement réalisés selon le protocole modifié de Pirovani et *al.* (2008) et de Bradford (1976) précédemment décrits.

Mesure de l'activité des peroxydases

Le dosage de l'activité des peroxydases dans les extraits protéiques précédemment obtenus a été réalisé selon le protocole modifié de Baaziz et *al.* (1994) décrit plus haut.

Mesure de l'activité des polyphénol-oxydases

L'activité des polyphénol-oxydases (PPO) a été évaluée dans l'extrait protéique d'après le protocole de Van Kammen et Brouwer (1964) en utilisant la catéchine comme substrat.

Le milieu réactionnel a été constitué de 500 µL de tampon phosphate 0.66 M et de pH 7, 150 µL de catéchine 10 mM, 35 µL d'extrait protéique. Le mélange a été incubé à 25 °C pendant 30 s et le changement de l'absorbance à 330 nm a été mesuré après cinq minutes à l'aide du spectrophotomètre (Shimadzu UV-1605, UV-visible). L'activité enzymatique a été

exprimée en Abs330/min/g de matière fraîche contre le blanc où l'extrait a été remplacé par de l'eau distillée. L'activité enzymatique a été calculée d'après la formule ci-dessous :

$$AE = \Delta Abs \cdot \Delta t * MF$$

Mesure de l'activité β -1,3-glucanases

L'activité β -1,3-glucanases a été évaluée dans l'extrait protéique selon le protocole modifié de Leelasuphakul et al. (2006) utilisant la laminarine 0,0025% (g/mL) qui est un polymère de β -1,3-glucane.

Principe

L'enzyme libère le glucose qui est quantifié et correspondant à la quantité de β -1,3-glucanases présente dans le milieu. L'activité β -1,3-glucanases est exprimée en μ mole de glucose libéré /min/g de matière.

Mode opératoire

Dans les tubes à essai, ont été introduits successivement un volume de 90 μ L du tampon acétate de sodium pH 4, 0,1 M contenant la laminarine (25mg/L) et 10 μ L d'extraits protéiques. Après avoir ajouté l'extrait protéique, le mélange a été incubé pendant 10 min à 40 °C au bain-Marie puis, 200 μ L de HCl 2 M ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Le volume a été complété avec 900 μ L d'eau distillée et la densité optique mesurée à 540 nm contre le blanc où l'extrait protéique est remplacé avec de l'eau distillée. La quantité de sucre libéré a été calculée à partir de la courbe standard du glucose ($DO = f(\text{concentration en glucose})$) et l'activité enzymatique exprimée en μ mole de glucose libéré /min /g de Matière Fraîche.

II.2.5. Évaluation de l'effet de la bioformulation OBF' sur les défenses des cabosses de cacaoyer

II.2.5.1. Prétraitement, inoculation et évaluation de la sévérité de la maladie sur les cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413

Les cabosses de cacaoyer des clones SNK10 et SNK413 qui ont été suivies dans le parc à bois du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé 1, ont été détachées et traitées d'après le protocole modifié de Zhang et al. (2015). En effet, les cabosses ayant 5 à 8 semaines ont été récoltées, lavées abondamment au robinet pendant 3 min, ensuite rincées à l'eau

distillée, puis stérilisées à l'alcool à 85 °C, au javel 0.25°Cl et enfin rincées à l'eau distillée stérile. Elles ont été ensuite séchées sous la hotte à flux laminaire (Photo 19). L'inoculation des cabosses de chaque clone a été effectuée après la répartition en deux lots :

- Le lot 1 constitué de cabosses saines.
- Le lot 2 constitué de cabosses inoculées avec la suspension de spores de *Phytophthora megakarya* à 10⁶ spores/mL.

L'inoculation des cabosses a été faite sous hotte à flux laminaire.

Par ailleurs, chaque lot de cabosses a été divisé en deux groupes et traité trois fois en trois jours à l'eau distillée d'une part et à la formulation OBF' d'autre part. Le 4^{ème} jour, les cabosses ont été inoculées par dépôt de 20 µL de suspension des spores pour le lot 2 et avec de l'eau distillée stérile au milieu de la taille des cabosses (Photo 18). Les cabosses ont ensuite été incubées dans une enceinte à fort taux d'humidité dans l'obscurité totale et à 26 ± 2 °C pendant 5 jours. La sévérité à *P. megakarya* a été interprétée grâce à l'échelle de score de Nyassé et *al.* (1995) et l'intensité (index) de l'infection a été évaluée d'après l'échelle de Paulin et *al.* (2008).



Photo 19 : Chérelles de cacao SNK 10 (A) et SNK413 (B) nettoyées. (Photo Foka, 2017).

II.2.5.2. Détermination de l'effet de la bioformulation OBF' sur l'expression des gènes des voies de défense médiées par l'AS, l'AJ et l'inhibiteur de la mort cellulaire

Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits des mésocarpes précédents après optimisation d'un protocole. En effet, plusieurs méthodes à base de *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) ont été mises en œuvre pour extraire les ARN sans succès et une nouvelle méthode utilisant le CTAB a été mise sur pieds. Il s'agit de :

- Method 1 : extraction utilisant le CTAB + le kit Qiagen RNeasy Mini kit (Wang et Stegemann, 2010).
- Method 2 : extraction utilisant le CTAB sans traitement DNase (Barman et *al.*, 2017).

- Méthode 3 : extraction utilisant le CTAB-Trisol-Crésol. Le protocole a été effectué comme décrit par les auteurs, mais le kit Qiagen a été utilisé après le traitement par la DNase (Jordon-Thaden et *al.*, 2015).
- Méthode 4 : extraction utilisant le CTAB et un lavage préliminaire au sorbitol (Inglis et *al.*, 2018).
- Méthode 5 : extraction utilisant le CTAB et 15 mL de tampon pour 100 mg de poudre de MF, sans traitement DNase, avec ultracentrifugation 31 000 g et précipitation au LiCl (Ali et *al.*, 2014).
- Méthode 6 : extraction utilisant le CTAB et 15 mL de tampon pour 100 mg de poudre de MF, sans traitement DNase, avec ultracentrifugation 30 000 g et précipitation au LiCl (Zeng et Yang, 2002).
- Méthode 7 : méthode optimisée d'extraction utilisant le CTAB, sans traitement DNase, avec ultracentrifugation 30 000g et précipitation au LiCl.

Description de la méthode utilisée pour l'extraction de l'ARN du péricarpe mucilagineux des cabosses de cacaoyer

Le protocole optimisé d'extraction utilisant un tampon CTAB stérilisé par autoclave {2% (m/v) CTAB, 2% (m/v) PVP, 100 mM Tris HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,5% de spermidine et 2% de β -mercaptoéthanol} et préchauffé à 65 °C a été appliqué. En effet, les péricarpes ont été broyés dans de l'azote liquide. Un volume de 15 mL de tampon CTAB (contenu dans un tube conique de 50 mL) a été utilisé pour extraire l'ARN de 100 mg de la poudre du péricarpe de cacao obtenue préalablement. Le mélange tampon a été préchauffé et la poudre a été introduite et homogénéisée pendant 2 min, puis maintenue à 65 °C pendant 15 min avec 2 autres homogénéisations à 5 et 10 min. Au bout de cette période, un volume égal de chloroforme-isoamyle alcool (24:1) a été introduit dans le mélange, homogénéisé pendant 4 min, puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min à 20 °C. La phase aqueuse supérieure très visqueuse a été récupérée et introduite dans un nouveau tube conique de 50 mL et réextraite grâce à un volume égal de chloroforme-isoamyle alcool (24:1). Le mélange précédent a été homogénéisé pendant 4 min et centrifugé comme précédemment décrit. Le surnageant a été récupéré et introduit dans un tube « Thermo Scientific Nalgene Centrifugeware » de 30 mL préalablement autoclavé. Une centrifugation à 30 000 g pendant 20 min à 4 °C a été effectuée pour séparer le matériel insoluble. Le surnageant a été transféré dans un autre tube « Thermo Scientific Nalgene Centrifugeware » de 30 mL préalablement autoclavé et 0,25 volume de la

solution de LiCl 10 M (préparé dans le DEPC-eau) a été introduit dans le milieu. L'ensemble a été homogénéisé avec la pipette et stocké à 4 °C pendant 42 à 44 h. La précipitation du culot d'ARN a été effectuée par la centrifugation à 30 000 g pendant 30 min, 4 °C. Le surnageant a été éliminé puis, 1 mL d'éthanol 75% a été utilisé pour récupérer le culot qui a été introduit dans un Eppendorf stérile de 1,5 mL puis centrifugé à 10 000 g pendant 5 min, 4 °C. Le culot obtenu a été lavé deux autres fois avec de l'éthanol 75% et centrifugé comme précédemment décrit et le culot séché 10 min à température ambiante. L'ARN obtenue a été solubilisé dans 35 µL de DEPC-eau; et une autre centrifugation 10 000 g pendant 5 min, 4 °C a été effectuée. Le surnageant ayant l'ARN a été récupéré dans un autre Eppendorf de 1,5 mL. L'ARN a été quantifié au Nanodrop et les ratios 260/280 et 260/230 qui renseignent sur la pureté de l'ARN ont été déterminés puis, l'ARN a été stocké à -20 °C jusqu'à utilisation.

Électrophorèse sur gel d'agarose des ARN

Les extraits d'ARN ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose-TAE 1 % ayant 8 µL RedGreen (6X) supplémenté juste avant de couler le gel. En effet, 10 µL d'ARN ont été additionnés de 4 µL de SYBR safe. La migration a été faite dans un tampon TAE (Tris-HCl 1.6 mM, acétate de sodium 1.6 mM, EDTA 0.04 mM, pH 8), sous une tension de 90 V. L'électrophorèse a été suivie grâce au dépôt dans un puits d'un marqueur moléculaire de 100 à 1 000 bases. Après la migration, le gel a été visualisé à l'aide du logiciel Image-lab 3.0.

Reverse transcription et Réaction en Chaîne de Polymérisation quantitative en temps réel (RT-qPCR)

L'analyse des gènes PR2, PR1, PR4, PR8, acyl carrier protéine, tubuline, B11, AOS, AOC4 et WRKY a été faite sur les ADNc après reverse transcription des ARNm.

La Reverse transcription (RT) a été effectuée dans un volume réactionnel final de 20 µL ayant 3 µL de RTmix1 (2 µL d'oligo dT 30 µM + 1 µL de dNTP 10 µM), 7.5 µL de RTmix2 (4 µL de 5 x Buffer + 2µL DTT 0.1 M + 0.2 µL de SCII enz 200 U/µL + 0.5 µL RNase inh + 0.8 µL de ddH₂O) et 9.5 µL d'ARN (700 ng/ 9.5 µL). Le milieu réactionnel a été introduit dans un thermocycleur (Bio-Rad) sous les conditions suivantes :

- Hybridation RTmix1 + ARN 65 °C, 5 min;
- Élongation par ajout de RTmix2 42 °C, 60 min;
- Élongation finale à 72 °C, 15 min.

Les procédures de RT-qPCR ont été effectuées d'après le protocole de Bailey et *al.* (2005) sur les ADNc qui ont été obtenus précédemment.

Principe

La technologie RT-qPCR basée sur l'amplification sélective des séquences d'ADNc par une action de l'ADN polymérase thermostable utilisant les amorces spécifiques et du fluorophore SYBR green. Le SYBR Green, s'intercale au niveau des chaînes double brin d'ADN et devient fluorescent. Il a un maximum d'excitation et d'émission respectivement à 491 nm et 521 nm. La fluorescence est ainsi mesurée à la fin de chaque cycle d'élongation.

Méthode

La RT-qPCR a été effectuée dans un volume réactionnel final de 20 µL contenant 10 µL de qPCRMix, 0.4 µL de Forward primer, 0.4 µL de Reverse primer, 5.2 µL de ddH₂O et 4 µL d'ADNc de concentration 10 ng/µL dans un thermocycleur (Bio-Rad) sous les conditions suivantes: pré-dénaturation à 95 °C pendant 3 min suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 10 s, hybridation et élongation à 60 °C pendant 30 s, et une courbe de fusion finale de 65 °C à 95 °C avec une augmentation de 0.5 °C toute les 5 s. Les paires des amorces utilisées ont été dessinées par Ali et *al.* (2017), Litholdo et *al.* (2015), Scotton et *al.* (2017) Zhang et *al.* (2015) et sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (Tableau VI). L'expression relative des gènes PR2, PR1, PR4, PR3, BI1, AOS, AOC4 et WRKY a été déterminée par rapport à deux gènes de référence (Acyl Carrier Protéine, Tubuline).

Tableau VI : Listes des couples d'amorces utilisées pour la RT-qPCR.

Gènes	Identifiant	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Pathogenesis-related protein P2	Tc05_g027220 ou XM_007030494.2	TTTGGTGTGGGAAAT GACA	CAGGGAATTGAGTTT TGAACC
Pathogenesis-related protein 1	Tc02_g002410 ou XM_018114714.1	GTGGACCTTATGGCG AGAAC	CCATTGCTGCACCTT ACCTT
Pathogenesis-related protein 4B	Tc00_g012980 ou XM_007023150.2	TCAACTTGGGATGCA AACAA	CCTCTCCATCCGTG TCAAT
Pathogenesis-related protein 5	Tc02_g005190 ou XM_007041823.2	GCATCACTATGTTCGG TGGA	ATGGCATCAAGGAC AATCAA
Pathogenesis-related protein 3Q	Tc04_g018160 ou XM_018119383.1	GTTGCCAGTATCGTGT CACCTGC	GGCATGTGCAAAAA AAGCAGCAATCTC
Acyl carrier Protein	Tc01_g039970 ou XM_007052353.2	GGAAAGCAAGGGTGT CTCGTTGAA	GCGAGTTGAAATCTG CTGTTGTTTG
Tubuline	Tc06_g000360 ou XM_007022848.2	GGAGGAGTCTCTATA AGCTTGCAGTTGG	ACATAAGCATAGCC AGCTAGAGCCAG

TcBI1 Bax-inhibitor-1	Tc03_P024350 ou XM_007039641.2	AATGGACGCGTTCTCT TCGT	ATCAGCGCACAAACA TAGGGT
TcAOS	XM_007017364.2	CGGTTCAAACCCGCCT GATA	GGCGGAAGACGAAA ACTGTG
TcAOC4	Tc04cons_t014520.1 ou XM_007033262.2	GTGAACTTCCCGAAG AGCTG	AATTAGCAACGGTG GCATGT
TcWRKY TF70 LOC18602206	Tc04_t016130 ou XM_018120477.1	TTCTCAGCTTTCCCAC CAGT	TTGAGCTGATGACTC GAACG
TcWRKY TF70 LOC18587501	Tc10cons_t018200.1 ou XM_018129667.1	TGCTAAGCACCCAAG GAGTT	TGGATGAGTCTCTGC AGGTG

TcAOS: Theobroma cacao allele oxyde synthase; TcAOC : Theobroma cacao allele oxide cyclase; TcWRKY TF: Theobroma cacao wrky Transcription factor

Vérification de la non-contamination de l'ARN par l'ADN

La non-contamination de l'extrait d'ARN par l'ADN a été vérifiée grâce à une RT-qPCR en absence de la reverse transcriptase. Ainsi, la Reverse Transcription a été faite dans un volume réactionnel final de 20 µL comme précédemment mais avec la reverse transcriptase remplacée avec de ddH_2O . Ainsi, le milieu réactionnel comprenait 3 µL de RTmix1 (2 µL d'oligo dT 30 µM + 1 µL de dNTP 10 µM), 7.5 µL de RTmix2 (4 µL de 5 x Buffer + 2µL DTT 0,1 M + 0,5 µL RNase inh + 1 µL de ddH_2O) et 9.5 µL d'ARN (700 ng/ 9.5 µL). Le thermocycleur a été réglé comme précédemment décrit et il a suivi une qPCR utilisant le l'acyl carrier protéine gène comme détaillé plus haut. La non-amplification au cours de cette qPCR a été un indicateur de l'absence de l'ADN.

Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de qPCR

Les fragments amplifiés par qPCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose-TAE 1,5% et 8 µL RedGreen (6X) supplémenté juste avant de couler de gel. Les produits de la PCR ont été additionnés 8 µL de SYBR safe. La migration et la visualisation des produits de qPCR ont été faites comme précédemment décrit pour l'ARN.

II.2.5.3. Détermination de l'effet de la bio formulation OBF' sur les métabolites du péricarpe des cabosses de cacaoyer SNK10 en comparaison à ceux du cacaoyer SNK413

Les péricarpes des clones SNK10 (inoculés et non inoculés) et SNK413 (inoculés et non inoculés) non traités à OBF', et les péricarpes SNK10 traités à OBF' (inoculés et non inoculés) ont été utilisés pour l'analyse LC-MS/MS métabolomique. En effet, 10 mg de poudre du péricarpe lyophilisé des cabosses de cacao ont été extraits à l'aide de 200 μ L d'acétonitrile. L'échantillon mouillé a été vortexé pendant 10 s, suivi d'une sonication [30 min à 89 °F (31,667 °C)] et d'une incubation à -20 °C pendant 10 min. Le mélange obtenu a été centrifugé 10 min à 10 °C et 9 726 g. Le surnageant a été récupéré dans un vial d'auto-échantillonnage après filtration de celui-ci avec une seringue en téflon de 1 mL ayant un diamètre des pores de 0,2 μ m. Cet extrait a été conservé pour analyse ultérieure à -20 °C.

Les métabolites secondaires contenus dans les extraits à l'acétonitrile ont été quantifiés en utilisant le système de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) QTRAP 6500+ de Sciex® (sciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-systems/qtrap-6500plus-system). Il fournit les meilleures limites de quantification (LOQ) pour permettre la détection et la quantification de la plus large gamme de composés chimiques dans les matrices les plus difficiles.

Les rapports masse/charge maximale (m/z_{max}) et la bibliothèque des données métabolomiques *MassBank* ont permis de déterminer les structures probables des composées les plus intéressants (majoritaire et/ou présent chez les cabosses traitées). Les analyses ont été effectuées trois fois et l'identité probable des principaux composés remarquables a été proposée.

II.3. Analyse statistique

Pour chaque essai, trois répétitions ont été réalisées. Les différentes variables ont été représentées en termes de moyennes plus ou moins écart-type. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test d'analyse de variance (ANOVA) à un facteur (one way). La différence significative entre les moyennes a été évaluée en utilisant le test de Tukey au seuil de significativité $P < 0,05$. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel SPSS version 20 pour windows. Les graphes ont été représentés grâce au logiciel GraphPad Prism version 8.01 et Statistica version 10.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

Les résultats ont été organisés en trois parties en fonction des objectifs spécifiques formulés dans la partie introductive du présent document.

III.1.1. Formulation du biopesticide

III.1.1.1. Extraits des intrants du biopesticide

L'huile de neem (Nh), l'extrait aqueux de neem (Nea), l'extrait hydroalcoolique de l'herbe sida (Seth), l'extrait calcique des coquilles d'huître (HCa) et l'huile essentielle de citronnelle (CEO) ont été obtenus avec des rendements de 25,95%, 5,28%, 10,95%, 81,1% et 0,1% respectivement. Ils ont eu des colorations jaune pâle, jaune et blanche grisâtre pour Nh, CEO et HCa, tandis que Nea et Seth ont été marron. Les intrants ont des états liquide pour Nh et CEO et solide pour Nea, Seth et HCa.

III.1.1.2. Formulation du biopesticide

Au regard de la première étape de la formulation utilisant la matrice quasi expérimentale, il ressort que les mélanges sont liquides et ont la coloration marronne. Ces derniers se caractérisent par une odeur d'huile de neem.

Cette première étape qui est en absence de CEO, a un bloc d'essais caractérisé par les teneurs variantes de Nh et de Tw, tandis que celle de HCa est de 6% et celles de Nea et de Seth sont de 9%. Il en ressort l'effet positif du Tw et celui négatif de Nh sur la stabilité de ces essais (Figures 1A, 1B). En effet, l'observation de ce bloc en 48 heures révèle la présence des floculations d'huile qui correspondent aux pourcentages de stabilité de 25% tandis que l'absence indique une stabilité maximale de 100% (Figure 1A). L'augmentation de Tw entraîne aussi celle de la stabilité. Ainsi, dans ce bloc, la stabilité optimale est atteinte avec 18%, 21% et 24% de Tw pour les teneurs en Nh de 6%, 9% et 12% respectivement (Figure 5A). La stabilité à 48 h avec 6% d'huile de neem, les teneurs en Tw inférieures ou égal à 6% permettent d'obtenir 25% de stabilité ; 9% de Tw permet d'avoir 50% de stabilité; 12% de Tw permet d'avoir 75% de stabilité et 18%, 21% et 24% de Tw permettent d'avoir 100% de stabilité (Figure 5B). Par ailleurs, avec 12% d'huile de neem, 0% de Tw permet d'avoir 25% de stabilité; 3% à 12% de Tw permettent d'avoir 50% de stabilité; 21% de Tw permet d'avoir 75% de stabilité et 24% de Tw permet d'avoir 100% de stabilité (Figure 5B). Ainsi, avec le maximum de Nh (12%) utilisé

au cours de ces travaux, le minimum et le maximum de stabilité (25% et 100 %) sont observés en absence de Tw et en sa présence à 24% dans les émulsions 1C et 9C respectivement (Figure 5B). Ces mélanges 1C et 9C sont deux des quatre facteurs de la matrice des mélanges de la deuxième phase de formulation.

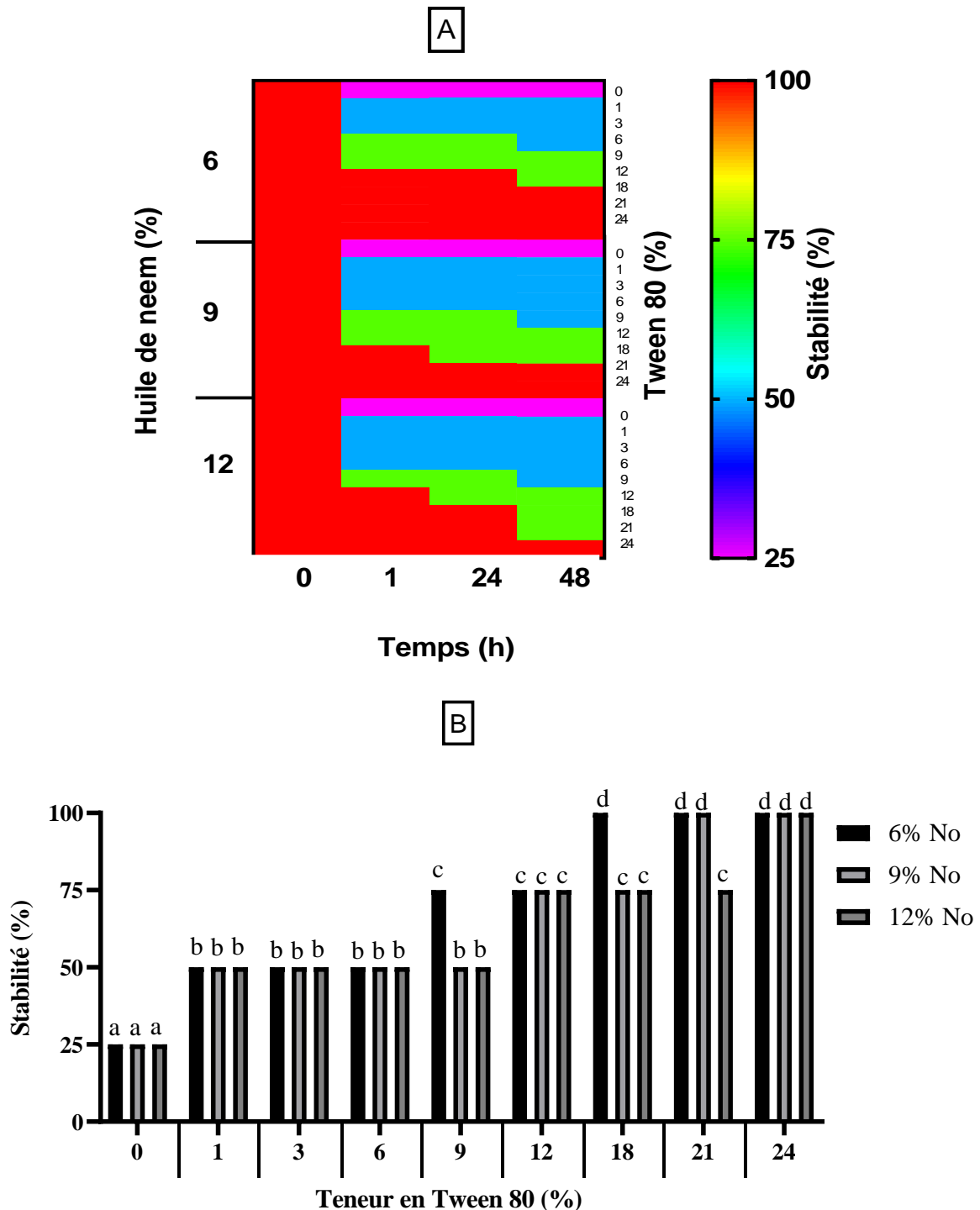


Figure 5 : Stabilité du premier groupe de l'étape quasi expérimentale de formulation en 48 h. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$. A: stabilité dans le temps du premier groupe de l'étape quasi expérimentale de formulation; B: Stabilité à T=48 h du premier groupe de l'étape quasi expérimentale de formulation. No= huile de neem.

Il en ressort du deuxième et du troisième bloc de la matrice quasi expérimentale de formulation que Ne et Se, influencent la stabilité des émulsions de manière équivalente (Figure 6). En effet, le deuxième bloc de cette étape de formulation montre qu'en variant la teneur en Tw de 0% à 21% en absence de Seth et de CEO ; et en présence des pourcentages constants de Nh, de Nea et de HCa, la stabilité augmente (Figure 6A). En outre, la stabilité des essais 1X, 6X et 8X est de 25%, 50% et 75% respectivement à 48 h. Par ailleurs, le troisième bloc montre aussi qu'en variant la teneur en Tw de 0% à 21% en absence de Neth et de CEO ; et en présence des pourcentages constants de Nh, de Sea et de HCa, la stabilité augmente aussi (Figure 6B). La stabilité des essais 1Y, 6Y et 8Y est de 25%, 50% et 75% respectivement à 48 h. Ainsi, les essais 8X et 8Y sont aussi deux des quatre facteurs retenus pour la matrice des mélanges de la deuxième phase de formulation.

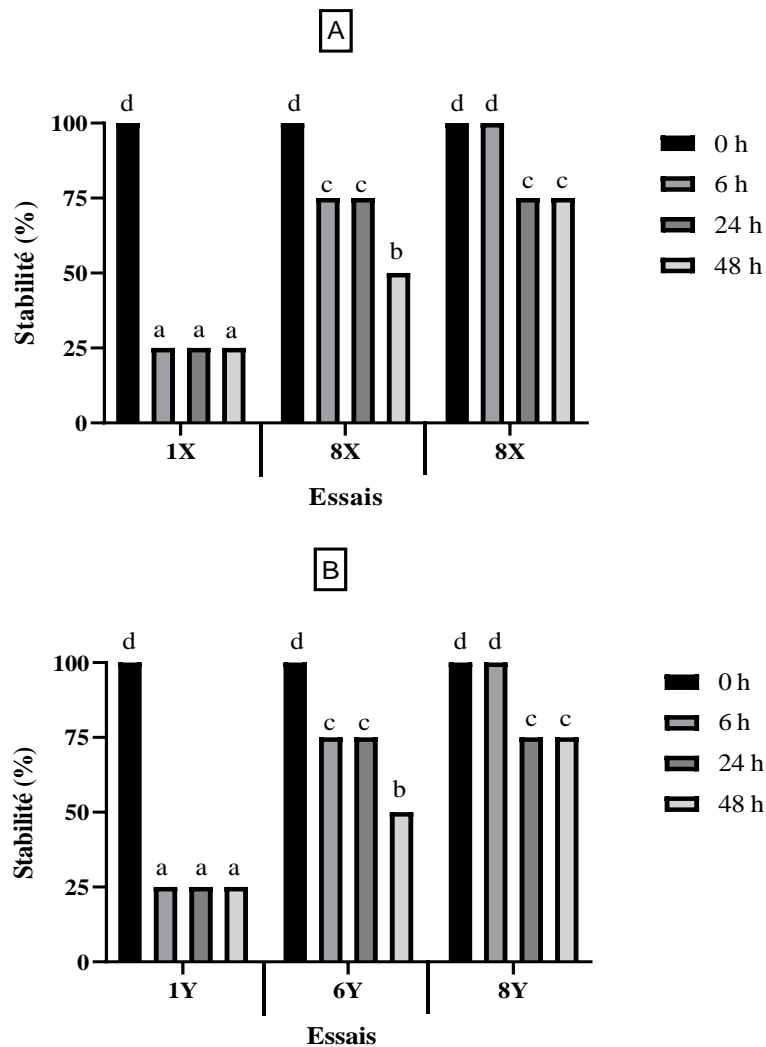


Figure 6 : Stabilité du deuxième et troisième groupe de l'étape de formulation quasi expérimentale. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$. A: stabilité des essais de mélanges en absence de Seth ; B: stabilité des essais de mélanges en absence de Nea. 1X, 6X, 8X, 1Y, 6Y, 8Y sont les codes des essais d'émulsions.

La seconde étape de formulation basée sur une matrice de mélange à quatre facteurs (1C, 8X, 8Y et 9C) ayant 15 mixtures a révélé que l'augmentation de l'essai 1C dans les mélanges déstabilise ceux-ci tandis que celle de 9C les stabilises (Figure 7). La stabilité optimale est obtenue avec l'émulsion 9C ou en mélangeant 0.5 volume de l'émulsion 9C à 0.5 volume de l'émulsion 8X ou 8Y (Figure 7).

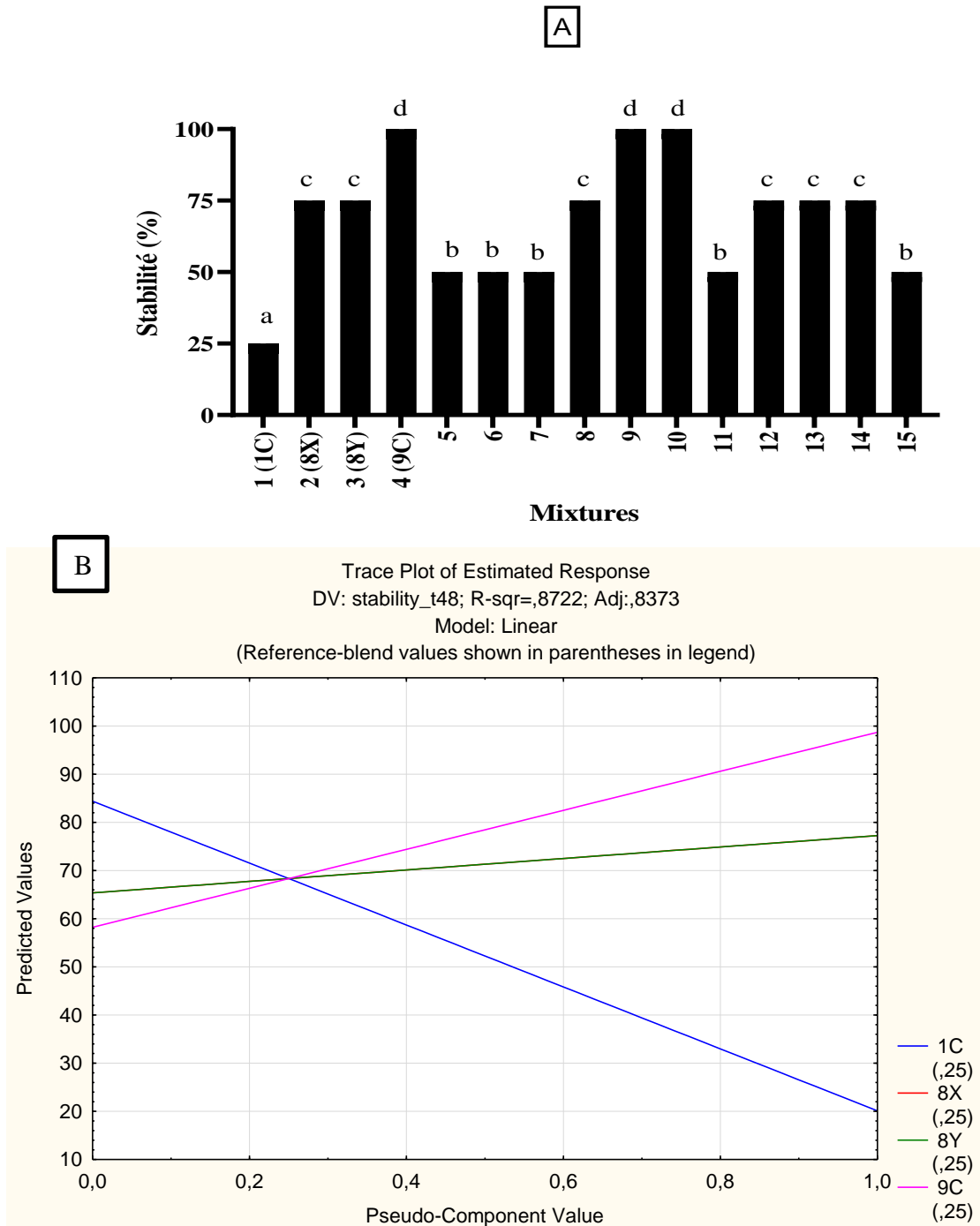


Figure 7 : Stabilité des mixtures de la matrice de mélange à quatre facteurs simplex-lattice design, 1C, 8X, 8Y, et 9C sont les émulsions utilisées comme facteurs pour obtenir les mixtures; A: Stabilité des mixtures; B: Comportement des facteurs dans le model linéaire. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

Tableau VII : Influence des extraits sur la stabilité des mixtures de la matrice des mélanges.

	Mixtures														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tw (v/v)	0	21	21	24	10,5	10,5	12	21	22,5	22,5	8,25	18,75	18,75	20,25	16,5
Nea (v/v)	9	18	0	9	13,5	4,5	9	9	13,5	4,5	9	13,5	13,5	13,5	9
Seth (m/v)	9	0	18	9	4,5	13,5	9	9	4,5	13,5	9	13,5	13,5	13,5	9
Stabilité (%)	25	75	75	100	50	50	50	75	100	100	50	75	75	75	50

Tw : Tween 80 ; Nea : Extrait aqueux du tourteau de neem ; Seth : Extrait hydroalcoolique de l'herbe sida.

La modélisation à l'aide du logiciel « STATISTICA 10 » de la stabilité des mixtures obtenues au cours de cette seconde étape de formulation montre que seul le modèle linéaire est significatif. Les caractéristiques de ce modèle sont données dans le Tableau VIII. Ce modèle possède une P value= 0,000033, un $R^2= 0,872169$ et le coefficient de chaque facteur est significatif (Tableau VIII). La représentation graphique du comportement de chaque mélange dans le modèle de stabilité linéaire est donnée dans la Figure 7B et son équation est la suivante :

$$\text{Stabilité} = 20,119 \cdot 1C + 77,262 \cdot 8X + 77,262 \cdot 8Y + 98,690 \cdot 9C + 0$$

où 1C, 8X, 8Y, 9C sont les facteurs du modèle.

Tableau VIII : Modèle de stabilité de la matrice des mélanges et ses paramètres.

Paramètres des modèles de stabilité						
Nature du Model	F	P	R ²	AdjR ²	MS effect	MS error
Linéaire	25,01704	0,000033	0,872169	0,837306	1986,607	79,4102
Quadratique	0,62007	0,712667	0,926706	0,794777	62,112	100,1684
Spécial cubique	0,64406	0,719258	0,979505	0,713076	90,199	140,0463
Caractéristiques du modèle linéaire de stabilité						
Facteur	1C	8X	8Y	9C		
Coefficient	20,11905	77,26190	77,26190	98,69048		
P	0,008332	0,000001	0,000001	0,000001		
Intervalle de confiance	[6,32;33,92]	[63,46;91,06]	[63,46;91,06]	[84,89;112,49]		

L'effet antifongique des mélanges de la deuxième étape de formulation sur *Fusarium oxysporum*, montre que la mixture 1 (8X) a le plus faible pourcentage d'inhibition de la

croissance (10,98%) tandis que celles 4 (9C), 7, 8 et 10 ont les pourcentages d'inhibition les plus élevés (51,76% à 54,11%) (Figure 8A; Tableau IX).

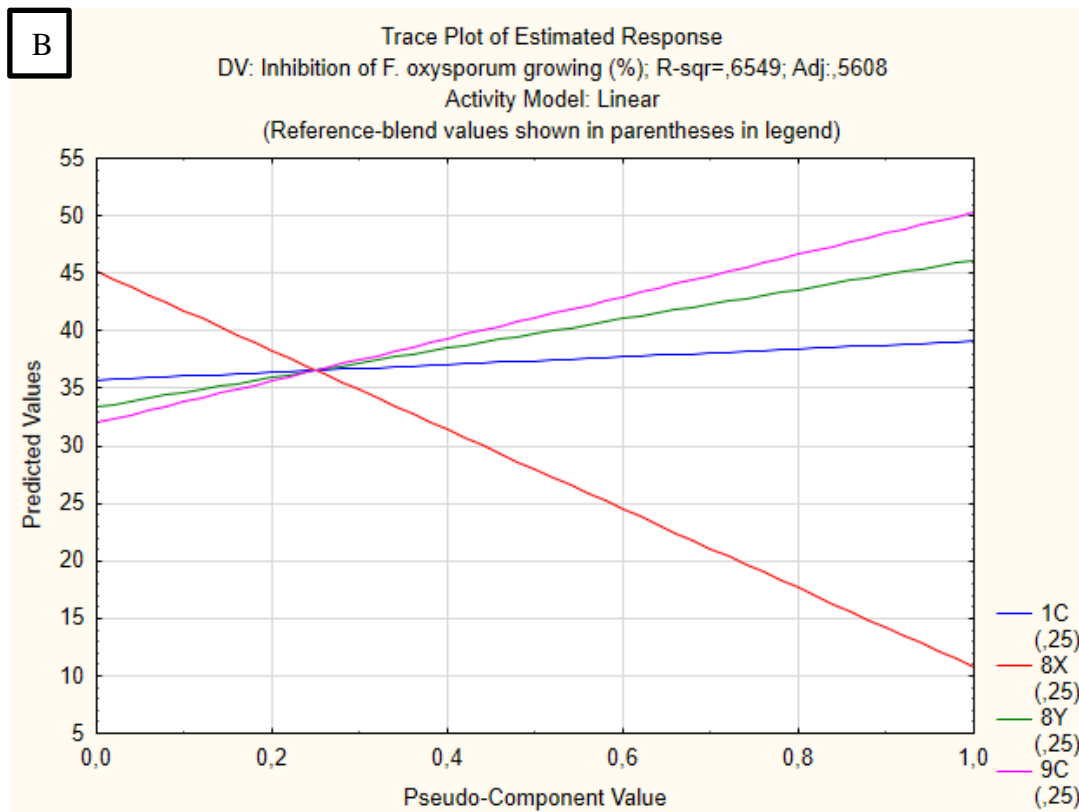
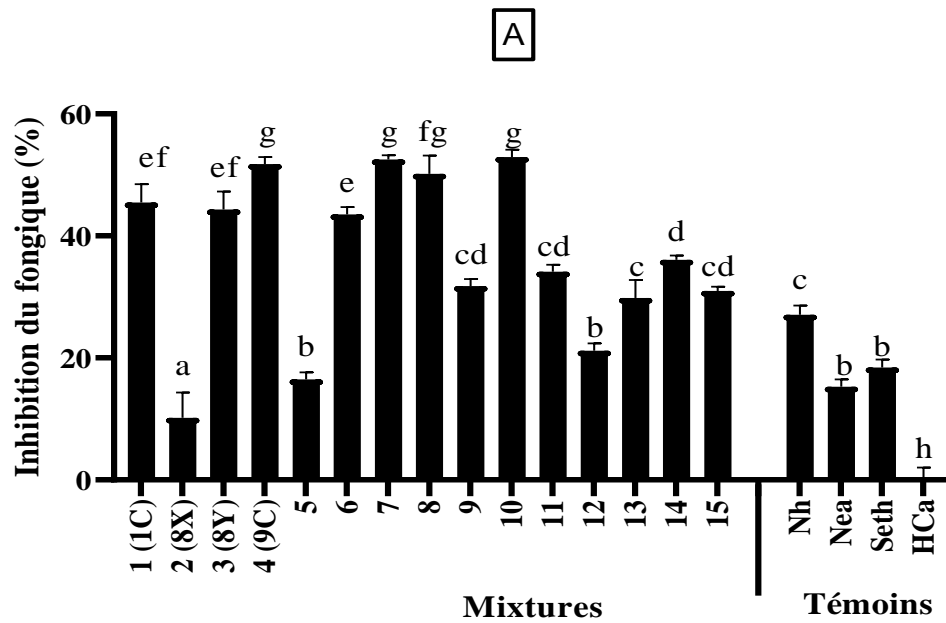


Figure 8 : Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique de *Fusarium oxysporum* par les mixtures (20%) de la matrice de mélange à quatre facteurs simplex-lattice design. 1C, 8X, 8Y, et 9C sont les facteurs des mixtures. A : Inhibition de la croissance fongique de *Fusarium oxysporum* ; par les mixtures; B : Comportement des facteurs dans le model linéaire d'inhibition. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

La modélisation à l'aide du logiciel « STATISTICA 10 » de l'inhibition de la croissance de l'agent pathogène fongique par les mixtures de cette matrice révèle que seul le modèle linéaire est significatif. Les caractéristiques de ce modèle sont données dans le tableau ci-dessous (Tableau X). Ce modèle possède une P value= 0,006820 et un $R^2= 0,654945$. Parmi les coefficients de ce modèle, seul celui de 8X n'est pas significatif (Tableau X). La représentation graphique du comportement de chaque facteur de la matrice des mélanges dans le modèle d'inhibition linéaire se retrouve dans la figure 8B et son équation est :

$$\text{Inhibition } F. \text{ oxysporum} = 39,10 \cdot 1C + 10,75 \cdot 8X + 46,16 \cdot 8Y + 50,30 \cdot 9C + 0$$

où 1C, 8X, 8Y, 9C sont les facteurs du modèle.

Tableau IX : Influence des extraits sur l'inhibition fongique par les mixtures vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*.

