

SERIE : C
N° d'Ordre : 194
N° de Série : 20

THESE

Présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES I

U.E.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR
Spécialité Sciences Agronomiques

par

Paco SEREME

Contribution à la lutte contre *Colletotrichum capsici*
(SYD) Butler & Bisby sur niébé, *Vigna unguiculata*
(L.) Walp., par l'amélioration des connaissances sur
les relations hôte-parasite

Soutenu le 27 JUIN 1985 devant la Commission d'Examen

MM. J. CITHAREL

Président

M. LE NORMAND

B. JOUAN

Examineurs

A ma mère,

E R R A T A

<u>Pages</u>	<u>Lire</u>	<u>Au lieu</u>
Sommaire	Deuxième partie :	
	Chapitre I - Utilisation du Peltar dans la lutte contre la maladie des taches brunes du niébé	Utilisation du Peltar dans la lutte contre la maladie brunes du niébé
2	on peut citer le cas	on peut citer la cas
14	capable d'activer	capable dactiver
17	nous retiendrons	nous reteindrons
18	Elles nous ont été	Elle nous ont été
31	121/135 et 116/135	121/145 et 116/135
38	ALLEN <i>et al.</i> 1981	ALLEN <i>et al.</i> 1982
40	variabilité morphologique	variabilité morphologiqu
55	nouvelles protéines	nouvelles prtoéines
68	nous avons cherché	nous avons chercher

Bibliographie

Ajouter

BIHARI L., 1977. - The influence of phosphorus sources on the growth and the sporulation of three isolates of *Colletotrichum capsici* (SYD.) Butler et Bisby. *Proc. of the National Acad. of Sci.*, 47 (B) 111, 169-171.

UNIVERSITE de RENNES I

U.E.R. Sciences et Philosophie

DOYENS HONORAIRES

M. MILON Y.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

PROFESSEURS HONORAIRES

M. FREYMANN R.	M. LE MOAL H.
M. ROHMER R.	M. PELTIER D.
M. MILON Y.	Mlle DURAND S.
M. SALMON-LEGAGNEUR F.	M. LE BOT J.
M. VALLET P.	M. MARTIN Y.
M. PHILIPPOT A.	M. RAZET P.
M. VENE J.	M. MAILLET P.
Mlle CHARPENTIER M.	M. ALLEGRET P.
M. VACHER M.	Mlle GOAS M.
M. VILLERET S.	Mlle GOAS G.
M. VIGNERON L.	

MAITRES de CONFERENCES HONORAIRES

Mlle HAMON M. R.

/...

MATHEMATIQUES et INFORMATIQUE

Professeurs

Mme ANDRE Fr. M. LEGOUPIL J.
M. BERTHELOT P. M. LENFANT J.
M. CAMUS J. M. LERMAN I
M. CONZE J. P. M. MARIE R.
M. COSTE M. M. METIVIER G.
M. CROUZEIX M. M. MIGNOT A.
M. FERRAND D. M. RAYNAL M.
M. GERVAIS M. M. SEGUIN J. (IUT L.)
M. GIORGIUTTI I. M. TOUGERON J. C.
M. GUERINDON J. M. TOURNEMINE G.
M. GUIVARC'H Y. M. TRILLING L.
M. HOUDEBINE J. M. VERJUS J. P.
M. KOTT L. M. WOLF J. (IUT L.)

Docteurs d'Etat

Mme ALLAIN M.F.
M. CIAVALDINI J. F.
Mme COSTE-ROY M. F.
M. DIVAY M. (IUT L.)
M. GRAS R.
M. HENNION H.
M. LE PAGE E.
M. MAHE L.
M. MEMIN J.
M. MERRIEN J.
M. NOURRIGAT J. F.
M. PERRIN Gérard
Mme TOUGERON M.

PHYSIQUE

Professeurs

M. ARQUES P.Y. M. LE FLOCH A.
M. BARON A. (IUT R.) M. LE MEN J.F. (IUT L.)
M. BENIERE F. M. LEROUX E.
M. BERTEL L. (IUT L.) M. LE TRAON A.
M. BOULET Ch. M. LEVASSEUR M. (IUT R.)
M. BRUN P. M. MALHERBE J.C. (IUT L.)
M. COLIN Y. (IUT R.) M. MEINNEL J.
M. CORAZZA M. (IUT L.) M. MEVEL J.Y.
M. DANIEL J.P. M. NUSIMOVICI M.
M. DECAMPS E.A. M. RIAUX E. (IUT R.)
M. DUBOST G. M. ROBIN S.
M. FOUCHE F. (IUT R.) Mme ROBIN S.
M. FUCHS J.J. née SALOMOND
M. GROSVARD (IUT R.) M. STEPHAN G.
M. GUIDINI J. M. TERRET Cl.
M. HAEUSLER Cl. M. THOMAS G.
M. DURAND A. M. VEZZOSI G.

Docteurs d'Etat

M. ANDRIAMIRADO C. — M. LAMBERT B. (IUT L.)
M. BALCOU Y. M. LANGOUET L.
M. BAUDOUR J. M. LARVOR M.
M. BERNARD D. M. LECLEAC'H (IUT L.)
M. BERTAULT M. M. LE COMTE A.
M. BESNIER G. M. LE DOUCEN R.
M. BIDEAU D. M. LENORMAND J.M.
M. BOULIOU A. M. MESSENGER J.C.
M. CAILLEAU H. M. PILET J.C.
M. CHAGNEAU (IUT R) M. POEY P.
M. CHARBONNEAU M. PRIOL M.
M. CHASSAY G. M. QUEFFELEC J.L.
M. COATRIEUX J.L. M. RABACHE P. (IUT L.)
M. DAUDE A. M. REBOURS B. (IUT L.)
M. DEFRANCE A. M. RILLET Y. (IUT L.)
M. ECOLIVET Cl. M. SAILLARD J.
M. GIRARD A. M. SEIGNAC A.
M. GOMET J.Cl. M. TANGUY P.
M. GOULPEAU L. M. T'KINT de ROODENBEKE
M. HAGENE B. (IUT R.)
Mlle HAGENE M. Mme T'KINT de ROODENBEKE M.
M. HOUDEAU J.P. (IUT R.)
M. JEZEQUEL G. M. TROADEC J.P. (IUT R.)
M. JOUBERT P (IUT L) M. TONNARD F (IUT R)

/...

CHIMIE

Professeurs

M. BARIOU B.(IUT R.) M. LE CORRE M.
M. BRAULT A.(IUT R.) M. LE GUYADER M.(IUT R)
M. CARRIE R. M. LEVAS E.
M. DABARD R. M. LISSILOUR R.
M. DIXNEUF P. M. LUCAS J.
M. FOUCAUD A. M. MARTIN G.(ENSCR)
M. GRANDJEAN D. M. MAUNAYE M.(ENSCR)
M. GUERILLOT Cl. M. PATIN H.(ENSCR)
M. HAMELIN Jack M. SOYER N.(IUT R.)
M. LANG J. M. TALLEC A.
M. LAURENT Y.

Docteurs d'Etat

M. AUFFREDIC J.P M. LAPLANCHE A.(ENSCR)
Mme BARS O. M. LEBORGNE G.
née BEAULIEU M. LE COQ A.
M. BOTREL A. M. LE FLOCH Y. (ENSCR)
Mme DANION R. Mme UTJES M. née LE GALL
née BOUGOT Mme RIVET P.
Mme LE ROUZIC A. née LE GUELLEC
née BELLEVRE Mlle LEPLOUZENNEC M.
(ENSCR) M. MARTELLI J.
Mme TEXIER Fr. M. MEYER A.
née BOULLET M. MOINET Cl.
M. BROCHU R. M. MORVAN J.(ENSCR)
M. CAILLET P. M. PERSON H.
M. CAREL Cl. Mme de COURVILLE
M. CARO B.(IUT L.) née PICHEVIN A.
Mme POMMERET M.F. M. PICOUAYS B.
née CHASLE(IUT R)M. PLUSQUELLEC D.(ENSCR)
M. CORRE F. M. POCHAT F.
M. DANION D. M. POULAIN M.
M. DARCHEN A. M. PRIGENT Y.(IUT R.)
M. DORANGE G(ENSCR)M. RAOUL E.
M. FAYAT Ch. M. RAPHALEN D.(ENSCR)
M. GADREAU Cl. M. RAULET Cl.
M. GAUDE J. M. ROBERT A.
Mme LOUER M. Mme CARLIER J.
née GAUDIN née ROLLAND (IUT R.)
M. GUERIN R. M. SAILLARD J.Y.
M. GUILLEVIC J. M. SARRAZIN J.
M. HAZARD R. Mme TEXIER Fr.
Mme PAPILLON née M. VENIEN F.(ENSCR)
JEGOU D (IUT R.) M. VERDIER P.
M. JOUCLA M.
M. JUBAULT M.

GEOLOGIE

Professeurs

M. BONHOMMET N. M. HAMEURT J.M.
M. CHAUVEL J.J. M. JAHN B.M.
M. CHOUKROUNE P. M. LARDEUX H.
M. COGNE J. M. WILLAIME Ch.

Docteurs d'Etat

M. AUVRAY B. M. LE CORRE Cl.
Mme ESTEOULE M. LEFORT J.P.
née CHOUX J. M. MORZADEC P.
M. HENRY J.L. Mme OLLIVIER M.F.
Mme MORZADEC née PIERRE
née KERFOURN M.T. M. MARTIN H.

/...

Professeurs

Docteurs d'Etat

BIOLOGIE CELLULAIRE et GENETIQUE

M. FOLLIOT R.
M. GOURANTON J.
M. JEGO P.
M. JOLY J.M.

M. LE PENNEC J.P.
M. PHILIPPE M.
M. WROBLEWSKI H.

M. BERNARD J.
M. BOISSEAU Cl.
M. COILLOT J.P.
M. GOURRET J.P.
M. GUILLET J.Cl.
M. HAMON Cl.

BIOLOGIE des ORGANISMES

Professeurs

Docteurs d'Etat

M. CITHAREL J.
M. CLAUSTRES G.
M. DAGUZAN J.
M. GAUTIER J.Y.
M. HUON A.
M. LARHER Fr.
Mme LEMOINE C.
M. LE RUDULIER D.
M. NENON J.P.
M. TOUFFET J.
M. TREHEN P.