	Mixtures														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Tw (v/v)	0	21	21	24	10,5	10,5	12	21	22,5	22,5	8,25	18,75	18,75	20,25	16,5
Ne (v/v)	9	18	0	9	13,5	4,5	9	9	13,5	4,5	9	13,5	13,5	13,5	9
Se (m/v)	9	0	18	9	4,5	13,5	9	9	4,5	13,5	9	13,5	13,5	13,5	9
Inhibition (%)	46	10	44	52	17	44	53	50	32	53	34	21	30	36	31

Tw : Tween 80 ; Ne : Extrait aqueux du tourteau de neem ; Se : Extrait hydroalcoolique de l'herbe sida.

Tableau X : Modèle de l'inhibition fongique par les mixtures de la matrice des mélanges vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*.

Paramètres des modèles d'inhibition fongique						
Nature du Model	F	P	R ²	AdjR ²	MS effect	MS error
Linéaire	6,959656	0,006820	0,654945	0,560839	556,2183	79,92038
Quadratique	1,037508	0,494183	0,846301	0,569644	81,2556	78,31808
Spécial cubique	1,395939	0,554996	0,976655	0,673168	83,0280	59,47826
Caractéristiques du modèle linéaire d'inhibition fongique						
Facteur	1C	8X	8Y	9C		
Coefficient	39,09617	10,74883	46,15500	50,30065		
P	0,000066	0,115563	0,000015	0,000007		
Intervalle de confiance	de [25,25;52,94]	[-3,1;24,6]	[32,31;60,00]	[36,45;64,15]		

La modélisation de la stabilité et de l'inhibition de *Fusarium oxysporum* nous a permis de sélectionner l'émulsion 9C comme la meilleure. Ainsi, à l'issue de la seconde étape de formulation celle sélectionnée est 9C (BF), ayant Nh (12%), Nea (9%), Seth (9%), HCa (6%), et Tw (24%).

Au cours de la troisième étape de formulation, la correction du pH de la formulation BF à l'aide de CaO a augmenté celle-ci de manière exponentielle de la zone fortement acide à celle basique. L'augmentation du pH est accompagnée par la décroissance de la conductivité (Figure 9). En effet, en utilisant CaO de 0% à 33,33%, le pH a augmenté de 2,75 à 8,57 et la conductivité a diminué de 269,93 mV à -107,8 mV. De plus, le pH de 5,45 et la conductivité de 81,24 mV ont été obtenus en substituant 25% de HCa avec du CaO (Figure 9). L'instabilité de cette dernière émulsion par solidification des micelles (coalescence) a été notée. En outre, le second procédé de production des émulsions a permis d'obtenir des micelles sans coalescence. Ainsi, la formulation OBF qui a été stable, est celle ayant Nh (12%), Nea (9%), Seth (9%), HCa (4,5%), CaO (1,5%) et Tw (24%) et ayant été produite par le procédé « (Tw + Nh, homogénéisation; +Phase aqueuse (ayant Nea, Seth, HCa et Cao), homogénéisation ».

Par ailleurs, la formulation OBF est optimisée en OBF' par la substitution de 1/10 de celle-ci avec EO. Ainsi, la formulation OBF' est celle ayant Nh (10,8%), Nea (8,1%), Seth (8,1%), HCa (4,05%), CaO (1,35%), Tw (21,6%) et CEO (10%).

III.1.1.3. Caractéristiques des formulations BF, OBF et OBF'

L'observation microscopique de ces formulations a montré que seules les micelles de OBF ne sont pas discernables au grossissement 1 000, contrairement à celles de BF et OBF' qui sont sphériques (Tableau XI). En effet, les micelles de diamètres $\leq 9,72$ nm et $\leq 14,9$ nm ont été observées pour les formulations BF et OBF' respectivement tandis que celles de OBF n'ont pas été discernables à 1 000 (Tableau XI). Les pH de ces formulations ont été de 2.84, 5.45 et 5.2 respectivement, tandis que leurs conductivités ont été de 269 mV, 81.24 mV et 95.25 mV.

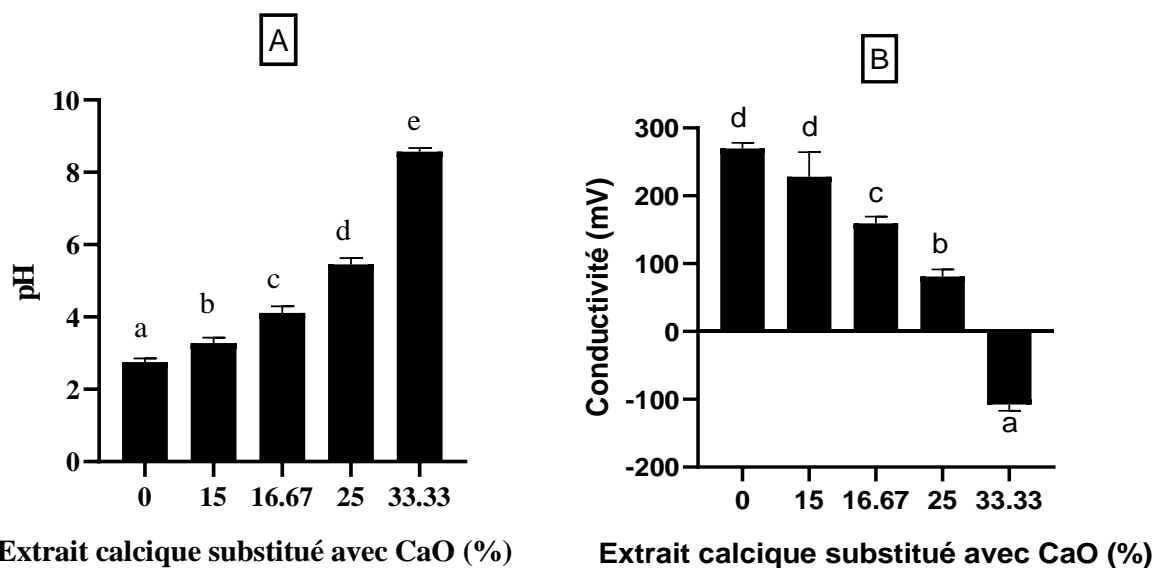
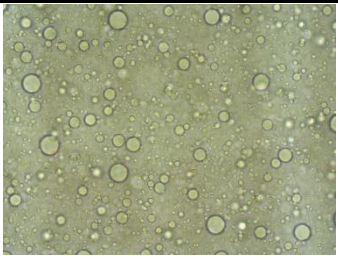
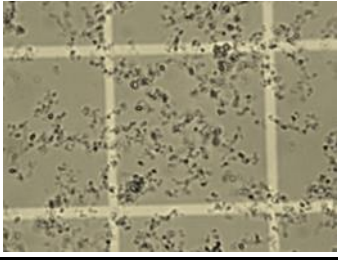
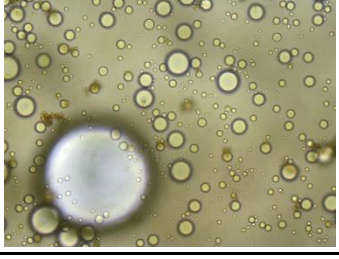





Figure 9 : Effet de l'oxyde de calcium (CaO) sur le pH (A) et la Conductivité (B) de la formulation BF. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

Tableau XI : Caractéristiques physiques des formulations BF, OBF et OBF'.

Formulations	Forme	Diamètre des micelles (μm)	pH	Conductivité (mV)	Images au grossissement 1000X
BF	Sphérique	≤ 9.72	2.84 ± 0.12	269 \pm 18	
OBF	Indiscernable	Indéterminé	5.45 ± 0.18	81.24 ± 10.24	
OBF'	Sphérique	≤ 14.9	5.2 ± 0.09	95.25 \pm 5.97	

La centrifugation des formulations BF, OBF et OBF' à 1 000 g et 10 000 g ; à 25 °C pendant 30 minutes a diminué la stabilité par précipitation de certains composés. En effet, chez OBF', elle a entraîné le changement des émulsions stables en émulsion ayant des précipités et des floculations d'huile ; BF a obtenu une floculation de la crème et d'huile, tandis que OBF a eu des précipités sans floculation. À 45 °C, une stabilité thermique a été observée pour la formulation OBF tandis que celle de BF a été caractérisée par la floculation de la crème et de l'huile et celle de OBF' par la floculation de l'huile. Par ailleurs, à -20 °C, OBF a été stable tandis qu'il a eu la floculation de la crème pour OBF' et un plus de précipité pour BF respectivement (Tableau XII).

Tableau XII : Caractéristiques thermodynamiques des formulations BF, OBF et OBF'.

Formulation	Centrifugation 1 000 g and 10 000 g	Stabilité thermique à 45 °C	Stabilité thermique à -20 °C	Images de l'effet de la gravité sur la stabilité
BF	Précipité et floculation de la crème	Floculation de la crème et de l'huile	Précipité et floculation de la crème	
OBF	Précipitation	Homogène	Homogène	
OBF'	Précipitation et floculation de la crème	Floculation de l'huile	Floculation de la crème	

Le pourcentage d'inhibition des champignons *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* et *Phytophthora megakarya* par les formulations BF, OBF et OBF' a montré une activité dose-dépendante et que celle OBF' possède les meilleures activités. Elles ont inhibé considérablement la croissance de ces agents pathogènes de 39,20% à 55,25% avec la formulation BF à 20% ; 72,48% à 100% avec la formulation OBF à 20% ; et

100% avec la formulation OBF' à 1%. Au regard de l'activité de ces formulations vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*, OBF' a été la formulation la plus active car à 0,1%, elle inhibe sa croissance de 55,88% (Tableau XIII). Ainsi, la formulation OBF' a été utilisée pour la suite des travaux.

Tableau XIII : Effet des formulations BF, OBF et OBF' sur la croissance des fongiques pathogènes.

Inhibition des phytopathogènes (%)					
Formulations	Concentration	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Phytophthora megakarya</i>
BF (µL / mL)	200	46,64 ± 4,77 ^{cd}	55,25 ± 1,27 ^c	48,6 ± 1,84 ^c	39,2 ± 3,97 ^d
	100	23,16 ± 0,65 ^e	7,90 ± 3,05 ^f	24,36 ± 7,07 ^e	20,69 ± 2,91 ^e
OBF (µL/ mL)	200	72,48 ± 8,4 ^b	83,46 ± 1,28 ^b	87,8 ± 0,64 ^b	100 ± 0 ^a
	100	48,03 ± 1,23 ^c	35,03 ± 1,58 ^e	37,4 ± 1,25 ^d	100 ± 0 ^a
OBF' (µL / mL)	100	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a
	10	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a
	1	37,39 ± 1,57 ^d	42,13 ± 1,24 ^d	36,23 ± 2,00 ^d	55,88 ± 1,65 ^d
Témoin positive (µg/mL)	33	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a

Dans chaque colonne, les moyennes accompagnées des lettres différentes (a, b, c et d) sont différentes au seuil de significativité $P < 5\%$.

III.1.1.4. Mécanisme d'action de la bioformulation OBF' sur *Phytophthora megakarya*

➤ Lyse de la membrane

Le suivi de la lyse de la membrane de *Phytophthora megakarya* par la formulation OBF' montre qu'elle n'a pas eu d'effet lytique sur l'agent pathogène mais, a inhibé la formation de la membrane de celui-ci (Figure 10A). En effet en utilisant 1CMI et 2CMI, il n'y a pas eu de variation significative de l'absorbance à 600 nm. Ainsi, seule l'absorbance du contrôle où le *Phytophthora megakarya* est dans de l'eau physiologique a augmenté de manière significative (Figure 10A).

➤ Inhibition de la synthèse des protéines

L'évaluation de l'effet de la formulation OBF' sur la synthèse des protéines par *Phytophthora megakarya* a montré un effet inhibiteur sur celle-ci. En effet en utilisant OBF' à 1CMI et 2CMI, elle a entraîné une réduction significative de la quantité de protéines produite par l'agent pathogène. Ainsi, une réduction de la production des protéines de 60% et 74% par *Phytophthora megakarya* a été notée en utilisant 1CMI et 2CMI respectivement, en comparaison au contrôle où l'agent pathogène est dans de l'eau physiologique additionnée de PDB (Figure 10B).

➤ Inhibition des pompes ATPases/H⁺

L'évaluation de l'effet de la formulation OBF' sur l'activité des pompes ATPases-H⁺ de *Phytophthora megakarya* a montré un effet inhibiteur sur ceux-ci (Figure 10C). En effet en utilisant 0,5CMI, 1CMI et 2CMI, après 30 minutes il y a eu une réduction significative du pH dans le contrôle (7,22) en comparaison aux milieux ayant OBF'. Cette inhibition de la réduction du pH reflétant ainsi l'inhibition de l'activité des pompes ATPases-H⁺ de *Phytophthora megakarya* par la formulation OBF' (Figure 10C).

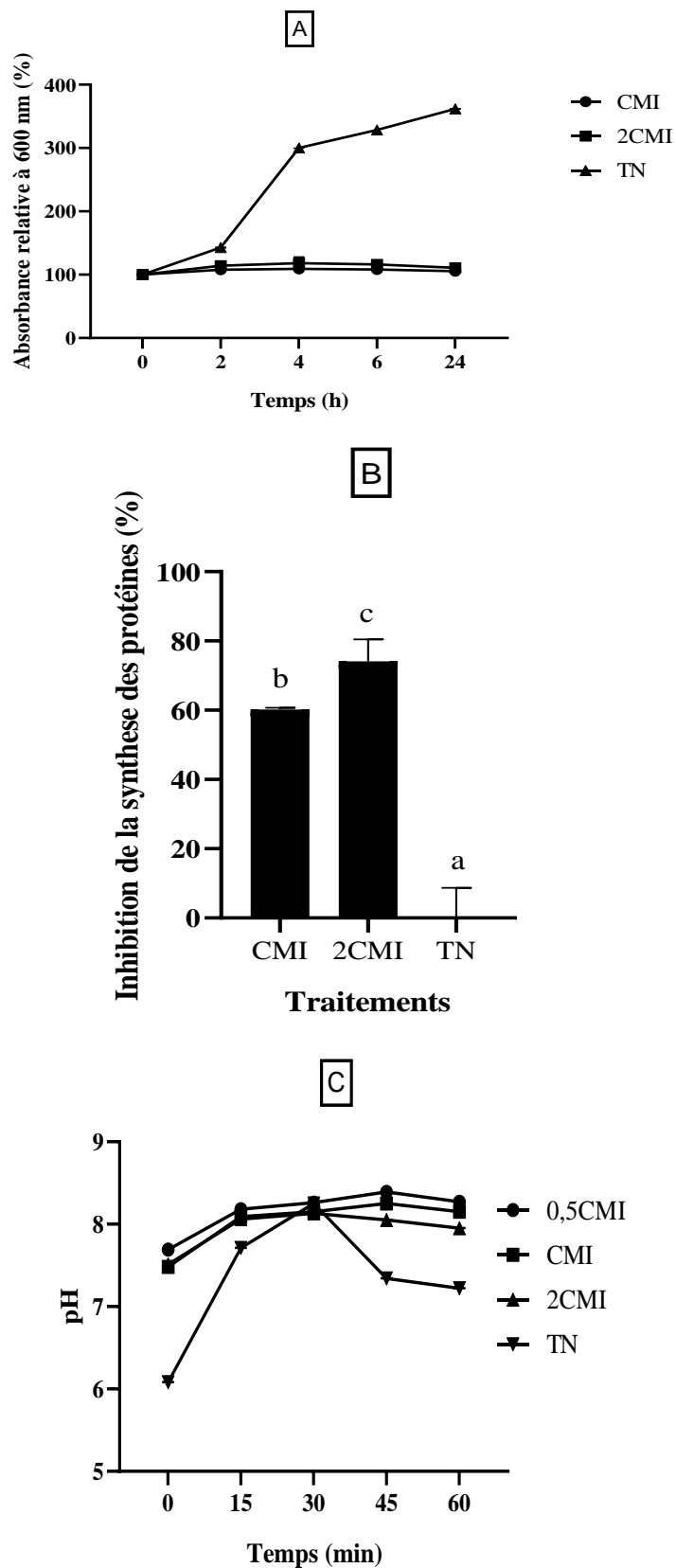


Figure 10 : Mode d'action de la formulation OBF³ vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* : effet sur l'intégrité de la membrane de l'agent pathogène (A); effet sur la synthèse des protéines par le pathogène (B); effet sur les pompes ATPase-H⁺ de l'agent pathogène (C).

III.1.2. Effet de la bioformulation OBF' sur la production des plantules de cacaoyer

III.1.2.1. Phytotolérance de la bioformulation OBF' par la plante

L'application foliaire de la formulation OBF' sur les feuilles détachées de cacaoyer au stade C de développement a révélé qu'au volume 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$ et aux concentrations inférieures ou égales à 1%, elle ne provoque pas des dommages foliaires (Photo 12; Figure 11A). En effet, l'application de la formulation OBF' à 1% et 0,1% de 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$ n'a pas causé de dommage significatif aux feuilles détachées au stade de développement C. Cependant, en appliquant 1 mL/60 cm^2 de la formulation OBF' aux concentrations 10% et 1%, elle a entraîné des dommages significatifs (décoloration plus brûlures et décoloration des feuilles) au cours du temps. En outre, la concentration 0,1% de 1 mL/60 cm^2 tout comme celle 10% de 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$ n'a entraîné que des décoloration et déformation des feuilles (Figure 11A).



Photo 20 : Effet des traitements sur les feuilles détachées au stade C de développement. A: OBF' à 10%, 1 mL/60 cm^2 ; B: OBF' à 1%, 1 mL/60 cm^2 ; C: OBF' à 1%, 0,2 mL/60 cm^2 ; D : TN (Photo Foka, 2019).

L'application foliaire de la formulation OBF' sur les feuilles non détachées de cacaoyer aux stades A, B, C et D de développement a révélé qu'elle a des effets significatifs en fonction de l'état de la feuille et de la dose appliquée (Figure 11B). En effet, en appliquant 1 mL/60 cm^2 de la formulation OBF' aux concentrations 20% et 10%, elle a entraîné des dommages significatifs (brûlures et décoloration plus brûlure des feuilles) aux feuilles du stade A de développement. Cependant, la concentration 1% de 1 mL/60 cm^2 tout comme celle 20% et 10% de 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$ n'a entraîné que des décolorations et déformations des feuilles au stade A. En outre, l'application de la formulation OBF' à 1% de 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$ n'a pas causé de dommage significatif aux feuilles indépendamment du stade de développement (Figure 11B). Ainsi, la formulation OBF' à 1% de 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$ est utilisée pour le traitement foliaire des plants de cacaoyer car OBF' à 1% a éliminé *Phytophthora megakarya* et n'a entraîné aucun dommage foliaire lorsque appliquée à 200 $\mu\text{L}/60\text{ cm}^2$.

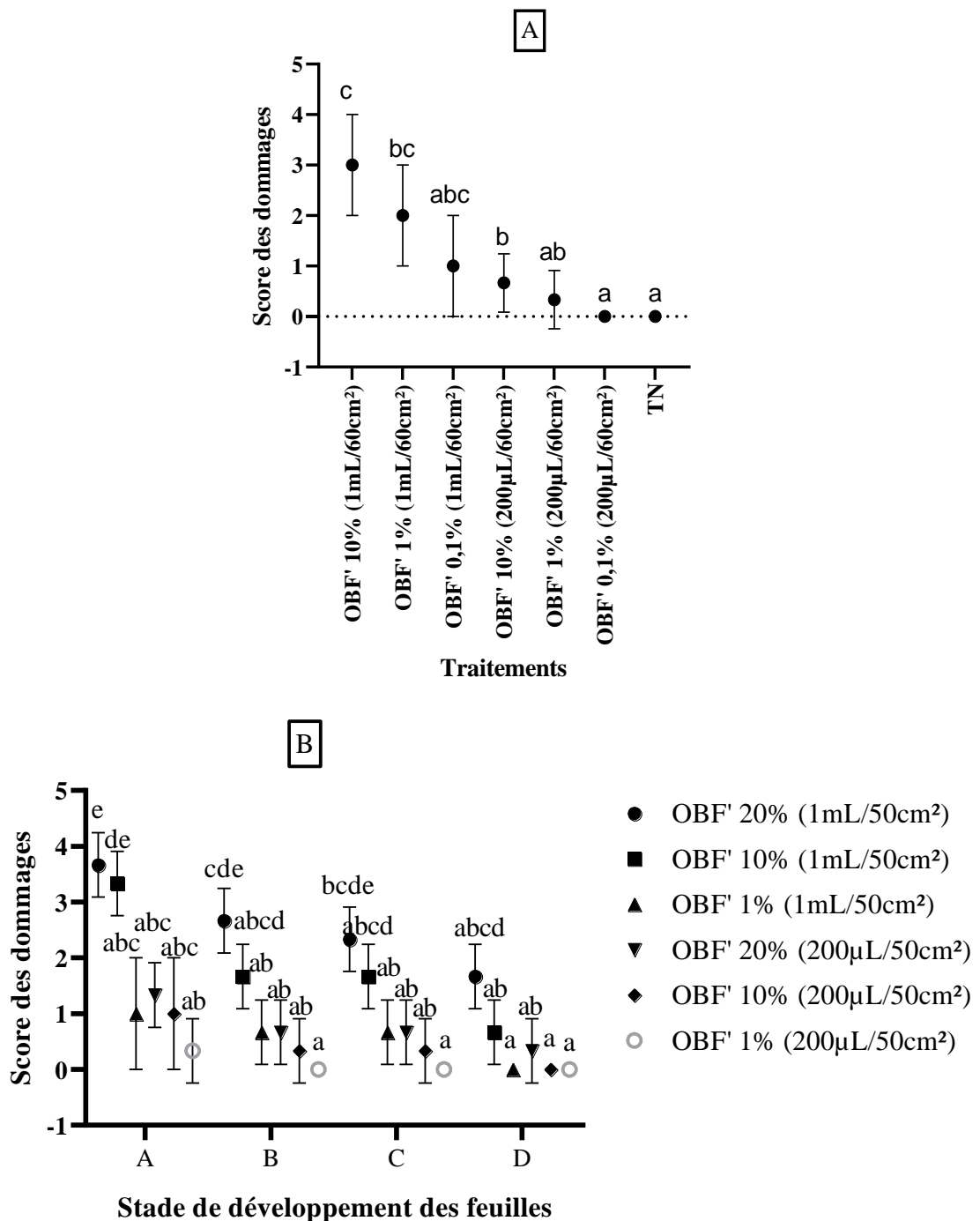


Figure 11 : Phytole tolérance de la formulation OBF' par les plants de cacaoyer après application foliaire sur des feuilles à différent stade de développement: effet sur les feuilles détachées au stade C de développement (A); effet sur les feuilles non détachées (B).

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

III.1.2.2. Effet de la bioformulation OBF' sur la production des plantules de cacaoyer en serre

Le prétraitement des fèves avant la germination avec la formulation OBF' à 1% a augmenté significativement la longueur de la racine principale et le nombre de racines

secondaires en deux semaines mais, n'a pas eu d'effet significatif sur la cinétique de germination et de la levée (Figure 12). Cependant, au cours de la levée, le traitement OBF' à 1% a significativement augmenté la longueur de la racine principale et le nombre de racines secondaires en 12 jours (Figure 13). Ainsi, la longueur des racines au 12^{ème} jour a été de 2,78 cm et 4,52 cm en moyenne, respectivement pour le témoin négatif et le traitement OBF'. En outre, le nombre de racines secondaires au 12^{ème} jour a été de 18,4 et 22,2 en moyenne, respectivement pour le témoin négatif et le traitement OBF'.

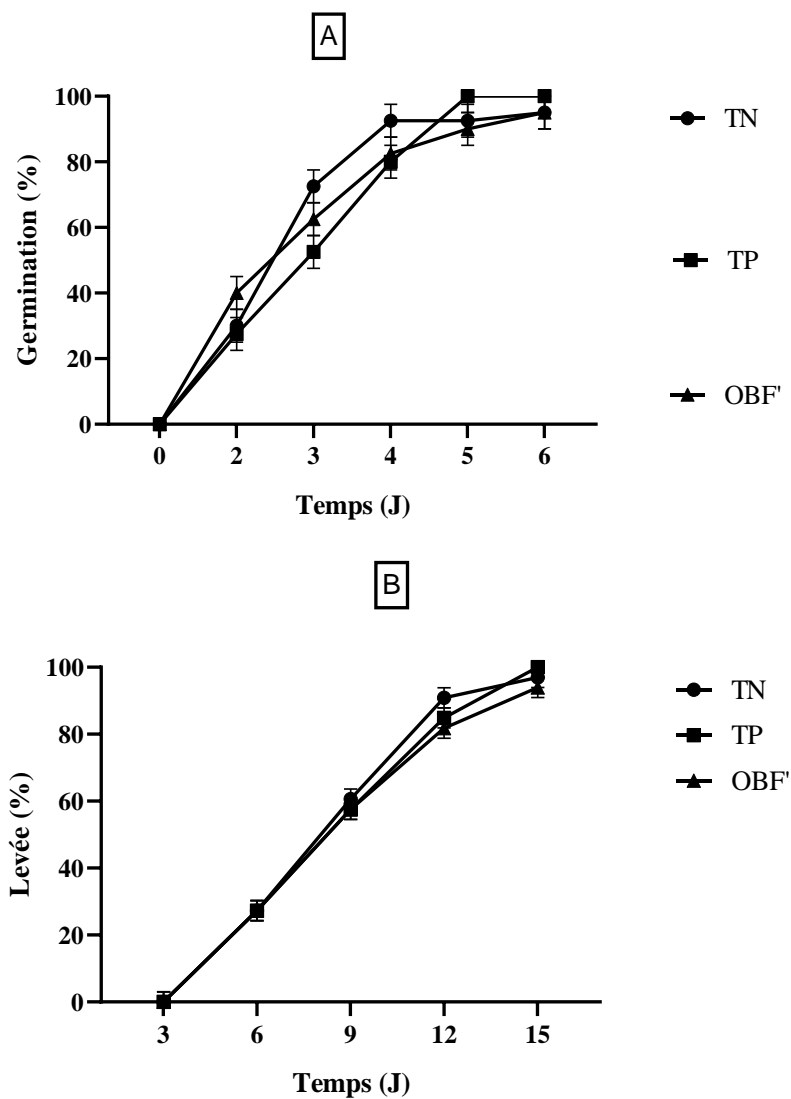


Figure 12 : Effet de la formulation OBF' sur la germination (A) et de la levée (B) des fèves de cacao. TN : Témoin négatif; TP : Témoin positif ; OBF' : bioformulation OBF'.

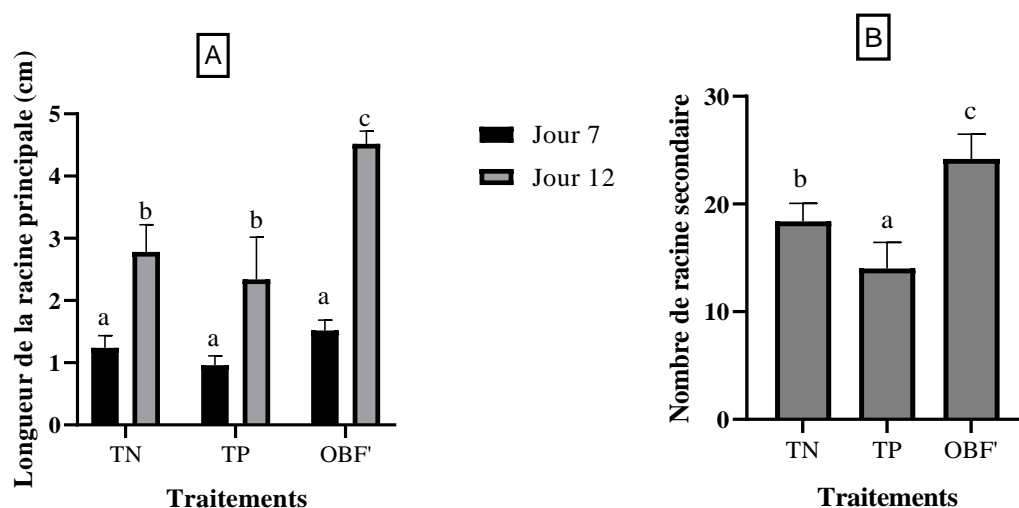


Figure 13 : Effet de la formulation OBF' sur la longueur des racines (A) et le nombre de racines secondaires (B) en 12 jours.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

La surface foliaire est le seul paramètre de croissance aérienne relevé qui a significativement augmenté après 16 semaines par application foliaire de OBF'. De plus, le substrat TNS a également favorisé l'augmentation de la surface foliaire par rapport à TS et TS+PM. La surface foliaire des plants a augmenté de 183,56 cm² à 301,02 cm² (Tableau XIV).

La hauteur des plants de cacao n'a pas été affectée par le traitement, mais par la nature du substrat. Seule la hauteur des lots ayant le substrat TNS a significativement augmenté par rapport au lot TS+PM+TN et les plants ont eu une hauteur moyenne de tige allant de 17,63 cm à 20,46 cm (Tableau XIV).

Le nombre de feuilles n'a pas été affecté par le traitement mais, par la nature du substrat. Ainsi, les substrats TS et TS+PM ont eu des nombres de feuilles significativement inférieurs au substrat TNS et ce dernier a varié de 7,27 à 9,82. Cependant, seuls les lots ayant le substrat TNS ont significativement augmenté par rapport au lot TS+PM+TN (Tableau XIV).

Les paramètres racinaires n'ont pas été affectés significativement par les traitements au bout de 16 semaines (Tableau XV). Seul le substrat TNS a amélioré la masse fraîche et sèche des racines tandis que le traitement OBF' n'a amélioré que la masse sèche des plants (Tableau XV). En effet, les masses fraîches racinaires ont varié de 6,82 g à 9,82 g tandis que les masses sèches ont varié de 197,02 mg à 334,05 mg.

Tableau XIV : Effet des traitements sur les paramètres aériens des plants de cacaoyer à 16 semaines.

Traitements	Hauteurs des plants (cm)	Nombre de feuilles	Surfaces foliaires (cm ²)
TS+TN	18,35±1,39 ^{ab}	7,82±0,87 ^{abc}	191,45±11,63 ^a
TS+TP	19,04±1,55 ^{ab}	7,73±1,1 ^{abc}	226,91±11,54 ^b
TS+OBF'	19,88±1,38 ^{ab}	7,82±1,08 ^{abc}	220,74±8,84 ^b
TNS+TN	20,37±2,11 ^b	9,64±1,75 ^c	300,17±12,51 ^e
TNS+TP	20,25±1,23 ^b	9,18±1,83 ^{bc}	299,61±21,73 ^c
TNS+ OBF'	20,46±0,94 ^b	9,82±1,72 ^c	326,68±8,50 ^d
TS+PM+TN	17,63±2,48 ^a	6,82±1,89 ^a	183,56±10,20 ^a
TS+PM+TP	19,23±2,09 ^{ab}	7,27±1,79 ^{ab}	215,73±9,37 ^b
TS+PM+ OBF'	18,55±1,67 ^{ab}	8,45±1,69 ^{abc}	215,68±9,81 ^b

Dans chaque colonne, les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$. TS: Terre stérile; TNS: Terre non stérile; TN: Témoin négatif; TP: Témoin positif; OBF': Formulation; PM: *Phytophthora megakarya*.

Tableau XV : Effet des traitements sur les paramètres morphologiques racinaires des plants de cacaoyer à 16 semaines.

Traitements	Longueur des racines (cm)	Masse fraîche des racines (g)	Masse sèche des racines (mg)
TS+TN	17,07±0,31 ^{ab}	7,82±0,87 ^{abc}	198,96±4,92 ^b
TS+TP	26,7±2,12 ^{ab}	7,73±1,1 ^{abc}	206,99±8,28 ^{bc}
TS+ OBF'	22,33±1,8 ^{ab}	7,82±1,08 ^{abc}	215,92±7,44 ^c
TNS+TN	22,4±2,16 ^b	9,64±1,75 ^c	331,72±13,03 ^e
TNS+TP	19,17±1,26 ^b	9,18±1,83 ^{bc}	314,29±9,94 ^d
TNS+ OBF'	21,1±0,09 ^b	9,82±1,72 ^c	334,05±17,05 ^e
TS+PM+TN	16,5±1,5 ^a	6,82±1,89 ^a	197,09±4,68 ^a
TS+PM+TP	26,78±1,97 ^{ab}	7,27±1,79 ^{ab}	205,02±9,29 ^a
TS+PM+ OBF'	24,67±2,93 ^{ab}	8,45±1,69 ^{abc}	201,58±6,44 ^a

Dans chaque colonne, les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$. TS: Terre stérile; TNS: Terre non stérile; TN: Témoin négatif; TP: Témoin positif; OBF': Formulation; PM: *Phytophthora megakarya*.

III.1.2.3. Effet de la bioformulation OBF' sur quelques marqueurs de croissance des plantules

L'épanouissement racinaire observé pendant la germination est associé à une augmentation significative ($P < 0.05$) de la teneur en AIA et en protéines dans les racines chez OBF' comparativement au témoin négatif et au témoin positif (Figure 14). En effet, après douze jours, il y a eu des quantités d'AIA de 0,84 à 1,18 mg/g de MF et des teneurs en protéines allant de 25,53 à 78,35 mg/g de MF respectivement chez le Témoin Négatif et OBF' respectivement (Figure 14).

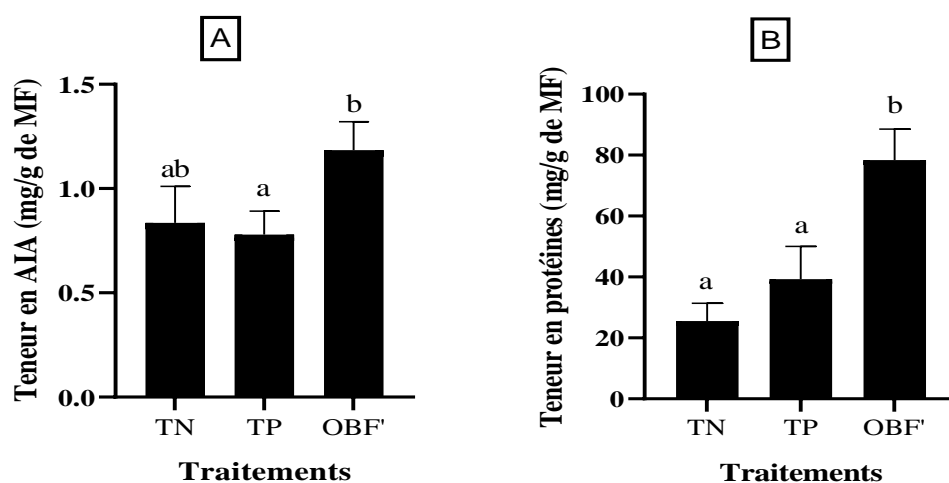


Figure 14 : Effet de la formulation OBF' sur la teneur en (A) Acide Indole Acétique (AIA) et en (B) protéines racinaires au 12^{ème} jour. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

L'analyse de la teneur en chlorophylle des feuilles après 16 semaines a révélé une augmentation significative de la teneur en chlorophylles totales chez les plants ayant reçu le traitement OBF' et les substrats TS et TS+PM (Figure 15). En effet, la teneur en chlorophylles totales des plants traités à OBF' a été de 56,09 à 62,16 mg/g de MF contre 50,34 à 55,67 mg/g de MF chez les plants traités à l'eau. Le traitement chimique quant à lui a donné des teneurs allant de 54,25 mg/g de MF à 63,02 mg/g de MF.

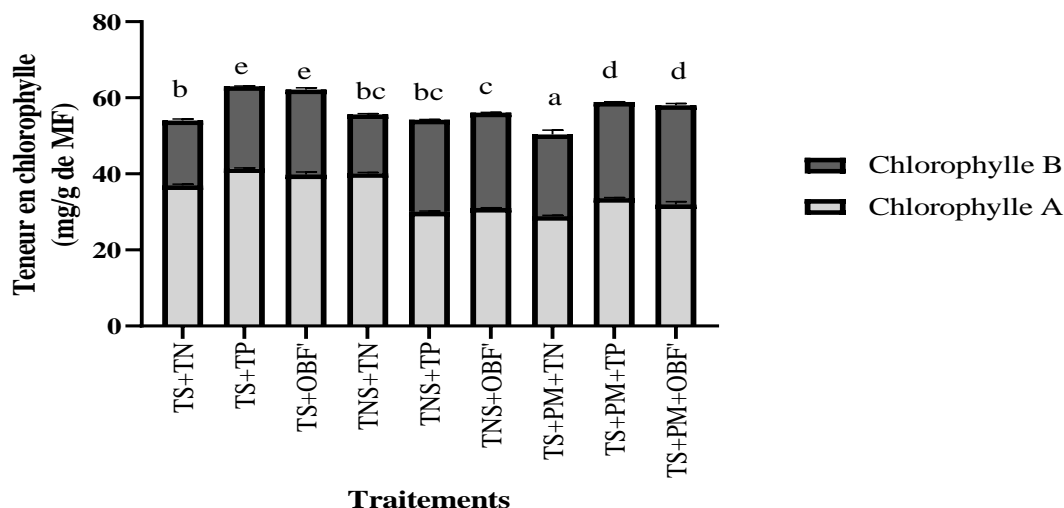


Figure 15: Effet du traitement sur la teneur en chlorophylles dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16^{ème} semaine.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif; OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*.

Par ailleurs, la teneur en protéines, en composés phénoliques et en peroxydases a significativement augmenté chez les plants ayant reçu OBF' indépendamment des substrats (Figures 16,17 et 18). En effet, les teneurs en protéines des plants traités à OBF' ont varié de 1,45 à 1,82 mg de BSA/g de MF tandis que celles des plants traités avec de l'eau ont varié de 0,4 mg à 1,08 mg de BSA/g de MF (Figure 16). Celles du traitement chimique ont varié de 1,01 à 1,56 mg de BSA/g de MF (Figure 16).

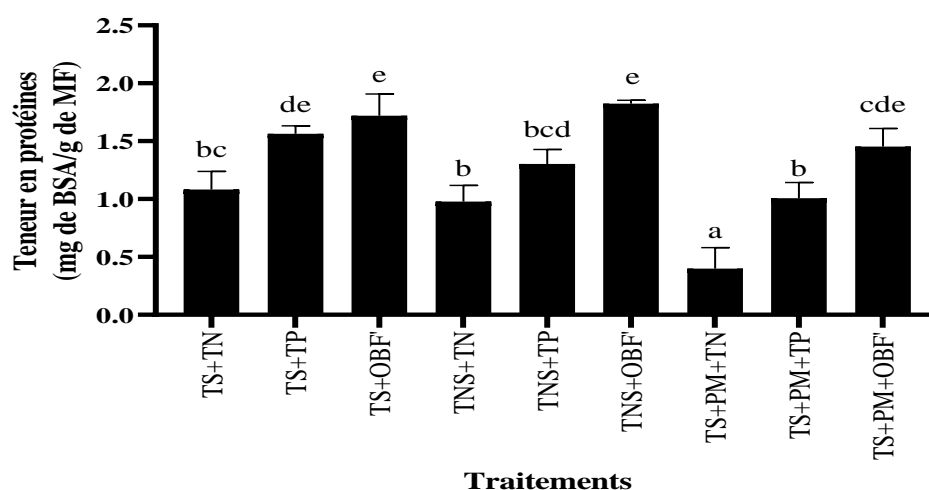


Figure 16: Effet du traitement sur la teneur en protéines dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16^{ème} semaine.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif; OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*.

En outre, les teneurs en composés phénoliques des plants traités à OBF' ont varié de 0,61 à 1,36 mg d'acide gallique/g de MF, tandis que celle des plants traités avec de l'eau ont varié de 0,37 à 0,87 mg d'acide gallique/g de MF et celles du traitement chimique ont varié de 0,44 à 0,90 mg d'acide gallique/g de MF (Figure 17).

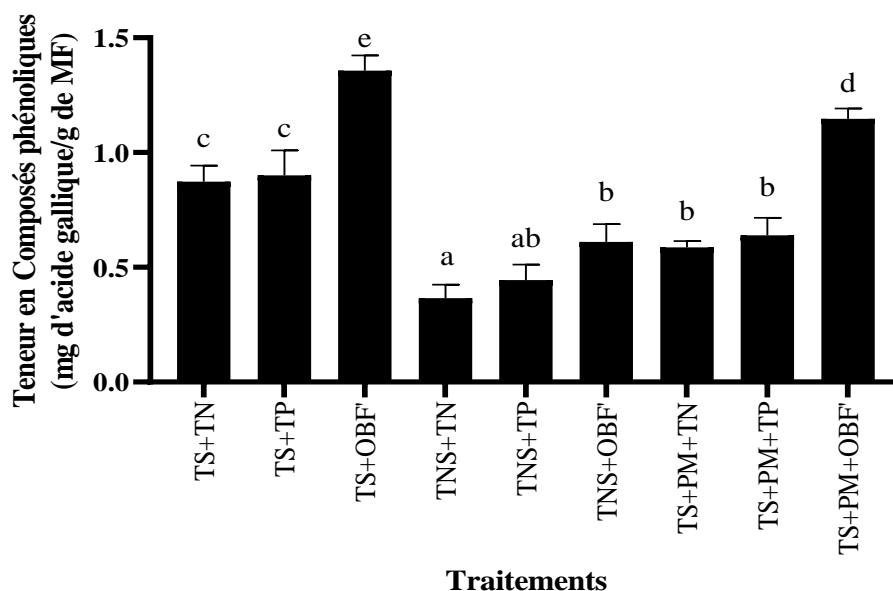


Figure 17: Effet du traitement sur la teneur en chlorophylle dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16^{ème} semaine.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;

OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*.

De plus, l'activité des peroxydases des plants traités à OBF' a varié de 2,30 à 4,17 Abs à 470nm /min (UE)/g de MF, tandis que celle des plants traités avec de l'eau a varié de 1,4 à 2,73 Abs à 470nm /min (UE)/g de MF et celle du traitement chimique a varié de 1,5 à 3,05 Abs à 470nm /min (UE)/g de MF (Figure 18).

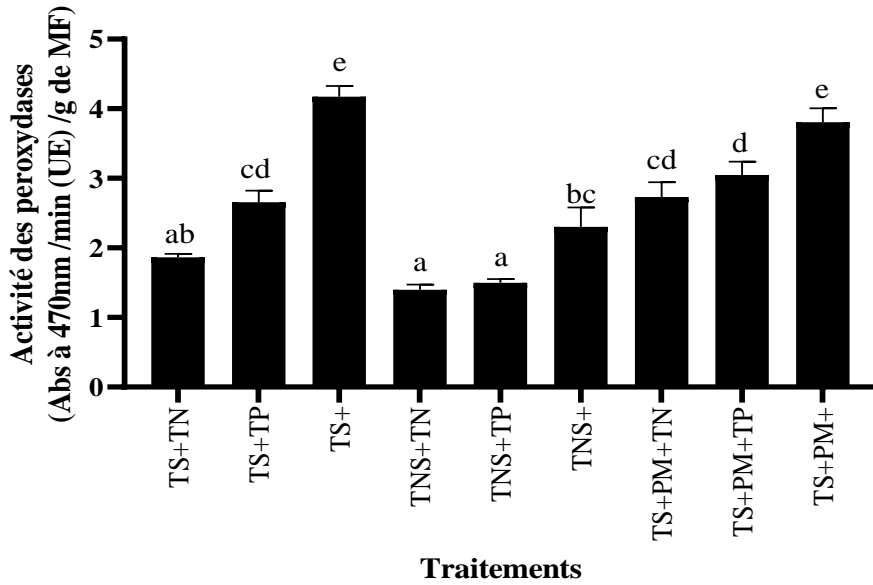


Figure 18: Effet du traitement sur l'activité des peroxydases dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16^{ème} semaine.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;
 OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*.

Les teneurs en sucres solubles ont été affectées significativement uniquement dans le substrat TS ayant reçu OBF' (Figure 19). Ainsi, les teneurs en sucres solubles ont varié de 1,92 mg de glucose/g de MF à 1,96 mg de glucose/g de MF chez TS+PM contre 2 mg de glucose/g de MF à 2,04 mg de glucose/g de MF pour TS et TNS.

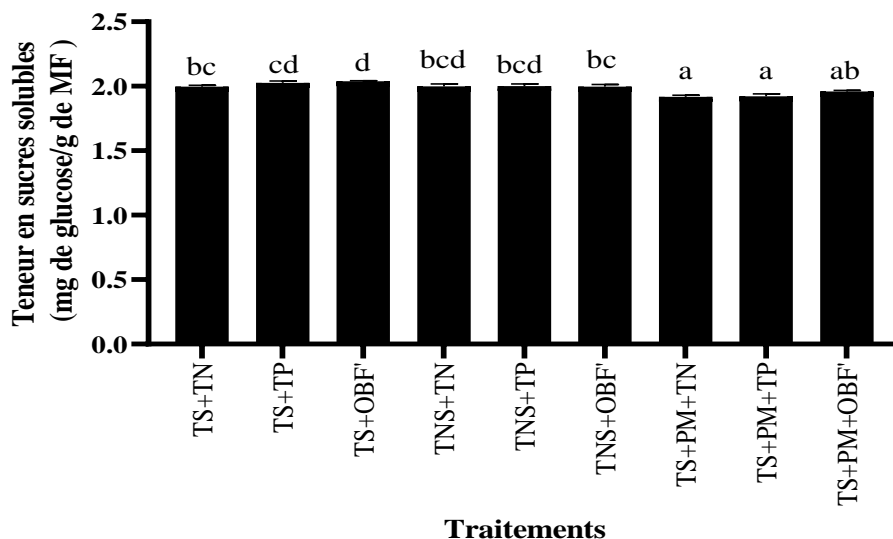


Figure 19: Effet du traitement OBF' la teneur en sucres solubles dans les feuilles des plants de cacaoyer à la 16^{ème} semaine.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;
 OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*.

III.1.2.4. Effet de la bioformulation OBF' sur la résistance des plantules de cacaoyer

Effet de la bioformulation OBF' sur la sévérité de l'inoculation à *P. megakarya* des feuilles détachées des plants SCA12xSNK16

L'analyse de la variance a montré que l'index de sévérité de la maladie obtenu après inoculation des feuilles détachées a été réduit significativement pour les traitements OBF' (formulation 1%) de même que les témoins positifs (pesticide chimique), comparativement aux témoins négatifs (eau). En effet, l'index de sévérité du traitement OBF' a varié de 0,38 à 0,86 (très tolérant) de même que les traitements chimiques, comparativement aux témoins négatifs qui ont varié de 2,75 à 3,57 correspondants à des plantes susceptibles (Figure 20).

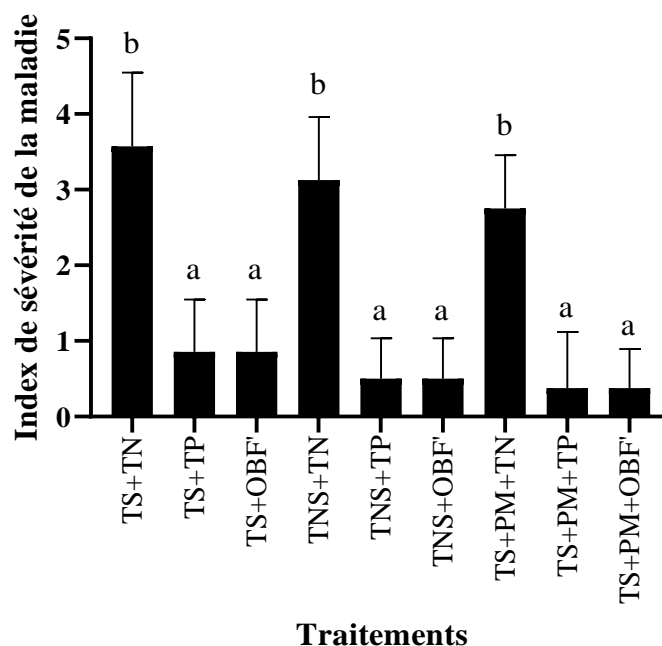


Figure 20: Effet de la formulation OBF' sur l'index de sévérité à *P. megakarya* des feuilles détachées de cacaoyer.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;

OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*.

Effet de la bioformulation OBF' sur la résistance des feuilles détachées des plants SCA12xSNK16 contre *Phytophthora megakarya*

➤ Effet des traitements sur la teneur en composés phénoliques totaux

L'analyse quantitative des composés phénoliques totaux dans les feuilles avant et après inoculation a montré des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements. Elle a été plus importante pour les traitements OBF' par rapport aux témoins négatifs pour chaque substrat (Figure 21). En effet, avant inoculation, la teneur en composés phénoliques des

traitements OBF' a été significativement supérieure comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette teneur a varié de 0,61 à 1,36 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements OBF' contre des teneurs de 0,37 à 0,87 mg/g de MF et de 0,44 à 0,90 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 21).

En outre, après inoculation, la teneur en composés phénoliques des traitements OBF' a été plus élevée comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette teneur a varié de 1,02 à 1,90 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements OBF' contre les teneurs de 0,66 à 1,19 mg/g de MF et de 0,77 à 1,29 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 21).

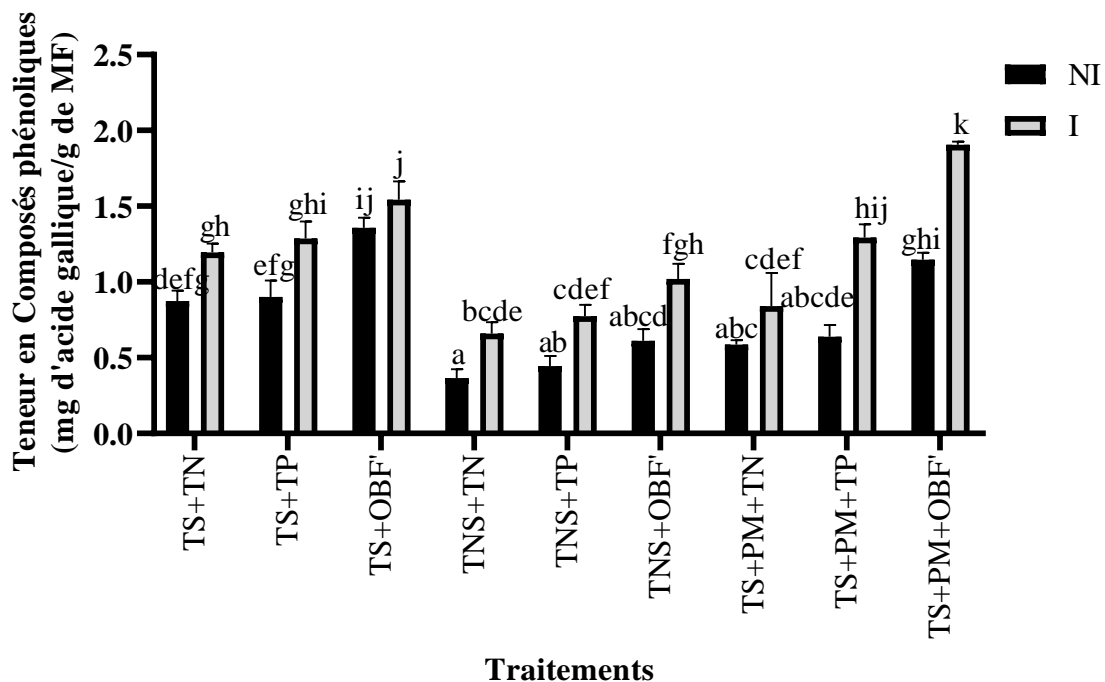


Figure 21: Effet de la formulation OBF' sur la teneur en composés phénoliques avant et après inoculation des feuilles des plants de cacaoyer.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;
OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*; NI: Non Infectée; I: Infectée.

➤ Effet des traitements sur la teneur en flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes dans les feuilles avant et après inoculation a montré des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements. Elle a été plus importante pour les traitements OBF' par rapport aux témoins négatifs pour chaque substrat (Figure 22).

En effet, avant inoculation, la teneur en flavonoïdes des traitements OBF' est plus élevée comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette teneur a varié de 0,22 à 0,54 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements OBF' contre les teneurs de 0,05 à 0,17 mg/g de MF et de 0,11 à 0,25 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 22).

Dans la même dynamique, après inoculation, la teneur en flavonoïdes des traitements OBF' est plus importante comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette teneur va de 0,57 à 0,94 mg/g d'équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements OBF' contre les teneurs de 0,19 à 0,31 mg/g de MF et de 0,46 à 0,62 mg/g de MF équivalent gramme d'acide gallique pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 22).

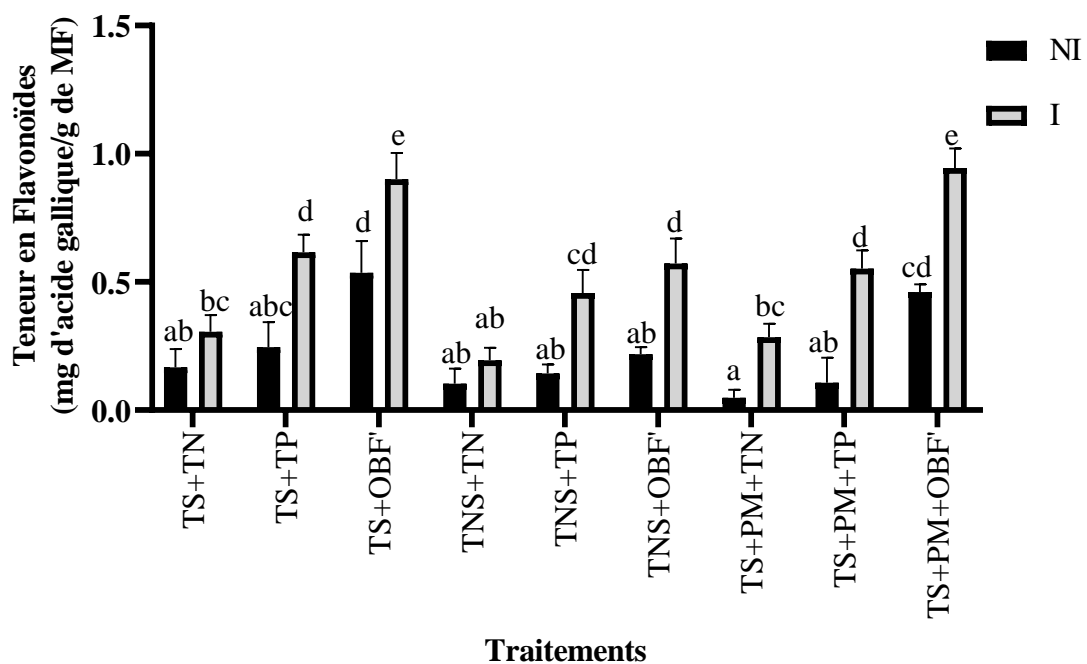


Figure 22: Effet de la formulation OBF' sur la teneur en flavonoïdes avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;
OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*; NI: Non Infectée; I: Infectée.

➤ Effet des traitements sur la teneur en protéines

L'analyse quantitative des protéines dans les feuilles avant et après infection a montré des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements. Elle a été plus importante pour les traitements OBF' par rapport aux témoins négatifs pour chaque substrat (Figure 23). En effet,

avant inoculation, la teneur en protéines des traitements OBF' a été plus élevée comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette teneur a varié de 1,45 à 1,82 mg/g de MF équivalent gramme de BSA pour les traitements OBF' contre les teneurs de 0,4 à 1,08 mg/g de MF et de 1,01 à 1,56 mg/g de MF équivalent gramme de BSA pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 23).

De plus, après inoculation, la teneur en protéines des traitements OBF' a été plus élevée comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette teneur a varié de 2,09 à 2,77 mg/g de MF équivalent gramme de BSA pour les traitements OBF' contre les teneurs de 0,79 à 1,74 mg/g de MF et de 1,63 à 2,41 mg/g de MF équivalent de BSA pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 23).

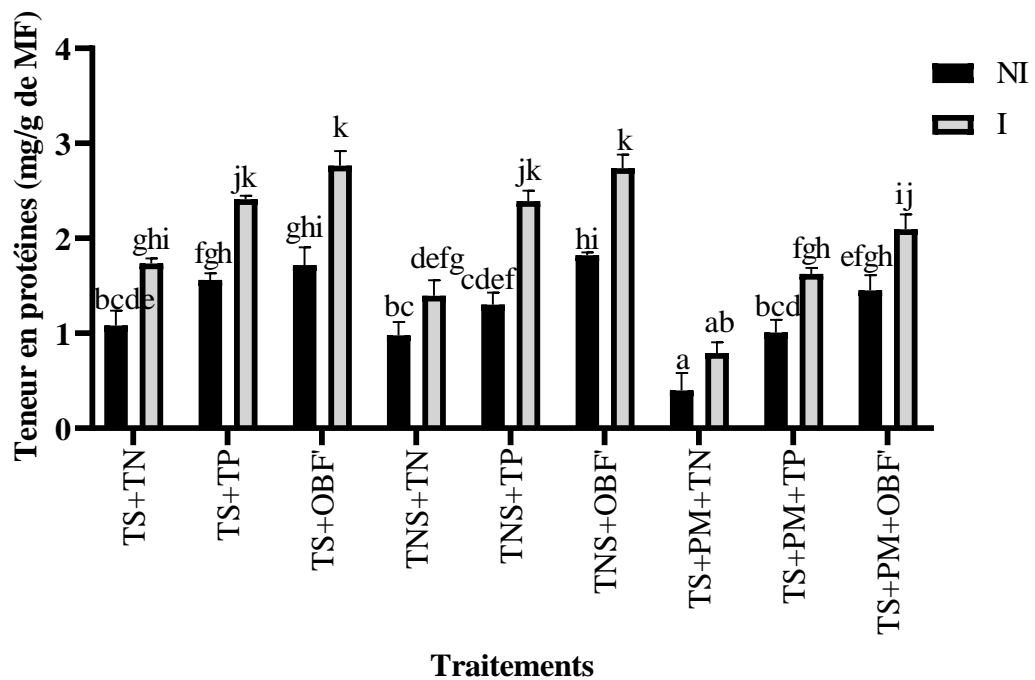


Figure 23: Variation de la teneur en protéines avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif;
OBF': formulation OBF'; PM : *Phytophthora megakarya*; NI: Non Infectée; I: Infectée.

➤ Effet des traitements sur l'activité β -1,3-glucanases

L'activité enzymatique β -1,3-glucanases avant et après inoculation des feuilles des différents traitements, a présenté des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements. Elle a été plus importante pour les traitements OBF' par rapport aux témoins négatifs pour chaque substrat (Figure 24). En effet, avant inoculation, cette activité a varié de 2,96 à 4,38

mMole de glucose libéré/min/g de MF pour les traitements OBF' contre les activités de 0,86 à 2,40 mMole de glucose libéré/min/g de MF et de 1,85 à 3,27 mMole de glucose libéré/min/g de MF pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 24).

Dans le même élan, après inoculation, l'activité enzymatique β -1,3-glucanase des traitements OBF' a été plus élevée comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette activité a varié de 8,08 à 10,98 mMole de glucose libéré/min/g de MF pour les traitements OBF' contre les activités de 5,86 à 8,39 mMole de glucose libéré/min/g de MF et de 7,59 à 9,99 mMole de glucose libéré/min/g de MF pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 24).

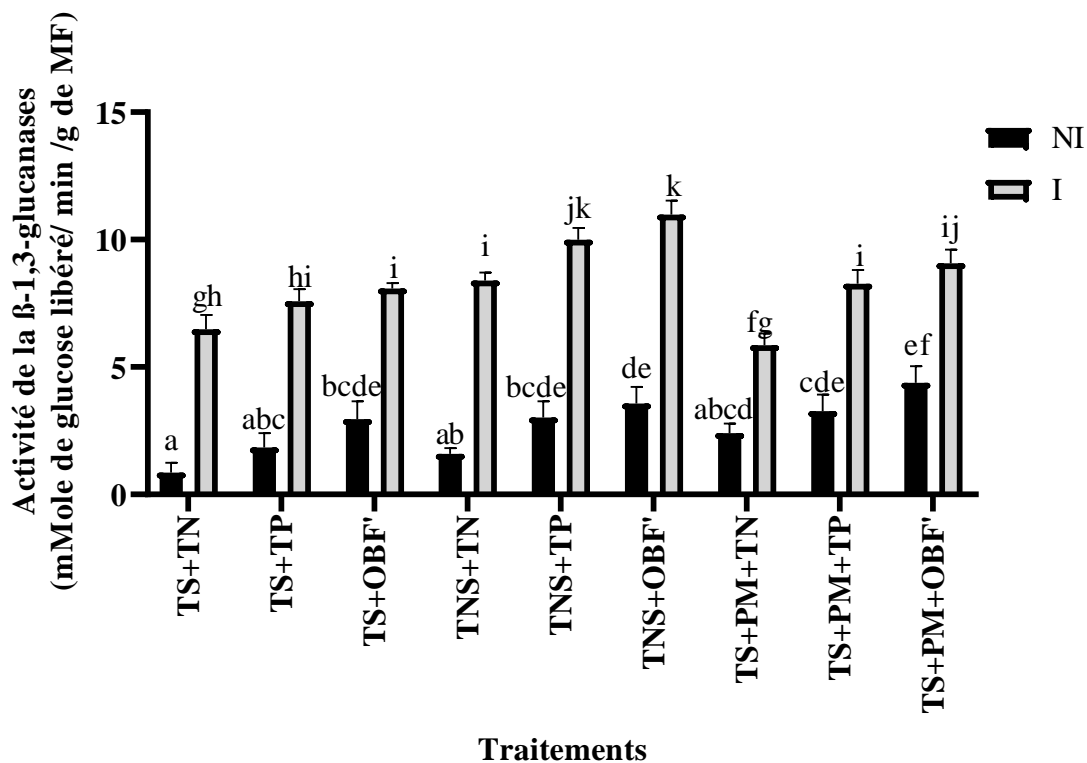


Figure 24: Variation de l'activité de la β -1,3-glucanases avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif; OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*; NI: Non Infectée; I: Infectée.

➤ Effet des traitements sur l'activité des peroxydases

L'activité enzymatique des peroxydases dans les feuilles avant et après inoculation a montré des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements et cette activité a été plus importante pour les traitements OBF' par rapport aux témoins négatifs pour chaque substrat

(Figure 25). En effet, avant inoculation, cette activité a varié de 2,30 à 4,17 Abs à 470 nm/min/g de MF pour les traitements OBF' contre les activités de 1,40 à 2,73 Abs à 470 nm/min/g de MF et de 1,50 à 3,05 Abs à 470 nm/min/g de MF pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 25).

En outre, après inoculation, l'activité enzymatique des peroxydases des traitements OBF' a été plus importante comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette activité a varié de 3,45 à 5,51 Abs à 470 nm/min/g de MF pour les traitements OBF' contre les activités de 1,57 à 3,38 Abs à 470 nm/min/g de MF et de 2,17 à 4,06 Abs à 470 nm/min/g de MF pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 25).

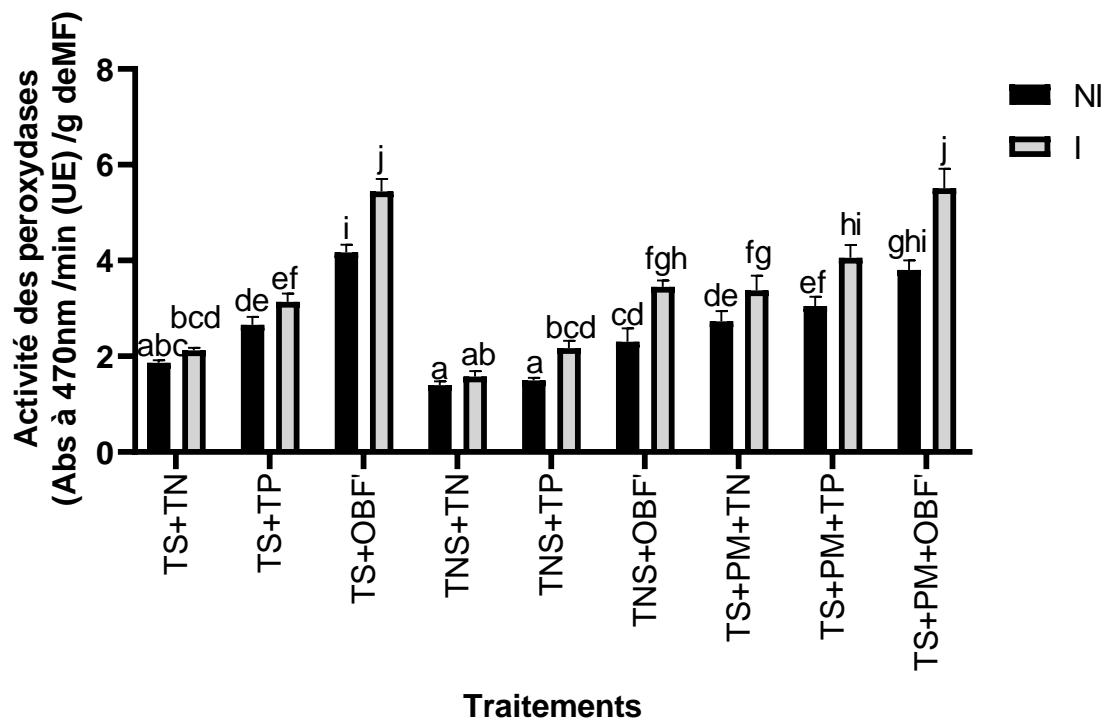


Figure 25: Variation de l'activité des Peroxydases avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif; OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*; NI: Non Infectée; I: Infectée.

➤ Effet des traitements sur l'activité des polyphénol-oxydases

L'activité enzymatique des polyphénol-oxydases dans les feuilles avant et après inoculation a montré des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements et cette activité a été plus importante pour les traitements OBF' par rapport aux témoins négatifs pour

chaque substrat (Figure 26). En effet, avant inoculation, cette activité a varié de 0,37 à 0,67 Abs à 330 nm/min/g de MF pour les traitements OBF' contre les activités de 0,11 à 0,51 Abs à 330 nm/min/g de MF et de 0,27 à 0,63 Abs à 330 nm/min/g de MF pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 26).

De même, après inoculation, l'activité enzymatique des polyphénol-oxydases des traitements OBF' a été plus importante comparativement aux témoins négatifs et aux témoins positifs. Ainsi, cette activité a varié de 0,89 à 1,35 Abs à 330 nm/min/g de MF pour les traitements OBF' contre les activités de 0,40 à 1,13 Abs à 330 nm/min/g de MF et de 0,79 à 1,26 Abs à 330 nm/min/g de MF pour les traitements témoins négatifs et témoins positifs respectivement (Figure 26).

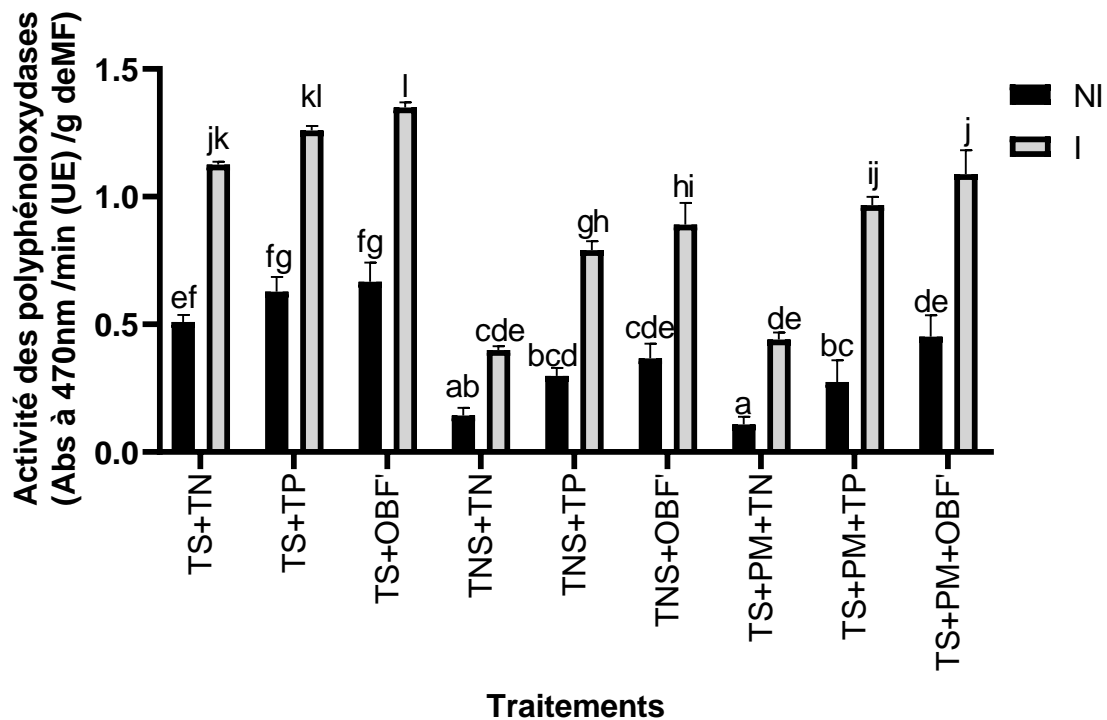


Figure 26: Variation de l'activité des polyphénol-oxydases avant et après infection dans les feuilles des plants de cacaoyer traités ou non traités à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

TS: Terre Stérile; TNS: Terre Non Stérile; TN: Témoin Négatif; TP: Témoin Positif; OBF': formulation OBF'; PM: *Phytophthora megakarya*; NI: Non Infectée; I: Infectée.

III.1.3. Effet de la bioformulation OBF' sur les défenses du cacaoyer vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* à partir des cabosses détachées

III.1.3.1. Effet de la bioformulation OBF' sur la sévérité de la pourriture des cabosses SNK10 et SNK413

L'analyse de la variance a montré que l'index de sévérité de la pourriture brune des cabosses causée par *P. megakarya* varie lorsque les cabosses sont préalablement traitées à la formulation OBF'. En effet, le prétraitement des cabosses à OBF' suivi de leur inoculation réduit la sévérité de la maladie des clones SNK10 et SNK413 comparativement à leurs témoins négatifs respectifs. Ainsi, la sévérité de l'infection des cabosses varie de 2,17 à 1 pour le clone SNK10 tandis qu'elle varie de 1,33 à 0,5 pour le clone SNK413 (Figure 27).

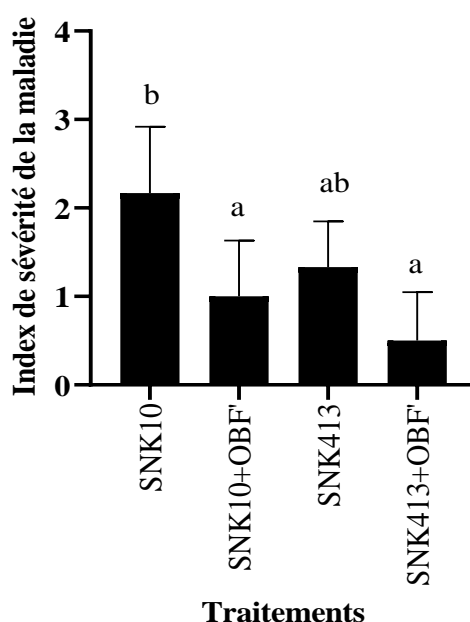


Figure 27: Variation de l'index de sévérité à la pourriture brune causée par *P. megakarya* sur les cabosses de cacaoyer détachées des clones SNK10 et SNK413.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; OBF': formulation OBF.

III.1.3.2. Effet de la bioformulation OBF' sur l'expression des gènes de résistance des cabosses détachées des clones SNK10 et SNK413 contre *Phytophthora megakarya*

Choix du meilleur système d'extraction des ARN totales à partir des cabosses

L'extraction des ARN totales par les différentes méthodes permet de les détecter. Toutefois, seule la nouvelle méthode décrite (Méthode 7) a permis de les obtenir en qualité et en quantité (Figure 28). En effet, les ARNm obtenus avec la méthode 7 ont un rapport 260/280

compris entre 1,8 et 2,0; contrairement aux autres méthodes qui donnent un rapport 260/280 compris entre 1,09 à 1,68. Par ailleurs, la méthode 3 a permis d'avoir un rapport 260/280 compris entre 1,03 à 2,62 dépendamment du clone (Figure 28). De plus, les ARN totales obtenus avec la méthode 7 ont un rapport 260/230 compris entre 1,71 et 2,02; contrairement aux autres méthodes qui donnent un rapport 260/230 compris entre 0,09 à 1,03 (Figure 29).

En outre, les quantités d'ARN totales obtenus avec la méthode 7 ont été comprises entre 3,89 et 5,72 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de MF; contrairement aux autres méthodes qui donnent des quantités comprises entre 0,11 à 3,82 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de MF. Par ailleurs, le clone SNK413 a permis d'avoir de meilleures quantités (allant de 1,98 à 5,72 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de MF) comparé au clone SNK10 (allant de 0,11 à 3,89 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de MF) (Figure 30).

L'amplification par qPCR des ARNm obtenus par la méthode 7 après leur transcription reverse a indiqué la présence des gènes ciblés (Photo 8). De plus, l'électrophorèse de ces ARN totales a permis de visualiser les ARNm 28S et 18S, tandis que l'électrophorèse des produits de qPCR a montré la présence du gène amplifié uniquement (Photo 8).

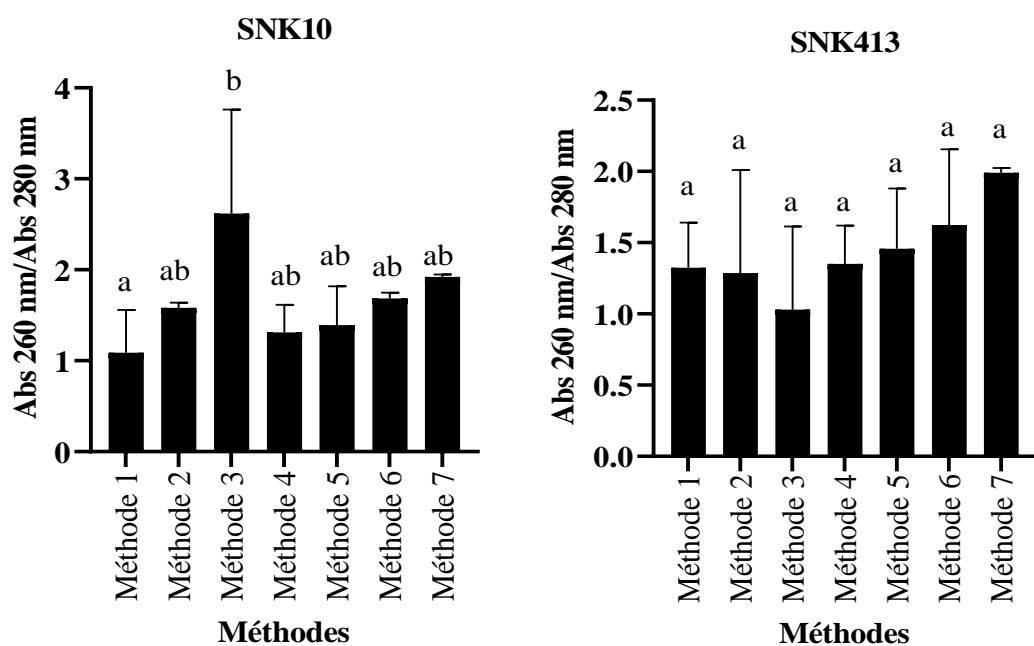


Figure 28: Variation du rapport 260/280 des ARN totales obtenus des cabosses après extraction utilisant différents protocoles à base de CTAB.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; Abs: Absorbance; nm: nanomètre.

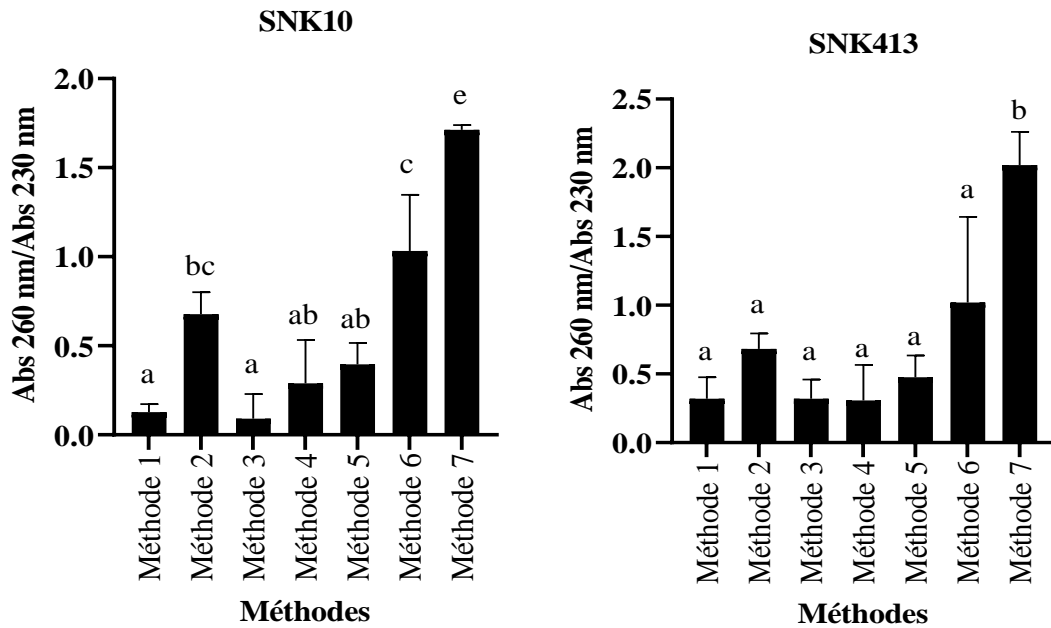


Figure 29: Variation du rapport 260/230 des ARN totales obtenues des cabosses après extraction utilisant différents protocoles à base de CTAB.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; Abs:

Absorbance; nm: nanomètre.

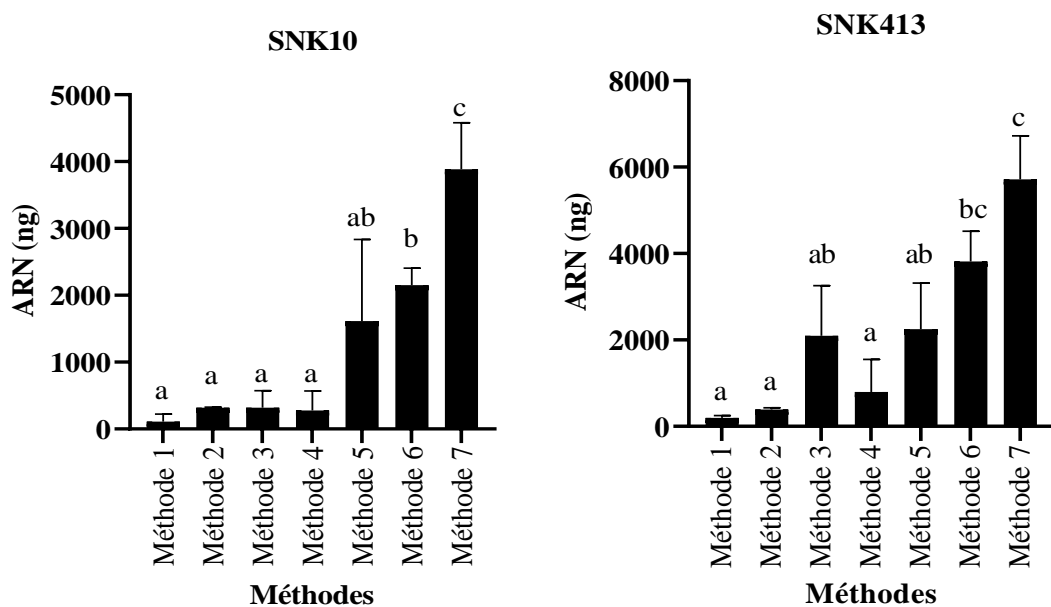


Figure 30: Variation de la quantité d'ARN totales obtenues des cabosses après extraction utilisant différents protocoles à base de CTAB.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; Abs:

Absorbance; nm: nanomètre.

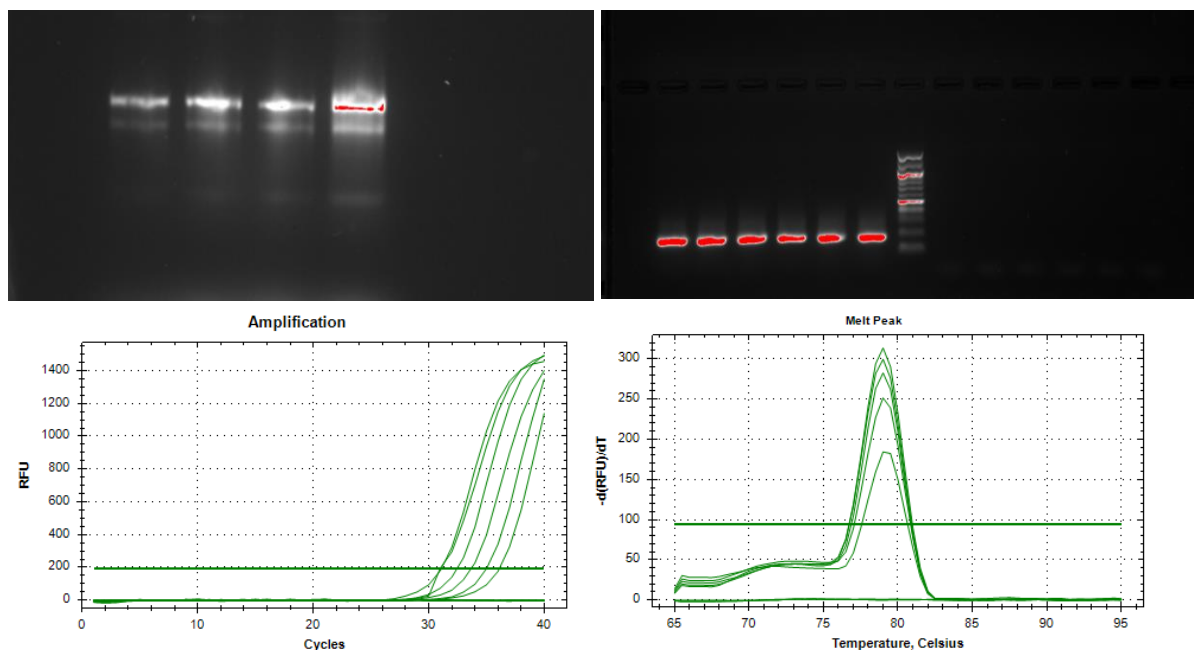


Photo 21 : Electrophorèse des ARN totales obtenue grâce à la méthode 7 et des produits de qPCR du gène de référence *acylcarrier proteine*: (A) image du gel d'électrophorèse des ARN totales, (B) image du gel d'électrophorèse des produits de qPCR des ARNm , (C) image de l'amplification du gène de référence en utilisant les ADNc, (D) pic d'ébullition du gène amplifié par qPCR en utilisant les ADNc.

Effet des traitements sur la voie de résistance médié par l'acide salicylique

Le suivi du niveau d'expression des gènes endo-1,3-beta-glucosidase (PR2) (Figure 31), pathogenesis-related protein 1-like (Pr1) (Figure 32), pathogenesis-related protein 4 (PR-4) (Figure 33) et endochitinase EP3 (PR8) (Figure 34) par RT-qPCR a montré une augmentation significative ($P \leq 0,05$) de ceux-ci en fonction du clone après application de OBF'. Cependant, le traitement des plants avec OBF' n'a pas entraîné une augmentation significative relative de ces gènes pour le clone SNK10. De plus, le traitement du clone SNK413 avec la formulation OBF' a entraîné une augmentation significative de l'expression relative de ces gènes (Figure 34) par rapport au clone SNK10 traité et non traité, et par rapport au clone SNK413 non traité. Ainsi, l'expression relative du gène PR2 avant et après inoculation chez le clone SNK413 traité à OBF' a significativement augmenté par rapport aux autres traitements et varié de 2,87 à 19,12 (Figure 31). Par ailleurs, le clone SNK10 a eu des expressions relatives des gènes allant de 0,61 à 1,47 tout comme le clone SNK413 non traité, ont eu des expressions relatives allant de 0,20 à 0,78 (Figure 31).