M. BARBIER R.
M. BERNARD Th.
M. BERTRU G.
M. BRIENS M.
M. CANARD A.
M. CHAUVIN G.
M. DENIS Ch.
M. GLOAGUEN J.Cl.
M. GUYOMAR'CH J.Ch.
Mme HUBERT M.
 née GUERGADY
M. LE GARFF B.
M. MICHEL R.
M. SAVOURE B.

PHILOSOPHIE

Professeurs

Docteurs d'Etat

M. JACQUES Fr.
M. ORTIGUES E.
M. VETO M.

M. CLAIR A.

/...

PERSONNEL C.N.R.S.

Directeurs de Recherche

Maîtres de Recherche

Chargés de recherche

MATHEMATIQUES

M. CREPEL P.
M. HARDY J.

INFORMATIQUE

M. DARONDEAU

CHIMIE

M. SERGENT M.
M. SIMONET J.

M. CHEVREL R.
M. COEURET (ENSCR)
M. DENIS J.M.
M. GREE R.

M. BATAIL P.
M. DEMERSEMAN B.
Mme BAUDY M.
née FLOC'H
M. FONTENEAU G.
M. GUYADER J.
M. HAMON J.R.
M. LAPINTE Cl.
M. LE BOZEC H.
M. LOUER D.
M. MARCHAND R.

M. MARTIGNY P.
M. MATECKI M.
M. MOREL G.
M. NOEL H.
M. PADIOU J.
M. PENNA
M. PERRIN A.
M. POTEL M.
M. SIMONNEAUX G.
M. VAULTIER M.

PHYSIQUE

M. DANG TRAN Q.
M. SANQUER M.

GEOLOGIE

M. CAPDEVILLA R.
M. COBBOLD P.

M. BERNARD-GRIFFS J.
M. PARIS Fl.
M. PEUCAT J.J.
M. ROBARDET M.

BIOLOGIE CELLULAIRE et GENETIQUE

Mlle GARNIER D.

BIOLOGIE des ORGANISMES

Mme GAUTIER A.
M. GAUTIER J.P.

Mme CLOAREC A.
M. DELEPORTE P.
Mme DELEPORTE S.
M. DELETTRE Y.
M. DEPUTTE B.
Mlle RIVault C.
Mlle EYBERT M. C.
M. VANCASSEL M.
M. VIDAL J.M.

ANTHROPOLOGIE

M. GIOT P.R.

M. BRIARD J.

M. MONNIER J. L.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de la Chaire de Botanique et pathologie Végétale de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance à Monsieur LE NORMAND, Maître de Conférences, Directeur de la Chaire de Botanique et Pathologie de l'ENSAR pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire et dirigé ce travail. Il n'a ménagé aucun effort pour me faire bénéficier de ses qualités indéniables et de son expérience de phytopathologiste par les critiques et suggestions qu'il m'a prodiguées tout au long de ce travail. De plus, je ne saurais oublier toute l'aide qu'il m'a apporté lors de la rédaction et pour la résolution des problèmes administratifs que j'ai rencontrés lors de la préparation de cette thèse.

Ma reconnaissance va aussi à Monsieur CITHAREL, Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université de Rennes I qui a bien voulu accepter de présider le Jury qui va juger cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur JOUAN, Directeur de la Station de Pathologie Végétale du Centre (IN.R.A.) de Recherches Agronomiques pour avoir accepté de participer au Jury qui va juger ma thèse.

Je remercie également tous mes collègues de l'Institut Burkinabé de recherches Agronomiques et Zootechniques qui, à des titres divers ont apporté leur concours à la réalisation de cette thèse. Je suis particulièrement heureux de trouver ici l'occasion de remercier Monsieur IBRANKO pour m'avoir fourni les souches de *Colletotrichum*, Monsieur DRABO et Madame DABIRE pour avoir mené mes essais au champ.

Mes remerciements vont enfin à :

- Viviane VILBOUX et Jean-Claude MARIE pour la dactylographie et la reproduction de ce document.

- Mon épouse Djénèba dont la présence à mes côtés durant ce séjour en France a été un grand réconfort moral.

- Tous les stagiaires du Laboratoire et mes compatriotes à Rennes.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - LE NIEBE ET SA CULTURE	4
A.1. - Généralités sur la culture du niébé	4
a) Importance de la culture au Burkina Faso	4
b) Caractères botaniques et systématique de la plante	5
c) Caractères écologiques	5
d) Technique de culture du niébé	5
e) Utilisations principales	6
f) Ennemis de la plante	6
A.2. - La maladie des taches brunes du niébé	6
a) Historique	6
b) Systématique et description du pathogène	7
c) Symptômes de la maladie des taches brunes	8
d) Transmission de la maladie et moyens de lutte	9
B - IMPORTANCE DES PROTEINES PR DANS LES INTERACTIONS HOTE-PATHOGENES	9
B.1. - Mise en évidence de protéines nouvelles ...	10
B.2. - Nomenclature des protéines nouvelles	11
B.3. - Rôle des protéines PR	11
B.4. - Synthèse des protéines PR	13
B.5. - Caractéristiques biochimiques et sérologiques des protéines PR	14
C - UTILISATION DE L'IMMUNOLOGIE EN PATHOLOGIE VEGETALE	14
C.1. - Réaction immunitaire par anticorps circulant	15

C.2. - Réaction immunitaire par hypersensibilité retardée.....	16
Conclusion à l'Etude bibliographique	17

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL BIOLOGIQUE	18
A.1. - La plante	18
A.2. - Les pathogènes	18
B - CONDITIONS DE CULTURE	
B.1. - Plantes en serre	19
B.2. - Plantes au champ	19
B.3. - Les pathogènes	19
C - APPORT D'INOCULUM ET NOTATION DES SYMPTOMES	20
D - EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES	21
D.1. - Diffusats de plantes	21
D.2. - Les filtrats de culture	21
E - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	22
E.1. - Electrophorèse en gels dénaturants	22
a) Méthode analytique	22
1) Préparation des gels	23
2) Migration	23
b) Méthode préparative	24
E.2. - Filtration sur gel de sephadex	25
F - METHODES IMMUNOLOGIQUES ET SEROLOGIQUES... 25	
F.1. - L'hypersensibilité retardée chez la souris	25
F.2. - L'immunisation	26
a) Méthode directe	26
b) la double immunisation	26
F.3. - La révélation	27

F.4. - L'immunodiffusion	27
--------------------------------	----

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I - UTILISATION DU PELTAR DANS LA LUTTE CONTRE LA MALADIE BRUNES DU NIEBE

A - CHOIX DU PELTAR	28
B - EFFET DU PELTAR SUR LA CROISSANCE IN VITRO DU <i>C. CAPSICI</i>	28
C - EFFET DU PELTAR SUR LA GERMINATION DES SEMENCES DE NIEBE CONTAMINEES PAR LE <u>C. CAPSICI</u>	29
D - EFFET DU PELTAR DANS UN ESSAI AU CHAMP.....	32
D.1. - Influence sur le peuplement	33
D.2. - Effets sur le rendement	34
E - CONCLUSION	37

CHAPITRE II : ETUDE DE LA RESISTANCE VARIETALE DU NIEBE CONTRE LA MALADIE DES TACHES BRUNES

A - ESSAI AU CHAMP	38
B - TESTS DU POUVOIR PATHOGENE SUR LES PLANTES EN SERRE	39
B.1. - Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats.....	40
B.2. - Mesure du pouvoir pathogène sur plante en serre.....	41
a) Choix d'une méthode d'inoculation	41
b) Etude des doses d'inoculum	42

c) Choix de la période d'incubation avant notation	43
d) Conditions environnementales après inoculation	44
e) Influence de l'état des plantes	44
f) Etude de la variabilité du pouvoir pathogène et de la sensibilité variétale ...	45

TROISIEME PARTIE

CHAPITRE I - SEPARATION SUR GELS DE POLYACRYLAMIDE DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES INTERACTIONS NIEBE-COLLETOTRICHUM

A - ANALYSE PAR ELECTROPHORESE DES PROTEINES SOLUBLES EXTRAITES DES FEUILLES DE NIEBE TRAITEES OU NON PAR <i>C. CAPSICI</i>	49
A.1. - Etude quantitative des protéines	49
A.2. - Etude qualitative des protéines	50
a) Présence de protéines nouvelles	50
b) Variation de la production des protéines nouvelles avec l'hôte et la concentration en acrylamide.....	51
c) Comparaison des profils protéiques de cinq variétés de niébé.....	51
Conclusion	53
A.3. - Influence du mode de traitements des plantes sur la production des protéines nouvelles	53
A.4. - Digestion enzymatique des protéines nouvelles de <i>V. unguiculata</i>	55
A.5. - Electrophorèse préparative sur les diffusats des plantes	56
B - ELECTROPHORESE DES PROTEINES DE <u>COLLETOTRICHUM SPP.</u>	57
B.1. - Protéines du filtrat	57
B.2. - Protéines du mycelium	58
Conclusion	59

**CHAPITRE II : ETUDES IMMUNOLOGIQUES DES PROTEINES
DES INTERACTIONS NIEBE-
COLLETOTRICHUM CAPSICI**

INTRODUCTION	60
A - MISE AU POINT DES TECHNIQUES D'IMMUNOLOGIE	61
A.1. - Détermination de la dose immunisante.....	61
A.2. - utilisation du Cyclophosphamide	62
B - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES DES DIFFUSATS DES PLANTES	63
B.1. - Etude des bandes frontales	63
a) Diffusats témoins	63
b) Diffusats de plantes traitées	65
B.2. - Etude immunologique des bandes PR.....	67
C - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES FILTRATS DE CULTURE	69
Conclusion	70
D - ANALYSES SEROLOGIQUES SUR DES PROTEINES DE NIEBE ET DE <u>COLLETOTRICHUM</u>	71
D.1. - Cas des protéines de plante	71
D.2. - Cas des protéines du champignon	72
CONCLUSION GENERALE	74
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	76

INTRODUCTION GENERALE

Le niébé représente la première source de protéines alimentaires pour les populations rurales des pays sahéliens comme le Burkina Faso où la paysannerie constitue sur les 7000.000 d'habitants plus de 90 % de la population. En plus de la sécheresse, qui constitue la première calamité naturelle de ces régions sahéliennes, la production de niébé est beaucoup limitée par les attaques d'insectes, les maladies et les infestations par certaines plantes parasites comme le *Striga gesnerioides*.

Ces différents problèmes ont conduit à la création en 1978 au Burkina Faso d'un Programme National pour l'Amélioration du niébé.

Parmi les nombreuses maladies qui attaquent la plante, une s'est particulièrement manifestée ces dernières années au Nigeria et au Burkina Faso. Il s'agit de la maladie des taches brunes due au *Colletotrichum capsici*. Plusieurs méthodes de lutte peuvent être utilisées dans la lutte contre la maladie. Le pathogène contaminant les semences et transmettant alors la maladie à la génération suivante, EMECHEBE (1981) préconise l'utilisation des semences traitées comme l'un des meilleurs moyens de lutte. Dans le but de vérifier cette proposition, nous avons mis en place à Kamboinsé (Burkina Faso) au cours de la campagne agricole 1983 et de la suivante, un essai avec un fongicide, le Peltar (Manèbe + Thiophanate méthyl) en traitement des semences. Il convient de remarquer que l'utilisation de semences traitées ne peut pas constituer une garantie totale quant à d'éventuelles contaminations par d'autres sources d'inoculum. A cet égard, l'utilisation des variétés résistantes semble offrir plus de sécurité.

Depuis le signalement de la maladie en Afrique, l'un des premiers efforts des phytopathologistes a donc consisté à mettre au point une méthode permettant l'évaluation au champ de la résistance variétale.

Dans le cadre de notre travail, nous avons essayé d'améliorer la méthode de notation mise au point par les chercheurs pour le criblage des variétés contre cette maladie. L'échelle de notation adoptée s'inspire du système de notation mis au point par l'IRRI (1975) pour évaluer la résistance naturelle du riz à la pyriculariose.

Nous nous sommes proposé de prendre uniquement en compte les manifestations de la maladie sur les plantes jeunes après inoculations en serre et de voir quel type de corrélation existerait entre ces résultats et ceux obtenus sur les plantes issues de ces mêmes variétés au champ pendant leur maturité.

D'un point de vue pratique, une corrélation positive entre les

résultats en serre et ceux du champ présenterait beaucoup d'avantages comme :

- rapidité des criblages
- faisabilité des criblages en toutes saisons car, à partir de jeunes plantes qu'on peut faire pousser pendant les saisons mortes, il n'est plus nécessaire d'attendre l'arrivée de la saison des pluies.

Cet objectif a exigé la mise en place d'un essai de comparaison variétale au champ à Kamboinsé lors de la campagne agricole 1983.

D'un point de vue génétique, 2 types de résistance caractérisent le comportement des plantes face aux attaques des pathogènes. Il s'agit de la résistance verticale et de la résistance horizontale. La résistance verticale confère une protection complète mais non permanente en impliquant donc des mécanismes qui sont à l'intérieur du pouvoir de variation du pathogène. Dans le cas de la résistance horizontale, les mécanismes sont hors de la variabilité du pathogène. Il n'y a pas d'interaction différentielle et les souches diffèrent par leur agressivité. Les plantes possédant le premier type de résistance perdent souvent cette résistance à la suite de l'apparition de souches virulentes du pathogène impliqué dans la maladie. L'existence d'une spécificité parasitaire se traduisant par la mise en évidence de races du pathogène est alors notée comme dans le cas du couple haricot-*Colletotrichum lindemuthianum*

A notre connaissance, il n'existe pas encore de cas de spécificité parasitaire variétale démontrée dans le cas du couple niébé-*Colletotrichum capsici*. Cette situation nous a paru intéressante pour entreprendre l'analyse des différentes protéines impliquées dans ce couple. En effet, plusieurs auteurs ont mis en évidence ces dernières années l'implication des protéines dans de nombreux cas d'interactions hôte-pathogènes. Comme exemple, on peut citer la cas du niébé et du virus de la nécrose du tabac (COUTTS, 1978). Nous avons repéré au laboratoire des protéines similaires.

L'analyse des différentes protéines impliquées dans l'interaction niébé-*Colletotrichum* ne nous permettrait-elle pas de les utiliser comme marqueurs des souches de *Colletotrichum* et des variétés de niébé et ainsi de pouvoir séparer les variétés utilisées suivant leur résistance? Telles sont les hypothèses que nous avons formulées en entreprenant cette étude.

Notre travail sera présenté selon le plan suivant :

- Dans une première partie, une étude bibliographique fera la synthèse des travaux effectués sur le couple niébé-*Colletotrichum* depuis l'apparition de la maladie des taches brunes en Afrique. Cette étude sera complétée par l'importance que revêt la synthèse de nouvelles protéines dans les mécanismes de résistance de la plante, et l'utilisation de

l'immunologie en pathologie végétale. Le matériel et les méthodes utilisés pour notre travail seront également exposés dans cette partie.

- Dans la deuxième partie, nous présenterons les résultats de notre essai de lutte chimique contre le *Colletotrichum capsici* par le traitement des semences du niébé. L'étude sur le comportement de résistance de quelques variétés de niébé face à la maladie des taches brunes aussi bien au laboratoire qu'au champ sera ensuite exposée pour illustrer la mise au point d'une méthode d'évaluation de la maladie.

- Dans la troisième partie nous présenterons les résultats sur la séparation et l'analyse des protéines des extraits de plantes de niébé (diffusats) traités ou non par différentes souches de *Colletotrichum* et aussi des protéines des mêmes souches de pathogène. La spécificité de ces différentes protéines sera étudiée par des méthodes immunologiques et sérologiques avec pour objectifs de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-parasite et de définir des critères ou marqueurs de variété ou de souche.

PREMIERE PARTIE :

- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**
- MATERIEL ET METHODES**

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - LE NIEBE ET SA CULTURE

Le niébé est la plus importante légumineuse alimentaire des régions de savane de l'Afrique de l'Ouest. Les statistiques de la FAO publiées ces dernières années révèlent que la production africaine représente 80 à 90 % de la production mondiale de cette légumineuse estimée à 1.400.000 tonnes. La production totale des pays sahéliens suivants: Mauritanie, Burkina Faso, Niger, Sénégal et du Nigéria était de 1.100.000 tonnes en 1971 pour un rendement de 240 kg/ha (KASSAN, 1976).

Première source de protéines végétales dans l'alimentation des populations rurales, il représente également une source de revenus monétaires pour les agriculteurs de ces pays.

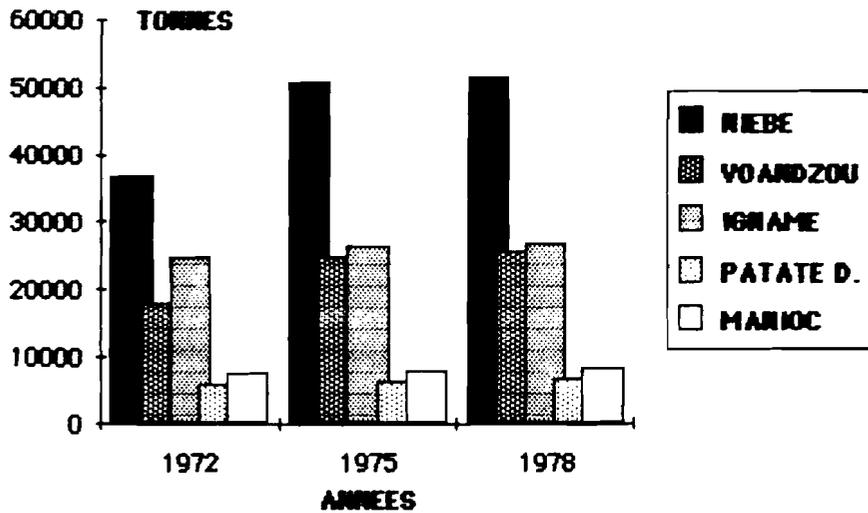
Depuis plusieurs années, l'Institut International de l'Agronomie Tropicale (IITA) basé à Ibadan (Nigéria) s'occupe à travers sa section d'Amélioration des légumineuses à graines de promouvoir la culture du niébé dans ses zones de production. Avec la création de la Commission Scientifique Technique et de Recherche de l'Organisation de l'Unité Africaine, une équipe de chercheurs travaillant pour l'amélioration du niébé a été installée en 1979 dans la Station de Recherches Agronomiques et Zootechniques de KAMBOINSE (Burkina Faso). Cette équipe a pour rôle d'aider les différents programmes nationaux de recherche des pays situés dans les zones semi-arides du continent dans la production de variétés à haut rendement et adaptées à ces zones.