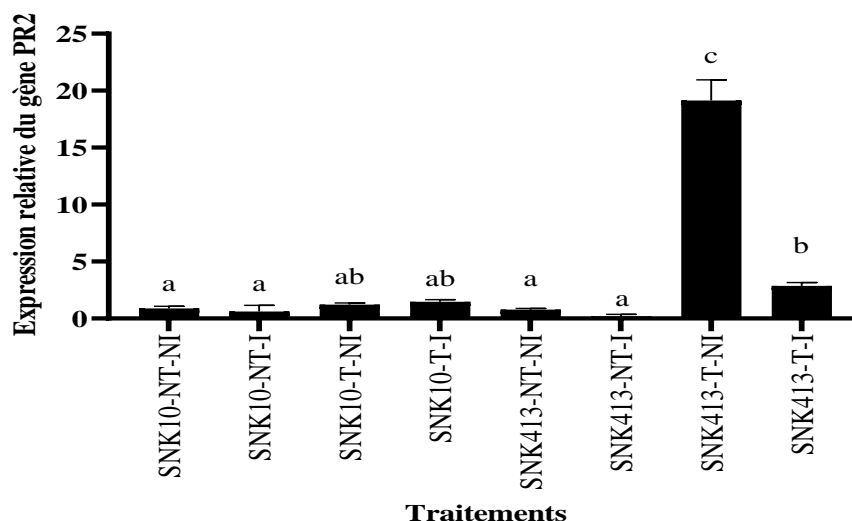


Figure 31: Variation de l'expression relative du gène endo-1,3-beta-glucosidase (PR2) avant et après infection des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

De plus, l'expression relative du gène PR1 avant et après inoculation chez le clone SNK413 traité à OBF' a significativement augmenté par rapport aux autres traitements et varié de 1,86 à 3,74. Par ailleurs, le clone SNK10 a eu des expressions relatives allant de 0,53 à 1,34; tout comme le clone SNK413 non traité, a eu des expressions relatives allant de 0,23 à 0,36 (Figure 32).

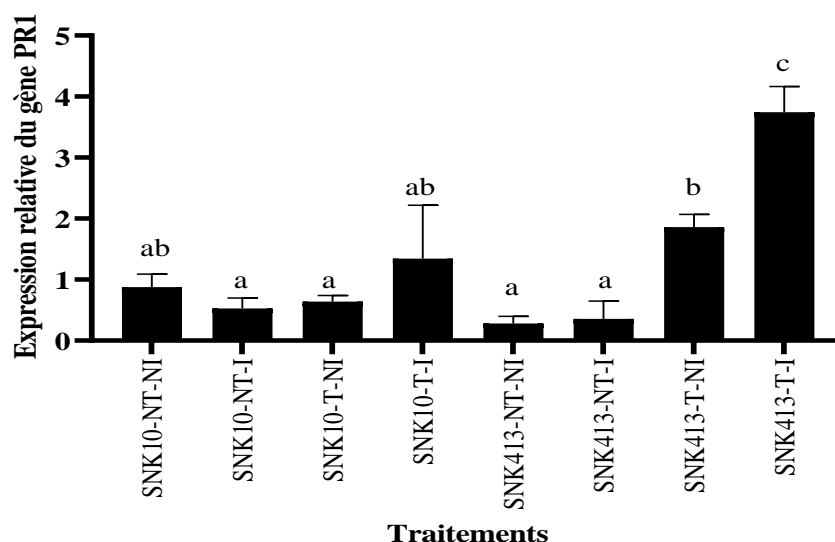


Figure 32: Variation de l'expression relative du gène pathogenesis-related protein 1-like (PR1) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

En outre, l'expression relative du gène PR4 avant et après inoculation chez le clone SNK413 traité à OBF' a également significativement augmenté par rapport aux autres traitements et varié de 2,67 à 3,24. Par ailleurs, le clone SNK10 a eu des expressions relatives allant de 0,58 à 1,00; tout comme le clone SNK413 non traité a eu des expressions relatives allant de 0,70 à 1,29 (Figure 33).

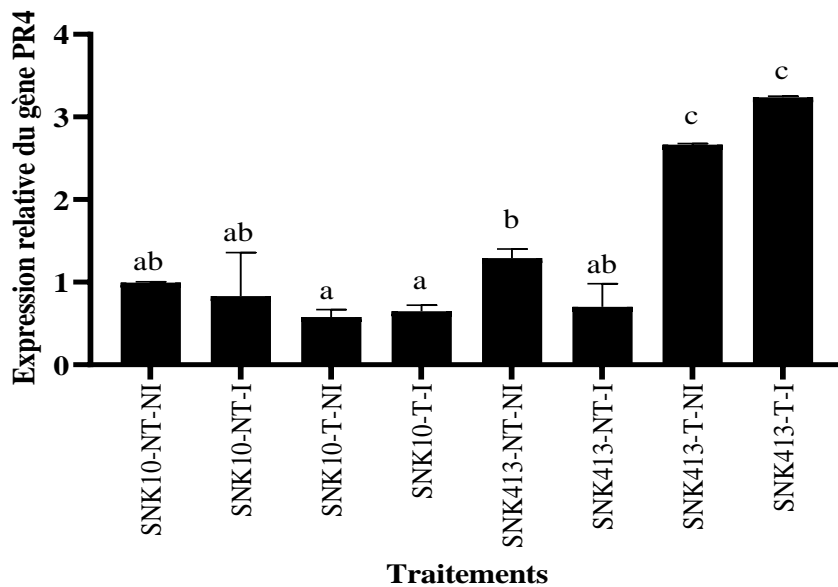


Figure 33: Variation de l'expression relative du gène pathogenesis-related protein 4 (PR4) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Par ailleurs, l'expression relative du gène PR8 avant et après inoculation chez le clone SNK413 traité à OBF' a également significativement augmenté par rapport aux autres traitements et varié de 2,3 à 56,92. Par ailleurs, le clone SNK10 a eu des expressions relatives allant de 0,35 à 0,94 tout comme le clone SNK413 non traité, a eu des expressions relatives allant de 0,30 à 1,16 (Figure 34).

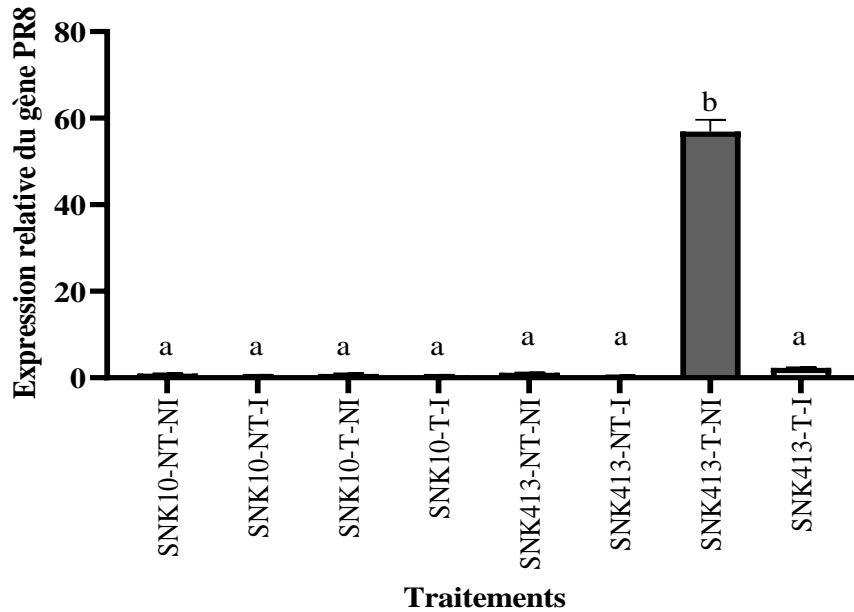


Figure 34: Variation de l'expression relative du gène endochitinase EP3 (PR8) avant et après infection des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non

Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Effet des traitements sur la voie de résistance médié par l'acide jasmonique

L'amplification par RT-qPCR des gènes allèle oxyde synthase 1 (TcAOS) (Figure 35) et allèle oxyde cyclase 4 (TcAOC4) (Figure 36), a montré une augmentation significative ($P \leq 0,05$) en fonction des variétés et des traitements. Le traitement à OBF' des clones SNK10 et SNK413 a entraîné une augmentation significative de l'expression relative du gène TcAOS (Figure 35). En effet, l'expression relative du gène TcAOS après inoculation chez les clones SNK10 et SNK413 traité à OBF', a été significativement augmentée par rapport aux autres traitements et variée de 4,94 à 9,74. De plus, les clones SNK10 et SNK413 non traités et non infectés, ont eu des expressions relatives allant de 0,97 à 2,66. Les clones SNK10 et SNK413 non traités et infectés, ont eu des expressions relatives allant de 1,27 à 3,51 (Figure 35).

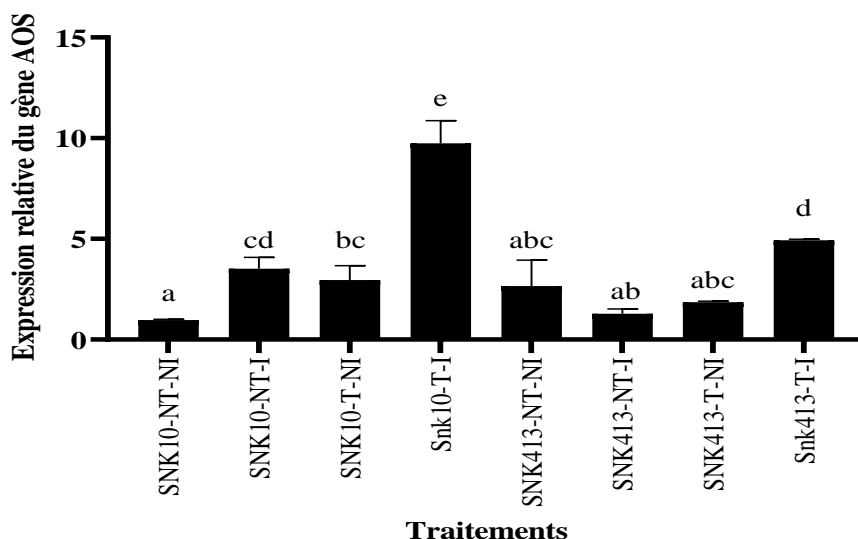


Figure 35: Variation de l'expression relative du gène allèle oxyde synthase 1 (TcAOS) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'. Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.
 SNK10 : Sélection de Nkoemvone 10 ; SNK413 : Sélection de Nkoemvone 413 ; NT= Non Traitée à OBF' ; T= Traitée à OBF' ; NI= Non Infectée ; I= Infectée.

En outre, l'expression relative du gène TcAOC4 n'a pas augmenté de manière significative à la suite du traitement avec OBF' et l'inoculation. Cependant seul l'expression chez le clone SNK10 non traité et infecté a significativement augmenté comparativement à SNK10 non traité et non infecté. Cette augmentation n'a pas été significative en comparaison aux cabosses traitées avec OBF' et à celles SNK413 non traitées. Ainsi, l'expression de ce gène chez le clone SNK10 a varié de 0,80 à 1,67 et chez le clone SNK413, de 1,15 à 1,60; (Figure 36).

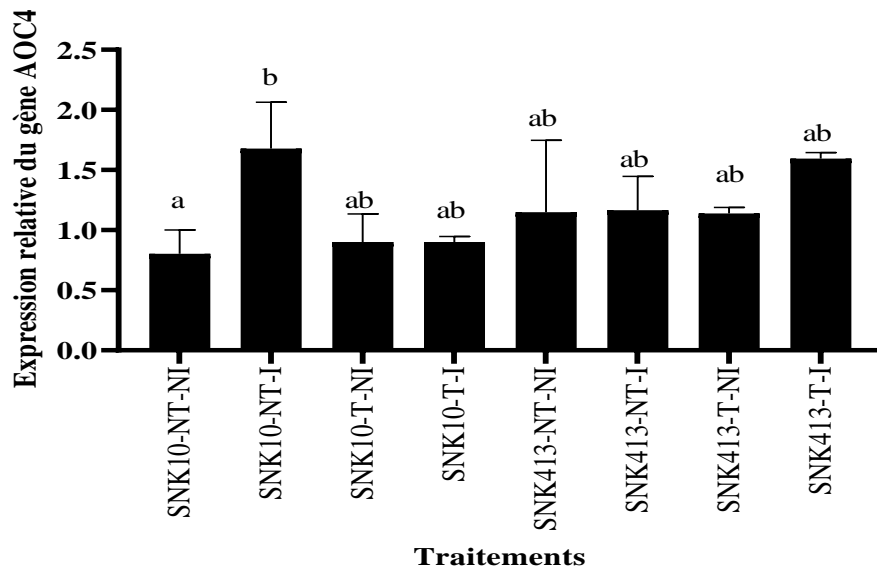


Figure 36: Variation de l'expression relative du gène allèle oxyde cyclase 4 (TcAOC4) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Effet des traitements sur la mort cellulaire

L'amplification par RT-qPCR du gène Bax-inhibitor-1 (TcBI1) a révélé une augmentation significative de l'expression relative en fonction de l'inoculation, du traitement avec OBF' et du clone (Figure 37). En effet, l'expression relative du gène TcBI1 après inoculation chez le clone SNK10 et celui SNK413 traité à OBF', a significativement augmenté par rapport aux autres traitements et varié de 3,97 à 6,61. Par ailleurs, les clones SNK10 et SNK413 non traités et non infectés, ont eu des expressions relatives allant de 0,95 à 2,30. De plus, les clones SNK10 et SNK413 non traités et infectés, ont eu des expressions relatives allant de 1,72 à 2,30 (Figure 37).

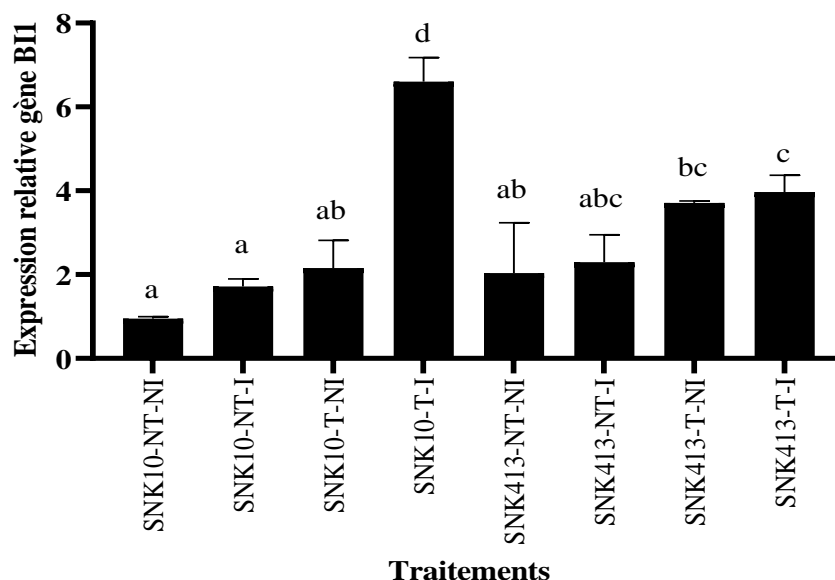


Figure 37: Variation de l'expression relative du gène Bax-inhibitor-1 (BI1) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non

Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Effet des traitements sur les facteurs de transcription de la résistance

L'amplification par RT-qPCR des gènes facteur de transcription WRKY 70 (TcWRKY TF70 LOC18602206 et LOC18587501) a montré une augmentation de l'expression relative en fonction du clone et du stress biotique (Figure 38 et 39). En effet, le facteur de transcription TcWRKY TF70 LOC18602206 a significativement augmenté en fonction du clone mais pas avec le traitement OBF' (Figure 38). Ainsi, seul le clone SNK413 traité et inoculé a entraîné une augmentation significative de l'expression relative du facteur de transcription TcWRKY TF70 LOC18602206 et a eu une valeur de 3,30 en comparaison à celle de 1,60 chez le clone SNK10. En outre, le traitement OBF' a entraîné une augmentation de l'expression relative de ce facteur de transcription de 0,97 à 2,04 après inoculation, chez les clones SNK10 et SNK413 respectivement (Figure 38).

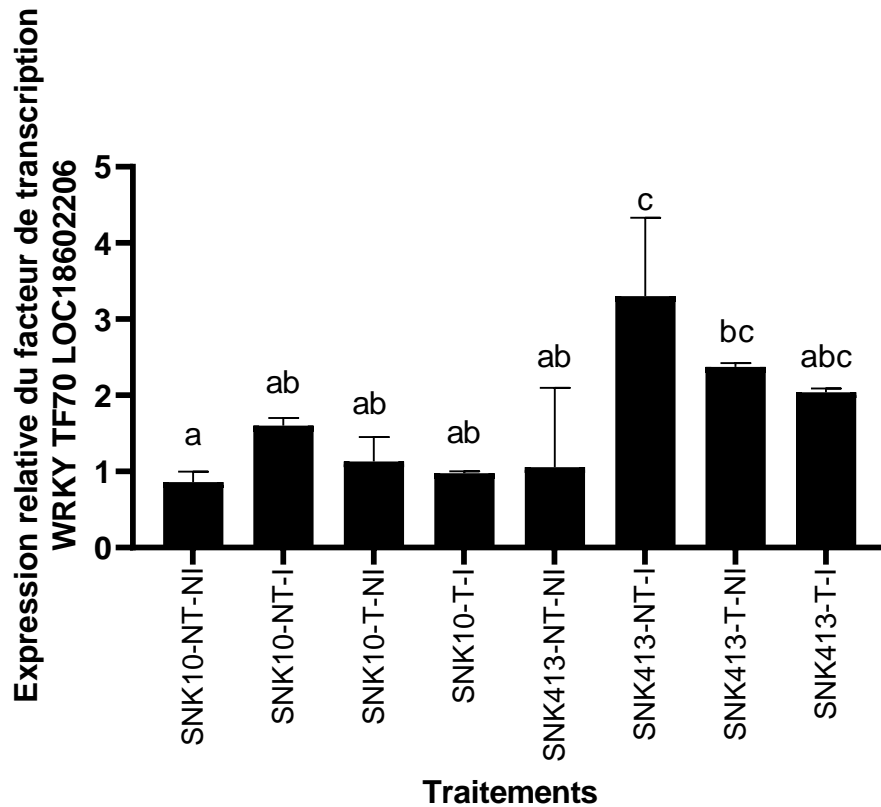


Figure 38: Variation de l'expression relative du facteur de transcription WRKY 70 (TcWRKY TF70 LOC18602206) avant et après inoculation des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT=

Non Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Par ailleurs, le traitement à OBF' des clones SNK10 et SNK413 ou l'inoculation ont entraîné une augmentation significative de l'expression relative du facteur de transcription TcWRKY TF70 LOC18587501 (Figure 39). En effet, l'expression relative de ce facteur de transcription après inoculation chez le clone SNK10 et celui SNK413 traité à OBF', a significativement augmenté par rapport aux autres traitements et varié de 3,52 à 16,37. De plus, le clone SNK10 et celui SNK413 non traité et non inoculé, ont des expressions relatives du facteur de transcription TcWRKY TF70 LOC18587501 de 0,94 à 1,90 respectivement tandis qu'après inoculation, ils ont été de 3,52 et de 9,94 respectivement (Figure 39).

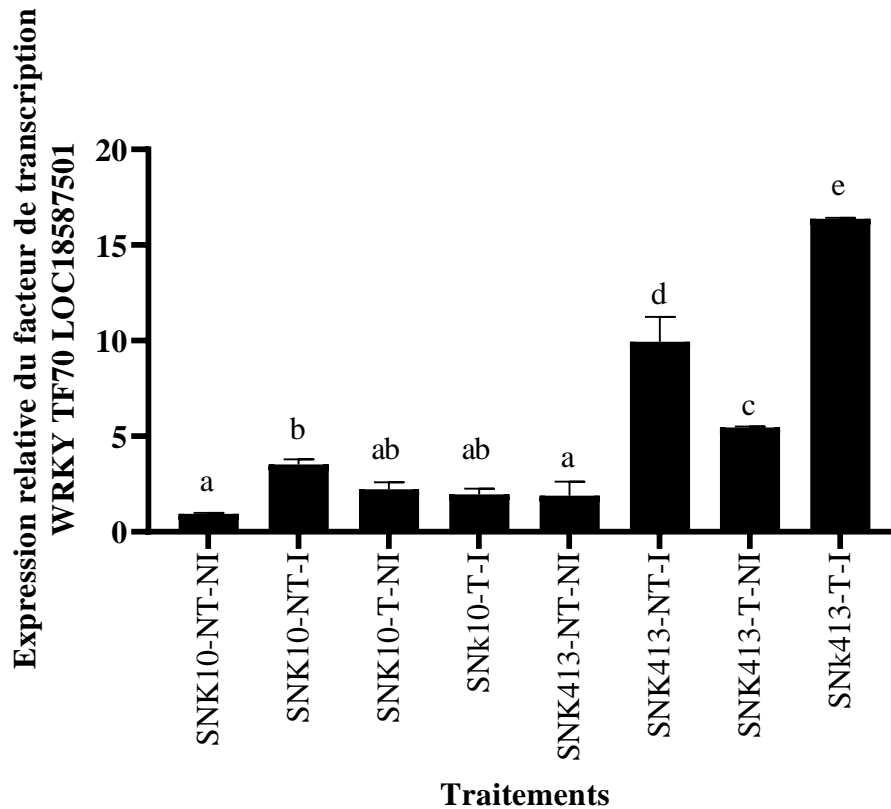


Figure 39: Variation de l'expression relative du facteur de transcription WRKY 70 (TcWRKY TF70 LOC18587501) avant et après infection des cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413 traitées ou non à la formulation OBF'.

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

III.1.3.3. Effet de la bioformulation OBF' sur les métabolites non volatiles du péricarpe des cabosses détachées des clones SNK10 et comparaison à ceux du cacaoyer SNK413

L'analyse LC-MS/MS des extraits à l'acétonitrile a révélé la présence d'un nombre de composés allant de 275 à 279 composés en fonction des traitements et donc certains sont spécifiques à un clone ou au traitement avec OBF' (Figures 40, 41 et 42; Tableaux XVI, XVII et XVIII). La variation du nombre de métabolites en fonction des variétés, du traitement avec OBF' et de l'état sanitaire des cabosses n'a pas été significative (Figure 40). En effet, il n'y a pas eu de différence significative entre les différents traitements et dans l'ordre croissant, nous avons eu les traitements SNK413-NT-I (275), SNK10-NT-NI (276), SNK413-NT-NI (277), SNK10-NT-I (279), SNK10-T-NI (279) et SNK10-T-I (279) (Figure 40).

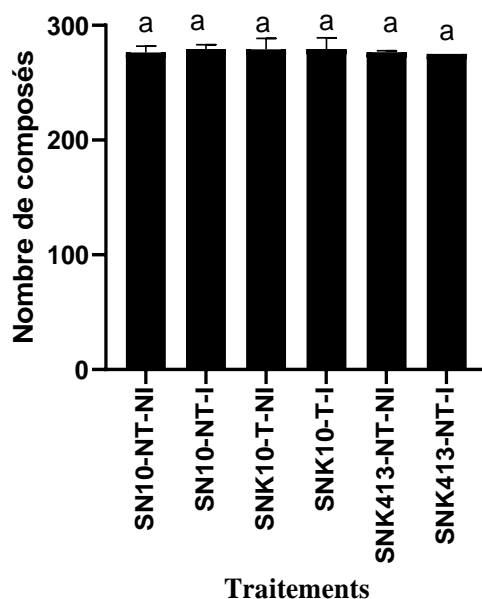


Figure 40 : Nombre de composés détecté par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Les moyennes accompagnées des lettres différentes sont différentes et significatives au seuil $P < 0,05$.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non

Traitée à OBF'; T= Traitée à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Les métabolites majoritaires communs aux lots de cabosses

Les métabolites communs probables les plus abondants identifiés à partir de la base de données utilisée ont été la poldine, le nitrazepam, le métamitron, la caféine, le tri-o-tolyl phosphate, l'éprosartan et l'ergocristine avec leurs formules et structure données dans le Tableau XVI. Certains métabolites communs aux clones SNK10 et SNK413 ont fortement été synthétisés chez le clone SNK413 et/ou le clone SNK10-T (Figure 41). Il s'agit de la caféine, la théobromine, le nitrazépan, la métamitron, la poldine et la périndopile comparativement à SNK10-NT. Par ailleurs, d'autres métabolites à l'instar de l'éprosartan et l'ergocristine ont significativement été réduits chez le clone SNK413 et le clone SNK10-T, comparativement à SNK10-NT (Figure 41).

Tableau XVI : Composés majoritaires communs aux lots de cabosses après analyse LC-MS/MS.

TR (min)	m/z _{max} ± 0,5	Composés probables	F. B	M. M (g/mol)	Score
0,4	203,0521	Metamitron	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	202,21	0,9999
3,7	195,0872	Cafeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	0,9999
13,5	282,2787	Nitrazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	281,27	0,9999
14,9	341,3518	Poldine	[C ₂₁ H ₂₆ NO ₃] ⁺	340,435	0,9999
15,5	369,3833	Perindopril	C ₁₉ H ₃₂ N ₂ O ₅	368,23	0,9979
17,7	425,4454	Eprosartan	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄	424,5	0,9999
18,4	610,1825	Ergocristine	C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₅	609,7	0,9999
0,5	181,0713	Theobromine	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,164	0,9999

RT: Temps de rétention, F.B: formule brute et M.M: masse moléculaire

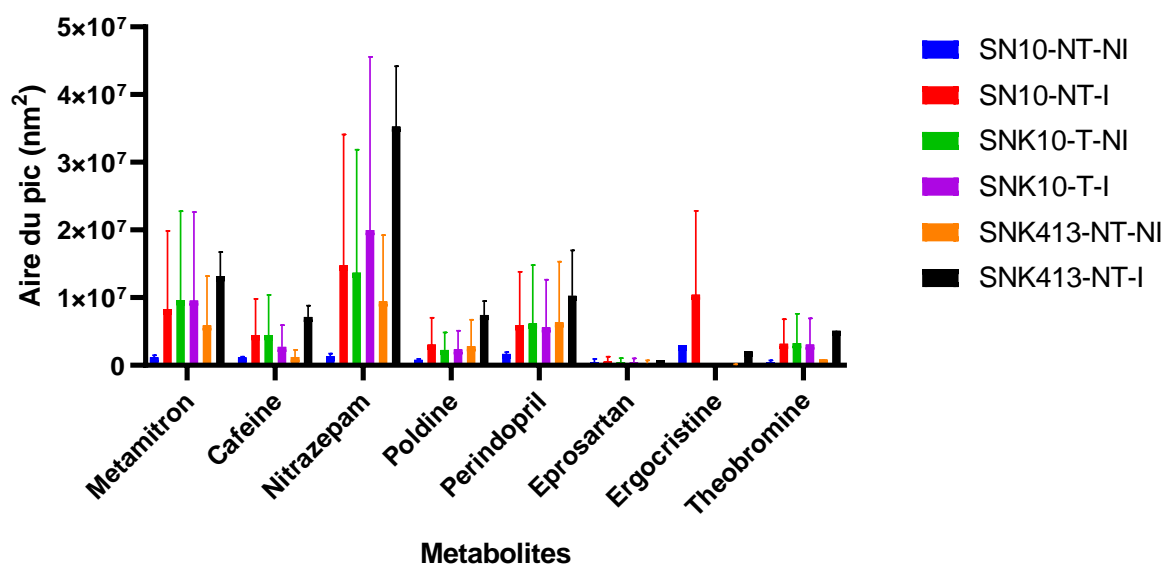


Figure 41 : métabolites non volatils majoritaires communs aux différents lots de cabosses.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traité à OBF'; T= Traité à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Les métabolites non volatils majoritaires et spécifiques aux lots de cabosses

Outre les composés majoritaires communs à tous les clones et traitements, certains composés ont été plus abondants dans certains lots de cabosses. Ces composés ont été représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau XVII). Parmi ces composés, certains sont plus abondants chez le clone SNK10 à l'instar de la zeta-carotène tandis que d'autres, au sein de ce clone ont augmenté ou diminué avec l'application de la bioformulation (Tableau XVII). Par ailleurs, d'autres ont significativement été abondants chez le clone SNK413 et /ou SNK10-T-I (Tableau XVII). Parmi ces composés, on note la présence du déhydrocyclopeptine, de la SB243213A, de la Madecassoside, de la zeta-carotène et du PG 32:1 (Tableau XVI).

Tableau XVII : Composés majoritaires dans les lots de cabosses analysés par LC MS/MS.

TR (min)	m/z _{max}	Composés	F. B	M. M (g/mol)	Cabosses						
					SNK10- NT-NI	SNK10- NT-I	SNK10- T-NI	SNK10- T-I	SNK413- NT-NI	SNK413- NT-I	
0,4	219,0257	Tributylphosphine oxide	C ₁₂ H ₂₇ OP	218,32			ü	ü			✓
2,8	181,0712	Phenazine	C ₁₂ H ₈ N ₂	180,2							✓
11,1	279,2313	Dehydrocyclopeptine	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	278,3	✓	✓				✓	✓
11,8	871,5692							✓	ü		✓
11,8	840,5414							ü			✓
13,4	829,504				✓			✓			✓
13,4	282,2783	Nitrazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	281,27	✓	✓	ü	ü			✓
13,6	975,5615	Madecassoside	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	975,1	✓	✓		✓			✓
13,8	311,2571				✓	ü					✓
14,5	824,5483				✓	✓	✓		✓		ü
14,5	284,2939							ü	ü		
15,2	808,554				-	✓					ü
15,3	719,4492	PG 32:1	C ₃₈ H ₇₃ O ₁₀ P	720,96	-	✓	✓	✓			ü
16,9	680,4784				Ü	ü	ü	✓	ü		
18,3	429,3719	SB243213A	C ₂₂ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₂	428,4	-			✓	✓		ü
19,3	453,4769	Diphenoxylate	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₂	452,6	Ü	ü		✓			ü
19,6	542,4245	zeta-Carotene	C ₄₀ H ₆₀	540,9	Ü	ü	✓	✓			

T.R: Temps de rétention, F.B: formule brute et M.M: masse moléculaire

Les métabolites non volatiles caractéristiques des différents lots de cabosses

Les métabolites non volatiles détectés qui ont caractérisé les clones et le traitement à la formulation OBF' ont été au nombre de 18, 14, 18, 21, 17 et 23 pour les traitements respectifs SNK10-NT-NI, SNK10-NT-I, SNK10-T-NI, SNK10-T-I, SNK413-NT-NI et SNK413-NT-I (Figure 41).

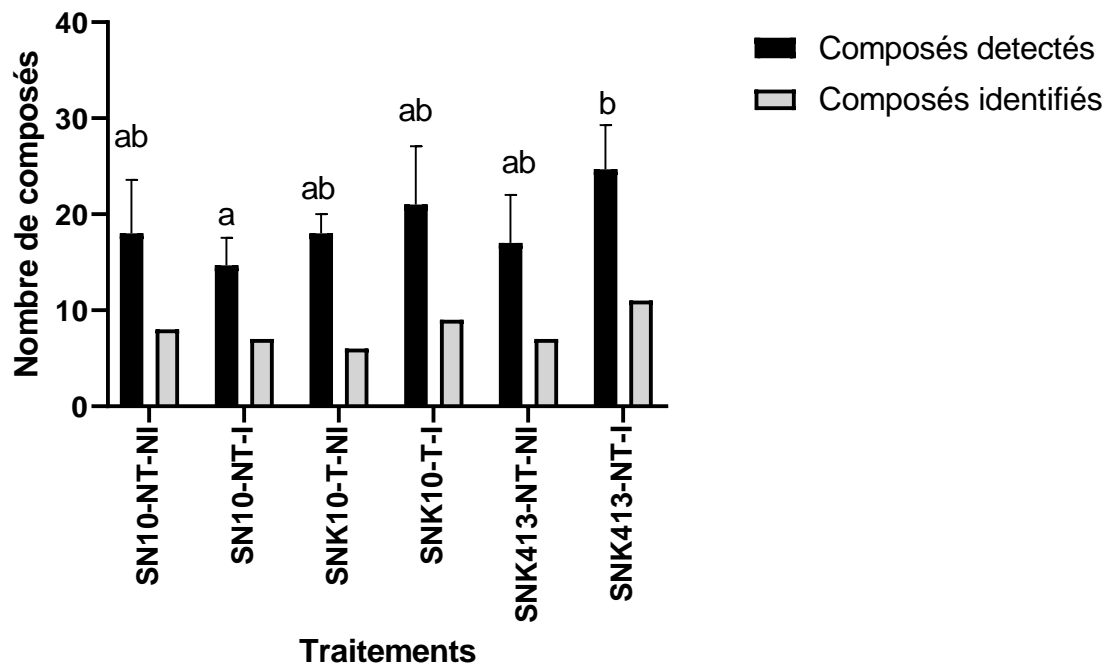


Figure 42 : Nombre de métabolites non volatiles identifiés qui caractérisent des différents traitements.

SNK10: Sélection de Nkoemvone 10; SNK413: Sélection de Nkoemvone 413; NT= Non Traité à OBF'; T= Traité à OBF'; NI= Non Infectée; I= Infectée.

Des métabolites uniques à chaque clone et à ceux traités avec OBF' ont été identifiés et présentés dans le tableau XVIII. Il en ressort que 8, 7, 6, 9, 7 et 10 métabolites appartenant aux lots de cabosses SNK10-NT-NI, SNK10-NT-I, SNK10-T-NI, SNK10-T-I, SNK413-NT-NI et SNK413-NT-I respectivement ont été de structures probables connues. De plus, le métabolite ifosfamide a été commun aux lots SNK10-NT-NI et SNK413-NT-NI ; la pterosin A a été commune aux lots SNK10-NT-NI et SNK10-T-NI ; la solanidine base + O-Hex-Hex a été commune aux lots SNK10-NT-I et SNK10-T-NI ; l'acide murocholic a été commun aux lots SNK413-NT-NI et SNK10-T-I ; l'hexose + hexose-deoxyhexose + C₂₀H₃₂ a été commun aux lots SNK413-NT-NI et SNK10-T-I ; tandis que la lyalosidic acid, l'ormosanine et la ginsenoside Rh3 ont été communs aux lots SNK413-NT-I et SNK10-T-I.

Tableau XVIII : Les composés identifiés caractéristiques des traitements.

R T	m/z _{max}	Composés	M. M	F. B
SNK10-NT-NI				
6,7	261,1325	Ifosfamide	260,02	C7H15Cl2N2O2P
6,7	144,9812			
7,2	623,1739	(S,S)-(+)-Tetrandrine	622,7	C30H44O8
7,7	149,0221			
		11-(6-{[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]amino}-4-chloro-1,3,5-triazin-2-yl)-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0<2,7>]trideca-		
8,8	483,1976	2,4-dien-6-one	483	C24H27ClN6O3
10,1	158,002			
11,3	171,1009			
11,7	146,9796	Coumarin	146,14	C9H6O2
12,7	199,1684	Pterosin A	198,11	C15H20O3
13,2	144,9815			
13,4	683,3602	Methyllycaconitine	682,8	C37H50N2O10
14,8	557,4531	Dronedarone	556,8	C31H44N2O5S
19,8	660,4866	Fucoxanthin	658,91	C42H58O6
SNK10-NT-I				
4,6	722,6748	Solanidine base + O-Hex-Hex	721,9	C39H63NO11
7,1	735,1841	Erythromycin	733,9	C37H67NO13
8,2	506,2727	AAL toxin TB	505,6	C25H47NO9
11,9	647,3933	Isorhamnetin-3-O-rutinoside	624,5	C28H32O16
11,9	149,0222			
12,4	146,9793	Coumarin	146,14	C9H6O2
13,3	144,9815			
14	473,3224	Maslinic acid	472,72	C30H48O4
		3-(4,6-dipyrrolidin-1-yl-1,3,5-triazin-2-yl)-1,2,3,4,5,6-hexahydro-8H-1,5-methanopyrido[1,2-a][1,5]diazocin-8-one, 11-(4,6-dipyrrolidinyl-1,3,5-triazin-2-yl)-7,11-diazatricyclo[7,3,1,0<2,7>]tri-		
14	408,3676	deca-2,4-dien-6-one	407,5	C22H29N7O
SNK10-T-NI				
4,7	722,1718	Solanidine base + O-Hex-Hex	721,9	C39H63NO11
7,8	727,2021			
7,9	609,1592	Reserpine	608,7	C33H40N2O9

8,2	255,1577	5,7-Dihydroxy-4-phenylcoumarin	254,24	C15H10O4
9	149,0956			
9,5	694,399			
9,5	699,3523			
12,7	199,1684	Pterosin A	198,11	C15H20O3
13,6	970,6047			
14,1	1000,6725			
14,2	226,1794			
14,2	226,1794	Cyprodinil	225,29	C14H15N3
18,7	885,5477	Spirostane + 1O, -2H, O-Hex-dHex-dHex	885,05	C45H72O17
SNK10-T-I				
1,4	273,0934	Alternariol methyl ether	272,06	C15H12O5
7,3	703,158			
7,5	513,1607	Lyalosidic acid	512,5	C26H28N2O9
7,8	727,2023			
8,3	318,2995	Ormosanine	317,5	C20H35N3
8,5	553,296	Bosentan	551,6	C27H29N5O6S
8,7	605,1629	Ginsenoside Rh3	604,9	C36H60O7
9,9	647,1747			
11,7	933,5518	Petunidin-3-O-(6'-O-(4'''-O-E-coum)-alpha-rhamnopyranosyl-beta-glucopyranosyl)-5-O-beta-glucopyranoside	933,8	[C43H49O23]+
12,5	1004,5111			
13,4	282,2784	Nitrazepam	281,27	C15H11N3O3
14,1	1000,6723			
14,1	912,6213			
14,1	509,355	Syringetin-3-O-glucoside	508,43	C23H24O13
14,2	912,6218			
20,6	391,2815	Murocholic acid	390,1	C16H12F6N4O
SNK413-NT-NI				
7,1	261,1087	Ifosfamide	261,08	C7H15Cl2N2O2P
7,9	777,1941	Hexsose + Hexsose-deoxyHexose + C20H32	776,9	C38H64O16
8,3	721,3193	Ritonavir	720,9	C37H48N6O5S2
9	149,0958			
9,8	777,3809			
11,5	933,5526	Petunidin-3-O-(6''-O-(4'''-O-E-coum)-alpha-rhamnopyranosyl-beta-glucopyranosyl)-5-O-beta-glucopyranoside	933,8	[C43H49O23]+
11,7	945,474			

14,1	184,9844	Metribuzin-diketo	184,2	C7H12N4O2
18,5	399,2492	11,12-Methylenedioxykopsinaline	398,5	C22H26N2O5
21,5	391,282	Murocholic acid	390,1	C16H12F6N4
SNK413-NT-I				
1,2	307,0828			
4,8	252,1878			
7,5	513,1614	Lyalosidic acid	512,5	C26H28N2O9
7,9	777,1941	Hexose + Hexose-deoxyHexose + C20H32	776,9	C38H64O16
8	398,1925	Echimidine	397,5	C20H31NO7
8,3	318,2989	Ormosanine	317,5	C20H35N3
8,7	605,1639	Ginsenoside Rh3	604,9	C36H60O7
9,7	699,1616			
11,8	945,4731			
12,1	688,517	Acetylaconitine	687,8	C36H49NO12
13,2	511,5181			
13,6	970,606			
14,1	926,4808			
14,1	887,5655	Emamectin B1a	886,1	C49H75NO13
17,6	481,5079	Decaethylene glycol	458,5	C20H42O11
17,8	887,5648	Furostane base -2H + O-Hex	1065,2	C51H84O23
17,9	184,9848	Metribuzin-diketo	184,2	C7H12N4O2

T.R: Temps de rétention, F.B: formule brute et M.M: masse moléculaire

III.2. Discussion

Formulation du biopesticide

La première partie de ce travail avait pour objectif de mettre sur pied une bioformulation à base de neem (Nh, Nea), l'herbe sida (Seth), des coquilles d'huître (HCa), et de la citronnelle (CEO) qui peut être utilisée pour la protection du cacaoyer contre *Phytophthora megakarya*.

Dans la présente étude, le plan quasi-expérimental et la matrice simplex-Lattice ont montré que l'augmentation de l'huile de Neem dans les essais de formulation avec une quantité fixe de surfactant déstabilise ces derniers. De plus, l'augmentation du tensioactif en présence des extraits hydrosolubles a augmenté également la stabilité des essais de formulation et les extraits Nea et Seth ont eu le même effet sur la stabilité. Les présents résultats corroborent ceux de Namasivayam et *al.* (2017) qui ont étudié les émulsions d'huile de Neem en milieu de dispersion contenant du chitosan et ont obtenu des nano émulsions plus stables, en diminuant le ratio huile - tensioactif de 1:1 à 1:7,5. En augmentant l'huile de Neem dans une formulation avec une quantité fixe de surfactant, la stabilité a diminué tandis que l'activité a augmenté (Bhattacharya et Dixit, 2015; Liauw et *al.*, 2008; Namasivayam et *al.*, 2017). Bhattacharya et Dixit (2015) ont observé l'effet plus favorable du Tween 80 sur la stabilité et l'influence de l'élément présent dans la phase continue sur la stabilité des émulsions. De plus, ils ont montré qu'à une concentration donnée de tensioactif, l'augmentation du % d'huile de neem a diminué la stabilité alors qu'à une concentration donnée d'huile de neem, l'augmentation du tensioactif a augmenté la stabilité. Ils ont rapporté l'effet du pH utilisé dans le milieu de dispersion sur la stabilité des émulsions. Dans la présente étude, la stabilité de l'émulsion peut être justifiée par le Tw, mais aussi par la présence de saponines, de polysaccharides et/ou de protéines dans les extraits (Nwankpa et *al.*, 2015). Ces familles de composés ont aidé le modèle de stabilité à être linéaire avec l'équation retenue. De plus, Dhivya et *al.* (2019) ont augmenté la stabilité de l'émulsion nanométrique de l'huile de drapeau (*Acorus calamus* L.) par l'émulsification spontanée de l'huile à 6% avec un rapport huile - tensioactif de 1 :0.5 et 1 :2 ; leurs tailles de gouttelettes ont diminué de 51.2 nm à 17.9 nm avec une augmentation du tensioactif.