A-1 Généralités sur la culture du niébé

a) Importance de la culture du niébé au Burkina Faso

L'agriculture burkinabè comme celle de la plupart des pays sahéliens est de type traditionnel. De par cette structure, le niébé y a de tout temps été cultivé en association avec les 3 principales cultures céréalières du pays que sont le Sorgho (*Sorghum bicolor*), le Mil (*Pennisetum typhoides*) et le Maïs (*Zea mais*). Selon les statistiques de la FAO (1978), le Burkina Faso était le 3ème producteur africain de niébé avec une production supérieure à 90 000 tonnes derrière le Nigéria (800 000 tonnes) et le Niger (271.500 tonnes). Les chiffres réunis par la Section de Statistiques agricoles de la cellule de la Planification Rurale du Burkina à la même époque donnaient 51.759 tonnes de niébé et

PRODUCTION BRUTE DE LEGUMINEUSES ET FECULENTS



PRODUCTION BRUTE DE CEREALES

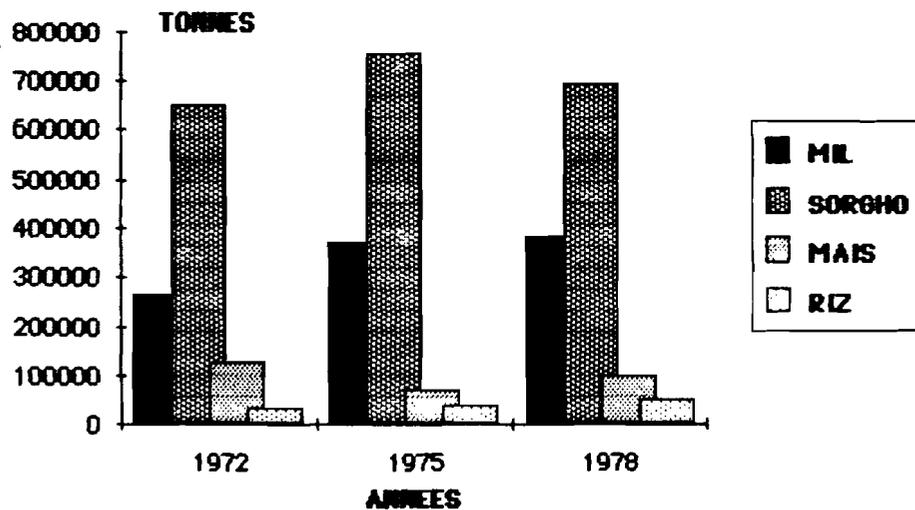


Figure 1: Evolution des Productions vivrières au Burkina Faso

25 491 tonnes de voandzou qui est la deuxième légumineuse derrière le niébé (cf figure 1).

b) - Caractères botaniques et systématique de la plante

Le niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (synonyme *V. sinensis* (L.) Savi ex Hassk. qui est une des six espèces cultivées du genre *Vigna* (Brenan, 1963) (160 espèces au total) appartient à la tribu des *Phaseoleae*, famille des légumineuses. C'est une plante herbacée annuelle, autogame (fécondation croisée de 0,2 à 2 %) dépassant rarement 60 centimètres de hauteur (BOIS, 1927). Les feuilles alternées trifoliolées sont rattachées à la tige par un pédoncule de 5 à 15 cm. Les ports sont érigés, rampants ou grimpants. Les gousses ont des longueurs variables (de 5 à 30 centimètres) sont déhiscentes avec des graines de couleur variable selon les cultivars.

c) Caractères écologiques

- VAVILOV (1935) a proposé l'Inde et l'Ethiopie comme les centres primaires d'origine du Niébé.

- STEELE et MEHRA (1980) citent les auteurs tels que PIPER, WIGHT, AMES et WATT, qui ont proposé respectivement l'Inde; le Nord de l'Inde, le Pakistan et l'Iran; l'Inde et l'Afrique, comme centres d'origine. Aucun doute ne subsiste quant aux centres de diversités génétiques que sont l'Inde et l'Afrique.

Plusieurs types de variétés adaptées aux différentes zones de culture de la plante qui couvrent les régions semi-arides aux zones tropicales humides à travers l'Afrique, l'Asie, l'Australie et l'Amérique existent.

- HUXLEY et SUMMERFIELD (1976) situent la variation génotypique la plus importante entre les variétés au niveau de la floraison précoce ou tardive correspondant respectivement aux variétés non photosensibles et aux photosensibles fleurissant pour des jours courts.

d) Technique de culture du niébé

Dans la plupart des pays africains où il est produit, le niébé est rarement cultivé en culture pure mais en association principalement avec le Mil, le Maïs, le Sorgho et les tubercules (Patate douce, Igname). L'avantage de cette pratique c'est qu'elle réduit les attaques des ennemis de la plante et permet une récolte de l'ordre de 25 à 50 % par rapport au rendement potentiel (KASSAN, 1976).

Tableau I : Principales maladies du niébé et distribution dans le Monde. (Allen et al., 1981).

	Maladie	Agent causal	Distribution	Importance des pourcentages de perte du rendement	Transmission par les semences
MALADIES FONGIQUES	1 Fonte de semis	<u>Rhizoctonia solani</u> <u>Pythium aphanidermatum</u>	Nigéria, Burkina faso et probablement ailleurs	Jusqu'à 75 %	+
	2 Maladies de la tige du collet et de la racine Anthracnose	<u>Colletotrichum lindemuthianum</u>	Afrique, Inde, Brésil	35 à 50	+ (40 %)
	Pourriture de la tige	<u>P. aphanidermatum</u>	Monde entier	Locale	-
	"	<u>Corticium rolfsii</u>	Probablement dans tout le monde	Faible	- ?
	"	<u>Fusarium solani</u>	Afrique, Amérique tropicale	Locale	+ ?
	"	<u>Macrophomina phaseoli</u>		Locale	+
	3 Flétrissement Fusarien	<u>F. oxysporum</u>	Toutes les zones de culture	Locale	+
	Verticillien				
	4 Taches foliaires Cercosporiose	<u>Cercospora canescens</u> et <u>C. cruenta</u>	Toutes les zones de culture	20 et 40 % respectivement	+
	Taches zonées	<u>Corynespora cassiicola</u>		Faible	+
	Septoriose	<u>Septoria vignae</u> et <u>S. vignicola</u>		Locale	+ ?
	5 Brûlures du feuillage	<u>Rhizoctonia solani</u> <u>Thanatephorus cucumeris</u> <u>Ascochyta phaseolorum</u>	Afrique, Amérique Centrale	Contrainte majeure dans les zones tropicales humides	+
	6 Rouilles, Charbons et Oïdiums Rouilles	<u>Uromyces appendiculatus</u> = <u>U. vignae</u> <u>Phakopsora pachyrhizi</u>	Toutes les zones de culture Afrique, Asie	Importante Faible	-
	Gousse rouille	<u>Synchytrium dolichii</u>	Afrique, Asie	Faible	- ?
	Charbon des feuilles	<u>Protomyces phaseoli</u> = <u>Entyloma vignae</u>	Afrique, Inde, Brésil	Localement important au Brésil	-
	Oïdium	<u>Erysiphe polygoni</u>	Sur tous les continents	Importante en Amérique tropicale et en Inde	-
	7 Maladies des gousses Pourritures des gousses	<u>Choanephora spp.</u>	Nigéria, Inde, Brésil	Faible	-
	Maladie des taches brunes	<u>Colletotrichum capsici</u> et <u>C. truncatum</u>	Afrique (Nigéria, Burkina faso)	Localement importante	+
	Gale	<u>Elsinoe phaseoli</u>	Afrique, Amérique Centrale	Probablement locale	
BACTÉRIENNES	Chancre bactérien	<u>Xanthomonas vignicola</u>	Afrique, Amérique, Inde		+
	Taches bactériennes	<u>Xanthomonas spp.</u>	Nigéria, Tanzanie, Brésil		+

Selon NORMAN (1972), les variétés locales en Afrique ont généralement des maturités tardives (80 à 160 jours) et sont plus adaptées aux intensités lumineuses plus faibles, sous les autres cultures avec lesquelles elles sont en association.

e) Utilisations principales

- Source de protéines végétales : la graine de niébé contient 24% de protéines alors que celle du voandzou n'en contient que 14,5 % (BOIS, 1927 ; Memento de l'Agronome, 1974).
- Source de revenu monétaire pour les agriculteurs de certains pays.
- Source de fertilité du sol, régénérée par la fixation symbiotique de l'azote.

f) Ennemis de la plante

Les insectes et les maladies constituent les principales contraintes pour l'augmentation de la culture du niébé dans les régions tropicales (WILLIAMS, 1975 ; ALLEN *et al.*, 1981).

SINGH et ALLEN (1980) signalent que, dans les savanes africaines où la plus importante quantité de niébé est produite, les pertes de rendement dues aux insectes sont plus grandes que celles dues aux maladies. Par contre, dans les zones plus humides de production, ce sont les maladies qui sont les plus importantes. Les chercheurs du Projet Conjoint 31 SAFGRAD (Recherche et Développement des Cultures Vivrières dans les Zones Semi-Arides) de l'OUA/CSTR dans leurs tournées d'Inspection du niébé en 1982 (Newsletter, 1983) ont remarqué que les insectes se sont avérés être la contrainte majeure dans tous les sites visités (Sahel, Savane soudanienne, Savane guinéenne) alors que la réaction face aux maladies variait considérablement. Voir le **tableau I** des principales maladies du niébé et leur distribution dans le Monde.

A - 2 La maladie des taches brunes du niébé

a) Historique

Deux espèces de *Colletotrichum* ont été identifiées comme étant pathogènes du niébé

- *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav. agent responsable de l'Anthracnose du niébé qu'on trouve dans les régions à

forte pluviométrie comme le Sud du Nigéria (ONESIROSAN et BARKER, 1971).

• *C. capsici* signalé pour la première fois en Afrique (Nigéria) par WILLIAMS (1975) est également responsable d'un type d'antracnose dans les régions de savane.

L'Antracnose due au *C. lindemuthianum* est essentiellement une maladie des tiges alors que celle due au *C. capsici* attaque en plus des tiges, les fleurs, les gousses et les graines. D'où l'appellation par certains auteurs (WILLIAMS, EMECHEBE, SINGH, ALLEN) de "maladie des taches brunes" dans le cas de *C. capsici* pour la différencier de la première. A partir de 1977, la maladie des taches brunes a pris de l'importance dans toute la zone Nord du Nigeria (région de savane soudanienne) qui représente 80 à 90 % des aires de production du pays (EMECHEBE, 1981).