En utilisant le plan expérimental simplex-Lattice, l'activité biologique des émulsions avec et sans Se contre *Fusarium oxysporum* a révélé l'effet favorable de Se sur celle-ci comparativement à Ne. Sur la base de ce résultat, nous pouvons dire que Neth et Sea ont eu une activité additive dans notre meilleure émulsion contre ce pathogène fongique, avec un effet de Seth meilleur par rapport à celui de Nea. Nwankpa et *al.* (2015) ont rapporté la présence de

tanins (0,9%), d'alcaloïdes (1,5%), de saponines (0,53%), de flavonoïdes (1,16%), de stéroïdes (1,45), de terpénoïdes (0,12%) et de glycosides cardiaques (0,85%) dans l'extrait éthanolique de feuilles de *Sida acuta*. La présence de certains de ces composés doués d'activité antimicrobiennes dans Se peut justifier l'activité de celui-ci dans la matrice simplex-Lattice. En outre, il a été montré par Karou et al. (2005) que les alcaloïdes de *Sida acuta* du Burkina Faso, ont une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella thyphi*, *Salmonella parathyphi* et *Escherichia coli* avec des concentrations minimales inhibitrices allant de 16 à 400 µg/mL et des concentrations minimales bactéricides allant de 80 à plus de 400 µg/mL. La cryptolépine et la quindoline ont été identifiées comme les principaux alcaloïdes de l'herbe sida (Karou et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que l'extrait de neem a des propriétés bioactives telles qu'antifongique (Biswas et al., 2002; Pohe et Agneroh, 2013), inappétence et insecticide (Sami et al., 2016). Chandrasekaran et al. (2012) ont prouvé l'activité plus insecticide que fongicide de l'extrait de neem (2 g/L) en enregistrant 8% d'inhibition sur *Phytophthora capsici* et 84% de mortalité sur la larve de *Spodoptera litura*. Sami et al. (2016) ont confirmé l'activité insecticide de l'extrait de graines de neem et relevé qu'elle a plusieurs principes actifs potentiellement insecticides, répulsifs et pouvant induire des anomalies de développement par action sur l'ecdysone.

La correction du pH de l'émulsion BF de 2,84 à 5,45 a entraîné une déstabilisation des émulsions par le phénomène de coalescence. Ainsi, le procédé de production de la formulation a été modifié pour corriger cette déstabilisation. En outre, le pH de la formulation BF étant très acide (pH de 2,75), il a été modifié par substitution de 25% de HCa avec de l'oxyde de calcium (CaO) pour avoir un pH de 5,45. Le procédé qui permet d'obtenir l'émulsion OBF utilise une énergie élevée (vortex 10 min) et l'ajout de CEO dans OBF permet d'obtenir la formulation OBF'. OBF a une meilleure stabilité thermodynamique et une meilleure activité inhibitrice comparativement à BF et OBF' qui, d'une part n'utilise pas de procédé à haute énergie et qui a une plus grande proportion d'huile. Ainsi, nous avons des nano-émulsions dans OBF, caractérisée par de fines gouttelettes qui ne sont pas visibles au microscope avec un grossissement de 1000x. La stabilité de l'émulsion OBF corrobore celle de Ghotbi et al. (2014) qui ont optimisé avec succès la formulation de la nano émulsion d'huile de Neem avec du Tween 20 dans de l'eau distillée par la méthode à haute énergie (30 à 45 min de sonication) et ont obtenu la plus petite taille de gouttelettes de 67,85 nm.

Les résultats de la présente étude ont montré qu'en terme d'activité antifongique, celle de OBF' est supérieur à celle de OBF, qui l'est aussi à celle de BF. Ces résultats corroborent ceux de Khaled et Mohamed (2016), qui ont montré l'effet *in vitro* de l'hydroxyde de silicate et de l'oxyde de calcium à 1000 ppm sur les isolats de *F. oxysporum*, *A. alternata*, *A. niger*, *P. digitatum*, *R. stolonifer* et *P. italicum*. Par ailleurs, la forte activité inhibitrice de la bioformulation efficace OBF' se justifie par la présence de l'huile essentielle de citronnelle dans la formulation.

La structure de la paroi cellulaire des microorganismes influence leur sensibilité à l'action des huiles essentielles (Guinoiseau, 2010). La présente étude a révélé que la formulation OBF' n'a pas une activité significative de lyse cellulaire en 24 h mais a inhibé totalement la formation de la membrane cellulaire à 0,5CMI. Cependant, elle a eu un effet significatif sur l'inhibition de la synthèse des protéines et l'activité des pompes ATPase-H⁺ de l'agent pathogène *Phytophthora megakarya*. Les résultats de cette étude épousent partiellement ceux de Limsuwan et Voravuthikunchai (2013) et Guinoiseau (2010) qui ont démontré l'effet défavorable des extraits et d'huiles essentielles sur la synthèse des protéines, l'activité des pompes ATPase-H⁺ et la lyse de la membrane sur *Streptococcus pyogenes*.

Les effets induits par la bioformulation efficace OBF' sur *Phytophthora megakarya* semblent donc être attribuables à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans celle-ci. En effet, les extraits, produits par ces plantes, se caractérisent par la présence de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de composés aromatiques, de terpènes et de lactones sesquiterpéniques.

Conclusion partielle 1

La présente partie de cette étude avait pour but de développer une formulation fongicide à partir du neem, de l'herbe sida, de la citronnelle et des coquilles d'huître contre *Phytophthora megakarya* qui est un agent responsable de la pourriture brune du cacaoyer. Il en ressort une formulation efficace nommée OBF' qui est l'émulsion ayant 10,8% de Nh, 8,1% de Nea, 8,1% de Seth, 4,05% de HCa, 1,35% de CaO, 21,6% de Tw et 10% de CEO. À température ambiante, elle est stable et possède des micelles de diamètre ≤ 14.9 nm, un pH de 5.2 et une conductivité de 95.25 mV.

La bioformulation efficace OBF' possède une activité dose dépendante sur les agents pathogènes étudiés. En effet, elle a inhibé totalement la croissance des champignons *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* et *Phytophthora megakarya* à 1% ; a réduit la croissance de ceux-ci variant de l'ordre de 37,39% à 55,88% lorsque utilisé à 0,1% et *Phytophthora megakarya* est le plus sensible.

Cette bioformulation efficace OBF' agit sur *Phytophthora megakarya* en inhibant sa synthèse des protéines de 60% et en inhibant l'activité des pompes ATPases/H⁺.

Effet de la bioformulation OBF' sur la production des plantules de cacaoyer

Cette partie du travail a permis d'évaluer les effets de la bioformulation OBF' sur la production et la protection des plantules de cacaoyer en serre. Les résultats obtenus ont montré que le traitement des plants avec la formulation à la concentration 1% (v/v) stimule significativement quelques paramètres agro-morphologiques et les marqueurs de croissance du cacaoyer comparativement au traitement chimique et à l'eau. De même, ces résultats ont montré surtout que l'application de OBF' à la concentration 1% (v/v) réduit l'indice de sévérité à *P. megakarya* du cacaoyer.

La synthèse des phytohormones ou régulateurs de croissance appartenant au groupe des auxines tel que l'Acide Indole Acétique (AIA) par les microorganismes ou les plantes est bien connue et constitue l'un des traits majeurs de promotion de la croissance chez les plantes (Bano et Musarrat, 2003; Djuidje et al., 2019). Dans la présente étude, le traitement des fèves avec la formulation OBF' a entraîné une augmentation significative de la longueur de la racine principale et le nombre de racines secondaires en deux semaines. Cette hausse des paramètres morphologiques racinaires au cours de la levée des fèves germées peut être due à la composition de la formulation, riche en calcium et en précurseur de l'Acide Indole Acétique (AIA). En effet, nous avons noté une augmentation de la teneur en AIA dans ces racines au bout des deux semaines ainsi qu'une augmentation de la teneur en protéines. L'un des acides aminés, le tryptophane est un précurseur de la synthèse de cette molécule. Ainsi, l'extrait aqueux de neem contient les protéines et le tryptophane. Il a pu influencer positivement la synthèse de l'AIA par la fève en cours de levée. En outre, il a été montré par Djuidje et al. (2019) qu'après co-culture de la souche antagoniste *Streptomyces* sp. PERM2 ayant présenté de meilleures activités PGP *in vitro* avec les vitroplants de macabo, une augmentation significative ($P < 0,05$) de la longueur racinaire grâce à l'effet synergique des métabolites AIA, ACC désaminase et ammoniac produits par cette souche et libérés dans le milieu.

Au cours de ce travail, le traitement foliaire des plants de cacaoyer avec la formulation OBF' a entraîné l'augmentation significative de la surface foliaire et du poids sec des racines. Cette hausse des paramètres agro morphologiques peut provenir de la présence de calcium dans la formulation, mais aussi de l'extrait aqueux de neem qui est riche en macroéléments particulièrement en azote et en potassium (Moyin-Jesu, 2012; Rab et al., 2017). En effet, l'extrait calcique étant reconnu riche en calcium et l'extrait aqueux de neem riche en potassium et composés azotés et soufrés, ces extraits constitutifs de la formulation OBF' contribuent à la croissance de la plante (Arfaoui et al., 2016; Liopa-Tsakalidi et al., 2010). Ce résultat va dans

le même sens que ceux obtenus par Rab et *al.* (2017) qui ont montré que l'application des formulations à base de calcium favorise la croissance des plants de tomate sous condition de stress. En outre, Téné et *al.* (2017;) et Téné et *al.* (2019) ont montré que le traitement des plants de cacaoyer avec les coquilles d'escargots riches en carbonate de calcium ou avec de la poudre des coquilles d'huîtres riche en oxyde de calcium, favorise la croissance et les paramètres morphologiques de ceux-ci.

Par ailleurs, au cours de la présente étude, la formulation OBF' a entraîné une augmentation de la surface foliaire qui peut permettre une bonne activité photosynthétique. La ribulose 1,5 biphosphate carboxylase est l'enzyme clé de la photosynthèse impliquée dans la fixation du dioxyde de carbone dans la biomasse végétale en initiant le cycle de Calvin grâce à l'énergie solaire captée par la chlorophylle (Khodary, 2004). Ainsi, on a noté une augmentation de la teneur en chlorophylles totales dans les feuilles issues des plants traités avec la formulation OBF'. En effet, cette augmentation peut se justifier par l'effet stimulateur du calcium présent dans la formulation OBF' qui a un effet biofortificateur (Rab et *al.*, 2017). De plus, l'augmentation de la teneur en chlorophylles peut être également due à la capacité de la formulation OBF' à améliorer l'absorption des nutriments par la plante.

En effet, le tourteau de neem et l'huile de neem sont utilisés comme biofertilisant et augmentent le rendement des cultures (Nishan et Subramanian, 2014). Ainsi, les travaux de Singh et Sahu (2018) ont montré que l'amendement aux extraits de neem et/ou au maja, a un effet bénéfique sur les paramètres biochimiques (teneur totale en chlorophylles, en caroténoïdes, en glucides, en acides aminés et en protéines) des feuilles de haricot mungo, et peut servir de biofertilisants. En outre, dans une recherche effectuée par Moyin-Jesu (2012) pour élucider les effets fertilisant du neem sur le maïs a montré que les feuilles de neem présentent les valeurs les plus élevées de hauteur des plantes, de la surface foliaire par rapport au témoin négatif. De plus, les résultats obtenus dans ce travail avec la formulation OBF' rejoignent ceux de Liopa-Tsakalidi et *al.* (2010) qui ont montré que le traitement des plantules de *Melissa officinalis* L. et de *Artemisia dracunculus* L. avec un biofortifiant (la chitine) entraînait une augmentation de la teneur de ces plantes en chlorophylles.

L'effet de la formulation OBF' sur la sévérité de l'infection des plantules de cacaoyer SCA12xSNK16 peut provenir de l'effet inhibiteur de la formulation sur l'agent pathogène. En effet, dans la première partie de ce travail, l'analyse des résultats relatifs à l'effet fongicide de la formulation OBF' vis-à-vis de *P. megakarya* a révélé l'effet inhibiteur de manière dose

dépendante de sa croissance avec une CMI de 0,1%. Ce résultat va dans le même ordre d'idée que ceux de Scotton et *al.* (2017) qui ont montré que l'application de l'huile de neem dans les vergers de cacaoyer réduit significativement la pourriture brune des cabosses de cacao.

Par ailleurs, la réduction de la sévérité à *P. megakarya* observée peut aussi être justifiée par l'effet stimulateur des défenses de la formulation OBF'. En effet, la formulation a induit mieux la protection en favorisant la production des plantules de cacaoyer par le biais des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes en particulier avant et après inoculation dans les feuilles des plants de cacaoyer. De même, ce traitement a induit aussi bien la production des protéines avant et après inoculation dans les feuilles des plants accompagnés de l'augmentation de l'activité des enzymes β -1,3-glucanases, peroxydases et polyphénol-oxydases par rapport au témoin négatif. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Téné et *al.* (2017); Téné et *al.* (2019) et Zhang et *al.* (2015) qui ont montré que le prétraitement du cacaoyer avec des éliciteurs, réduisait l'indice de sévérité à *P. megakarya*. Par ailleurs, ces résultats corroborent avec ceux de Rab et *al.* (2017) et Arfaoui et *al.* (2016) qui ont montré que l'application foliaire du calcium sur la tomate et le soja respectivement, induit une meilleure résistance de celles-ci contre les stress. De plus, les travaux de Nicolas et *al.* (2019) mettent en exergue les capacités du calcium et du magnésium à réduire l'incidence de la maladie de la tache bactérienne chez la laitue et à induire les mécanismes de défenses de cette dernière.

Conclusion partielle 2

La seconde partie de cette étude avait pour but d'évaluer l'effet de la formulation OBF' sur la production des plantules de cacao en serre. Il en résulte que l'application foliaire de la formulation OBF' à une concentration $\leq 1\%$ et $200 \mu\text{L}/60 \text{ cm}^2$ n'entraîne pas de dommage sur les feuilles de cacaoyer non détachées, indépendamment du stade de développement des feuilles de cacaoyer.

Lorsque la formulation OBF' est appliquée à 1% (v/v) sur les fèves et sur les feuilles de cacaoyer, elle stimule l'épanouissement des racines; n'entraîne pas de dommage foliaire et augmente la surface foliaire des plants de cacaoyer comparativement au traitement chimique et au témoin. De plus, elle augmente significativement la teneur en chlorophylles totales, en protéines, en composés phénoliques solubles et augmente l'activité des peroxydases chez les plantes traitées à la formulation OBF'.

Le prétraitement des feuilles des plants de cacao avant de les détacher et de les inoculer à *Phytophthora megakarya* a réduit l'index de sévérité de la maladie en rendant les feuilles susceptibles 3,35 en feuilles très résistantes 0,86. Cette réduction de la sévérité de la maladie est accompagnée par une augmentation de la teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et l'activité des enzymes liées à la défense (peroxydases, polyphénol-oxydases et β -1,3-glucanase) dans le tissu.

Effet de la bioformulation OBF' sur les défenses du cacaoyer vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* à partir des cabosses détachées

L'étude de cette partie nous a permis d'évaluer l'effet de la bioformulation OBF' sur l'interaction cacaoyer /*P. megakarya* sur les fruits d'un point de vue transcriptomique et métabolomique. Il en découle que l'application de OBF' à la concentration 1% v/v réduit l'indice de sévérité à la pourriture brune des fruits causée par *P. megakarya* de 2,17 (moyennement résistant) à 0,5 (très résistant).

Au cours de cette partie, l'expression des gènes de diverses voies de défense a été déterminée utilisant les fruits des clones sensible (SNK10) et tolérant (SNK413) à la maladie causée par *P. megakarya*. Pour y parvenir, les ARN totales ont été extraits des péricarpes des cabosses et utilisés pour la RT-qPCR. En général, les échantillons d'acides nucléiques ayant les rapports Abs260/Abs280 et Abs260/Abs230 compris entre ~1,8 et 2,0 indiquent une grande pureté de ceux-ci (Wang et Stegemann, 2010). Ces rapports sont souvent utilisés pour indiquer la pureté des échantillons d'ARN car les acides nucléiques ont une absorbance maximale à 260 nm, alors que les protéines sont absorbées à 280 nm et ainsi que d'autres contaminants, notamment les glucides, les phénols et les composés aromatiques. Les études sur l'extraction de l'ARN à partir d'échantillons récalcitrants a montré l'adéquation du tampon CETAB (De Wever *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2016; Wang et Stegemann, 2010). Ali *et al.* (2014) ont extrait avec succès l'ARN du péricarpe des cabosses de cacaoyer en utilisant la méthode 5. Cependant, dans la présente étude, la qualité d'ARN a été mauvaise avec un rapport 260/230 similaire à celui obtenu avec la méthode 1 (Wang et Stegemann, 2010), la méthode 2 (Barman *et al.*, 2017), la méthode 3 (Jordon-Thaden *et al.*, 2015), la méthode 4 (Inglis *et al.*, 2018), et la méthode 6 (Zeng et Yang, 2002). Seule la méthode 7 a permis d'obtenir une bonne qualité d'ARN.

L'extraction d'ARN de tissus de cacaoyer a été faite par Da Silva *et al.* (2003) avec un protocole utilisant un tampon SDS et la qualité de l'ARN des feuilles et des méristèmes a été meilleure que celle des fruits (Da Silva *et al.*, 2003). D'autres études sur l'extraction de l'ARN du cacaoyer à partir des méristèmes apicaux des pousses et des fèves de cacao ont montré la pertinence du tampon CTAB par rapport au tampon SDS et aux kits comme le kit d'ARN total végétal et le kit RNAqueous (De Wever *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2016). Dans la présente étude, les méthodes de tampon CTAB ont été utilisées et seule la méthode 7 a donné un bon résultat en termes de qualité et de rendement. En effet, le péricarpe du cacao est un tissu très difficile pour l'extraction de l'ARN par rapport aux feuilles et selon la variété de cacaoyer. Melnick *et al.* (2012) ont travaillé sur des cabosses de cacaoyer et ont utilisé une grande quantité de tampon

CTAB (30 mL) et une ultracentrifugation (31 000 g) pour obtenir une bonne qualité d'ARN. Dans le présent travail, l'utilisation d'un petit volume de tampon d'extraction a diminué également la qualité et la quantité d'ARN en raison de la coextraction et de la coprécipitation de l'ARN avec les glucides, ce qui a donné une viscosité élevée au culot d'ARN. De plus, l'ultracentrifugation (30 000 g et 31 000 g) et un volume élevé de tampon (15 ml) ont été essentiels pour séparer les glucides de l'ARN. L'utilisation du LiCl a empêché le traitement par la DNase et le nettoyage de l'ARN à l'aide du kit Qiagen RNeasy Mini comme l'a démontré Pratama *et al.* (2021). La durée de la précipitation de l'ARN a affecté le rendement et l'incubation pendant au moins 24 h à 4 °C semble être essentielle pour faciliter sa précipitation pendant l'ultracentrifugation. Ainsi, le type de tampon, la forte vitesse de l'ultracentrifugation, le volume du milieu et la précipitation sélective de l'ARN à l'aide de LiCl 10M peut expliquer l'obtention d'une meilleure qualité d'ARN à partir d'échantillons récalcitrants. De plus, le type de tampon a facilité la précipitation sélective de l'ARN à l'aide de LiCl 10M (Pratama *et al.*, 2021)

Dans cette étude, l'extraction de l'ARN est exempte de contamination par l'ADN en raison de la non-amplification de l'ARN extrait lors de la réalisation de la RT-qPCR sans transcriptase inverse. Ces résultats ont confirmé l'utilisation possible de l'ARN extrait pour d'autres expériences, sans aucun traitement DNase comme cela a été rapporté dans d'autres protocoles d'extraction d'ARN (Barman *et al.*, 2017; Zeng et Yang, 2002).

Ce nouveau protocole permettra de mieux comprendre l'expression génique des tissus très mucilagineux comme les coques de cabosses de cacaoyer SNK10 et SNK413.

Le phénomène de *priming* se caractérise par deux événements majeurs à savoir la phase précoce et la phase post précoce caractérisées par la réaction de défense rapide de la plante vis-à-vis de l'agent pathogène et l'augmentation du degré de résistance via une production d'une pléthore des molécules de défenses (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Ce phénomène d'induction de la résistance a été confirmé dans notre étude par la capacité de la bioformulation OBF' à induire précocement les systèmes de défenses des fruits de cacaoyer entraînant ainsi les changements de l'état physiologique, transcriptionnel et métabolique de la plante. En effet, dans la présente étude, le prétraitement des fruits SNK10 de cacaoyer à la formulation OBF' a entraîné une augmentation non significative de l'expression relative des gènes PR1, 2, 4 et 8 tandis que chez le clone SNK413, elle a entraîné une augmentation significative de l'expression relative de ces gènes avant et après inoculation. Cependant, les gènes AOS et AOC qui sont caractéristiques

de la défense médiée par l'acide jasmonique, le gène BI qui est inhibiteur de la mort cellulaire et le facteur de transcription WRKY70 ont été stimulés par l'application de la formulation OBF' chez ces deux clones de cacao.

Le facteur de transcription WRKY70 a été identifié comme un intégrateur dans le dialogue entre l'acide salicylique (AS) et l'acide jasmonique (JA), deux hormones ayant une fonction bien définie dans la régulation de la réponse de défense des plantes (Shim et al., 2013). En général, l'acide salicylique est généralement associé à la réponse de défense contre les agents pathogènes biotrophes, tandis que l'acide jasmonique a une fonction dans les réponses de défense contre les herbivores et les nécrophages (Shim et al., 2013). Il a été montré que chez le cacaoyer, ce facteur de transcription est un marqueur de sa défense vis-à-vis de *M. perniciosa* (Silva et al., 2017). De même, dans le présent travail, ce facteur de transcription a été induit après inoculation des cabosses tolérantes et sensibles par *P. megakarya* et le traitement de celles-ci à la formulation OBF' a entraîné la surexpression du facteur de transcription WRKY70 avant et après inoculation. Cependant, la nature hémibiotrope de *P. megakarya*, le phénomène de *priming*, la nature antagoniste des voies de défense médiées par l'acide salicylique et l'acide jasmonique et le temps écoulé entre l'inoculation et le prélèvement de tissu pour analyse de l'expression des gènes, peut expliquer les différences observées entre les clones SNK413 et SNK10 en fonction des traitements. En effet, il a été montré que l'interaction *T. cacao* et *M. perniciosa* active la défense médiée par JA et les marqueurs génétiques associés TcAOS et TcAOC ont été identifiés (Litholdo et al., 2015).

Par ailleurs, la mort cellulaire programmée (PCD) joue un rôle clé dans les réponses des plantes aux agents pathogènes (Scotton et al., 2017). Dans la présente étude, le gène du cacaoyer Baxinhibitor-1 (TcBI-1), codant pour un atténuateur basal putatif de la PCD, a été exprimé de manière constitutive chez les clones sensibles et tolérants non infectés. Mais, son expression a été significativement induite après inoculation chez ceux-ci et le prétraitement à la formulation OBF' a davantage induit son niveau d'expression. Ces résultats vont dans le même ordre d'idée que ceux de Scotton et al. (2017) qui, utilisant *Moniliophthora perniciosa*, ont montré que l'expression du gène anti-apoptotique du cacao Baxinhibitor-1 a affecté l'incidence et la sévérité de la maladie.

Les résultats de l'analyse LC-MS/MS de cette étude ont révélé que les métabolites communs les plus abondants aux six lots de cabosses sont significativement augmentés en réponse au prétraitement des cabosses avec OBF' et à l'inoculation à *P. megakarya*.

De plus, la théobromine dont les quantités ont été déterminées dans chaque lot de cabosses a été élevée après inoculation des cabosses. Ces métabolites ont été la poldine (de la famille des diphénylméthanes), le nitrazepam (de la famille des benzodiazépine), le métamitron (de la famille des 1,2,4-triazines), la caféine (alcaloïde de la famille des méthylxanthines), le tri-*o*-tolyl phosphate (de la famille des organophosphorés), l'eprosartan (de la famille des acides carboxyliques) et l'ergocristine (alcaloïdes de la famille des ergots alcaloïdes).

La présence de métabolites impliqués dans la réparation des tissus tel que le terpène madecassoside est synthétisé en quantité abondante chez le clone SNK10 non traité avec OBF' et indépendamment de l'état sanitaire, tandis qu'elle abonde uniquement après infection chez le clone SNK10 traité à OBF' et infecté et chez le clone SNK413 infecté (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ce résultat peut s'expliquer par la réparation rapide du tissu induite par OBF' chez SNK10, entraînant ainsi une baisse de la quantité de ce métabolite après une semaine comme chez le clone SNK413 non infecté. Cependant, après inoculation, les deux clones ont eu une teneur élevée en ce métabolite en réponse aux lésions continues produites par *P. megakarya*.

Certains composés ont été plus abondants chez le clone SNK10 à l'instar du terpène zeta-carotène qui est un caroténoïde précurseur de la pigmentation rougeâtre) de ce clone (<https://cocoa-genome-hub.southgreen.fr/content/kegg>). En outre, d'autres composés ont été significativement abondants chez le clone SNK413 et/ou celui SNK10-T-I comme l'alcaloïde déhydrocyclopeptine qui est un intermédiaire dans la synthèse des alcaloïdes benzodiazepines et le composé SB243213A qui agit comme un agoniste inverse sélectif pour le récepteur 5HT2C et a des effets anxiolytiques (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

L'ifosfamide a été commun aux lots de cabosses SNK10-NT-NI et SNK413-NT-NI. Il peut être un marqueur de cacao sain sans système de défense stimulé. En effet, c'est un agent alkylant administré par voie parentérale semblable au cyclophosphamide qui est utilisé dans le traitement de plusieurs formes de cancer, qui s'alkyle et forme des réticulations d'ADN, empêchant ainsi la séparation des brins d'ADN ainsi que la réplication de l'ADN (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La pterosin A a été commune aux lots de cabosses SNK10-NT-NI et SNK10-T-NI et ainsi, peut être un marqueur du clone SNK10 peu importe son état sanitaire. La pterosine A est un produit naturel présent dans *Pteridium aquilinum*, *Dennstaedtia scabra* et *Microlepia substrigosa* et présente une activité antihypoglycémique

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La solanidine base + O-Hex-Hex a été commune aux lots SNK10-NT-I et SNK10-T-NI est un glycoalcaloïde ayant un goût amer et utilisé comme insecticide agricole. Les glycoalcaloïdes *Solanum* peuvent inhiber le cholinestérase et perturber les membranes cellulaires. Des expériences montrent que l'exposition à la solanine ouvre les canaux potassiques des mitochondries, diminuant ainsi leur potentiel membranaire. Cela conduit à son tour à ce que le Ca^{2+} soit transporté des mitochondries dans le cytoplasme, et c'est cette concentration accrue de Ca^{2+} dans le cytoplasme qui déclenche les dommages cellulaires et l'apoptose (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

L'acide murocholic qui a été commun aux lots SNK413-NT-NI et SNK10-T-I, est un stéroïde 3alpha-hydroxy qui est de l'acide cholan-24-oïque substitué par des groupes hydroxy aux positions 3 et 6. C'est un acide conjugué d'un murideoxycholate. L'Hexose + Hexose-deoxyHexose + C₂₀H₃₂) est commun aux lots SNK413-NT-NI et SNK10-T-I.

Par ailleurs, trois métabolites (*lyalosidic acid*, ormosanine et ginsenoside Rh3) ont été communs aux lots SNK413-NT-I et SNK10-T-I et peuvent être des marqueurs de tolérance du cacao au vis-à-vis de *P. megakarya*. En effet, le prétraitement des cabosses sensibles SNK10 avec le biofongicide OBF' (ayant des propriétés de stimulateur de défense comme démontré dans la seconde partie du présent travail) a entraîné leurs synthèses tout comme le clone tolérant SNK413, les synthétisant en réponse à l'inoculation par *P. megakarya*. L'acide lyalosidique est un glycoside terpénique tandis que l'ormosanine est un alcaloïde quinolizidinique et un parent fondamental de l'alcaloïde quinolizidine. Toutefois, le ginsenoside Rh3 est un triterpénoïde saponine connu comme ayant un effet anti-inflammatoire en modulant l'AMPK et ses voies de signalisation en aval. Elle inhibe l'activité de l'acétylcholinestérase d'une manière dose-dépendante (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Conclusion partielle 3

La troisième partie de cette étude avait pour but d'évaluer l'effet de la formulation OBF' sur la résistance des cabosses de cacaoyer vis-à-vis de *Phytophthora megakarya* d'un point de vue transcriptomique et métabolomique. Il en résulte que le prétraitement des cabosses de cacaoyer sensibles et tolérantes à *Phytophthora megakarya* réduit la sévérité de la maladie de 2,17 à 1 pour le clone SNK10 tandis que celui SNK413 diminue de 1,33 à 0,5.

Un protocole d'extraction de l'ARN du péricarpe des cabosses de cacao a été optimisé pour permettre d'étudier l'expression des gènes par RT-qPCR. Ce protocole a utilisé le CTAB, l'ultra centrifugation à 30000g, le LiCl et une précipitation pendant 42 h.

Le prétraitement des cabosses a entraîné une augmentation significative des protéines PR chez le clone SNK413 traité à la formulation OBF'. Par ailleurs, cela a entraîné une augmentation significative du gène de défense BI1, et du facteur de transcription WRKY. Cependant, le gène AOS a significativement augmenté uniquement chez le clone SNK10.

L'analyse métabolomique du péricarpe des cabosses SNK413-NT-I, SNK10-NT-NI, SNK413-NT-NI, SNK10-NT-I, SNK10-T-NI et SNK10-T-I a révélé la présence de 275 à 279 composés parmi lesquels la zeta-carotène qui est responsable de la pigmentation rouge des clones SNK10 ; l'ifosfamide qui peut être un marqueur des cabosses saines non biofortifiées SNK10 et SNK413 ; la pteridine A qui peut être un marqueur du clone SNK10 ; l'Hexose + Hexose-deoxyHexose + C₂₀H₃₂ qui peut être un marqueur du clone SNK413 ; et de l'acide lyalosidique, de l'ormosanine et du ginsenoside Rh3 qui peuvent être des marqueurs de tolérance des cabosses SNK10 et SNK413 vis-à-vis de *Phytophthora megakarya*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

La présente étude avait pour objectif d'évaluer l'effet d'une formulation fongicide faite à partir du neem, de l'herbe sida, de la citronnelle et des coquilles d'huître sur le cacaoyer au cours de son interaction avec *Phytophthora megakarya* qui est un agent responsable de la pourriture brune des cabosses du cacaoyer. Il ressort au terme de ce travail que :

- la bioformulation efficace OBF' est une l'émulsion prometteuse ayant 10,8% de Nh, 8,1% de Nea, 8,1% de Seth, 4,05% de HCa, 1,35% de CaO, 21,6% de Tw et 10% de CEO. À température ambiante, elle est stable et possède des micelles de diamètre $\leq 14,9$ nm, un pH de 5,2 et une conductivité de 95,25 mV. Elle possède une activité dose dépendante sur *Phytophthora megakarya* et réduit sa croissance de 55,88% lorsque utilisé à 0,1%. Par ailleurs, elle agit sur *Phytophthora megakarya* en inhibant la synthèse des protéines chez cet agent pathogène fongique de 60% lorsque utilisée à 1% et en inhibant l'activité des pompes ATPases/H⁺.
- lorsque la bioformulation OBF' est appliquée à 1% (v/v) sur les fèves et sur les feuilles de cacaoyer pour produire les plants, elle stimule l'épanouissement des racines; n'entraîne pas de dommage foliaire et augmente la surface foliaire. En outre, elle stimule significativement la synthèse des protéines, des chlorophylles totales, des composés phénoliques solubles et augmente l'activité des peroxydases chez les plantes traitées à la formulation OBF' indépendamment de la présence de *Phytophthora megakarya* dans le substrat. De plus, le prétraitement du cacao avant inoculation du tissu avec *Phytophthora megakarya* réduit l'index de sévérité de la maladie en transformant les plants susceptibles (3,35) en plants très résistants (0,86). Cette réduction de la sévérité à la maladie due à *P. megakarya* est accompagnée par une augmentation de la teneur en composés phénoliques, en flavonoïdes et l'activité des enzymes peroxydases, polyphénol-oxydases et β -1,3-glucanases dans le tissu chez les plants.
- le prétraitement des cabosses de cacao avant inoculation du tissu avec *Phytophthora megakarya* réduit l'index de sévérité de la maladie en transformant celles moyennement résistantes (2,17) en résistantes (1) tandis que celles résistantes (1,33) sont rendues très résistantes (0,5). En outre, le prétraitement des cabosses de cacao réduit la sévérité à la maladie due à *P. megakarya* par une augmentation significative des protéines PR chez le clone SNK413 traité à la formulation OBF'. Mais cette

augmentation est non significative chez le clone SNK10. Par ailleurs, cela a entraîné une augmentation significative des gènes de défense BI1, et du facteur de transcription WRKY. Cependant, l'expression du gène AOS a été significativement augmentée uniquement chez le clone SNK10 après application de la formulation. En outre, un marqueur du clone SNK10 (ifosfamide), du clone SNK413 (l'Hexsose + Hexsose-deoxyHexose + C20H32) et trois marqueurs de la tolérance des clones SNK10 et SNK413 après inoculation avec *Phytophthora megakarya* (Lyalosidic acid, Ormosanine et Ginsenoside Rh3) ont été détectés.

Au regard de ces résultats, la bioformulation efficace OBF' constitue un potentiel candidat alternatif aux fongicides et fertilisants chimiques fortement utilisés en agriculture ; permettant ainsi de promouvoir une agriculture durable, compétitive, économique et respectueuse de la santé et l'environnement. Ce travail contribue d'une part à la valorisation des ressources génétiques. D'autre part, ce travail permet de montrer l'importance des extraits de plantes dans le contrôle des agents phytopathogènes en particulier *Phytophthora megakarya* et dans la promotion de la croissance des plantes à l'instar de *Theobroma cacao*.

Perspectives

Dans l'optique d'apporter une plus-value à ce travail, il sera important de:

- évaluer l'efficacité de la formulation OBF' sur la qualité du cacaoyer en champ par application foliaire;
- compléter l'identification des composés de la formulation OBF' via l'analyse chimique;
- évaluer l'effet de la formulation OBF' sur les métabolites bioactifs produits par le cacao;
- évaluer l'effet de la formulation OBF' sur les protéines produites par le cacao.

BIBLIOGRAPHIE

- AgenceBIO. (2021). *L'agriculture bio dans le monde edition 2020 l'agriculture bio dans le monde* (Sarah Le Douarin, Ed.; 2020th ed.). 12 rue Henri Rol-Tanguy: Agence française pour le développement et la promotion de l'agriculture biologique. Retrieved from https://www.agencebio.org/wp-content/uploads/2021/01/Carnet_MONDE_2020-1.pdf
- Aguilar, P., Keho, Y., Paulin, D., N'Kamleu, G., Raillard, A., Petithuguenin, P., Deheuvelds, O., & Gockowski, J. (2012). Dispersal and distribution of *Phytophthora megakarya* in young cacao plantations. *14th International Cocoa Research Conference*, 1167–1175. Retrieved from https://www.academia.edu/73314108/Dispersal_and_distribution_of_Phytophthora_megakarya_in_young_cacao_plantations
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics 2021, Vol. 9, Page 42*, 9(3), 42. doi: 10.3390/TOXICS9030042
- Ali, S. S., Melnick, R. L., Crozier, J., Phillips-Mora, W., Strem, M. D., Shao, J., Zhang, D., Sicher, R., Meinhardt, L., & Bailey, B. A. (2014). Successful pod infections by *Moniliophthora roreri* result in differential *Theobroma cacao* gene expression depending on the clone's level of tolerance. *Molecular Plant Pathology*, 15(7), 698–710. doi: 10.1111/MPP.12126/SUPPINFO
- Ali, S. S., Shao, J., Lary, D. J., Strem, M. D., Meinhardt, L. W., & Bailey, B. A. (2017). *Phytophthora megakarya* and *p. Palmivora*, causal agents of black pod rot, induce similar plant defense responses late during infection of susceptible cacao pods. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/FPLS.2017.00169/FULL
- Ambang, Z., Dida, S. L. L., Kiam, H. B., Angoula, S. B., Pegalepo, A. N., & Mboussi, B. S. (2019). Influence of the structure of cocoa agroforestry systems on the development of black pod disease in central region of Cameroon. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 9, 338-342.
- Arfaoui, A., El Hadrami, A., Adam, L. R., & Daayf, F. (2016). Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes' expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 12–21. doi: 10.1016/J.PMPP.2015.11.004
- Arzel, E., Rocca, P., Grellier, P., Labaëid, M., Frappier, F., Guéritte, F., Gaspard, C., Marsais, F., Godard, A., & Quéguiner, G. (2001). New synthesis of benzo- δ -carboline,

- cryptolepines, and their salts: In vitro cytotoxic, antiplasmodial, and antitrypanosomal activities of δ -carbolines, benzo- δ -carbolines, and cryptolepines. *Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(6), 949–960. doi: 10.1021/JM0010419
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., & Oyedeji, A. (2015). Cymbopogon Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. *Molecules*, *20*, 7438–7453. doi: 10.3390/molecules20057438
- Baaziz, M., Aissam, F., Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I., & Cheikh, R. (1994). Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars in Morocco. *Euphytica*, *76*(3), 159–168. doi: 10.1007/BF00022160
- Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K. H., Eichmann, R., & Hückelhoven, R. (2008). Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics* *2008 118:3*, *118*(3), 455–463. doi: 10.1007/S00122-008-0912-2
- Babin, R., Hoopen, G. ten, Gendre, P., & Lumaret J. . (2010). Impact of shade on the spatial distribution of *Sahlbergella singularis* in traditional cocoa agroforests. *Researchgate.Net*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Regis-Babin/publication/221966884_Impact_of_shade_on_the_spatial_distribution_of_Sahlbergella_singularis_in_traditional_cocoa_agroforests/links/5b310972aca2720785e4b9c1/Impact-of-shade-on-the-spatial-distribution-of-Sahlbergella-singularis-in-traditional-cocoa-agroforests.pdf
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Antúnez De Mayolo, G., Gultinan, M. J., Verica, J. A., Maximova, S. N., & Bowers, J. H. (2005). Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *43*(6), 611–622. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2005.04.006
- Bano, N., & Musarrat, J. (2003). Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Current Microbiology*, *46*(5), 324–328. doi: 10.1007/S00284-002-3857-8
- Barman, P., Choudhary, A. K., & Geeta, R. (2017). A modified protocol yields high-quality RNA from highly mucilaginous *Dioscorea* tubers. *3 Biotech*, *7*(2), 1–5. doi: 10.1007/S13205-017-0775-9/FIGURES/3
- Bartley, B. (2005). *The genetic diversity of cacao and its utilization*. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=_I40iGVJD64C&oi=fnd&pg=PR7&dq=

- Bartley+B.G.+(2005).+The+genetic+diversity+of+cacao+and+utilization.+CABI+publishing+London.+357P.&ots=M8I8K9tZX_&sig=SJF2W28ltChUy3LTrFQBIN7p5cg
- Bayala, B., Bassole, I., Maqdasy, S., Baron, S., Simpore, J., & Lobaccaro, J.-M. (2018). Cymbopogon citratus and Cymbopogon giganteus essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti. *Biochimie*, *153*, 162–170. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908418300567?casa_token=rgxkmUsn1ZoAAAAA:7OArzXVtkISPADlpz6Qs3-6vqoYkobn628mPF9GfKXEpZefFk2VydTRnoair5mxVG5UZg8Wzg
- Bempah, K., Buah-Kwofie, A., & Asomaning, J. (2011). Morphological studies of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed and physicochemical properties of its oil extracts collected in Accra metropolis of Ghana. *Elixir Applied Botany*, *39*, 4951–4953. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Bempah+KC%2C+Buah-Kwofie+A%2C+Asomaning+J.+2011.+Morphological+studies+of+Neem+%28Azadirachta++indica+A.+Juss.%29+seed+and+physicochemical+properties++of+its+oil+extracts+collected+in+Accra+metropolis+of++Ghana.+Elixir+Applied+Botany+39%2C+4951-4953.&btnG=
- Benhamou, N., & Picard, K. (1999). *La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes Induced resistance : a novel plant defense strategy against pathogens*. *80*(3). doi: 10.7202/706189ar
- Bertea, M. C., Buffa, G., Camusso, W., Bossi, S., Scannerini, S., Maffei, M., Tesio, M., & Mucciarelli, M. (2003). The C4 biochemical pathway, and the anatomy of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) cultivated in temperate climates. *Taylor & Francis*, *137*(2), 175–184. doi: 10.1080/11263500312331351441
- Besseau, S., Li, J., & Palva, E. T. (2012). WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *63*(7), 2667–2679. doi: 10.1093/JXB/ERR450
- Bhattacharya, M., & Dixit, S. (2015). International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences Emulsification of Neem oil: effect of polar solvents and chain length of surfactant. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, *3*(12), 2175–2179. Retrieved from www.pharmaresearchlibrary.com/ijcps

- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., & Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *CURRENT SCIENCE*, 82(11).
- Boller, T., & Biol, G. F. (2009). A renaissance of elicitors: perception of Microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition. *Ann. Rev. Plant Biol*60, 60, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Bonjean, K., de Pauw-Gillet, M. C., Defresne, M. P., Colson, P., Houssier, C., Dassonneville, L., Bailly, C., Greimers, R., Wright, C., Quetin-Leclercq, J., Tits, M., & Angenot, L. (1998). The DNA intercalating alkaloid cryptolepine interferes with topoisomerase II and inhibits primarily DNA synthesis in B16 melanoma cells. *Biochemistry*, 37(15), 5136–5146. doi: 10.1021/BI972927Q
- Boudjeko, T., Djocgoue, P. F., Nankeu, J. D., Mbouobda, H. D., Omokolo, D. N., & El Hadrami, I. (2007). Luteolin derivatives and heritability of resistance to *Phytophthora megakarya* in *Theobroma cacao*. *Australasian Plant Pathology*, 36(1), 56–61. doi: 10.1071/AP06083
- Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libian Journal of Medecine*, 9(1), 25431. doi: 10.3402/ljm.v9.25431
- 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(1–2), 248–254. doi: 10.1006/ABIO.1976.9999
- Champagne, D. E., Koul, O., Isman, M. B., Scudder, G. G. E., & Neil Towers, G. H. (1992). Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry*, 31(2), 377–394. doi: 10.1016/0031-9422(92)90003-9
- Chandrasekaran, R., Revathi, K., Nisha, S., Kirubakaran, S. A., Sathish-Narayanan, S., & Senthil-Nathan, S. (2012). Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(1), 65–71. doi: 10.1016/J.PESTBP.2012.07.002
- Chisowa, E. H., Hall, D. R., & Farman, D. I. (1998). Volatile Constituents of the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. *Ltd. Flavour Fragr. J*, 13, 29–30. doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(199801/02)13:1
- Chujo, T., Miyamoto, K., Shimogawa, T., Shimizu, T., Otake, Y., Yokotani, N., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Nojiri, H., Yamane, H., Minami, E., & Okada, K. (2013). OsWRKY28, a PAMP-responsive transrepressor, negatively regulates innate immune responses in rice

- against rice blast fungus. *Plant Molecular Biology* 2013 82:1, 82(1), 23–37. doi: 10.1007/S11103-013-0032-5
- Conway, W., Gross, K., Boyer, C., & Sams, C. (1988). Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology*, 78(8), 1052–1055. Retrieved from https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n08_1052.PDF
- Coulibaly, K., Kebe, I. B., Koffi, N. K., Mpika, J., & Kone, D. (2013). Caractérisation des isolats de *Phytophthora* spp du verger cacaoyers de Côte d’Ivoire. *Ajol.Info*, 70, 5567–5579. doi: 10.4314/jab.v70i1.98757
- Da Costa, J. T., Forim, M. R., Costa, E. S., de Souza, J. R., Mondego, J. M., & Boiça Junior, A. L. (2014). Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. *Journal of Stored Products Research*, 56, 49–53. doi: 10.1016/J.JSPR.2013.10.004
- Da Silva, G., Micheli, F., Ferreira, C. F., & de Mattos Cascardo, J. C. (2003). Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. <https://doi.org/10.2144/03353st02>, 35(3), 494–500. doi: 10.2144/03353ST02
- Damintoti, K. S., Mc Nadembega, W., Ilboudo, D. P., Ouermi, D., Gbeassor, M., de Souza, C., & Simporé, J. (2007). *Sida acuta* Burm. f.: a medicinal plant with numerous potencies. *Ajol.Info*, 6(25), 2953–2959. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58270>
- Dassonneville, L., Lansiaux, A., Wattelet, A., & Watez, N. (2000). Cytotoxicity and cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 409, 9–19. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299900008050?casa_token=4ZiCVeJWZMYAAAAA:laWJjS0jMTT1-c-aOMBH9dgYjID4SQZSjoORQd9Zk2zOg30MITDfLwxRUQUZnf49uREC8Vx5FQ
- De Almeida, A. A. F., & Valle, R. R. (2007). Ecophysiology of the cacao tree. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 425–448. doi: 10.1590/S1677-04202007000400011
- De Wever, J., Tulkens, D., Verwaeren, J., Everaert, H., Rottiers, H., Dewettinck, K., Lefever, S., & Messens, K. (2020). A combined rna preservation and extraction protocol for gene expression studies in cacao beans. *Frontiers in Plant Science*, 11, 992. doi: 10.3389/FPLS.2020.00992/BIBTEX

- Deberdt, P., Mfegue, C., Tondje, P., Bon, M. C., Ducamp, M., Corinne Hurard, B. A., Begoude, Ndoumbe-Kenk, M., Prakash, K. H., & Cilas C. (2008). Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (Phytophthora). *Elsevier*. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964407002836?casa_token=7CF0BJTEx6YAAAAA:NFIppeWVwZnKCYKpsepGclt_fJWuqskM68E58nlZVWjviyMZP8KI04oxDhAG6co-J-cWIS0mYw
- Delteil, A., Blein, M., Faivre-Rampant, O., Guellim, A., Estevan, J., Hirsch, J., Bevitori, R., Michel, C., & Morel, J. B. (2012). Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. *Molecular Plant Pathology*, *13*(1), 72–82. doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00731.X
- Dhivya, V., Nelson, J., Johnson Thangaraj Edward, Y. S., Vichangal Pridiuldi, S., Jeyarajan Nelson, S., Subramanian, K., Johnson Thangaraj Edward, Y., Rajamani, K., Santhanakrishnan, V., & Sithanatham, S. (2019). Formulation of sweet flag oil (*Acorus calamus*) nanoemulsion by spontaneous emulsification method for the management of *Sitophilus oryzae*. *International Journal of Chemical Studies*, *7*(3), 2072–2076. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/333603038>
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A. G. J., & van Berkel, W. J. H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Academicjournals.Org*, *1*(1), 21–38. Retrieved from <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-full-text-pdf/35754E940209>
- Dihazi, A., Jaiti, F., WafaTaktak, kilani-Feki, O., Jaoua, S., Driouich, A., Baaziz, M., Daayf, F., & Serghini, M. A. (2012). Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *55*, 7–15. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2012.03.003
- Djuidje, K. P. F., Ewané, C. A., Lerat, S., Omokolo, N. D., Beaulieu, C., & Boudjeko, T. (2019). Evaluation of antagonistic activities against *Pythium myriotylum* and plant growth promoting traits of *Streptomyces* isolated from Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) rhiz Antitumor activities of some african herbal medicine View project Rehabilitation of fermentation View project. *Australian Journal of Crop Science*, *13*(6), 920–933. doi: 10.21475/ajcs.19.13.06.p1670
- Domori. (2015, July 15). *DOMORI, L'ÂME DU CHOCO*. Retrieved from <https://www.yumpu.com/fr/document/read/51644638/cacao-culture-agriland/4>

- Dzelamonyuy, A., Martial, T. T. P., Ruth, N. N. E., Grace, L. B., Ebenezer, F. T., Flore, M. P. T., & Thaddee, B. (2022). Effects of a Powder Formulation of *Streptomyces cameroonensis* on Growth and Resistance of Two Cocoa Hybrids from Cameroon against *Phytophthora megakarya* (Causal Agent of Black Pod Disease). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 160–169. doi: 10.4014/JMB.2110.10006
- Effa, O. P., Akoa, S. P., Ondobo, M. L., & Djocgoue, P. F. (2016). Assessment of tolerance level to *Phytophthora megakarya* in four hybrid populations of *Theobroma cacao* L. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 9(3), 53–64. doi: 10.12692/IJB/9.3.53-64
- Eichmann, R., Bischof, M., Weis, C., Shaw, J., Lacomme, C., Schweizer, P., Duchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., & Hüchelhoven, R. (2010). BAX INHIBITOR-1 Is Required for Full Susceptibility of Barley to Powdery Mildew. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 23(9), 1217–1227. doi: 10.1094/MPMI
- Ekpenyong, C., & Ernest, E. (2017). Use of *Cymbopogon citratus* essential oil in food preservation: Recent advances and future perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(12), 2541–2559. doi: 10.1080/10408398.2015.1016140
- Essian J. (2019). La filière cacao se porte mal au Cameroun : Un plan stratégique de la société de développement du cacao veut redynamiser la filière. *Journal Le Jour*. No 2897 du 22 mars 2019.pp 6-7.
- Essingan. (2019). *La filière cacao se porte mal dans la Région du sud* | *Journal Essingan*. Retrieved from <https://journalessingan.com/la-filiere-cacao-se-porte-mal-dans-la-region-du-sud/>.
- Ewané, C.A., Tatsegouock, R. N., Meshuneke, A., Niemenak, N. (2020a) Field efficacy of a biopesticide based on *Tithonia diversifolia* against Black Sigatoka disease of plantain (*Musa* spp., AAB). *Agricultural Sciences*, 11(08), 730.
- Ewané C.A., K. Nott, L. Lassois, P. Lepoivre, L. de Lapeyre de Bellaire. 2020b. Severe modifications in source-sink ratio influence the susceptibility of bananas to crown rot and its phenolic content. *Plant Pathology*, 69 (9) : 1740-1753. <https://doi.org/10.1111/ppa.13243>
- Ewané, C.A., Ndongo, F., Ngoula, K., Tene Tayo, P.M., Opiyo, S.O., & Boudjeko, T. (2019) Potential Biostimulant Effect of Clam Shells on Growth Promotion of Plantain PIF Seedlings (var. Big Ebanga & Batard) and Relation to Black Sigatoka Disease Susceptibility. *American Journal of Plant Science*, 10, 1763-1788.

- Ewané CA., Lepoivre P., de Lapeyre de Bellaire L. & Lassois L. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(3): 393-404.
- Fouelefack, F. R., Tapan, K. P., Dongmo, L. J. B., Ndonkeu, M. G., Mekam, P. N., & Nguefack, J. (2024). Correlation between the chemical composition of fresh and dried *Cymbopogon citratus* essential oil fractions and their antifungal effects against the causal agents of brown spot and bakanae diseases of rice. *European Journal of Plant Pathology*, 1-16.
- Gaonkar, M., & Innovative, A. C. (2016). Application of eggshell as fertilizer and calcium supplement tablet. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 5(3), 3520–3525. doi: 10.15680/IJIRSET.2016.0503183
- Ghotbi, R. S., Khatibzadeh, M., & Kordbacheh, S. (2014). Preparation of Neem Seed Oil Nanoemulsion. *Proceedings of the 5 Th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, 150, 150. Retrieved from https://avestia.com/ICNFA2014_Proceedings/papers/150.pdf
- Guinoiseau, E. (2010). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action - TEL - Thèses en ligne* [Université de Corse]. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00595051/>
- Harni, Khaerati, Noveriza, & Yuliani, (2020). Effectiveness of Citronella Oil Nanoemulsion on *Phytophthora palmivora* Butl. Black Pod Pathogen. *Jurnal Tanaman Industri Dan Penyegar*, 7(3), 136. doi: 10.21082/JTIDP.V7N3.2020.P127-136
- Hashmat, I., Azad, H., & Ahmed, A. (2012). Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)-A Nature's Drugstore: An overview. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(6), 76. Retrieved from www.isca.in
- Holm, L., Plucknett, D., Pancho, J., & Herberger, J. (1977). *The world's worst weeds. Distribution and biology*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19782319336>
- Hütz-Adams, F., Claudia Huber, Irene Knoke, Pedro Morazán, & Mara Mürlebach. (2016). *Renforcer la compétitivité de la production de cacao et augmenter le revenu des producteurs de cacao en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale*. Bonn, Germany. Retrieved from www.suedwind-institut.de
- ICCO (2013). International cocoa organization. About-cocoa/growing-cocoa.
- ICCO. (2024). Production of cocoa beans. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, L(2), 1–1.
- Imani, J., Baltruschat, H., Stein, E., Jia, G., Vogelsberg, J., Kogel, K. H., & Hüchelhoven, R. (2006). Expression of barley BAX Inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis*

- cinerea. *Molecular Plant Pathology*, 7(4), 279–284. doi: 10.1111/J.1364-3703.2006.00339.X
- Inglis, P. W., Marilia de Castro, R. P., Resende, L. v., & Grattapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLOS ONE*, 13(10), e0206085. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0206085
- INSTITUT NATIONAL DE LA STATISTIQUE. (2021, July). *COMMERCE EXTERIEUR DU CAMEROUN EN 2020*. Retrieved from https://ins-cameroun.cm/wp-content/uploads/2021/09/Note-Commerce-exterieur-2020_VF_.pdf
- Jafari, S., Saeidnia, S., Shams Ardekani, M. R., Hadjiakhoondi, A., & Khanavi, M. (2013). Micromorphological and preliminary phytochemical studies of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. *Turkish Journal of Botany*, 37(4), 690–697. doi: 10.3906/bot-1205-14
- Jagoret, P. (2011). *Analyse et évaluation de systèmes agroforestiers complexes sur le long terme: Application aux systèmes de culture à base de cacaoyer au Centre Cameroun*. Retrieved from <https://agritrop.cirad.fr/560345>
- Jamiołkowska, A. (2020). Natural Compounds as Elicitors of Plant Resistance Against Diseases and New Biocontrol Strategies. *Agronomy 2020*, Vol. 10, Page 173, 10(2), 173. doi: 10.3390/AGRONOMY10020173
- Jeong, M.-R., Beom Park, P., Kim, D.-H., Jang, Y.-S., Sol Jeong, H., & Choi, S.-H. (2009). Essential Oil Prepared from *Cymbopogon citrates* Exerted an Antimicrobial Activity Against Plant Pathogenic and Medical Microorganisms. *Mycobiology*, 37(1), 48–52. doi: 10.4489/MYCO.2009.37.1.048
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature 2006 444:7117*, 444(7117), 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Jordon-Thaden, I. E., Chanderbali, A. S., Gitzendanner, M. A., & Soltis, D. E. (2015). Modified CTAB and TRIzol protocols improve RNA extraction from chemically complex Embryophyta. *Applications in Plant Sciences*, 3(5), 1400105. doi: 10.3732/APPS.1400105
- Kalia, V., Miglani, R., Purnapatre, K. P., Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Voleti, S. R., Upadhyay, D. J., Singh Saini, K., Rattan, A., & Raj, V. S. (2009). Mode of action of ranbezolid against staphylococci and structural modeling studies of its interaction with ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1427–1433. doi: 10.1128/AAC.00887-08

- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *Https://Doi.Org/10.1199/Tab.0153*, 2011(9), e0153. doi: 10.1199/TAB.0153
- Karim, A., Jiang, Y., Guo, L., Ling, Z., Ye, S., Duan, Y., Li, C., & Luo, K. (2015). Isolation and characterization of a subgroup IIa WRKY transcription factor PtrWRKY40 from *Populus trichocarpa*. *Tree Physiology*, 35(10), 1129–1139. doi: 10.1093/TREEPHYS/TPV084
- Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simporé, J., Colizzi, V., & Traore, A. S. (2005). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, 4(12), 1452–1457. doi: 10.4314/ajb.v4i12.71463
- Khaled, A., & Mohamed, R. (2016). EFFET DE COMPOSÉS CALCIQUES INORGANIKES SUR LE DÉVELOPPEMENT IN VITRO DE MOISSURES ISOLÉES D'AGRUMES APRÈS LA RÉCOLTE. *Https://Popups.Uliege.Be/0037-9565*, 263–275. doi: 10.25518/0037-9565.6482
- Khodary, S. E. A. (2004). Effect of Salicylic Acid on the Growth, Photosynthesis and Carbohydrate Metabolism in Salt Stressed Maize Plants. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, 6(1), 5–8. Retrieved from <http://www.ijab.org>
- Kramling, T., & Singleton, V. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture History*, 20(2), 86–92. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/20/2/86.short>
- Kuiate, J.-R., Brigitte Kouitchou Mabeku, L., Jules Roger, K., & Essame Jean Louis, O. (2011). Screening of Some Plants Used in the Cameroonian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *International Journal of Biology*, 3(4), 13–21. doi: 10.5539/ijb.v3n4p13
- Kumar, P., Debasis, M., Goutam, G., & Chandra S.. (2010). Biological action and medicinal properties of various constituent of *Azadirachta indica* (Meliaceae): an overview. *Cabdirect.Org*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103302434>
- Kumar, V. S., & Navaratnam, V. (2013). Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(7), 505–514. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60105-7
- Langrand, S. (2013). *Influence de l'agro-industrie sur la production de cacao au Cameroun*. Retrieved from <https://agritrop.cirad.fr/572676>

- Lara, I., García, P., & Vendrell, M. (2004). Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 34(3), 331–339. doi: 10.1016/J.POSTHARVBIO.2004.05.018
- Lee, C. H., Lee, D. K., Ali, M. A., & Kim, P. J. (2008). Effects of oyster shell on soil chemical and biological properties and cabbage productivity as a liming materials. *Waste Management*, 28(12), 2702–2708. doi: 10.1016/J.WASMAN.2007.12.005
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., & Phongpaichit, S. (2006). Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 990–997. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2005.08.030
- Legavre, T., Ducamp, M., Sabau, X., Argout, X., Fouet, O., Dedieu, F., Surujdeo-Maharaj, S., Garcia, D., Paulin, D., & Lanaud, C. (2015). Identification of *Theobroma cacao* genes differentially expressed during *Phytophthora megakarya* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 92, 1–13. doi: 10.1016/J.PMPP.2015.08.005
- Lesueur, F. (2006). *Élaboration de formulations à base d'extraits de neem (Azadirachta indica A. Juss) pour la protection de la pomme de terre (Solanum tuberosum L.) contre le Myzus persicae, un puceron colonisateur et vecteur de virus circulants et non circulants*. [Mémoire de Maîtrise, Université de Laval]. Retrieved from <https://www.bac-lac.gc.ca/eng/services/theses/Pages/item.aspx?idNumber=1032918981>
- Li, J., Besseau, S., Törönen, P., Sipari, N., Kollist, H., Holm, L., & Palva, E. T. (2013). Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 200(2), 457–472. doi: 10.1111/NPH.12378
- Liau, M. Y., Natan, F. A., Widiyanti, P., Ikasari, D., Indraswati, N., & Soetaredjo, F. E. (2008). EXTRACTION OF NEEM OIL (*Azadirachta indica* A. Juss) USING N-HEXANE AND ETHANOL: STUDIES OF OIL QUALITY, KINETIC AND THERMODYNAMIC. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(3), 49–54. Retrieved from www.arpnjournals.com
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*. 591–592. Retrieved from <https://www.researchgate.net/profile/Millton-Lima-Neto/post/Spectrophotometric-method-of-dosage-of-chla/attachment/59d64f9179197b80779a8abf/AS%3A498331311722496%401495822851961/download/Lichtenthaler+et+al.+1983+->

+Determination+of+total+carotenoids+and+chlorophylls+a+and+b+of+leaf+extracts+in
+different+solvents.pdf

- Limsuwan, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2013). Bactericidal, Bacteriolytic, and Antibacterial Virulence Activities of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schltr Extract against *Streptococcus pyogenes*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 1023–1028. doi: 10.4314/tjpr.v12i6.23
- Liopa-Tsakalidi, A., Chalikiopoulos, D., & Papasavvas, A. (2010). Effect of chitin on growth and chlorophyll content of two medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 499–508. doi: 10.5897/JMPR10.174
- Litholdo, C. G., Leal, G. A., Albuquerque, P. S. B., & Figueira, A. (2015). Differential expression of jasmonate biosynthesis genes in cacao genotypes contrasting for resistance against *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell Reports 2015 34:10*, 34(10), 1747–1759. doi: 10.1007/S00299-015-1821-X
- Mabeku, L., Roger, K., & Louis, O. (2011). Screening of some plants used in the Cameroonian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *International Journal of Biology*, 3(4), 13–21. doi: 10.5539/ijb.v3n4p13
- Manavathu, E. K., Dimmock, J. R., Vashishtha, S. C., & Chandrasekar, P. H. (2001). Inhibition of H⁺-ATPase-mediated proton pumping in *Cryptococcus neoformans* by a novel conjugated styryl ketone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(4), 491–494. doi: 10.1093/JAC/47.4.491
- Manga, J. N., Ondobo, M. L., Effa, P. O., Djoko, J. C. K., & Djougoue, P. F. (2018). Heterosis, heterobeltiosis, narrow-sense and broad-sense heritabilities for *Phytophthora megakarya* tolerance in two populations of *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology*, 17(14), 495–504. doi: 10.5897/AJB2017.16129
- Mann, A., Gbate, M., & Umar, A. (2003). *Medicinal and economic plants of Nupeland* (Jube Evans Books and & Publication, Eds.). Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Mann+A%2C+Gbate+M%2C+Umar+AN+%282003%29.+Sida+acuta+subspecie+acuta.+Medicinal+and+economic+palnt+of+Nupeland%2C+Jube+Evans+Books+and+Publication%2C+p.+241&btnG=
- Marigo, G. (1973). On one fractioning methods and estimations of phenolic compounds in the vegetables. *Analy*, 2, 106–110. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Marigo+G.+%281973%29.+On+one+fractioning+methods+and+estimations+of+phenolic+compounds+in+the+ve

- getables.+Analyse.+2%3A106-110.&btnG=#d=gs_cit&t=1660380966108&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3AEBsGLsNQw4sJ%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D0%26hl%3Den
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512. doi: 10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042916-041132
- Melnick, R. L., Marelli, J. P., Sicher, R. C., Strem, M. D., & Bailey, B. A. (2012). The interaction of *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease, during parthenocarpy. *Tree Genetics & Genomes* 2012 8:6, 8(6), 1261–1279. doi: 10.1007/S11295-012-0513-8
- Méteignier, L. (2015). *Investigation sur la régulation traductionnelle pendant la réponse immunitaire végétale induite par les protéines NB-LRR*. Retrieved from <https://www.bac-lac.gc.ca/eng/services/theses/Pages/item.aspx?idNumber=1033181085>
- Mfegue, C. (2012). *Origine et mécanismes de dispersion des populations de Phytophthora megakarya, pathogène du cacaoyer au Cameroun*. PhD thesis. SupAgro, Montpellier, France. 185 p. Retrieved from https://agritrop.cirad.fr/567532/1/document_567532.pdf
- Mohideen, S., Sasikala, E., life, V. G.-A. science of, & 2002, undefined. (2002). Pharmacognostic studies on *Sida acuta burm. f.* *Ancient Science of Life*, 22(1), 57–66. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3330990/>
- Mondall, N. K., Banerjee Sant Gahira Guru Vishwavidyalaya, A., kumar Datta, J., & Gupta, S. (2009). Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium . *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 13(1), 49–53. Retrieved from www.bioline.org.br/ja
- Montagna, M. T., Diella, G., Triggiano, F., Caponio, G. R., de Giglio, O., Caggiano, G., di Ciaula, A., & Portincasa, P. (2019). Chocolate, “food of the gods”: History, science, and human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(24). doi: 10.3390/ijerph16244960
- Moyin-Jesu, E. (2012). *Comparative evaluation of modified neem leaf, neem leaf and woodash extracts on soil fertility improvement, growth and yields of maize (Zea mays L.) and watermelon*. Retrieved from https://www.scirp.org/html/12-3000144_16850.htm
- Mpika, J., Kébé, I., Issali, A., N'guessan, F.K., Druzhinina, S., Komon-Zelazowska, M., Kubicek, C.P., Ake, S. (2009). Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease

- on cocoa. *Ajol.Info*. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/65962>
- Mustafa, G., Iqbal, Z., Bansal, T., Talegaonkar, S., & Khan, Z. I. (2009). Preparation and characterization of oil in water nano-reservoir systems for improved oral delivery of atorvastatin. *Current Nano Science*, 5, 428–440. doi: 10.2174/157341309789377989
- Namasivayam, K. R. S., Lazar, F., Sanjana, H., Shardha, V., Francis, A., Elson, J., George, J., Xavier, D., & Sreekanth, J. (2017). EFFECT OF POLYMER BASED SURFACE COATING ON DROPLET SIZE AND POTENTIAL PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF NEEM OIL. *IOAB Journal*, 8, 1–6. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Francis-Lazar/publication/320215306_EFFECT_OF_POLYMER_BASED_SURFACE_COATING_ON_DROPLET_SIZE_AND_POTENTIAL_PHARMACOLOGICAL_PROPERTIES_OF_NEEM_OIL_NANOEMULSION/links/59d52b45a6fdcc87469560ca/EFFECT-OF-POLYMER-BASED-SURFACE-COATING-ON-DROPLET-SIZE-AND-POTENTIAL-PHARMACOLOGICAL-PROPERTIES-OF-NEEM-OIL-NANOEMULSION.pdf
- Ndolo, D., Njuguna, E., Adetunji, C. O., Harbor, C., Rowe, A., Breeyen, A. den, Sangeetha, J., Singh, G., Szewczyk, B., Anjorin, T. S., Thangadurai, D., & Hospet, R. (2019). Research and Development of Biopesticides: Challenges and Prospects. *Outlooks on Pest Management*, 30(6), 267–276. doi: 10.1564/V30_DEC_08
- Negrelle, R., Medicinai, E. G. & R. B. . (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Ibb.Unesp.Br*, 1, 80–92. Retrieved from https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMedicinai/revisao_v9_n1.pdf
- Newhook, F., Waterhouse, G., & papers, D. S.-. (1978). Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*. Retrieved from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302114101>
- Nicolas, O., Charles, M. T., Jenni, S., Toussaint, V., Parent, S. É., & Beaulieu, C. (2019). The ionomics of lettuce infected by *xanthomonas campestris* pv. *Vitians*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 351. doi: 10.3389/FPLS.2019.00351/BIBTEX
- Nisha, C., Bhawana, P., & Fulekar, M. H. (2017). Antimicrobial Potential of Green Synthesized Silver nanoparticles using *Sida acuta* Leaf extract. *Nano Science & Nano Technology: An Indian Journal Research* |, 11(1), 111. Retrieved from www.tsijournals.com

- Nishan, M., & Subramanian, P. (2014). *Pharmacological and non pharmacological activity of Azadirachta indica (Neem)-A review Cite this paper Pharmacological and non pharmacological activity of Azadirachta indica (Neem)-A review*. 5(6), 104–112. doi: 10.12692/ijb/5.6.104-112
- c, J., Wulff, G. E., Lekagne Dongmo, J. B., Fouelefack, F. R., Fotio, D., Mbo, J., & Torp, J. (2013). Effect of plant extracts and an essential oil on the control of brown spot disease, tillering, number of panicles and yield increase in rice. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 871-882
- Nwankpa, P., Chukwuemeka, O., Uloneme, G., Etteh, C., Ugwuezumba, P., & Nwosu, D. (2015). Phyto-nutrient composition and antioxidative potential of ethanolic leaf extract of *Sida acuta* in wistar albino rats. *African Journal of Biotechnology*, 14(49), 3264–3269. doi: 10.4314/ajb.v14i49.
- Nyassé, S., Cilas, C., Herail, C., & Blaha, G. (1995). Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. *Crop Protection*, 14(8), 657–663. doi: 10.1016/0261-2194(95)00054-2
- Oladeji, O., Adelowo, F., Ayodele, D., & Odelade, K. (2019). Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. *Scientific African*, 6, e00137. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227619306982>
- Ondobo, M. L., Onomo, P. E., Djocgoue, P. F., & Boudjeko, T. (2013). Influence of *Phytophthora megakarya* inoculation on necrosis length, phenolic content, peroxidase and polyphenoloxidase activity in cocoa (*Theobroma cacao* L) plants Antitumor activities of some african herbal medicine View project Genetics improvement of maize for acid soils tolerance View project. *Syllabus Review*, 4, 8–18. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/310464786>
- Ondobo, M. L., Onomo, P. E., Ndjaga, J. M., Kouam, D., Agron, I. J., Agri, R., Christian, J., Djocgoue, P. F., & Ndoumou, D. O. (2017). Breeding of parental and tolerant hybrids of *Theobroma cacao* L. to *Phytophthora megakarya* Bras. And Griff. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 9 (2),9-21.
- Pandey, D., Tripathi, N., Tripathi, R., & Dixit, S. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*/Fungitoxische und phytotoxische Eigenschaften des ätherischen Öis von *Hyptis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 344–349. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/43214961>

- Pankaj, S., Lokeshwar, T., Mukesh, B., & Vishnu, B. (2011). *Review on neem (Azadirachta indica): thousand problems one solution*. 2(12), 97–102. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Pankaj+S%2C+Lokeshwar+T%2C+Mukesh+B%2C+Vishnu+B.+2011.+Review+on+neem+%28Azadirachta+indica%29%3A++Thousand+problems+one+solution.+International++Research+Journal+of+Pharmacy+2%2812%29%2C+97-102.&btnG=
- Paulin, D., Ducamp, M., & Lachenaud, P. (2008). New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana. *Crop Protection*, 27(7), 1143–1147. doi: 10.1016/J.CROPRO.2008.01.004
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., van der Ent, S., & van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 2009 5:5, 5(5), 308–316. doi: 10.1038/nchembio.164
- Pirovani, C. P., Carvalho, H. A. S., Machado, R. C. R., Gomes, D. S., Alvim, F. C., Pomella, A. W. V., Gramacho, K. P., Cascardo, J. C. de M., Pereira, G. A. G., & Micheli, F. (2008). Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *ELECTROPHORESIS*, 29(11), 2391–2401. doi: 10.1002/ELPS.200700743
- Ploetz, R. C. (2007). Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology*, 97(12), 1634–1639. doi: 10.1094/PHYTO-97-12-1634
- Pohe, J., & Agneroh, T. (2013). L'huile des graines de neem, un fongicide alternatif à l'oxyde de cuivre dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 62(0), 4644–4652. doi: 10.4314/jab.v62i0.86147
- Pratama, A. N., Grandmottet, F., Rod-In, W., & Monmai, C. (2021). *Efficient mini-prep RNA extraction from Dendrobium floral tissues rich in polysaccharides for validation of reference genes during flower development Genetic transformation of D. Sonia "Earsakul" View project Durio project View project*. doi: 10.34044/j.anres.2021.55.3.04
- Rab, A., Sajid, M., Khyber, N. A., & Khyber, K. N. (2017). Foliar Calcium Application Ameliorates Salinity-Induced Changes of Tomato Crop Grown in Saline Conditions. *Sarhad Journal of Agriculture*, 33, 540–548. doi: 10.17582/journal.sja/2017/33.4.540.548
- Ramroop, P., & Neetoo, H. (2018). Antilisterial activity of *Cymbopogon citratus* on crabsticks. *AIMS Microbiology*, 4(1), 67. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6605026/>
- Ranf, S. (2017). Sensing of molecular patterns through cell surface immune receptors. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 68–77. doi: 10.1016/J.PBI.2017.04.011

- Regnault-Roger, C., & Philogène BJR. (2002). *"De nouveaux phyto-insecticides pour le troisième millénaire.* (Biopesticides d'origine végétale., Ed.). Paris: _Lavoisier-Éditions Tec & Doc_. Retrieved from [https://link.springer.com/978-1-58829-129-5](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Regnault-Roger+C.+%282002%29.+De+nouveaux+phyto-insecticides+pour+le+troisi%C3%A8me+mill%C3%A9naire+%3F+Dans+Biopesticides+d%27origine+v%C3%A9g%C3%A9tale.+Sous+la+direction+de+B.J.R.+Philog%C3%A8ne+et+C.+Vincent.+Tec+Se+Doc%2C+Lavoisier%2C+Paris%2C+p.+19-34.&btnG=Ren, D., Yang, H., & Zhang, S. (2002). Cell Death Mediated by MAPK Is Associated with Hydrogen Peroxide Production in Arabidopsis*. <i>Journal of Biological Chemistry</i>, 277(1), 559–565. doi: 10.1074/JBC.M109495200</p>
<p>Ross, I. (2005). <i>Medicinal plants of the world, volume 3: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses.</i> Retrieved from <a href=)
- Saha, A., & Brewer, C. (1994). Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydrate Research*, 254, 157–167. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008621594842493>
- Sahal, G., Woerdenbag, H. j, Hinrichs, W. L. J., Visser, A., Tepper, P. G., Quax, P. G., van der mei, H. C., & Bilkay, I. S. (2020). Antifungal and biofilm inhibitory effect of Cymbopogon citratus (lemongrass) essential oil on biofilm forming by Candida tropicalis isolates; an in vitro study. *J Ethnopharmacol* , 246, 112188. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119320641?casa_token=I0uoBG4Jo1IAAAAA:NyOkH9rJ60jTfKYTKXrZWxUtdFPnJhbASEDA07oj_FufBbWrC_03QPUQvev_KUNAs0u3ZaGzFg
- Sami, A. J., Bilal, S., Khalid, M., Shakoori, F. R., Rehman, F., & Shakoori, A. R. (2016). Effect of crude neem (azadirachta indica) powder and azadirachtin on the growth and acetylcholinesterase activity of tribolium castaneum (herbst) (coleoptera: Tenebrionidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 48(3), 881–886.
- Sansregret, R. (2016). *Étude Des Réponses de Défense Mises en Place Chez la Plante en Réaction À la Suppression de L'ARN D'interférence.* Retrieved from <https://www.bac-lac.gc.ca/eng/services/theses/Pages/item.aspx?idNumber=1032938386>
- Santino, A., Taurino, M., de Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Victoria, •, & Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Springer*, 32(7), 1085–1098. doi: 10.1007/s00299-013-1441-2

- Scorzoni, L., Benaducci, T., Marisa Fusco Almeida, A., Helena Siqueira Silva, D., da Silva Bolzani, V., & José Soares Mendes Gianinni, M. (2007). The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, *38*, 391–397.
- Scotton, D. C., Azevedo, M. D. S., Sestari, I., Da Silva, J. S., Souza, L. A., Peres, L. E. P., Leal, G. A., & Figueira, A. (2017). Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular Plant Pathology*, *18*(8), 1101–1112. doi: 10.1111/MPP.12463
- Shaila, H., Sumaiya, F. K., & Laisa, A. L. (2016). Antibacterial properties of Neem (*Azadirachta indica*): a mini review . *Biojournal of Science and Technology*, *4*. Retrieved from <https://bio-journal.com/content/article/2016/09/antibacterial-properties-of-neemazadirachta-indica>
- Sharma, S., & Malik, P. (2012). Biopesticides: Types and applications. *International Journal of Advances in Pharmacy Biology and Chemistry*, *1*(4), 508–515. Retrieved from <http://www.mbbcollege.in/db/notes/417.pdf>
- Shen, G., Liu, X., Zhang, S., Jiang, Q., & Ding, W. (2017). Effects of oyster shell powder on metabolic diversity of microorganism in tobacco rhizosphere soil and incidence of bacterial wilt. . *Journal of Tobacco Science & Technology*, *50*, 22–28. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Shen+G.%2C+Liu+X.%2C+Zhang+S.%2C+Jiang+Q.%2C+Ding+W.+%282017%29.+Effects+of+oyster+shell+powder+on+metabolic+diversity+of+microorganism+in+tobacco+rhizosphere+soil+and+incidence+of+bacterial+wilt.+Journal+of+Tobacco+Science+%26+Technology%2C+50%3A+22-28&btnG=
- Shi, P., Liu, M., Ratkowsky, D.A., Gielis, J., Su, J., Yu, X., Wang, P., Zhang, L., Lin, Z. Schrader, J. (2019). Leaf area–length allometry and its implications in leaf shape evolution. *Trees*, *33*, pp.1073-1085. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01843-4>
- Shim, J. S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y. W., Choi, Y., Lee, J. S., Song, J. T., Kim, J. K., & Choi, Y. do. (2013). AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The Plant Journal*, *73*(3), 483–495. doi: 10.1111/TPJ.12051
- Silva Monteiro De Almeida, D., Oliveira Jordão Do Amaral, D., Del-Bem, L. E., Bronze Dos Santos, E., Santana Silva, R. J., Peres Gramacho, K., Vincentz, M., & Micheli, F. (2017). Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors

- and analysis of their expression in response to witches' broom disease. *PLOS ONE*, 12(10), e0187346. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0187346
- Silva, D. v, Branco, S. M. J., Holanda, I. S. A., Royaert, S., Motamayor, J. C., Marelli, J. P., & Corrêa, R. X. (2016). *Comparative evaluation of total RNA extraction methods in Theobroma cacao using shoot apical meristems*. doi: 10.4238/gmr.15017364
- Simo, C., Djocgoue, P. F., Mbouobda, H. D., Boudjeko, T., Ndiang, Z., & Omokolo, D. N. (2014). Assessing relationship between phenolic compounds and resistance tPhytophthora megakarya using two cocoa (Theobroma cacao) families. *Ajol.Info*, 13(29), 2956–2965. doi: 10.5897/AJB2014.13747
- Singh, A. K., & Sahu, C. (2018). Efficacy of Neem (Azadirachta indica A. Juss) and Bael (Aegle marmelos (L.) Correa) Leaf Extracts as Biofertilizers in Cultivation of Mung Plant (Vigna radiata (L.) Wilczek). *Nature Environment and Pollution Technology*, 17(2), 643–648. Retrieved from www.neptjournal.com
- Sonker, N., Pandey, A., Singh, P., & Tripathi, N. N. (2014). Assessment of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf Essential Oil as Herbal Preservatives Based on Antifungal, Antiaflatoxin, and Antiochratoxin Activities and In Vivo. *Journal of Food Science*, 79(4), M628–M634. doi: 10.1111/1750-3841.12390
- Stael, S., Wurzinger, B., Mair, A., Mehlmer, N., Vothknecht, U. C., & Teige, M. (2012). Plant organellar calcium signalling: an emerging field. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1525–1542. doi: 10.1093/JXB/ERR394
- Sultana, S., Khan, M., Ahmad, M., Bano, A. Zafar M., Shinwari, Z. K. (2011). Authentication of herbal medicine neem (Azadirachta indica A. Juss.) by using taxonomic and pharmacognostic techniques. *Pakistan journal of botany* 43, 141-150
- Swanson, J. D., Carlson, J. E., & Guiltinan, M. J. (2008). Comparative flower development in Theobroma cacao based on temporal morphological indicators. *International Journal of Plant Sciences*, 169(9), 1187–1199. doi: 10.1086/591986
- Tagne, A., Silvie, P., Martin, P., Abanda, R. N., Tindo, M., Fekam Boyom, F., Bokogo, C., Ntaffeu, E., & Chimi, L. (2018). Usages des plantes à effet pesticide au Cameroun. Poster communications–P47. *IBMA*. Retrieved from <https://agritrop.cirad.fr/589165>
- Tchameni, S. N., Sameza, M. L., O'donovan, A., Fokom, R., Mangaptche Ngonkeu, E. L., Wakam Nana, L., Etoa, F., & Nwaga, D. (2017). Antagonism of Trichoderma asperellum against Phytophthora megakarya and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tmyc*, 8(2), 84–92. doi: 10.1080/21501203.2017.1300199

- Tcheghebe, O., Seukep, A., & Tatong, F. (2017). Ethnomedicinal uses, phytochemical and pharmacological profiles, and toxicity of *Sida acuta* Burm. F.: a review article. *The Pharma Innovation*, 6(6), 1–6. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Armel-Jackson-Seukep/publication/320325056_Ethnomedicinal_uses_phytochemical_and_pharmacological_profiles_and_toxicity_of_Sida_acuta_Burm_f_A_review_article/links/59de13caa6fdccc2e0f4eeeb/Ethnomedicinal-uses-phytochemical-and-pharmacological-profiles-and-toxicity-of-Sida-acuta-Burm-f-A-review-article.pdf
- Tchoumboungang, F., Dogmo, P. M. J., Sameza, M. L., Mbanjo, E. G. N., Fotso, G. B. T., Zollo, P. H. A., & Menui, C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *BASE*. Retrieved from <http://popups.ulg.be/1780-4507/index.php?id=3547&lang=en>
- Ten Hoopen, G. M., & Krauss, U. (2016). Biological control of cacao diseases. *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*, 511–566. doi: 10.1007/978-3-319-24789-2_17
- Téné, T. M. P., Ewane, C. A., Onomo Effa, P., & Thaddée, B. (2017). Effects of chitosan and snail shell powder on cocoa (*Theobroma cacao* L.) growth and resistance against black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *African Journal of Plant Science*, 11(8), 331–340. doi: 10.5897/AJPS2016.1487
- Téné, T. P. M., Aristide, D., Denis, O. N., & Thaddée, B. (2019). Enhancement of *Theobroma cacao* Seedling Growth and Tolerance to *Phytophthora megakarya* by Heat-Treated Oyster Shell Powder. *American Journal of Plant Sciences*, 10(04), 578–594. doi: 10.4236/AJPS.2019.104042
- Thierry, R. (2004). *Infestation des coquilles d’huitres Crassostrea gigas par les polydores en Basse-Normandie: recommandations et mise au point d’un traitement pour reduire cette nuisance*. Dissertation doctorale, Université de Caen.
- Uchida, N. S., Silva-Filho, S. E., Aguiar, R. P., Wiirzler, L. A. M., Cardia, G. F. E., Cavalcante, H. A. O., Silva-Comar, F. M. D. S., Becker, T. C. A., Silva, E. L., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2017). Protective Effect of *Cymbopogon citratus* Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Liver Injury. *American Journal of Chinese Medicine*, 45(3), 515–532. doi: 10.1142/S0192415X17500318

- Van Kammen, A., & Brouwer, D. (1964). Increase of polyphenoloxidase activity by a local virus infection in uninoculated parts of leaves. *Virology*, 22(1), 9–14. doi: 10.1016/0042-6822(64)90042-X
- Vashist, H., & Jindal, A. (2012). *Antimicrobial Activities of Medicinal Plants -Review* . 3(1), 222–230. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Antimicrobial-Activities-of-Medicinal-Plants-Review-Vashist-Jindal/ad78493a99406fad37634ef38e0e0d7084c7da12>
- Venzon, L., Mariano, L., Somensi, L., Boeing, T., Souza, P., Wagner, T., de Andrade, S., Nesello, L., & da Silva, L. (2018). Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomed & Pharmacother*, 98, 118–124. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217348606>
- Verna, R. (2013). The history and science of chocolate. *The Malaysian Journal of Pathology*, 35(2), 111–121. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362474/>
- Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010). Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials*, 31(7), 1612–1618. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.024
- Whitlock, B. A., Bayer, C., & Baum, D. A. (2001). Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae (“Sterculiaceae” or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, *ndhF*. *Systematic Botany* 26(2): 420–437. - *Biota of NZ*. 26, 420–443. Retrieved from <https://biotanz.landcareresearch.co.nz/references/f825a55f-8090-430b-a117-a7edc6b9cbc0>
- Wright, C. W., Addae-Kyereme, J., Breen, A. G., Brown, J. E., Cox, M. F., Croft, S. L., Gökçek, Y., Kendrick, H., Phillips, R. M., & Pollet, P. L. (2001). Synthesis and evaluation of cryptolepine analogues for their potential as new antimalarial agents. *ACS Publications*. doi: 10.1021/jm010929
- Xing, R., Qin, Y., Guan, X., Liu, S., Yu, H., & Li, P. (2013). Comparison of antifungal activities of scallop shell, oyster shell and their pyrolyzed products. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(2), 83–90. doi: 10.1016/J.EJAR.2013.07.003
- Xing, T., Malik, K., Martin, T., & L. Miki, B. (2001). Activation of tomato PR and wound-related genes by a mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways. *Plant Molecular Biology* 2001 46:1, 46(1), 109–120. doi: 10.1023/A:1010633215445

- Xu, X., Chen, C., Fan, B., & Chen, Z. (2006). Physical and Functional Interactions between Pathogen-Induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 Transcription Factors. *The Plant Cell*, 18(5), 1310–1326. doi: 10.1105/TPC.105.037523
- Yarou, B. B., Silvie, P., Assogba Komlan, F., Mensah, A., Alabi, T., Verheggen, F., & Francis, F. (2017). Plantes pesticides et protection des cultures maraichères en Afrique de l'Ouest (synthèse bibliographique). *Orbi.Uliege.Be*, 21(4), 288–304. Retrieved from <https://orbi.uliege.be/handle/2268/215373>
- Zeng, Y., & Yang, T. (2002). RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 2002 20:4, 20(4), 417–417. doi: 10.1007/BF02772130
- Zhang, Y., Smith, P., Maximova, S. N., & Gultinan, M. J. (2015). Application of glycerol as a foliar spray activates the defence response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*. *Molecular Plant Pathology*, 16(1), 27–37. doi: 10.1111/MPP.12158/SUPPINFO
- Zinga, I., Longue, R., Komba, E., Tropicultura, C. B. (2016). Assessment of protein and chlorophyll contents in leaves of five local varieties of cassava infected by African mosaic virus in Central African Republic. *Tropicultura*, 34(1), 3–9. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20163134045>

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des solutions

Formulation à 25% (V/V) ; 100 mL : Mesurer 25 mL de formulation 100%, introduire dans 50 mL d'eau distillée et homogénéiser puis, compléter le volume avec 25 mL d'eau distillée.