Au Burkina Faso, le programme National pour l'Amélioration du niébé qui a été créé en 1978 n'a cessé de signaler la présence de la maladie dans le pays depuis cette date. En 1981, il a été décidé d'incorporer la recherche à la résistance variétale de la maladie dans les programmes de recherche (Rapport annuel, 1981). Les travaux d'EMECHEBE (1981) d'ALLEN *et al.*, (1981) font ressortir l'importance que revêt cette maladie au Burkina Faso et au Nigeria.

b) Systématique et description du pathogène

Colletotrichum capsici (Syd.) Butler et Bisby comme la plupart des agents responsables des Antracnoses est un champignon dont la forme conidienne permet de le classer dans l'ordre des Mélanconiales.

Le pathogène de la maladie des taches brunes du niébé a été identifié par le Commonwealth Mycological Institute (EMECHEBE, 1981) comme étant le *C. capsici*. On le rencontre sur les hôtes comme le piment, la tomate, l'aubergine (LING et LIN, 1946 ; ROGER, 1953; SMITH et CROSSAN, 1958; CHI-CHANG CHEN et HUN-YING HSU, 1968) sur lesquels il provoque la pourriture des fruits mûrs. Sur le poids d'Angole et le Jute (SOMANI *et al.*, 1975, 1976) il est responsable de la brûlure des plantules, du chancre des tiges et de leur mort. On le trouve aussi sur la canne à sucre (SINGH *et al.*, 1974), le coton (CHOPRA *et al.*, 1975), le soja (ROY, 1982).

Les acervules du champignon de forme arrondie ou allongée ont un diamètre variant entre 110 μ et 350 μ .

Les soies brun-noir (76 à 193 x 4,5 à 7,0 μ) ont 2 à 5 divisions et ont une cellule terminale lancéolée (largeur de l'apex 2,5 à 3,3 μ) et une cellule basale qui est plutôt légèrement renflée (largeur de 6,9 à 10,3 μ) ou

ayant le même diamètre que les cellules centrales.

Les conidophores (8,5 à 17,3 x 3,0 à 4,0 μ) sont cylindriques et hyalins, les conidies (21 à 31 x 3,5 à 4,5 μ) sont hyalines, légèrement lancéolées (largeur à la base de 1,7 à 2,5 μ), unicellulaires et le plus souvent falciformes mais occasionnellement droites. La masse conidienne en culture sur PDA est initialement de couleur crème, elle devient par la suite rosée.

c) Symptômes de la maladie des taches brunes

1 - Sur semences et plantules

Il apparaît une coloration brun-pourpre ou brun-noir de la graine accompagnée d'une craquelure du tégument dans les cas les plus avancés. Ces symptômes diffèrent de ceux dus au *Macrophomina phaseolina* qui donne une coloration grise aux graines attaquées (EMECHEBE et Mc DONALD, 1979). Occasionnellement les semences affectées par *C. capsici* sont grises à noires et ceci est dû à la formation d'acervules. Les travaux d'EMECHEBE (1981) montrent que les graines sévèrement attaquées n'arrivent pas à germer. Les plantules provenant des graines faiblement contaminées meurent, soit avant, soit quelques jours après la levée, à la suite de la formation d'une lésion pourpre entourant la tige au niveau du sol ou des cotylédons.

2 - Sur tiges, feuilles et gousses

La présence de taches brunes sur toute la tige est caractéristique. Celles qui sont en bas de la tige peuvent éventuellement anneler la tige à ce niveau causant le flétrissement et la mort de la plante. D'autres lésions sur tiges sont initialement bruns noires et ultérieurement développent de petites craquelures au centre. La coloration jaune paille du centre est souvent entourée par un liseré brun-noir.

Les symptômes sur feuilles sont rares. On observe souvent une décoloration brun-noir du pétiole et des nervures.

La formation de taches brunes sur tout l'appareil floral conduit à une perte totale de productivité des gousses. Une attaque partielle entraîne la déformation, le ratatinement et la momification des gousses immatures. Sur les gousses sèches, en conditions humides au champ, le champignon sporule pour produire une lésion avec alternance de bandes brunes et noires (les noires étant dues à la formation d'acervules). C'est la phase la plus propice au diagnostic de la maladie (EMECHEBE, 1981).

d) - Transmission de la maladie et moyens de lutte

Selon les travaux d'EMECHEBE et Mc DONALD (1979) et d'EMECHEBE (1981), le pathogène contamine les semences de niébé qui transmettent alors la maladie à la génération suivante comme dans le cas du piment (GROVER et BANSAL, 1970), du coton (CHOPRA *et al.*, 1975), du soja (ROY, 1982). Ces graines contaminées produisent l'infection primaire sur plantules au niveau du sol à partir de laquelle l'infection secondaire s'étend par projection des gouttes de pluie. Les infections primaires jouent donc un rôle important dans la propagation de la maladie au champ. Il est à signaler que les graines contaminées par *C. capsici* subissent au cours de leur conservation des transformations biochimiques importantes marquées essentiellement par une augmentation de la quantité en acides gras libres, une augmentation en sucres réducteurs et une diminution en protéines, (CHARYA et REDDY, 1981) leur faisant perdre ainsi une part importante de leurs qualités alimentaires.

Concernant les moyens de lutte contre cette maladie du niébé, EMECHEBE (1981) montre de façon claire que le semis de graines saines indemnes du pathogène constitue une des méthodes de lutte les plus efficaces et ceci en raison du rôle important joué par les infections primaires dans la propagation de la maladie.

L'élimination des débris végétaux est une pratique nécessaire. CHOWDHURY (1957) a montré sur le piment le rôle important que jouent ces débris dans la propagation dans l'air des conidies de *C. capsici*.

L'utilisation des fongicides comme le Ferbame (Dimethyldithiocarbamate ferrique), le Captane (groupe des Phtalimides) et le Dithane (Dithiocarbamate de manganèse) en pulvérisations donne de bons résultats (EMECHEBE, 1981). Mais ce moyen n'est pas à la portée des paysans africains. Parmi les moyens de lutte chimique, le traitement des semences paraît être une voie plus facile à mettre en oeuvre.

ALLEN *et al.* (1981) par la mise en place d'essais internationaux contre les maladies du niébé, essais conçus sur le même dispositif que WILLIAMS (1977) ont aussi réussi à identifier quelques variétés de niébé résistantes à la maladie des taches brunes.

B - IMPORTANCE DES PROTEINES P.R. DANS LES INTERACTIONS HOTE-PATHOGENES

L'attaque d'une plante par un parasite aboutit soit au développement du parasite, soit à l'arrêt de sa propagation. Dans ce dernier cas, on parle de la résistance de la plante. Cette résistance est exprimée par

les 2 types de moyens de défense dont dispose la plante :

*les moyens préformés existant dans les plantes saines et dus à la présence de structures physiques et/ou de molécules préformées (CAMPBELL *et al.*, 1980, AKAI et FUKUTOMI, 1980)

*les moyens dynamiques qui se déclenchent dans la plante après l'arrivée du pathogène et comportent une série de réactions qui vont empêcher le développement du parasite (BECKMAN 1980, CRUICKSHANK, 1980).

La réaction hypersensible (RH) est l'une des manifestations les plus typiques de la résistance des plantes aux maladies. Elle se caractérise chez la plante par la formation de nécroses cellulaires précoces aux points de pénétration dans les tissus (MESSIAEN, 1981). L'arrêt de la croissance du parasite fait suite à l'infection qui déclenche dans la plante des réactions cytologiques et biochimiques inhibant son développement (BECKMAN 1980, CRUICKSHANK, 1980)

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la RH pour étudier la nature des nouvelles molécules formées dans les cellules des plantes présentant ce type de résistance.

B 1 - Mise en évidence de protéines nouvelles

Déjà en 1961 ROSS suggère que la résistance d'un cultivar de tabac face à une infection par le VMT serait due à des substances transportées des sites d'infection vers les autres parties de la plante. Ce type de résistance est appelé résistance induite. La mise en évidence des nouvelles protéines dans les interactions hôte-parasite date des premiers travaux de GIANINAZZI *et al.* (1969 et 1970) et de VAN LOON et VAN KAMMEN (1970). Lors de la RH observée avec la variété Samsun NN de *Nicotinia tabacum* infectée par le VMT, GIANINAZZI et VALLEE (1969) constatent que l'arrêt de la répllication virale n'est pas dû à une barrière de cellules mortes car il existe du virus biologiquement actif dans les cellules vivantes situées au delà de la nécrose. Cet arrêt est dû à une autre barrière qui rend ces cellules incapables de répondre complètement à l'information génétique que possède l'acide ribonucléique viral. Une élévation de la température de 20 à 30° C levant cette incapacité, ils pensent à la mise en jeu de substances protéiques. Utilisant par la suite la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, GIANINAZZI *et al.* (1970) et VAN LOON et VAN KAMMEN (1970) ont mis en évidence l'apparition de nouvelles protéines lors de la RH observée avec la variété Samsun NN de *Nicotinia tabacum* infectée par le VMT. Ces nouvelles molécules sont observées dans les fractions protéiques solubles et stables en milieu acide, extraites des feuilles de la plante.

BARKER en 1975 démontre que ces nouvelles molécules n'apparaissent pas seulement lors de la RH mais font partie des constituants normaux de la cellule. VAN LOON (1976) conteste les conclusions de BARKER par une étude approfondie des électrophorégrammes en réaffirmant que les nouvelles protéines ne se trouvent pas dans les plantes saines.

FRASER en 1981 soulève à nouveau ce problème en publiant que les plantes sénescents peuvent contenir une faible quantité de ces protéines. AHL (1983) trouve que cette observation n'est pas en opposition avec le lien entre ces protéines et la résistance car les lésions virales sont plus petites sur feuilles âgées que sur feuilles jeunes.

B 2 - Nomenclature des protéines nouvelles

Elle varie beaucoup selon les auteurs. GIANINAZZI *et al.* (1970) observent l'apparition de 4 bandes protéiques supplémentaires dans un extrait des feuilles de tabac cv. *Xanthi*. nc. par rapport à un extrait témoin non inoculé au VMT. Ils appellent ces bandes b1, b2, b3 et b4. VAN LOON et VAN KAMMEN (1970) déterminent également 4 bandes protéiques nouvelles par séparation en gel d'électrophorèse d'une solution protéique des feuilles de tabac cv. *Samsun* et *Samsun Nn*, infectées par le VMT. Ces composés sont notés I, II, III et IV correspondant respectivement à b4, b3, b2 et b1.