Réactif de Bradford : Peser 50 mg de Bleu de Coomassie, dissoudre dans 25 ml d'éthanol 95 % et Agiter pendant 30 min puis, ajouter 50 ml d'acide orthophosphorique 85 % et incubé pendant 10 min. Compléter le volume de la solution à 500 ml avec l'eau distillée, puis filtré et conservé à 4 °C.

Solution PVP 25 mg/mL ; 50 mL : Peser 125 mg de PVP et dissoudre dans 50 mL d'eau distillée.

Solution de BSA (Bovin serum albumin) (1 mg/ml) : Peser 2 mg de poudre de BSA et dissoudre dans 2 ml d'eau distillée.

Solution formaldéhyde 8 mg/mL ; 150 mL : Peser 1200 mg de formaldéhyde et dissoudre dans 150 mL d'eau distillée.

Solution de Na₂CO₃ 20 % : Peser 4 g de poudre de Na₂CO₃ et dissoudre dans 20 ml d'eau distillée.

Solution d'acide gallique 0,1 mg/ml : Peser 1mg d'acide gallique et dissoudre dans 10 ml d'eau distillée.

Solution de méthanol 80 %, V= 100 ml : Prélever 80 ml de méthanol pur et ajouter 20 ml d'eau distillée.

Tampon Acétate C= 3M, pH = 4,5, V= 100 ml : Peser 24,6 g d'acétate de sodium et dissoudre dans 100 ml d'eau distillée ; ajuster le pH à 4,5 avec de l'acide acétique pur.

Tampon Tris-maléate C=0,1M ; pH=7,2 ; V=500ml : Peser 6 g de Tris base ; 6,7 g d'acide malique ; 277 mg de CaCl₂ et les dissoudre successivement dans 500 ml d'eau distillée.

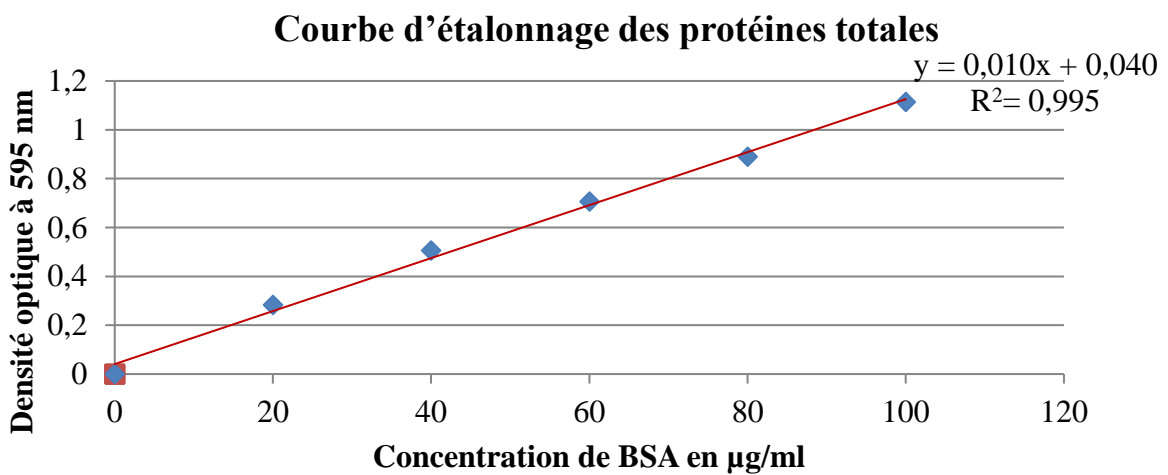
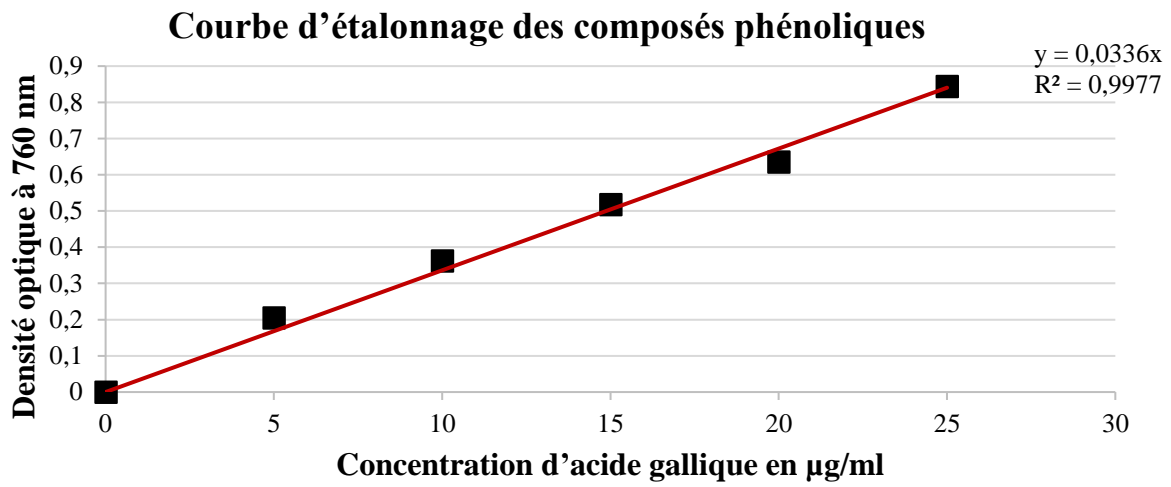
Tampon Tris-maléate C=0,1M ; pH=7,2 ; V=500ml ; 0,2% gaiacol: Peser 6 g de Tris base ; 6,7 g d'acide malique ; 277 mg de CaCl₂ ; 1g de gaiacol et les dissoudre successivement dans 500 ml d'eau distillée.

Annexe 2 : Préparation du milieu de culture

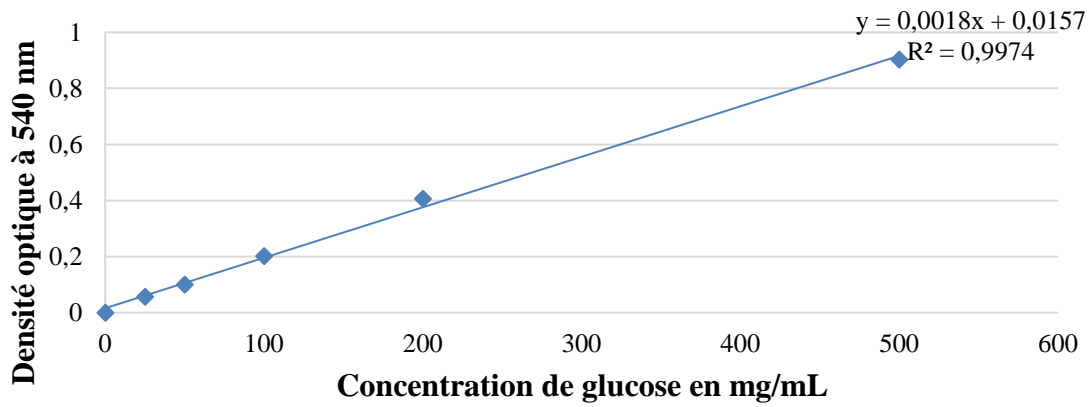
Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) : 400 mL de jus de pomme de terre (obtenu de 200 g de pomme de terre) ; 20 g Glucose ; 15 g d'Agar sont dissout dans 600 ml H₂O pH final 5,6 ± 0,2. Le mélange est cuit et autoclavé à 121°C, pendant 15 min.

Milieu PDB (Potatoes Dextrose Broth) : 400 mL de jus de pomme de terre (obtenu de 200 g de pomme de terre) et 20 g Glucose sont dissout dans 600 ml H₂O pH final 5,6 ± 0,2. Le mélange est autoclavé à 121°C, pendant 15 min.

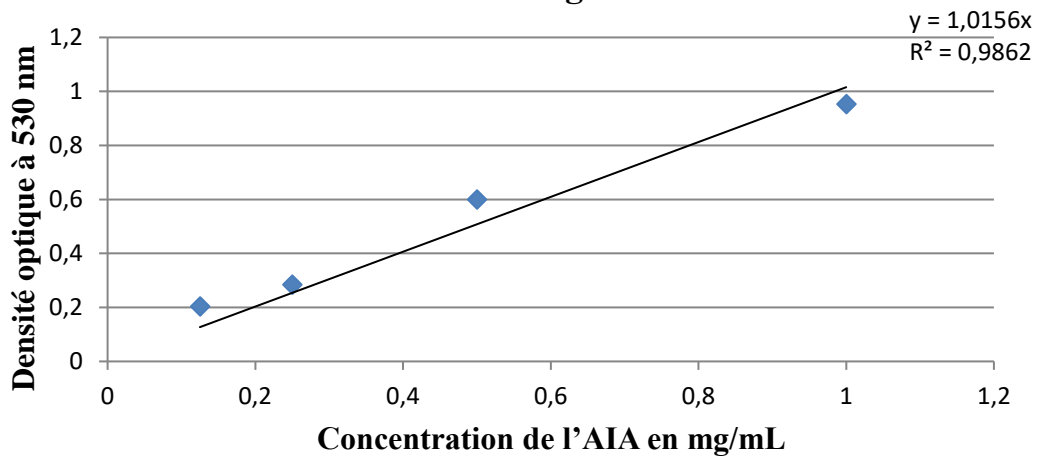
Annexe 3 : Courbes d'étalonnages



Courbe d'étalonnage du glucose



Courbe d'étalonnage de l'AIA



Annexe 4 : Traitement du sol

Prétraitement du sol

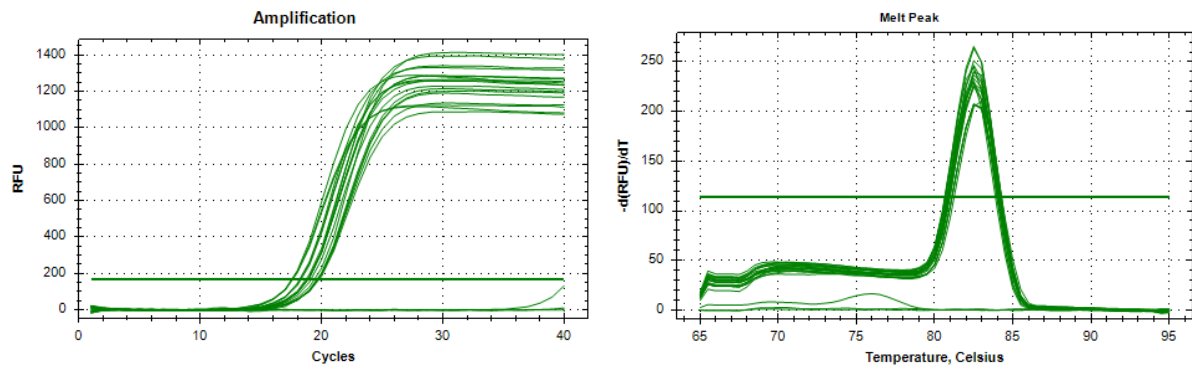
Séchage à température ambiante pendant 72 h; Tamisage afin d'éliminer les cailloux et les racines d'arbres

Stérilisation du sol

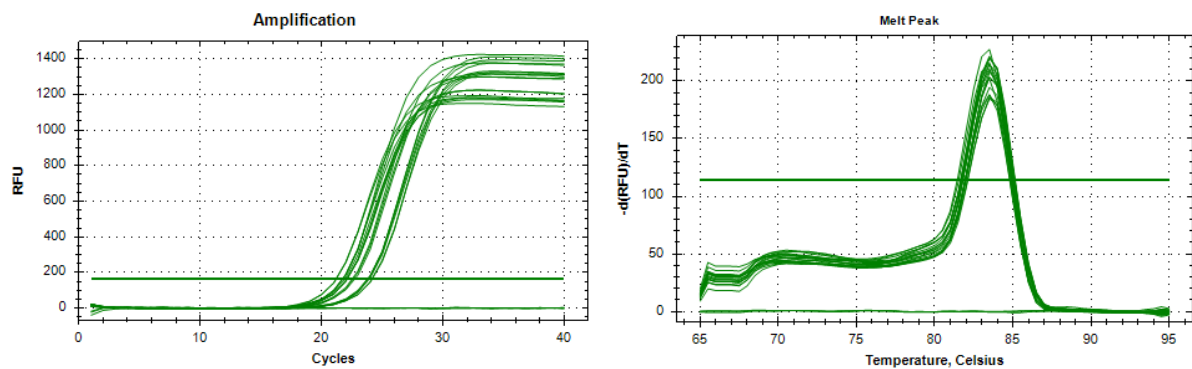
Le sol a été stérilisé à l'étuve à 121°pendant 4h à trois reprises

Annexe 5 : Courbes d'amplification et de fusion (*Melting curve*) des gènes par RT-qPCR

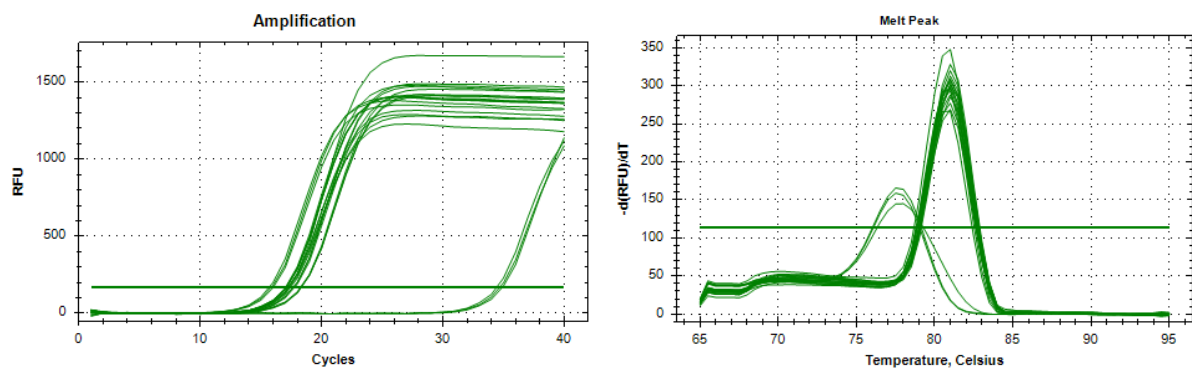
1. Courbes d'amplification et de fusion du gène endo-1,3-beta-glucosidase (PR2)



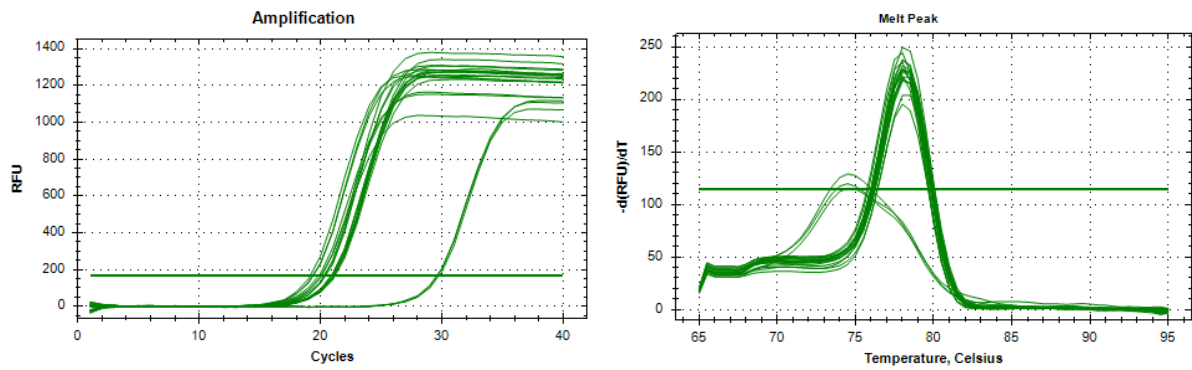
2. Courbes d'amplification et de fusion du gène pathogenesis-related protein 1-like (PR1)



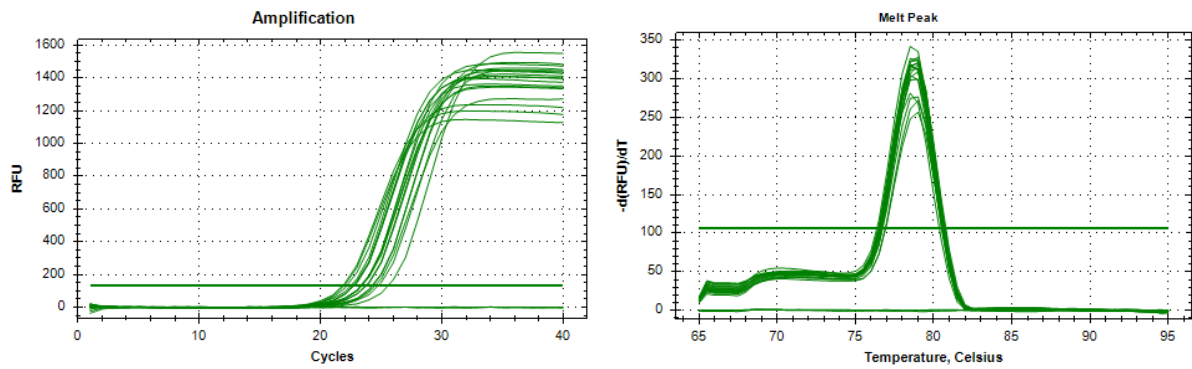
3. Courbes d'amplification et de fusion du gène pathogenesis-related protein 4 (PR4)



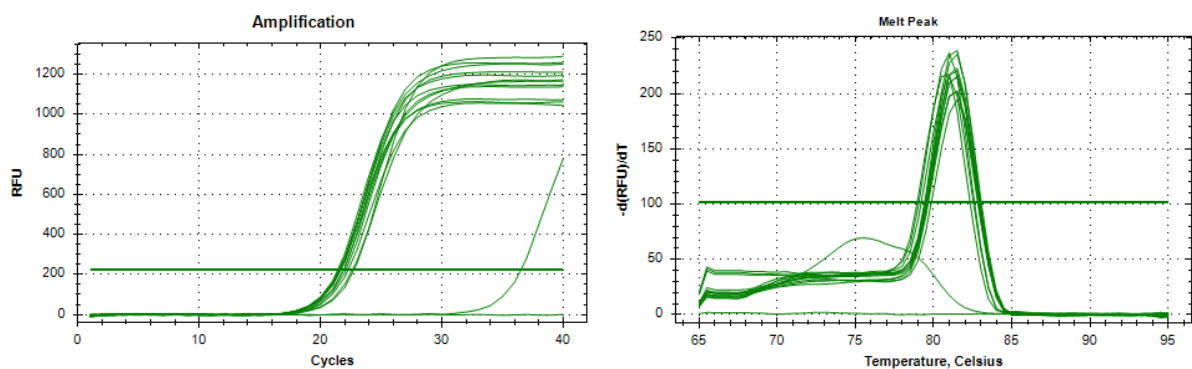
4. Courbes d'amplification et de fusion du gène endochitinase EP3 (PR8)



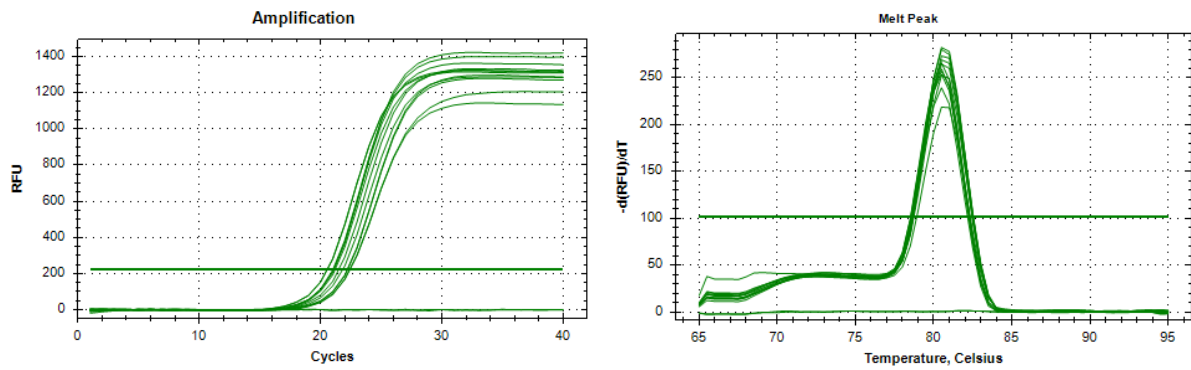
5. Courbes d'amplification et de fusion du gène Acylcarrier protein



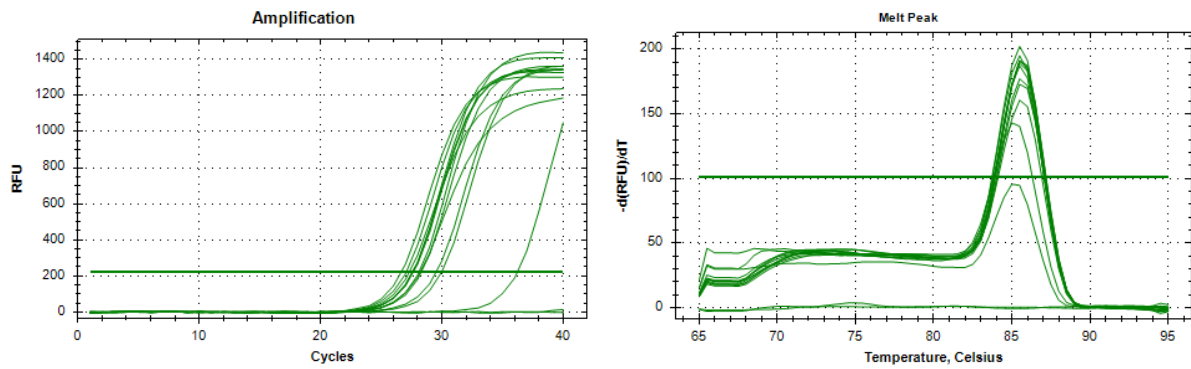
6. Courbes d'amplification et de fusion du gène Bax-inhibitor-1 (BI1)



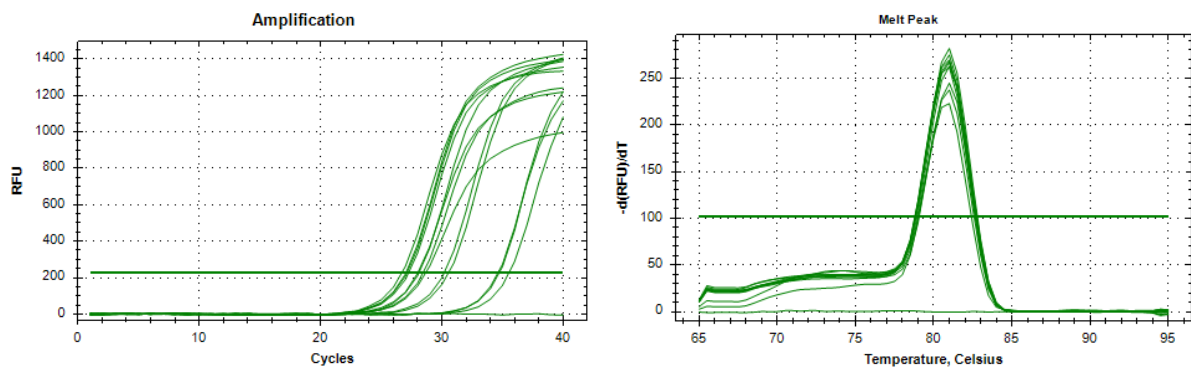
7. Courbes d'amplification et de fusion du gène allèle oxyde synthase 1 (TcAOS)



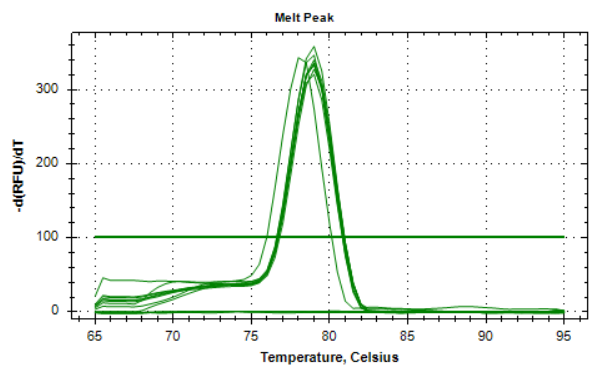
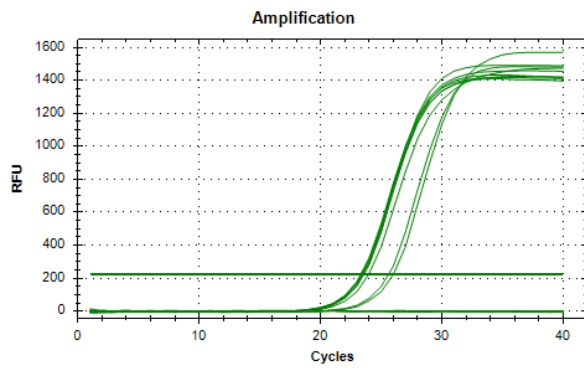
8. Courbes d'amplification et de fusion du gène allèle oxyde cyclase 4 (TcAOC4)




9. Courbes d'amplification et de fusion du facteur de transcription TcWRKY TF70 LOC18602206




10. Courbes d'amplification et de fusion du facteur de transcription TcWRKY TF70 LOC18587501




Annexe 6 : Etiquettes des biopesticides OBF ' et OBF



CONTACT: Tel:695566520 /
<https://biotechnologycenter-uy1.uninet.cm>





BP: 176731, etekak—Yaoundé





PHYTOGREEN_OBF'

Biopesticide de contact et systémique;


&


Biostimulant







Elimine les mériides, cochenilles, moustiques, mouches à scie, charançons ;

Inhibe la croissance des phytopathogenes oomycètes, champignons

PROPRIETES

Insecticide, fongicide et promoteur de croissance et stimulateurs de défense des plantes

INGREDIENTS

- Limonoides (Azadirachtine,, limonene)
- Alcaloides (Cryptolepine)
- Additifs (Eliciteurs calciques et Emulsifiants)

POSOLOGIE

Utiliser à 1%.pour tremper les graines 12h avant semis.

Pour les plantes en champs, effectuer une application foliaire.

Pour préparer un pulvérisateur (15 L) mélanger 150 mL et 8 L d'eau, homogénéiser puis compléter le volume.

NB: En cas de conservation à 4°C, acclimater à 25°C pendant 24 heures avant

PRECAUTIONS


Sensible à la lumière

Ne pas inhaler; en cas de consommation par inadvertance, consommer l'eau abondamment et voir un médecin


Après contact avec les yeux, laver abondamment et voir un médecin

CONSERVATION: A conserver à l'abri des enfants et de la lumière, à 4°C pour usage à long terme ou à 25°C pour usage à moyen terme


Conçu et développé au centre de biotechnologie (LPVRG) UY1 Distribué au Cameroun par BT-Seeds



CONTACTS: Tel:695566520 /
<https://biotechnologycenter-uy1.uninet.cm>





BP: 176731, etekak—Yaoundé




PHYTOGREEN_OBF

Biopesticide de contact et systémique;


&


Biostimulant






Elimine les mériides, cochenilles, moustiques, mouches à scie, charançons ;

Inhibe la croissance des phytopathogenes oomycètes, champignons

PROPRIETES

Insecticide, fongicide et promoteur de croissance et stimulateurs de défense des plantes

INGREDIENTS

- Limonoides (Azadirachtine,)
- Alcaloides (Cryptolepine)
- Additifs (Eliciteurs calciques et Emulsifiants)

POSOLOGIE

Utiliser à 1%.pour tremper les graines 12h avant semis.

Pour les plantes en champs, effectuer une application foliaire.

Pour préparer un pulvérisateur (15 L) mélanger 150 mL et 8 L d'eau, homogénéiser puis compléter le volume.

NB: En cas de conservation à 4°C, acclimater à 25°C pendant 24 heures avant d'homogénéiser et de diluer.

PRECAUTIONS

Sensible à la lumière

Ne pas inhaler; en cas de consommation par inadvertance, consommer l'eau abondamment et voir un médecin

Après contact avec les yeux, laver abondamment et voir un médecin

CONSERVATION: A conserver à l'abri des enfants et de la lumière, à 4°C pour usage à long terme ou à 25°C pour usage à moyen terme

Conçu et développé au centre de biotechnologie (LPVRG) UY1 Distribué au Cameroun par BT-Seeds

Annexe 7 : Liste des Publications issues de la thèse

Le présent travail a fait l'objet de présentation au cours de séminaires et conférences :

- **Foka TE**, Magni PTF, Dzelamonyuy A, Tene TPM, Sado KSL, Boudjeko T*. Biopesticide base on calcium, *Azadirachta indica* A. Juss and *Sida acuta* Burn. F.: Formulation and model building for an optimal use in plant production. 27th annual conference of CBS / The University Of Yaoundé 1; December 2nd – 4th, 2020.
- **FOKA T.E.**, MAGNI P.T.F., DZELAMONYUY A., FORNKWA Y.V., BOUDJEKO T. Effect of a Biopesticide base on calcium, *Azadirachta indica* A. Juss, *Sida acuta* Burm. F. and *Cymbopogon citratus* on cocoa (*Theobroma cacao*) seedling production. 27^{ème} conférence de la Société Camerounaise des Biosciences en 2021 ;
- **FOKA T. E.***, MAGNI P. T. F., DZELAMONYUY A., SADO K. S. L., BOUARAB K., BEAULIEU C., BOUDJEKO T. Effet d'une bioformulation sur l'agent causal de la pourriture brune *Phytophthora megakarya* chez le cacao. Concours Etudiant d'affiche scientifique du Centre SÈVE, 2021/ Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada ;
- **Foka Tatiekam Ebenezer**, Gonzalez-lamothe Maria Rocio², Lerat Sylvain, Beaulieu Carole, Boudjeko Thaddée, Bouarab Kamal. Effect of a bioformulated fungicide on *Theobroma cacao* L. defense against black pods disease cause by *Phytophthora megakarya*. 29^{ème} conférence de la Société Camerounaise des Biosciences en 2022 ;
- **Foka T.E.**, Magni P.T.F., Dzelamonyuy A., Tene T.P.M., Sado K.S.L., Gonzalez-Lamothe R.M., Beaulieu C., Bouarab K., Boudjeko T. Potential of a biopesticide formulation based on Calcium, Neem, Sida weeds and Citronella on *Theobroma cacao*. First Phytopathology conference, University of Yaoundé I, 29 to 30 July 2022.

Un article a été publié :

Foka T. E., Téné T. P. M., Magni P. T. F., Dzelamonyuy A., Sado K. S. L., Onomo P. E., Ewané C. A., Boudjeko T. (2023). Biofungicide Based Calcium, *Azadirachta indica* and *Sida acuta* Against *Phytophthora megakarya*. *Journal of Plant Sciences*. 11 (6), 171-181. doi: 10.11648/j.jps.20231106.11

Un article est en cours de soumission :

Effect of bioformulation based on oyster shell, neem, sida weeds and citronella extracts on the cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedling production and on the resistance against *Phytophthora megakarya*, an agent of cocoa black pods disease. Ebenezer FOKA TATATIEKAM, Paul Martial TENE TAYO, Tatiana Flore MAGNI PACHA, Pierre EFFA ONOMO, Cécile Annie EWANE, Thaddée BOUDJEKO.

Biofungicide Based Calcium, *Azadirachta indica* and *Sida acuta* Against *Phytophthora megakarya*

Ebenezer Tatiekam Foka^{1,2}, Paul Martial Téné Tayo^{1,*}, Tatiana Flore Magni Pacha^{1,2},
Aristide Dzelamonyuy^{1,3}, Sylvain Leroy Kamdem Sado⁴, Pierre Effa Onomo^{1,2},
Cécile Annie Ewané^{1,2,*}, Thaddée Boudjeko^{1,2}

¹Laboratory of Phytoprotection and Valorization of Genetic Resources, Biotechnology Centre-Nkolbisson, Yaounde, Cameroon

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

³Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Michigan, USA

⁴Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

Email address:

martialtene@gmail.com (Paul Martial Téné Tayo), ccilany.ewane@gmail.com (Cécile Annie Ewané)

*Corresponding author

To cite this article:

Ebenezer Tatiekam Foka, Paul Martial Téné Tayo, Tatiana Flore Magni Pacha, Aristide Dzelamonyuy, Sylvain Leroy Kamdem Sado, Pierre Effa Onomo, Cécile Annie Ewané, Thaddée Boudjeko. Biofungicide Based Calcium, *Azadirachta indica* and *Sida acuta* Against *Phytophthora megakarya*. *Journal of Plant Sciences*. Vol. 11, No. 6, 2023, pp. 171-181. doi: 10.11648/j.jps.20231106.11

Received: September 14, 2023; **Accepted:** October 4, 2023; **Published:** November 9, 2023

Abstract: Plant pesticides are a complementary means to other control methods and an alternative to chemical control. The identification of potential plants that can be used in plant protection against pests is increasing enormously, but the availability of bioformulations is low. The new products developed for plant protection aim to protect them against a larger range of pathogens and include elicitors. The objective of this study is to produce an optimal emulsion bioformulation based on neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), Sida (*Sida acuta* Burm. F.) and calcium, that can be used for plant protection against pests. The surface plot of the four factor simplex lattice designs data help to construct significant linear models for stability and activity. The best formulation was selected and optimized. The four Factor mixture designs and stability as well as activity models showed that the best formulation has neem oil (No) 12% (v/v), neem aqueous extract (Ne) 9% (w/v), sida weed hydroalcoholic extract (Se) 9% (w/v), Oyster shell's calcium-rich extract (Ca) 6% (w/v) and tween-80 (Tw) 24% (v/v) with the production process "AQ + (Tw+No)". Therefore, the optimize formulation has No 12% (v/v), Ne 9% (w/v), Se 9% (w/v), Ca 4.5%(w/v), calcium oxide (CaO 1.5% (w/v) and Tw 24% (v/v) with the production process "(Tw+No) + AQ". The best formulation and the optimize one at ambient temperature have 100% of stability and a significant dose dependent activity ($P < 0.05$) against plant pathogens. Apply optimize formulation at 1% on the detached cocoa leaves before inoculation with *Phytophthora megakarya* reduces disease severity index from 4.2 to 1.5. These results suggest that our models and bioformulation can be useful for *T. cocoa* protection against *P. megakarya*, the causal agent of black pod disease.

Keywords: *Theobroma cocoa* L., *Phytophthora megakarya*, Bioformulation of Fungicide, Neem, Sida Weed, Oyster Shell

1. Introduction

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is one of the main cash crops in tropical countries. Cocoa production in Cameroon contributes to the national Gross Domestic Product (GDP) by 1.2% and generates annual revenue of over €400 million, providing more than 400,000 jobs [1]. However, its cultivation is facing many problems among which parasitic attacks such as black pod disease caused by the soil borne

fungal pathogen *Phytophthora megakarya* [2]. The use of chemical fungicides is often necessary to counter this problem despite the fact that it creates many problems, including the emergence of resistant pathogens, soil biodegradation and human health. It is therefore necessary to explore environmentally safe and effective alternative methods of control. In recent decades, prospects for biological control of black pod disease have been regularly explored [3-5]. Improving the formulation of natural bioactive agents like

microorganisms and plants extracts was therefore an important next step towards optimization of this biological control strategy. A new dynamic is trying to combine biocontrol agents and "inert" materials in formulations for pest management [6].

Among the plants used by indigenous peoples and now included in formulation worldwide, neem and sida weed have a great place. Indeed, on the one hand, neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) is a valuable source of compounds, such as azadirachtin, which can be used for the development of drugs or biopesticides [7]. Neem oil amplifies pesticidal properties with its composition which contain sulfurous compound [7]. Many neem-based formulations exist but, the problem with these formulations is their instability under natural conditions [8]. In the other hand, *Sida acuta* Burm. F. (Malvaceae) is a small, erect, branched perennial herb or small shrub about 1.5 m tall [9]. It grows abundantly on cultivated fields, wastelands and roadsides in Cameroon, where it is called "sengh" in the West of the country and its common name is sida [10]. Many authors have demonstrated the antimicrobial activity of ethanolic, hot and cold-water extracts of *S. acuta* [11, 12]. Additionally, [13] study the antimicrobial potential of *Sida acuta* leaf extract nanoparticles.

The oyster shell is the waste product of the oyster and consists mainly of calcium carbonate and chitin [14]. In the previous work, we demonstrated that application of oyster shell powder stimulated the resistance of *T. cacao* in its interaction with *P. megakarya* [4]. This stimulation could be correlated to the component of oyster shell powder such as calcium. Calcium is a key nutrient for plant with significant functions including structural roles in the plant cell wall providing mechanical strength for normal transport and retention of other elements [15, 16]. When plants are exposed to a stressful situation, a rapid increase in cytosolic Ca^{2+} occurs, which is a key factor in the expression of stress-responsive genes and physiological responses of plant cells to stressful conditions as extreme temperatures, drought, salinity and pathogenic attack. Changes in cytosolic Ca^{2+} concentrations are often closely related to the severity of the stress [17].

This investigation was carried out to produce and optimize a bioformulation based on neem, *Sida acuta* and calcium-rich extracts of oyster shells, usable against *Phytophthora megakarya*. The stability of bioformulation was studied and the selected formulation was used in a simplex lattice design. Then, the stability and activity model were built from the data of the simplex-lattice experiment and the best formulation was selected and optimized by correcting its pH.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Neem kernels were obtained after shelling the dry neem seed, collected from urban and peri-urban zones of Maroua (Far North Region, Cameroon). Neem oil (No) was extracted by manual pressure on powder obtain after grinding the dry

kernels in electrical blender. Neem aqueous extract (Ne) was obtained according to the protocol of F. Lesueur [18].

The sida plants were collected from urban and peri-urban areas of Yaoundé (Centre Region, Cameroon). Extraction was done twice and its extract was obtained according to J. R. Kuate [19]. A hydroalcoholic solution (1 volume of water and 0.5 volume of ethanol 95%) and air-dried plants powder were used for extraction. 100 g of powder was put into a conical flask containing 600 ml of sterile distilled water and left to macerate for 24 h at room temperature. The resulting mixture was then filtered using a piece of cloth and Whatman N° 2 filter paper, then the filtrate was lyophilized and stored at room temperature.

The oyster shells from Mouanko (Littoral Region, Cameroon) were carefully washed in tap water and air-dried. Calcium-rich oyster shells extract was obtained according to [20] with modifications. Briefly, 2 kg of oyster shell were heated at 200°C for one hour to facilitate the grinding. They were then ground in a grinding machine (MS 20B grinding machine), and then sieved using a 0.8 mm sieve to obtain the finest powder that was heated in an oven at 1000°C for 1h. Ash obtains was dissolved in 25% HCl (v/v) in the proportion 1/15 (w/v). Soluble compounds were collected by filtration and the solvent evaporated in an oven at 115°C. The calcium-rich oyster shells extract (Ca) was store at room temperature.

Fusarium oxysporum, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora megakarya* isolates used in this study were obtained from the microorganism bank of the Laboratory of Phytprotection and Valorisation of Genetic Resources (LPVGR) of the Biotechnology Centre of the University of Yaoundé 1, Cameroon.

2.2. Process of Bioformulation of the Emulsion Product

The bioformulation process was done in two steps and followed by an optimization by correcting its pH.

In the first step, emulsification process of No was carried out using a quasi-experimental design which can be subdivided in three groups (Table 1). This design has in the first group three oil concentration 6%; 9% and 12% (v/v); and nine surfactant Tween 80 (Tw) concentration 0%; 1%; 3%; 6%; 9%; 12%; 18%; 21% and 24% (v/v) that were used with fixed amount of Ne 9% (w/v), Se 9% (w/v) and Ca 6% (w/v). Each aqueous soluble extract was dissolved in water then Tw and No were added and the whole was mixed using a vortex at 1000 rpm for one minute to form emulsion. The stability of the emulsions was observed for 48 h.

In the second group, the emulsion was made by changing the surfactant concentration while Se was absent. Fixed among No (12% v/v), Ne (18% w/v), and Ca (6% w/v) were used while Tw were used at 0%, 12% and 21% (v/v). In the third group of this quasi-experiment design, the emulsion was made using the surfactant concentration of 0%, 12% and 21% (v/v) while Ne was absent (0% w/v). The fixed among of No 12% (v/v), Ne 0% (w/v), Se 18% (w/v) and Ca 6% (w/v) were used. The emulsion (2 mL) was prepared and stored at 26 °C in a 5 mL test tube and the stability was determined by

observing the phase separation in 48 h. The stability scale was as follow: (1) 0% for oil flocculation, 25% for milky medium with oil flocculation; (2) 50% for milky medium with cream and oil flocculation, (3) 75% for milky medium with cream flocculation, and (4) 100% for milky medium without oil or cream separation.

Table 1. Quasi-experiment design data.

Essai codes	No v/v [%]	Tw v/v [%]	Ne w/v [%]	Se w/v [%]	Ca w/v [%]
1A	6	0	9	9	6
2A	6	1	9	9	6
3A	6	3	9	9	6
4A	6	6	9	9	6
5A	6	9	9	9	6
6A	6	12	9	9	6
7A	6	18	9	9	6
8A	6	21	9	9	6
9A	6	24	9	9	6
1B	9	0	9	9	6
2B	9	1	9	9	6
3B	9	3	9	9	6
4B	9	6	9	9	6
5B	9	9	9	9	6
6B	9	12	9	9	6
7B	9	18	9	9	6
8B	9	21	9	9	6
9B	9	24	9	9	6
1C	12	0	9	9	6
2C	12	1	9	9	6
3C	12	3	9	9	6
4C	12	6	9	9	6
5C	12	9	9	9	6
6C	12	12	9	9	6
7C	12	18	9	9	6
8C	12	21	9	9	6
9C	12	24	9	9	6
1X	12	0	18	0	6
6X	12	12	18	0	6
8X	12	21	18	0	6
1Y	12	0	0	18	6
6Y	12	12	0	18	6
8Y	12	21	0	18	6

No: Neem oil; Tw: Tween 80; Ne: Neem aqueous extract; Se: Sida weeds hydroalcoholic extract; Ca: Calcium extract.

The second formulation step was a 4-Factor mixture design (Simplex-Lattice design with two polynomial degree and reinforced with interior points and a centroid) selected based on data from the previous formulation stage. This 4-Factor mixture designs had 15 runs coded in Table 2 and the corresponding values of Tw, Ne, Se, No and Ca are shown in the Table 3. The

stability of these mixtures was recorded after 48 h. The design of the matrix was carried out with the STATISTICA 10 software. The inhibition of the growth of *Fusarium oxysporum* was determined for each run at 20% (v/v) by the dilution method using PDA medium. A disc of fungi was introduced inside of the Petri dish, sealed and kept at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ for 1 week. After that, the growth diameter was recorded, and the inhibition percentage was calculated using the formula below.

$$\%I = (Dc - De) * 100 / Dc$$

where Dc is the growth diameter of the negative control and De is the growth diameter of the medium with emulsion.

The biological activity of each emulsion was tested three time.

The modelling of stability and the biological activity of the second stage of formulation were carried out for the surface triangular representation of the data. Then, the linear, quadratic and special cubic model were analyzed for the stability model and the activity model as well as the best model was identified.

2.3. Evaluation of the Characteristics of the Best Bioformulated Emulsion Product

2.3.1. Evaluation of the Physico-Chemical Characteristics of the Best Bioformulated Emulsion Product

The pH and conductivity of the stable emulsion were checked using a pH meter. The Thermodynamic stability was evaluated on the one hand by centrifugation and on the other hand by temperature variation. The developed formulation was subjected to centrifugation at $1,000 \times g$ and $10,000 \times g$ for 30 minutes at 25°C . Then, formulation mixture was observed for any phase separation [21]. The effect of temperature on the formulations was studied at 45°C and -20°C . For the effect of temperature at 45°C on the formulation, it was evaluated by incubation in a water bath at 45°C for 6 h and at room temperature for 18 h while, the effect of a temperature of -20°C on the formulation was evaluated by exposing the emulsion to a cycle of -20°C for 24 h and at room temperature for 24 h. This cycle was repeated three times, then each formulation was observed for the separation of the oil and/or cream phases [21]. The diameter of droplet of the stable emulsion with high biological activity was measured in photos taken on Neubauer hemocytometer with an optical microscope at magnifications of 400 and 1000.

Table 2. Coded of 4 factor Simplex lattice design for the fourth phase emulsion preparation from mixtures of Ne, Se, Ca, No and Tw.

Elements of mixtures	Mixture codes and proportions (mL)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1C	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.625	0.125	0.125	0.125	0.25
8X	0	1	0	0	0.5	0	0	0.5	0.5	0	0.125	0.625	0.125	0.125	0.25
8Y	0	0	1	0	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0.125	0.125	0.625	0.125	0.25
9C	0	0	0	1	0	0	0.5	0	0.5	0.5	0.125	0.125	0.125	0.625	0.25

1C: content 9% Ne (m/V), 9% Se (m/V), 6% Ca (m/V), 12% No (V/V) and 0% Tw (V/V); 8X: content 9% Ne (m/V), 0% Se (m/V), 6% Ca (m/V), 12% No (V/V) and 21% Tw (V/V); 8Y: content 0% Ne (m/V), 9% Se (m/V), 6% Ca (m/V), 12% No (V/V) and 21% Tw (V/V); 9C: content 9% Ne (m/V), 9% Se (m/V), 6% Ca (m/V), 12% No (V/V) and 24% Tw (V/V); Ne: Neem aqueous extract; Se: Sida weeds hydroalcoholic extract; Ca: Calcium extract; No: Neem oil; Tw: Tween 80.

Table 3. Coded of the 4 factor Simplex lattice design and the corresponding amount of the extracts in the formulation Ne, Se, Ca, No and Tw.

Mixture codes and proportions of the extracts (%)																
Elements of the mixtures	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Tw (v/v)	0	21	21	24	10.5	10.5	12	21	22.5	22.5	8.25	18.75	18.75	20.25	16.5	
Ne (w/v)	9	18	0	9	13.5	4.5	9	9	13.5	4.5	9	13.5	13.5	13.5	9	
Se (w/v)	9	0	18	9	4.5	13.5	9	9	4.5	13.5	9	13.5	13.5	13.5	9	
No (v/v)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Ca (w/v)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

Tw: Tween 80; Ne: Neem aqueous extract; Se: Sida weeds hydroalcoholic extract; No: Neem oil; Ca: Calcium extract.

2.3.2. Evaluation of the Biological Activity of the Best Bioformulated Emulsion Product

The growth inhibitions of the best emulsion were obtained against fungi (*Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* and *Phytophthora megakarya*) by dilution method described previously using PDA medium incorporated with the best formulation at 20% and 10%; and against bacteria (*Ralstonia solanacearum*) using micro-plaque dilution to determine MIC. These assays were performed four times.

2.4. Evaluation of the Characteristics of the Best Bioformulated Emulsion Product After pH Correction

2.4.1. Production of the Best Bioformulated Emulsion Product with Corrected pH

The correction of pH has been carried out considering the pH of the best formulation. To this end, a calcium oxide (CaO) was included in the process to produce the best formulation by replacing 0%, 15%, 16.67%, 25% or 33.33% (w/w) extract of calcium by CaO. Using the same process of the first and the second formulation step, the correction of pH induces the coalescence of emulsion. Then, the effect of formulation process on the coalescence was studied by comparing the three methodologies described below.

- 1) Every aqueous soluble extract was dissolved in water (aqueous phase or Aq) and Tween 80 (Tw) plus Neem oil (No) were added and vortexed for 1.5 to 2 minutes to form an emulsion. This abbreviated method "Aq+(Tw+No)" corresponds to the process used during the two formulation steps.
- 2) Aqueous phase (Aq) and Tween 80 (Tw) were added and vortexed for 0.75 to 1 min, then No was added and vortexed for 1.5 to 2 minutes to form emulsion. This method is the "(Aq+Tw) +No" process.
- 3) Tween 80 (Tw) plus No were vortexed for 0.75 to 1 min and each aqueous soluble extract dissolved in water was added and vortexed for 1.5 to 2 minutes to form an emulsion. This method is the "(Tw+No) +Aq" process.

The best process was used to prepare the formulation at the optimize pH, by a high-energy method which consist of mixing for 10 min to have emulsion with a chosen percentage

of CaO.

2.4.2. Evaluation of the Characteristics of the Corrected best Bioformulated Emulsion Product

As the best formulation, the droplet size, pH, conductivity, thermodynamic stability and biological activity of the optimize formulation were evaluated. In addition, MIC₅₀ of the optimized formulation and the effect to the integrity of cell wall of *P. megakarya* were determined according to the protocol described by S. Limsuwan [22]. The effect of the optimize emulsion (1%), was evaluated on cocoa black pod disease (*Theobroma cacao* L., SCA12 × SNK413 variety) caused by *P. megakarya*, using detached leaf protocol describe by [23]. The experiment was performed two more times and the disease severity index was determined. Disease expression was assessed six days after inoculation, using the rating scale developed by [24, 25].

Data analysis

The results were expressed as means ± standard deviation and subjected to Analysis of Variance (ANOVA) and significant differences were established using the Tukey's test with *P* value less than 0.05. STATISTICA 10 software was used to develop the validity of stability and activity models.

3. Results

3.1. Bioformulation of the Emulsion Product

In the first step of bioformulation, the first group of the quasi-experiment model that had different concentrations of No and Tw had the maximum stability (100% stability) of the emulsion in the bioformulation having 6% No when 18% minimum of Tw was used (Figure 1). For the bioformulations with 9% and 12% of No, it is 21% and 24% of Tw which contribute to having the 100% of stability (Figure 1). Minimal stability (25% stability) was recorded in the surfactant-free bioformulation (Figure 1). By using 12% of No, the minimum stability is observed for the 1C emulsion and the maximum stability for the 9C emulsion. Both 1C and 9C emulsions were used in the simplex-Lattice design.

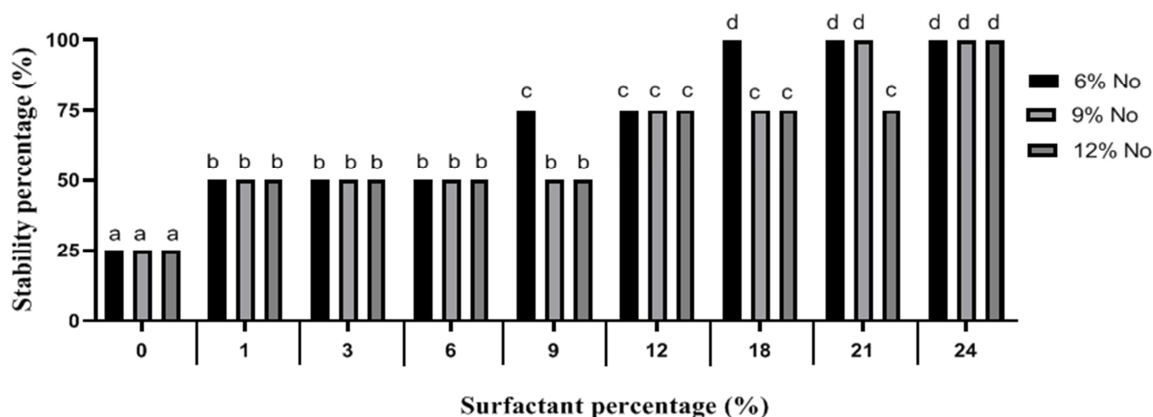


Figure 1. Stability of the emulsion in runs having Ne 9%, Se 9% and Ca 6% using the quasi-experiment design. No: Neem oil; Ne: Neem aqueous extract; Se: Sida hydroalcoholic extract; Ca: calcium extract. The means with different letters are different and significant at the 5% probability level.

For the second group of this quasi-experiment where Se was absent and only Tw had a different concentration, we recorded 75% stability for the 8X trial which contains 12% of neem oil and 21% of surfactant after 48 h (Figure 2A). For the third group in this experiment where Ne was absent and only

Tw had different concentration, the same percentage stability was recorded for the 8Y trial which contains 12% neem oil and 21% Tw after 48 h (Figure 2B). 8X and 8Y emulsions were also used in the simplex-Lattice design.

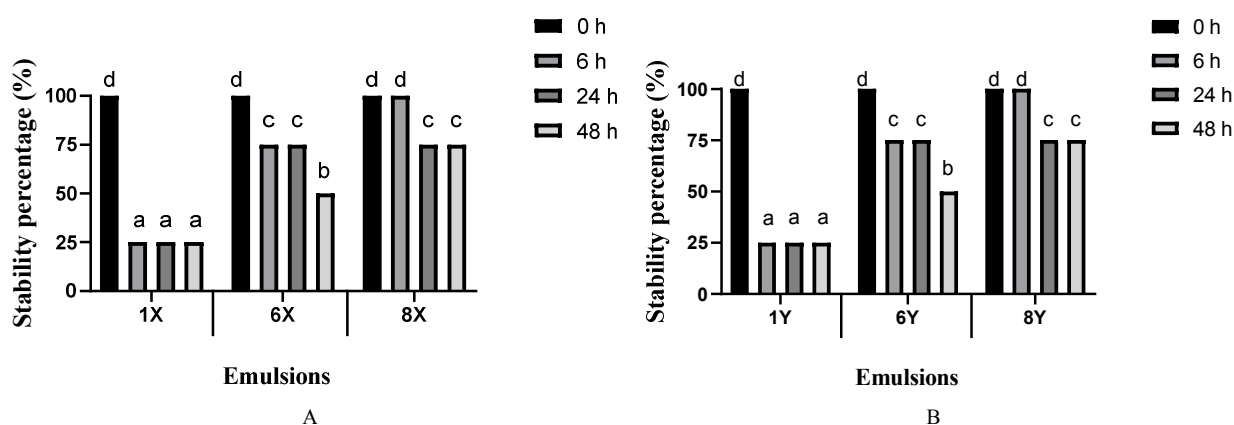


Figure 2. Stability of the emulsion using the quasi-experiment design. (A) Runs having Ne 9%, Se 0% and Ca 6% (runs 1X, 6X and 8X who respectively have 0%, 12% and 21% of NO). (B) Runs having Ne 0%, Se 9% and Ca 6% (runs 1Y, 6Y and 8Y who respectively have 0%, 12% and 21% of NO). No: Neem oil; Ne: Neem aqueous extract; Se: Sida hydroalcoholic extract; Ca: calcium extract. The means with different letters are different and significant at the 5% probability level.

In the second step of bioformulation, regarding the stability of the fifteen mixtures (Figure 3A) and their model obtained from the 4 factors simplex-lattice design, the linear model was statistically significant with $P=0.000033$ while quadratic and special cubic models were not significant with $P=0.712667$ and $P=0.719258$ respectively (Table 4). This linear model has confirmed the strong beneficial effect of the 9C emulsion on the stability model (Figure 4A). The stability equation obtained is presented below.

$$\%Stability = 20.119*1C + 77.262*8X + 77.262*8Y + 98.690*9C \quad (1)$$

where 1C, 8X, 8Y and 9C are the independent variables used for the construction of the Simplex-Lattice matrix.

Regarding the inhibition of the fifteen mixtures on

Fusarium oxysporum (Figure 3B) and the activity model obtained from the 4 factors simplex-lattice design, the linear model had also shown the statistically significance with $P=0.006820$ while quadratic and special cubic model had $P=0.494183$ and $P=0.554996$ respectively (Table 4). This linear model showed that the 9C emulsion was the one with high beneficial effect on the activity model (Figure 4B). The best equation for % inhibition against *Fusarium oxysporum* was:

$$\%Inhibition_{Fusarium\ oxysporum} = 39.096*1C + 10.749*8X + 46.155*8Y + 50.301*9C \quad (2)$$

where 1C, 8X, 8Y and 9C are the independent variables used for the construction of the Simplex-Lattice matrix and only the 8X coefficient is not significant.

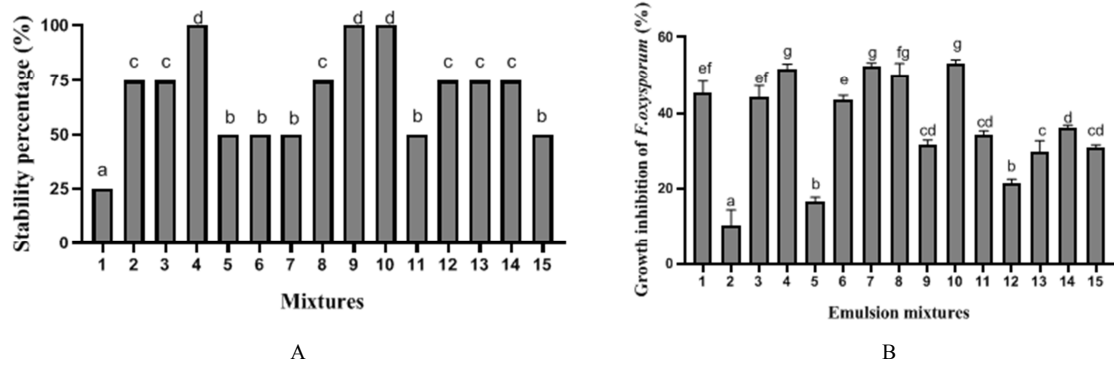


Figure 3. Stability and activity against *Fusarium oxysporum* of the second stage of formulation using the simplex-lattice design. (A) Stability. (B) Activity. The means with different letters are different and significant at the 5% probability level.

Table 4. Stability model and bioactivity model of the Simplex lattice coded design for the fourth phase emulsion.

Parameters of the stability models						
Model nature	F	P	R2	AdjR2	MS effect	MS error
Linear	25.01704	0.000033	0.872169	0.837306	1986.607	79.4102
Quadratic	0.62007	0.712667	0.926706	0.794777	62.112	100.1684
Special cubic	0.64406	0.719258	0.979505	0.713076	90.199	140.0463
Parameters of the linear stability model						
Factor	1C	8X	8Y	9C		
Coeff.	20.11905	77.26190	77.26190	98.69048		
P	0.008332	0.000001	0.000001	0.000001		
Cnf. Limt	[6.32; 33.92]	[63.46; 91.06]	[63.46; 91.06]	[84.89; 112.49]		
Parameters of the bioactivity models: Fusarium oxysporum inhibition						
Model nature	F	P	R2	AdjR2	MS effect	MS error
Linear	6.959656	0.006820	0.654945	0.560839	556.2183	79.92038
Quadratic	1.037508	0.494183	0.846301	0.569644	81.2556	78.31808
Special cubic	1.395939	0.554996	0.976655	0.673168	83.0280	59.47826
Parameters of the linear bioactivity model: Fusarium oxysporum inhibition						
Factor	1C	8X	8Y	9C		
Coeff.	39.09617	10.74883	46.15500	50.30065		
P	0.000066	0.115563	0.000015	0.000007		
Cnf. Limt	[25.25; 52.94]	[-3.1; 24.6]	[32.31; 60.00]	[36.45; 64.15]		

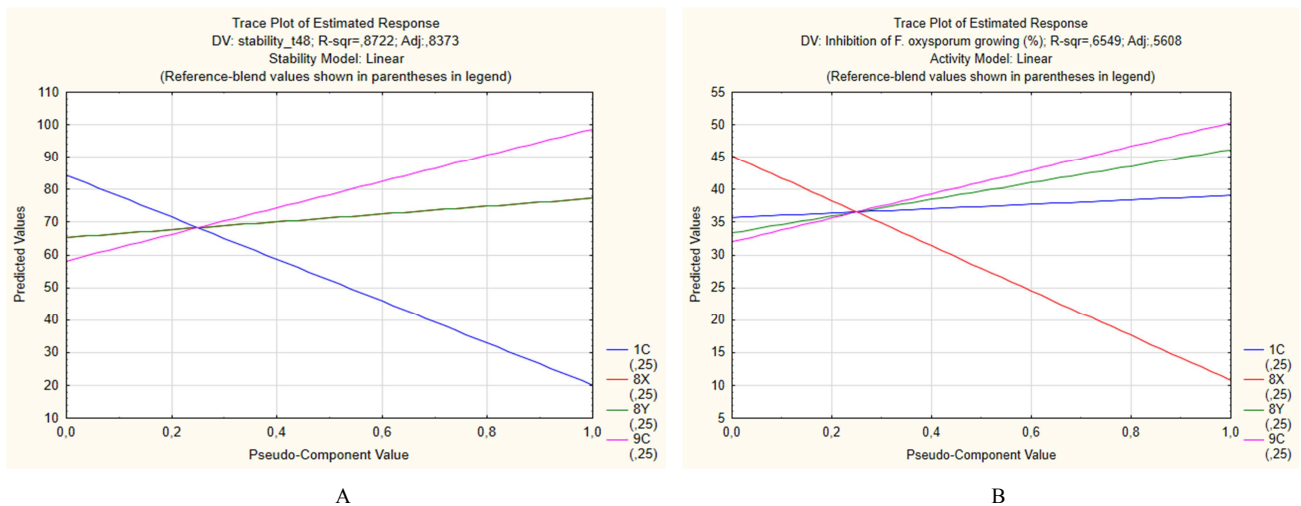


Figure 4. Trace plot of estimated significant linear model response of the 4 factors of the simplex-lattice design use in the stage two formulation. 1C, 8X, 8Y and 9C are the independent factors. (A) Stability of the linear model. (B) Activity (growth inhibition of *Fusarium oxysporum*) linear model.

3.2. Characterization of the Best Bioformulated Emulsion Product

The best formulation was the 9C emulsion which is composed of water-soluble compounds (Ne 9%, Se 9%, Ca

6%), 12% (v/v) No and 24% Tw. This best formulation was very acidic despite surfactant concentration (Table 5). A pH of 2.84 and a conductivity 269 mV were recorded for the best formulation (Table 5). Table 5 also shows that centrifugation of the best bioformulation at 1000 ×g and 10000 ×g at 25°C

for 30 minutes decreases the stability by precipitating some compounds and changing the stable emulsion to one with precipitate and cream flocculation. At 45 °C, the best bioformulation is characterized by no precipitation but cream flocculation and oil (Table 5). The microscope image of the

best bioformulation reveals the spherical shape of the emulsion, and also confirms the micro size of droplets (Figure 5). The maximum droplet size of the best recorded bioformulation was 9.72 μm (Table 5).

Table 5. Characterization of the best emulsion formulation and the optimize formulation.

Formulation	Shape	droplet size [μm]	PH	Conductivity [mV]	Centrifugation at 1000 $\times\text{g}$ and 10,000 $\times\text{g}$	thermal stability at 45°C	thermal stability at -20°C
Best	Spherical	≤ 9.72	2.84 (0.12)	269.00 (18.00)	Precipitation and cream flocculation	Cream and oil flocculation	Precipitation and cream flocculation
Optimize	Invisible on the photonic microscope	Undetermined	5.45 (0.18)	81.24 (10.24)	Precipitation and no flocculation	Homogeneous	Homogeneous

The values in the parenthesis are standard deviations.

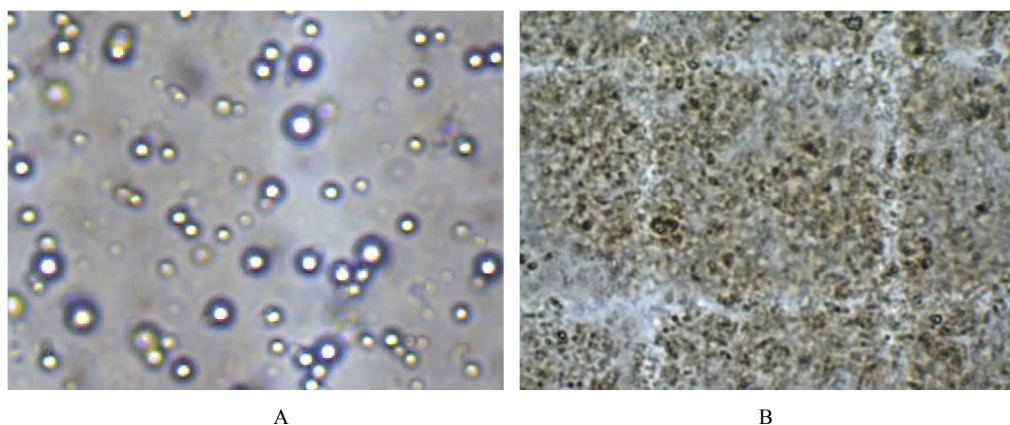


Figure 5. Microscopic Pictures of the best emulsions and the optimize emulsions at 1000 x magnification. (A) Best formulation. (B) Optimize formulation.

The growth inhibition of the fungi *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* and *Phytophthora megakarya* by the best bioformulation at 20% and 10% showed a dose-dependent activity (Table 6). These

two formulations significantly decrease the growth from 7.90% to 55.25% when used at 20% (Table 6). In addition, the MIC of the best bioformulation against *Ralstonia solanacearum* was 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Table 6).

Table 6. Biological activity of the best emulsion formulation and the optimize formulation.

	Concentration		Growth inhibition (%)			
	$\mu\text{L}/\text{mL}$	mg/mL	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Phytophthora megakarya</i>
Best emulsion	200		46.64 (4.77) cd	55.25 (1.27) c	48.6 (1.84) c	39.2 (3.97) b
	100		23.16 (0.65) d	7.90 (3.05) e	24.36 (7.07) e	20.69 (2.91) c
Optimize emulsion	200		72.48 (8.4) b	83.46 (1.28) b	87.8 (0.64) b	100 (0.00) a
	100		48.03 (1.23) c	35.03 (1.58) d	37.4 (1.25) d	100 (0.00) a
Negative Control	/	/	0.00 (0.00) e	0.00 (0.00) f	0.00 (0.00) f	0.00 (0.00) d
Positive control	/	0.0033	100.00 (0.00) a	100.00 (0.00) a	100.00 (0.00) a	100.00 (0.00) a

The values in the parenthesis are standard deviations and the means in each column with different letters are different and significant at the 5% probability level.

3.3. Characteristics of the Best Bioformulated Emulsion Product After pH Correction

By changing part of Ca to CaO, the pH also increases from 2.84 to 8.57 and the conductivity decreases from 269 mV to -107.8 mV (Figure 6). The use of pH adjusters at different concentrations with the Aq+(Tw+No) and (Aq+Tw)+No methods destabilizes the emulsion by a

mechanism coalescence (characterized by the particles which become block at the interface and adopt a solid behavior) while (No+Tw)+Aq maintains stability. Then, the optimize formulation is composed of water-soluble compounds (Ne 9%, Se 9% Ca 4.5% and CaO 1.5% in w/v), 12% (v/v) No with 24% (v/v) Tw and the formulation method (No+Tw)+Aq.

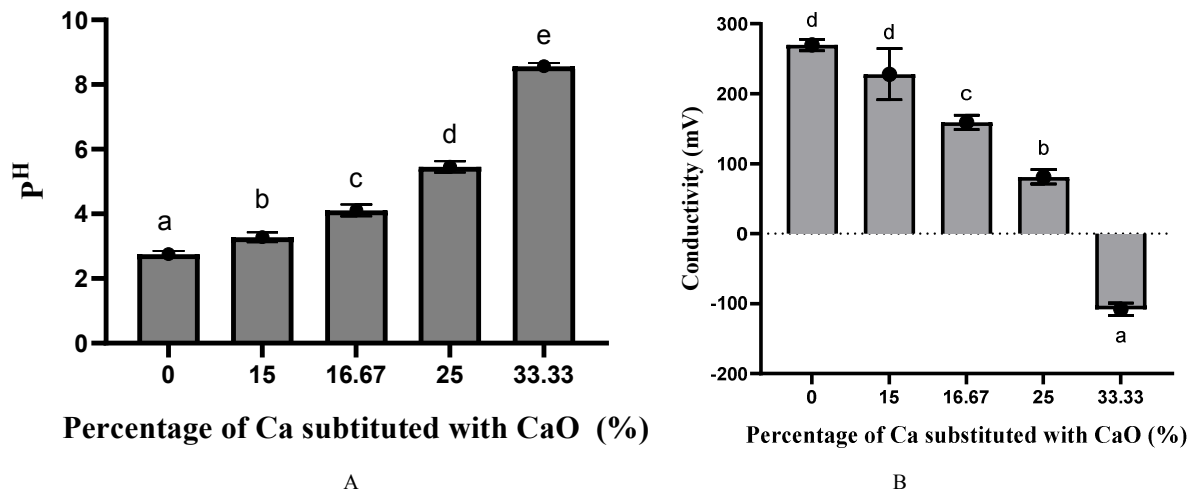


Figure 6. Effect of Calcium oxide on pH and Conductivity. (A) Effect of CaO on the pH. (B) Effect of CaO on the conductivity. The means with different letters are different and significant at the 5% probability level.

The pH 5.45 and the conductivity 81.24 mV were recorded from the optimized bioformulation (Table 5). Table 5 also show that, centrifugation of the optimized bioformulation at 1000 ×g and 10,000 ×g at 25°C for 30 minutes decrease the stability by precipitating some compounds without cream flocculation. At 45°C thermal stability was observed for the optimized bioformulation without precipitation or flocculation (Table 5). The microscope image of the optimized bioformulation revealed that the droplets were imperceptible at 1000 magnificant (Figure 5B).

The inhibition of the growth of the fungi *Fusarium oxysporum*, *Pythium myriotylum*, *Phytophthora infestans* and *Phytophthora megakarya* by the optimized bioformulation at 20% and 10% showed a dose-dependent activity (Table 6). It

significantly decreases growth from 72.48% to 100% when used at 20% (Table 6). The MIC of the formulation optimized against *Ralstonia solanacearum* was 9.6 µL/mL.

The optimized 1% bioformulation significantly reduced the growth of *Phytophthora megakarya* by 51.31% and reduced the formation of pathogenic cell wall by approximately 69% when used at 1% (MIC₅₀) and 2% (2MIC₅₀) after 24 h (Figure 7A and 7B) *in vitro*. In addition, the disease severity index obtained with detached leaf protocol inoculated with *Phytophthora megakarya* is significantly reduced ($P < 0.05$) from very susceptible to resistant with the disease severity index 4.2, 1 and 1.5 for negative control, positive control and optimize bioformulation respectively (Figure 7C).

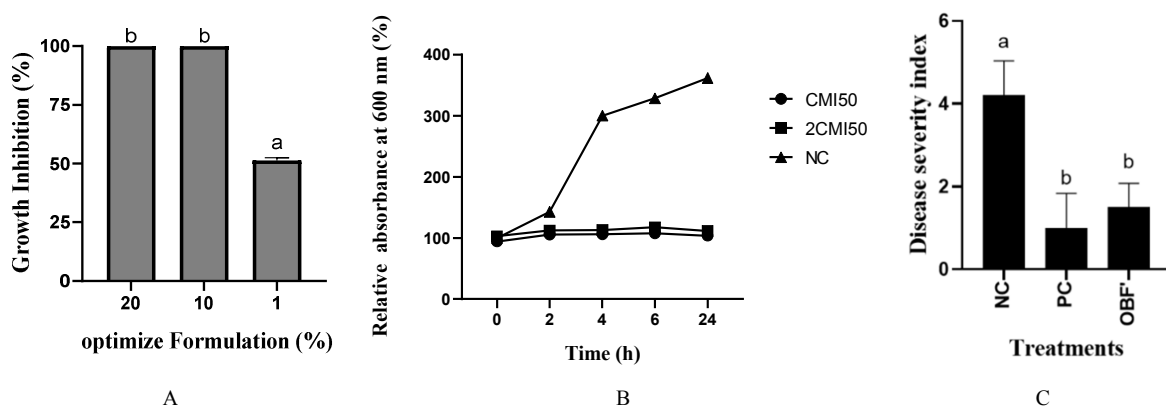


Figure 7. Effect of the optimize bioformulation on *Phytophthora megakarya* integrity and cocoa black pods disease severity. (A) Inhibition of the growing after a week. (B) Effect on the cell wall integrity. (C) Effect of treatments on cocoa black pods disease severity. The means with different letters are different and significant at the 5% probability level. NC: negative control, PC: positive control, OBF Optimized bioformulation.

4. Discussion

Biopesticides are ecofriendly pesticides obtained from natural substances. They are more widely used in agriculture and health programs; and can be beneficial for the environment [26]. Research on biological control of cacao

black pod disease in cacao production is sparse or in its infancy [27]. There is a steady increase in information on the influencing factors and mechanisms that underlie the biological control of cacao diseases as well as practical aspects such as production, formulation and application of inoculum. Intensive research on plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) or organic substances is carried out

worldwide to develop biofertilizers and biocontrol agents like actinobacteria *Streptomyces cameroonensis* or oyster shell powder amendment for cocoa protection against *P. megakarya* [4, 17]. Further work on production, formulation is also needed for biocontrol to become economically attractive. There is a growing interest in formulations based on natural bioactive agents like plant extracts as they often break down quickly [28]. A new dynamic is trying to combine elicitors in formulations for agricultural purposes, as shown in [6].

This study presents the production of an optimized emulsion bioformulation based on No, Ne, Se, Ca and Tw that can be used for plant protection. The quasi-experimental design and the simplex-lattice showed that, increasing surfactant also increase stability while Ne and Se have the same effect on stability. By increasing Neem oil in a formulation with a fixed amount of surfactant, stability was decreased and activity was enhanced [29, 30]. In the present study, the stability of the emulsion can be justified by Tw, but also by the presence of saponins, polysaccharides and/or proteins in the Se extracts [31].

The biological activity of emulsions containing or not containing Se against *Fusarium oxysporum* shows that Ne and Se have an additive effect. This could be due to the nature of the compounds that constitute them and their properties. In fact, the presence of tannin, saponin, flavonoid, steroid, terpenoids, cardiac glycosides, cryptolepin and quindoline has been reported in *Sida acuta* extract, which may justify its activities [11, 31]. Neem extract has shown many bioactive properties such as antifungal [7, 32].

Correcting the pH from 2.84 to 5.45 increased the thermodynamic stability of the optimized formulations and their bioactivity. By mixing No and Tw and after adding the aqueous phase and mixing again using a high-energy (vortex 10 min), favored nano-emulsion characterized by fine droplet sizes which are not visible under microscope with 1000 x magnification. The stability of the optimized formulation corroborates those of [29] who managed to optimize Neem oil nano emulsion formulation with Tween 20 in distilled water by the high-energy method (30 to 45 min of sonication) and obtain smallest droplet size of 67.85 nm. These results also corroborate those of [33] who reported the *in vitro* effect of silicate hydroxide and calcium oxide at 1000 ppm on isolates of *F. oxysporum*, *A. alternata*, *A. niger*, *P. digitatum*, *R. stolonifer* and *P. italicum*. A possible mechanism of action could be associated with effects on virulence factors notably the enzyme protease.

The optimized emulsion showed a significant dose-dependent activity ($P < 0.05$) against *Phytophthora megakarya* with an inhibition of 51.31 % when the emulsions were used at 1% *in vitro* and a reduction in the severity index of disease from 4.2 to 1.5 when applied to cocoa leaves. The effect of the optimized emulsion on the severity of the infection may come from the inhibitory effect of the formulation on the pathogen and/or from the ability of calcium to increase plant defence. These results corroborate those obtained by [23, 34] who showed that pre-treatment of cocoa with calcium elicitors and snail shell powder (rich in calcium

and chitins) respectively, reduced the severity index of the disease caused by *P. megakarya*.

5. Conclusion

The 4 Factor mixture designs, stability and activity models showed that the best formulation contains No 12% (v/v), Ne 9% (w/v), Se 9% (w/v), Ca 6% (w/v) and Tw 24% (v/v) with the “AQ + (Tw+No)” production process. Therefore, the optimized formulation contains No 12% (v/v), Ne 9% (w/v), Se 9% (w/v), Ca 4.5% (w/v), CaO 1.5% (w/v) and Tw 24% (v/v) with the “(Tw+No) + AQ” production process. The best formulation and the one optimized at room temperature have 100% stability and a significant dose-dependent activity ($P < 0.05$) against plant pathogens. We have 20.69% and 100% inhibition against *Phytophthora megakarya* with the best emulsion and the one optimized respectively at 10%. When the optimized formulation is applied at 1% on the detached cocoa leaves before inoculation with *Phytophthora megakarya*, it reduces the disease severity index from 4.2 to 1.5. These results suggest that our models and bioformulation could be useful for protection of cocoa against *P. megakarya*, the causal agent of Black Pod Disease.

Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Biotechnology Centre of the University of Yaoundé 1 for allowing laboratory facility to conduct this study. The authors are also grateful to Victorine Yaya FORNKWA and Romaric Armel MOUAFUO TCHINDA for their writing assistance and proof-reading assistance.

References

- [1] G. Lescuyer, L. Boutinot, P. Goglio et al., “Analyse de la chaîne de valeur du cacao au Cameroun,” Rapport pour l'Union Européenne, DG DEVCO. Value Chain Analysis for Development Project (VCA4D CTR 2016/375-804),” p. 127, 2020.
- [2] M. Ndoumbe-Nkeng, C. Cilas, E. Nyemb et al., “Impact of Removing Diseased Pods on Cacao Black Pod Caused by *Phytophthora megakarya* and on Cacao Production in Cameroon,” *Journal of Crop Protection*. vol. 23, pp. 415–424, 2004.
- [3] J. B. Mbarga, G. M. T. Hoopen, J. Kuate et al., “*Trichoderma Asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum* causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon,” *Crop Protection*, vol. 36, pp. 18–22, 2012.
- [4] P. M. Tene-Tayo, A. Dzelamonyuy, D. Omokolo Ndoumou et al., “Enhancement of *Theobroma cacao* seedling growth and tolerance to *Phytophthora megakarya* by heat-treated oyster shell powder,” *American Journal of Plant Sciences*, vol. 10, pp. 578-594, 2019.

- [5] A. Dzelamonyuy, P. M. Tene-Tayo, E. R. Ngotcho et al., "Development of a powder formulation of *Streptomyces cameroonensis* and evaluation of its biocontrol and growth promoting activities against *Phytophthora megakarya* (causal agent of black pod disease) for two cocoa hybrids from Cameroon," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 32 no. 2, pp. 160-169, 2022.
- [6] Guomin Yang, Yanling Yao & Na Li. (2022). Knowledge, Attitudes and Practices (KAP) Related to the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Village in Southern China: A Cross-sectional Survey. *World Journal of Public Health* (1). doi: 10.11648/J.WJPH.20220701.14 A. Jamiolkowska, "Natural Compounds as elicitors of plant resistance against diseases and new biocontrol strategies," *Agronomy*, vol. 10, no. 2, p 173, 2020.
- [7] K. Biswas, I. Chattopadhyay, R. K. Banerjee et al., "Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*)," *Current science*, vol. 82, no. 11, pp 1336-1345, 2002.
- [8] C. Wanren and L. Hua, "A brief review of the extraction technologies of azadirachtin, a plant-derived bio-pesticide," *African Journal of Engineering Research*, vol. 6, no. 1, pp. 15-8, 2018.
- [9] S. Mohideen, E. Sasikala and V. Gopal, "Pharmacognostic studies on *Sida acuta* Burm. f.," *Ancient science of life*, vol. 22, no. 1, pp. 57-66, 2002.
- [10] O. T. Tcheghebe, A. J. Seukep and F. N. Tatong, "Ethnomedicinal uses, phytochemical and pharmacological profiles, and toxicity of *Sida acuta* Burm. f.," *The Pharma Innovation Journal*. vol. 6, no. 6, pp 01-06, 2017.
- [11] D. Karou, A. Savadogo, A. Canini et al. "Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*," *African Journal of biotechnology*. vol. 4, no. 12, pp. 1452-7, 2005.
- [12] I. R. Iroha, E. S. Amadi, A. C. Nwuzo et al., "Evaluation of the antimicrobial activity of extracts of *S. acuta* against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients," *Research Journal of Pharmacology*. Vol. 3, no. 2, pp. 22-25, 2009.
- [13] C. Nisha, P. Bhawana and M. H. Fulekar, "Antimicrobial Potential of Green Synthesized Silver nanoparticles using *Sida acuta* leaf extract," *Nano Science and Nano Technology*. Vol. 11, no. 1, pp. 111-119, 2017.
- [14] B. Maia, S. Arcaro, M. Souza et al., "Characterization of sand casting and oyster shells as potential sources of raw material to produce soda-lime glasses," *Chemical Engineering and Transformation Journal*, vol. 43, pp. 1795-1800, 2015.
- [15] N. Prabhakar and S. R. N. P. Jayashankar, "Relevance of Calcium Nutrition in Present Day Agriculture technology refinement for biochar production and evaluation of its effect on soil health and crop productivity view project waste management view project," *Advances in Life Sciences*, vol. 5, pp. 2526-2530, 2016.
- [16] A. S. Djabou-Mouafi, Y. Qin, T. Boudjeko et al. "Effects of calcium and magnesium fertilization on antioxidant 2 activities during cassava postharvest physiological deterioration," *Crop Science*, vol. 58, pp. 1-8, 2018.
- [17] S. E. Ranf, P. Lennart, J. Pascal et al., "Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns," *Plant Journal*, vol. 68, pp. 100-113., 2011.
- [18] F. Lesueur, "Élaboration de formulations à base d'extraits de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) pour la protection de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) contre le *Myzus persicae*, un puceron colonisateur et vecteur de virus circulants et non circulants," p 139. 2006.
- [19] J. R. Kuate, K. M. L. Brigitte, R. K. Jules et al., "Screening of Some Plants Used in the Cameroonian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases," *International Journal of Biology*, vol. 3, no. 4, pp. 13-21.
- [20] M. Gaonkar and A. C. Innovative, "Application of eggshell as fertilizer and calcium supplement tablet," *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, vol. 5, no. 3, pp. 3520-5, 2016.
- [21] J. Nelson, T. E. Y. S. Johnson, P. S. Vichangal et al., "Formulation of sweet flag oil (*Acorus calamus*) nanoemulsion by spontaneous emulsification method for the management of *Sitophilus oryzae*," *International Journal of Chemical Studies*, vol. 7, no. 3, pp. 2072-6, 2019.
- [22] S. Limsuwan and S. P. Voravuthikunchai, "Bactericidal, Bacteriolytic, and Antibacterial Virulence Activities of *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schltr Extract against *Streptococcus pyogenes*," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 6, pp. 1023-8, 2013.
- [23] Y. Zhang, P. Smith, S. N. Maximova et al., "Application of glycerol as a foliar spray activates the defense response and enhances disease resistance of *Theobroma cacao*," *Molecular Plant Pathology*, vol. 16, no. 1, pp. 27-37, 2015.
- [24] S. Nyassé, C. Cilas, C. Herail et al., "Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora black* pod disease," *Crop Protection*, vol. 14, no. 8, pp; 657-63, 1995.
- [25] D. Paulin, M. Ducamp and P. Lachenaud, "New sources of resistance to *Phytophthora megakarya* identified in wild cocoa tree populations of French Guiana," *Crop Protection*, vol. 27, no. 7, pp. 1143-7. 2008.
- [26] D. Srijita, "Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control," *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 4, no. 6, pp. 250-65, 2015.
- [27] G. M. Ten Hoopen and U. Krauss, "Biological Control of Cocoa Disease," Springer, Cham, pp 511-566. 2016.
- [28] R. S. Ghotbi, M. Khatibzadeh and S. Kordbacheh, "Preparation of Neem Seed Oil Nanoemulsion," In: *Proceedings of the 5 th International Conference on Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, Pp 11-13, 2014.
- [29] M. Bhattacharya and S. Dixit, "Emulsification of Neem oil: effect of polar solvents and chain length of surfactant," *International Journal of chemical and pharmaceutical sciences*. vol. 3, no. 12, pp. 2175-9, 2015.
- [30] K. R. S. Namasivayam, F. Lazar, H. Sanjana et al. "Effect of polymer-based surface coating on droplet size and potential pharmacological properties of neem oil," *IOAB Journal*, vol. 8, pp. 1-6, 2017.
- [31] P. Nwankpa, O. Chukwuemeka, G. Uloneme et al. "Phyto-nutrient composition and antioxidative potential of ethanolic leaf extract of *Sida acuta* in wistar albino rats," *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, no. 49, pp. 3264-9, 2015.

- [32] J. Pohe and T. Agneroh, "L'huile des graines de neem, un fongicide alternatif à l'oxyde de cuivre dans la lutte contre la pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire," *Journal of Applied Biosciences*, vol. 62, pp. 4644–4652, 2013.
- [33] A. Khaled and R. Mohamed, "Effet de composés calciques inorganiques sur le développement *in vitro* de moisissures isolées d'agrumes après la récolte," *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, vol. 85, pp. 263–75, 2016.
- [34] P. M. Téné-Tayo, C. A. Ewane, P. O. Effa et al., "Effects of chitosan and snail shell powder on cocoa (*Theobroma cacao* L.) growth and resistance against black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*," *African journal of Plant Science*, vol. 11, no. 8, pp. 331-340, 2017.