ANTONIOW *et al.*, (1980) ont proposé de remplacer les noms initiaux de ces protéines par le terme général de protéines "P.R." ("Pathogenesis Related proteins"). L'unanimité n'a pas encore été faite autour de cette nomenclature et KASSANIS (1981) propose le terme de "Résistance-Associated proteins".

Pour notre part, nous avons retenu le terme de protéines PR et les raisons de ce choix tiennent compte des premiers résultats obtenus par VEDIE, (1984).

B 3 - Rôle des protéines PR

La plupart des travaux montrent que les protéines PR sont observées essentiellement dans les plantes infectées qui manifestent une réponse de type réaction hypersensible. La production de nouvelles protéines par la plante semble donc être spécifique de son état de résistance. Il a fallu, dans un premier temps, montrer que ces composés nouveaux ne sont pas des produits de dégradation s'accumulant dans les plantes à la suite de processus nécrotiques déclenchés par la RH. Cette hypothèse a été écartée à la suite des travaux de KASSANIS et WHITE

(1974) et de GIANINAZZI et MARTIN (1975). Ces 2 équipes montrèrent que l'utilisation de l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) supprimait l'apparition des nouvelles protéines. D'autre part, GIANINAZZI et KASSANIS (1974) signalent que l'injection dans des feuilles de tabac saines d'acide polyacrylique non seulement stimule la production de 3 des 4 bandes protéiques nouvelles mais aussi induit la résistance à l'infection par le VMT. La production de protéines b diminue rapidement et la multiplication virale reprend lorsqu'une plante ayant produit des protéines b à la suite d'une RH est transférée à 32° C (GIANINAZZI 1970). AHL (1983) montre que des tabacs sensibles greffés sur des plantes inoculées hypersensibles au VMT synthétisent leurs propres protéines sous l'effet d'un stimulus (messager chimique) produit par les feuilles inoculées.

En 1983, AHL conclut que la production de protéines b n'est pas spécifique vis à vis du pathogène. En effet plusieurs auteurs ont montré que les protéines b apparaissent lors de la RH aux virus (GIANINAZZI *et al.* 1970 ; VAN LOON et VAN KAMMEN 1970 ; VAN LOON 1975) ; TAS et PETERS 1977 ; COUTTS 1978), aux bactéries (AHL *et al.* 1981) et aux champignons (GIANINAZZI *et al.* 1980 ; ANDEBRAHN *et al.*, 1980 , DE WITT et BAKKER 1980). Cette liste fut étendue à un nématode provoquant des lésions nécrotiques locales (*Aphelenchoides ritzemabosi* après les travaux de AHL (1983).

Toutes ces différentes observations lient donc la présence ou l'apparition des protéines PR dans un tissu avec la résistance aux agents pathogènes et de même l'absence ou la disparition des protéines PR avec une absence ou une perte de la résistance.

Bien que associées à la manifestation de la résistance par hypersensibilité, les protéines PR ne semblent pas capables d'induire cette résistance. En effet KASSANIS *et al.*, 1974 constatent que des tabacs sains traités par un extrait de tabac contenant ces protéines ne deviennent pas résistants à l'infection virale.

Les travaux de AHL (1983) basés sur les aspects moléculaires et génétiques de la RH résument assez bien les hypothèses actuelles sur le rôle possible des protéines PR. La première concerne l'implication de ces composés dans un mécanisme de résistance aspécifique c'est-à-dire déclenché par des virus, des bactéries, des champignons ou induit par des produits chimiques et s'exerçant indépendamment de l'agent inducteur contre les 3 types de pathogènes. La deuxième hypothèse est leur rôle plus spécifique de résistance contre les virus en entrant en compétition avec la multiplication virale. Ceci n'est pas *a priori* incompatible avec le fait que les protéines PR apparaissent également lors de RH à des bactéries ou à des champignons, ou après infection par un nématode foliaire. En réponse à l'attaque de parasites, un grand nombre de modifications interviennent

dans la plante. Certaines de ces modifications pourraient intervenir directement contre le pathogène présent, et les autres être mises "en réserve" pour le cas où d'autres pathogènes arriveraient par la suite. On sait par exemple que lors de la RH aux virus, les *Nicotiana tabacum* et le *N. glutinosa* accumulent les phytoalexines qui n'ont pas d'action antivirale (MANSFIELD 1982). Pourquoi donc les plantes n'accumuleraient-elles pas des protéines PR sans action antifongique après infection par un champignon ?

B4 - Synthèse des protéines PR

L'utilisation de l'actinomycine D inhibe l'apparition des protéines PR (KASSANIS et WHITE 1974 ; GIANINAZZI et MARTIN 1975). Cette observation a été utilisée par ces auteurs pour montrer que les protéines PR ne sont pas des produits de dégradation qui s'accumulent dans les cellules des plantes à la suite de processus nécrotiques. Compte tenu de la propriété inhibitrice de la synthèse d'ARN messenger propre à l'actinomycine D, on en conclut donc que la synthèse des protéines PR doit être sous la dépendance d'un code génétique porté par l'ADN. Ceci est confirmé plus tard par AHL *et al* (1982) qui proposent l'utilisation de ces protéines comme marqueurs génétiques de résistance. En effet, des croisements interspécifiques de certaines espèces de *Nicotiana* ont montré que les déterminants des protéines PR sont transmis sexuellement. Les hybrides possèdent la somme des protéines de leurs parents.

CARR *et al* (1982) montrent la présence d'ARNm des protéines PR dans les *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* sains, bien que ces protéines n'aient pas été révélées dans les mêmes plantes. Ceci montre que le contrôle de la synthèse des protéines PR s'effectue au niveau de la traduction et non de la transcription comme le montraient KASSANIS et WHITE (1974) et GIANINAZZI et MARTIN (1975).

AHL (1983) pose la question de savoir pourquoi les ARNm des protéines PR sont traduits lors de la RH ou après traitement par certains inducteurs, provoquant ainsi une accumulation de ces protéines dans les tissus des plantes qui conjointement deviennent plus résistants aux virus. La suggestion faite par CARR *et al* (1982) et l'hypothèse avancée par GIANINAZZI (1970 et 1982) répondent à cette question. En effet, CARR *et al* 1982 suggèrent que les ARNm des protéines PR sont présents soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme sous forme de complexe protéines - acides ribonucléiques et donc non disponibles pour la traduction. Lors de la RH après traitement par divers inducteurs, ces ARNm seraient alors libérés puis traduits. GIANINAZZI (1970, 1982) pense que les protéines PR sont des analogues de l'interferon, une glycoprotéine qui apparaît dans les

cellules animales après infection virale et qui confère à l'organisme un état antiviral.

B-5 - Caractéristiques biochimiques et sérologiques des protéines P.R.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la purification et à la caractérisation des protéines PR obtenues dans les interactions tabac-virus. GIANINAZZI *et al.* (1977), ANTONIW *et al.*, 1980, AHL 1983, montrent que les bandes b1, b2 et b3 des protéines PR du couple tabac-virus sont des composés de masse moléculaire identique. Selon les auteurs et en fonction des techniques utilisées, cette masse varie de 16000 à 14200 daltons.

GIANINAZZI *et al.* (1977) par extraction préférentielle à pH 2,8 ont suggéré que b1, b2 et b3 seraient composées du même monomère de poids moléculaire voisin de 16000 alors que la bande b4 serait composée d'un monomère de poids moléculaire 29500. Les bandes b2 et b3 seraient des dimères et trimères de b1.

ANTONIW et PIERPOINT (1978), utilisant la chromatographie sur gel et l'absorption sur DEAE cellulose pour la purification, estiment le poids moléculaire de b1 à 15000.

En 1980, ANTONIW *et al.* précisent que les bandes b1, b2 et b3 sont constituées d'un simple polypeptide, d'un poids moléculaire similaire d'environ 14200, la même composition en acides aminés, des propriétés sérologiques identiques mais ont des charges différentes. Les protéines PR, b, PS; mises en évidence avec les couples tabac-virus et haricot-virus sont en outre résistantes à la digestion enzymatique par les peptidases (PIERPOINT, 1983; AHL, 1983; REDOLFI et CATHIANI, 1984).

C - UTILISATION DE L'IMMUNOLOGIE EN PATHOLOGIE VEGETALE

L'immunologie ou science de la défense de l'organisme consiste en l'étude des moyens de la **reconnaissance** et de la **neutralisation** des substances ou corps étrangers. La réaction immunitaire des animaux à sang chaud est hautement spécifique. En effet, l'animal est capable d'activer pour chaque substance étrangère qui le pénètre, des cellules hautement spécifiques ayant pour rôle la défense de l'organisme. Deux types de réactions sont rencontrées en immunologie : la réaction humorale par anticorps circulants et la réaction cellulaire souvent révélée par l'hypersensibilité retardée témoignant de l'activité des lymphocytes T.

C.1. - Réaction immunitaire par anticorps circulant (ou réaction humorale)

Lorsqu'on injecte à un animal des macromolécules étrangères (antigènes), il fabrique des anticorps (produits par les lymphocytes B), spécifiques de l'antigène, qui, lorsqu'ils sont à nouveau mis en présence de la substance, la reconnaissent puis l'agglutinent ou participent à sa destruction. L'antigène se caractérise dans la majorité des cas par deux parties. L'une d'elles, le déterminant antigénique ou haptène intervient dans la spécificité antigénique des anticorps grâce à une reconnaissance de type stérique. Cette propriété a permis de résoudre certains problèmes de taxonomie en pathologie végétale grâce à l'utilisation d'antiserums spécifiques. L'existence de communautés antigéniques très importantes au niveau des champignons entraînant des réactions croisées ou hétérologues, (un anticorps réagit avec un autre antigène que celui qui a induit sa formation) (DOUBLY *et al* 1960 ; SCHNATHORST et DE VAY 1963), constitue un facteur limitant dans l'utilisation de la sérologie en mycologie.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour résoudre le problème de la grande complexité antigénique des champignons lors de l'utilisation de la sérologie. Ainsi on peut employer comme immunogènes des fractions particulières intervenant dans l'expression du pouvoir pathogène, par exemple:

- des toxines, enzymes ou autres métabolites produits spécifiquement par le champignon.
- ou certains organes tels que les pycniospores (HINGAND *et al.*, 1982) ou les parois des hyphes (CHOO et HOLLAND, 1970).

Des résultats intéressants ont ainsi été enregistrés et nous n'en citerons que quelques uns :

- * MADOSINGH (1964) après avoir produit du sérum par immunisation de lapins avec les antigènes mycéliens de *Fusarium* réussit à séparer par la technique d'immunodiffusion les espèces suivantes : *F. oxysporum*, *F. moniliforme* et *F. solani*

- * MORTON et DUKES (1966) par cette même technique vont jusqu'à séparer les races 1 et 2 de *F. oxysporum f. sp. lypopersici*. Auparavant, cette différence ne pouvait être mise en évidence que par des inoculations en serre de variétés appropriées de tomate comme le soulignent certains auteurs (RAYNAL, 1983). Mais ce processus demeure long, laborieux et sujet à des variations dépendant de la concentration de l'inoculum, des températures d'incubation et de l'alimentation des plantes.

- * KAISER et SEN GUPTA (1976) différencient par l'utilisation des protéines solubles de 3 isolats de *Fusarium* les *f. sp. udum*, *vasinfectum* et *ciceri* de *F. oxysporum*. Ces deux auteurs avaient auparavant en 1975 établi la spécificité des 2 premiers pathogènes dans

des études de pathogénicité.

* Recherches sur la sérologie des *Colletotrichum*.

En 1967, HEGDE *et al.* produisant du sérum avec les antigènes mycéliens de 2 races physiologiques de *C. lindemuthianum* réussissent à différencier ces races. Ils montrèrent aussi les relations antigéniques très étroites entre *C. lindemuthianum* et les 5 espèces suivantes de *Colletotrichum* : *C. atramentarium*, *C. capsici*, *C. curvatum*, *C. falcatum* et *C. gloeosporioides*.

En outre, par des tests d'agglutinations sur lamelle avec les sérums des 2 races et 16 variétés de haricot, ils montrèrent l'existence d'une corrélation négative entre l'étendue de l'agglutination et la résistance. Les variétés immunes ne présentent aucune agglutination. Cette observation concorde avec la théorie de WARD et STOESSL (1976) qui définissent la résistance comme étant le fait d'une absence de récepteurs spécifiques à un pathogène donné et la maladie comme étant, au contraire, due à une rencontre entre un récepteur spécifique et un déterminant du pathogène. SOMSIRI JEWSKUM *et al.* (1978) différencient aussi par la sérologie *C. capsici* et *C. piperatum* tous deux agents responsables de l'antracnose du piment.

Une observation s'impose néanmoins à la plupart de ces études sérologiques en pathologie végétale. Il s'agit le plus souvent de la non répétitivité de ces expériences. L'exemple le plus frappant est celui des travaux sur la théorie des antigènes communs. Plusieurs auteurs (DOUBLY *et al.*, 1960 ; SCHNATHORST et DE VAY, 1963 ; WIMALAJEEWA et DE VAY, 1971 ; CARROLL et LUKEZIC, 1972 ; CHARUDATTAN et DE VAY, 1972) ont mis en évidence par l'utilisation de la technique d'immunodiffusion l'existence d'antigènes communs dans différents cas de couples hôte-pathogènes. CARROLL *et al.* (1972) n'ont pas réussi à obtenir des résultats identiques entre différentes variétés de Luzerne (*Medicago sativa*) et des souches virulentes et avirulentes de *Corynebacterium insidiosum*. Bien que les méthodes d'extraction des antigènes et de la diffusion en gel soient différentes de celles des auteurs cités, les résultats de CARROLL *et al.* (1972) restent fiables car d'autres auteurs (URITANI et STAHMANN, 1961) avaient auparavant établi la présence d'antigènes communs entre la patate douce et son agent responsable de la pourriture noire, en utilisant la même méthodologie.

C.2. - Réaction immunitaire par hypersensibilité retardée

La réaction immunitaire par hypersensibilité retardée correspond à l'immunité à médiation cellulaire. Elle se manifeste chez l'animal immunisé par l'apparition d'une réactivité spécifique vis à vis de

l'antigène due aux lymphocytes T, fabriqués par le thymus, qui se déplacent vers les organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions lymphatiques. Lorsque les lymphocytes T rencontrent l'antigène présenté par des macrophages, ils se transforment en cellules blastiques et donnent de petits lymphocytes non sécréteurs d'anticorps, les effecteurs. Ces effecteurs, en contact avec l'antigène, sécrètent des substances spécifiques à l'origine de la réaction hypersensible.

La spécificité dans l'immunité à médiation cellulaire serait basée sur le déterminant transporteur de l'antigène, de nature protéique et responsable du pouvoir immunogénique (BENACERRAF, 1981) plutôt que sur la partie haptène. Cette spécificité étant maintenue lors de la dénaturation des protéines correspondrait à la séquence des acides aminés plutôt qu'à des aspects stériques.

Compte tenu de la nature protéique des substances qui nous intéressent, nous avons utilisé la méthode immunologique par hypersensibilité retardée pour rechercher les spécificités portées par les antigènes fongiques et des hôtes.

Conclusion de l'étude bibliographique.

De l'étude bibliographique que nous venons de présenter nous retiendrons la mise en évidence des protéines nouvelles dans les interactions hôte-parasites. La plupart des travaux montrent que ces protéines accompagnent la manifestation de la réaction de résistance, mais ne sont pas capables d'induire cette résistance. Cependant, même dans le cas d'une réponse de maladie à lésions autolimitées, on peut penser que c'est le volet résistance de la plante qui est tardivement activé.

Le rôle des protéines nouvelles n'a pas encore été déterminé de manière précise. AHL(1983) leur confère dans 2 hypothèses différentes une implication dans un mécanisme de résistance aspécifique (première hypothèse) ou un rôle plus spécifique de résistance contre les virus (deuxième hypothèse). Les premiers résultats du laboratoire obtenus sur le couple féverole-*Botrytis* (VEDIE, 1984) semblent indiquer que les protéines nouvelles interviendraient probablement dans les mécanismes de reconnaissance entre l'hôte et le pathogène.

Les problèmes de la pathologie du niébé au Burkina Faso nous conduisent à tenter de réaliser une étude des possibilités de lutte au niveau des semences et à mettre au point des méthodes pathologiques pour étudier la sensibilité variétale avant d'envisager une amélioration.

Par ailleurs, dans le cadre de l'étude des relations hôte-pathogènes, nous chercherons à améliorer les connaissances sur les protéines PR dans l'interaction niébé -*Colletotrichum*.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL BIOLOGIQUE

A-1 - La Plante

Neuf variétés de niébé ont été utilisées au cours des différentes expériences de ce travail. Leur choix tient au fait qu'elles présentent de bonnes caractéristiques agronomiques au BURKINA FASO, notamment des rendements potentiels assez élevés. Le comportement de ces variétés face à la maladie des taches brunes sous des conditions favorables à la manifestation de la maladie demeure inconnu.

Liste des variétés et leur origine :

Suvita-2 ou Locale Gorom BURKINA FASO
 KN-1 ou Locale Kamboinsé BURKINA FASO
 IAR-48 : NIGERIA
 Vita-4 : NIGERIA
 TVU 2027-1-11 : NIGERIA
 Mougne : SENEGAL
 KVK-30-351-3K d'une part, et TVX 3236, TVX 1999-01F d'autre part, sont des croisements effectués respectivement par l'IITA/BURKINA FASO et l'IITA Ibadan (NIGERIA)

A-2 - Les pathogènes :

Les souches de *Colletotrichum* impliquées dans la manifestation de la maladie des taches brunes de niébé proviennent d'isolements issus de graines et de tiges malades :

- C.2017 : graines de niébé
- C.T.N. : tiges de niébé

Nous avons utilisé des souches de *C. capsici* provenant d'autres hôtes comme le pois d'Angole (*Cajanus cajan*) et le piment (*Capsicum frutescens*)

- C.P.A. : tiges malades de pois d'Angole
- P2, P3 : feuilles malades de Piment

D'autres espèces de *Colletotrichum* ont été utilisées. Elles nous ont été fournies par M. RAYNAL de l'INA. Paris-Grignon :

- *C. trifoli* C.28.5 } isolées
- *C. destructivum* } de la luzerne

- *C. gossypii* } isolées
- *C. indicum* } sur les capsules du cotonnier

- *C. lindemuthianum* } isolées sur haricot

B - CONDITIONS DE CULTURE

B-1 - Plantes en serre

Les graines sont semées dans des bacs plastiques (13 x 13 cm) contenant un mélange de tourbe et de vermiculite (2 volumes de tourbe pour 1 de vermiculite). Après leur germination, le développement des plantes a lieu dans la serre (période d'été) ou dans les mini-serres (reste de l'année). Les plantes sont utilisées après la formation des premières feuilles trifoliolées qui intervient 3 à 4 semaines après le semis.

B-2 - Plantes au champ

- Les variétés utilisées dans l'étude de la résistance variétale à la maladie des taches brunes ont été semées après labour durant la campagne agricole de 1983. Des parcelles élémentaires constituées de 2 lignes de 4 mètres de long ont été utilisées par variété en 2 répétitions. Une ligne intercalaire dite "ligne infestante" a été laissée pour 2 lignes expérimentales. Une variété sensible à la maladie a été semée sur ces "lignes infestantes" 2 semaines avant le semis des variétés à expérimenter pour favoriser le démarrage de l'infection (ALLEN *et al.*, 1981).

Les semis sont faits avec 2 ou 3 graines par poquet avec 50 cm entre les poquets et 50 cm entre les lignes. Après la levée, un démariage à un plant par poquet est effectué sur les plantes des lignes expérimentales.

- L'essai préliminaire avec le Peltar (Manèbe + Thiophanate-Méthyl) dans la lutte contre la maladie des taches brunes du niébé a été conduit avec le même dispositif de contamination artificielle que l'expérience ci-dessus. Quatre lignes par traitement ont été utilisées avec une "ligne infestante" toutes les cinquièmes lignes.

L'évaluation de la maladie dans les 2 expériences a été faite au stade de la maturité des gousses.

B-3 - Les pathogènes

Les souches de *Colletotrichum capsici* sont cultivées en boîte de Pétri sur le milieu minimal défini, mis au point par BIHARI (1977). Ce milieu permet d'obtenir à la fois une bonne croissance et une bonne sporulation du champignon. Nous avons également utilisé le milieu PDA.

Les souches de *C. capsici* ont été maintenues à la température de 30° C qui nous a donné les meilleurs développements par rapport à d'autres températures (15, 20, 25, et 35° C.)

C - APPORT D'INOCULUM ET NOTATION DES SYMPTOMES

C-1 - Pour les études au laboratoire, nous avons utilisé la pulvérisation sur plante entière. Les suspensions de spores employées proviennent des cultures de 7 à 10 jours et les doses utilisées sont de l'ordre de 10⁵ spores par ml d'eau distillée.

Une fois les plantes contaminées par pulvérisation, nous les plaçons pendant 7 jours en atmosphère humide sous une housse en polyéthylène transparent ou dans des mini-serres que nous avons spécialement aménagées. Les notations sont effectuées en 2 fois, 7 et 14 jours après la contamination. Le maintien des plantes durant les 7 jours sous la housse plastique ou les mini-serres permet d'obtenir une meilleure expression des symptômes de la maladie en un temps plus réduit. Ce phénomène a été constaté avec le couple Luzerne-*Colletotrichum trifolii* (RAYNAL, 1983). Nous avons noté comme EMECHEBE (1981) que les premiers symptômes apparaissent 3 à 5 jours après inoculation.

- Au champ

La transmission de la maladie se faisant par les graines (EMEHEBE, 1981) nous avons semé 2 semaines avant les variétés à expérimenter des graines contaminées de la TVU 2027.1.11 qui est une variété très sensible à la maladie des taches brunes afin de favoriser le démarrage de l'infection dans les parcelles expérimentales. TVU 2027.1.11 a été semée en alternance sur des lignes dites infestantes avec les variétés étudiées.

C-2 - Notation des symptômes

L'échelle de notation utilisée pour les études au laboratoire prend en compte uniquement les symptômes sur tiges et s'inspire de celle utilisée par l'IIRRI (1975) (Institut International de Recherche sur le riz) dans l'évaluation de la pyriculariose du riz. Cette échelle s'inspire également de celles utilisées par d'autres auteurs dans les études de comparaison des réponses des couples hôte-*Colletotrichum* (BANNEROT, 1965 ; RAYNAL, 1977).

Les 5 classes de cette échelle sont :

- 1 : Aucun symptôme sur les tiges
- 2 : Petites taches de couleur grise sur les tiges
- 3 : Taches coalescentes sur les tiges
- 4 : Taches coalescentes avec présence d'acervules sur les tiges
mais plantes non mortes
- 5 : Tiges flétries, plantes mortes

Cinq classes caractérisent également les symptômes sur les plantes au champ et l'évaluation a lieu au moment de la maturité des gousses. L'échelle utilisée est celle mise au point par ALLEN *et al* (1981) et utilisée par plusieurs auteurs :

- 1 : Aucun symptôme sur les plantes
- 2 : Légers symptômes localisés soit à la base de la tige, soit au sommet des pétioles
- 3 : Présence de symptômes modérés, de taches brunes sur les tiges, les nervures des feuilles et sur les gousses mais sans déformations.
- 4 : Taches brunes importantes sur les gousses avec quelques gousses endommagées
- 5 : Nombreuses gousses endommagées ou plantes sans gousses

La moyenne des symptômes ou indice moyen de la maladie est calculée dans les 2 cas par la formule suivante :

$$I = \frac{\sum ini}{n}$$

avec i = note des symptômes
 ni = nombre de plantes de note i

Une transformation angulaire (Arcsinus) des indices moyens de la maladie est faite avant d'effectuer les analyses de variance sur ces données (DANG *et al.*, 1983).

D - EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES

D-1 - Diffusats des plantes

Les protéines extracellulaires des feuilles témoins ou infectées sont extraites par infiltration sous vide d'une solution saline de NaCl à 0,5M suivant une méthode inspirée de celle de KEEN (1978). Une centrifugation sur grille à 5 000 tours/mn pendant 20 minutes (KLEMENT, 1965) permet de recueillir ainsi le diffusat.

Les protéines contenues dans les diffusats sont précipitées à l'acide Trichloroacétique (TCA) à 10 % à la température de la glace fondante (30 mn) (HAMES, 1981). A chaque précipitation, 3 à 5 ml de diffusats de plantes traitées ou témoins sont utilisés ce qui correspond à 10-20

plantes. Après centrifugation à 6 000 tours/min, pendant 15 min, le précipité obtenu, contenant les protéines est lavé 3 fois par un mélange d'éthanol-éther (V à V) pour éliminer toute trace d'acide. L'éthanol-éther est lui-même éliminé en maintenant le précipité au bain-Marie bouillant pendant 2 minutes. Le précipité repris dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 (ou tampon de dissolution) contenant 2 % de SDS, 5 % de 2-Mercaptoéthanol, 10 % de Glycérol et 0,002 % de Bleu de bromophénol est à nouveau chauffé pendant 3 min au bain-Marie bouillant avant d'être utilisé en électrophorèse.

D-2 - Les filtrats de culture

Un explantat de 6 mm de diamètre provenant d'une culture de 7 à 10 jours est introduit dans un Erlen de 500 ml contenant 400 ml de milieu B liquide. La culture se fait sous agitation pendant 10 à 14 jours. Une centrifugation à 6000 tours/min. pendant 10 min. permet de recueillir le mycelium. Le surnageant appelé filtrat de culture du champignon est ensuite passé sur filtres Whatman appropriés (1,6 μ) pour le débarrasser des spores et de tout fragment de mycelium.

La précipitation des protéines contenues dans le filtrat est faite au sulfate d'ammonium. Le culot obtenu après centrifugation pendant 5 min. à 6000 tours/min est repris dans l'eau physiologique. Après dialyse et concentration, les protéines sont reprises dans du tampon Tris-Glycine pH 8,3 (tampon de migration) contenant du SDS. La dissolution totale de ces protéines dans le tampon Tris-Glycine est facilitée par le maintien de la solution au bain-Marie bouillant pendant 2 à 5 minutes. La concentration de la solution protéique ainsi obtenue est déterminée au spectrophotomètre UV à 280 nm.

E - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

E.1. - Electrophorèse en gels dénaturants

a) - Méthode analytique

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide permet la séparation des protéines suivant leurs charges et leurs poids moléculaires. Nous avons utilisé la technique dite "SDS-PAGE", mise au point par LAEMMLI (1970). Cette méthode se caractérise par l'utilisation d'un gel de concentration et

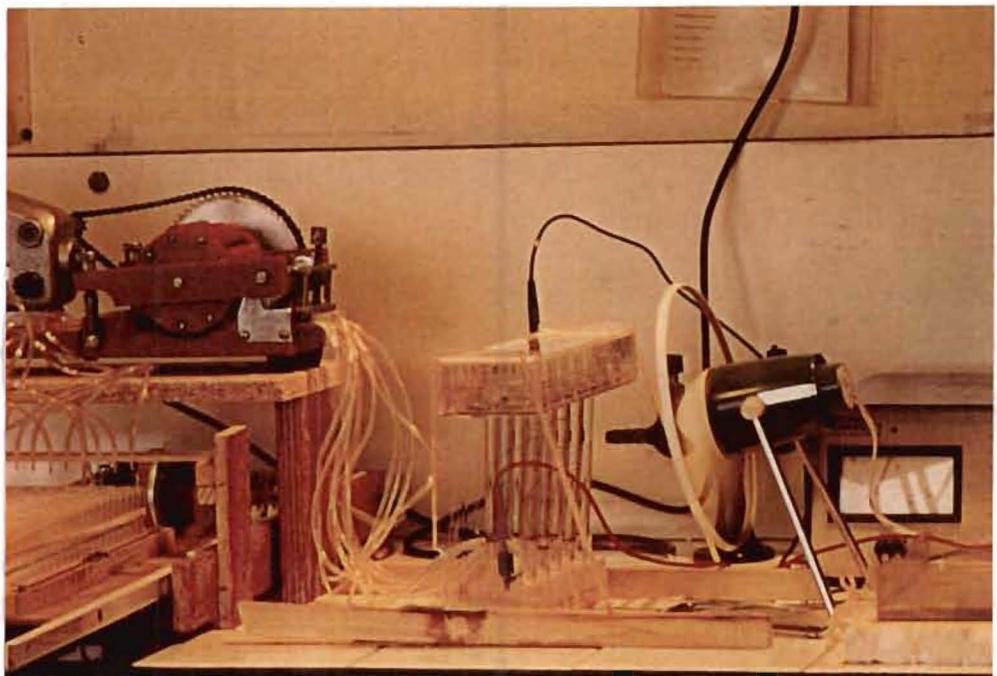


Figure (2) : Appareil d'electrophorèse préparative

d'un gel de migration en présence de SDS et de Mercaptoéthanol. Le SDS permet une uniformisation de la charge (négative). Le mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures dissociant les protéines en sous-unités polypeptidiques.

1.- Préparation des gels (voir tableau II)

Tableau II Composition des gels d'électrophorèse à 10% de polyacrylamide

SOLUTIONS	GEL DE CONCENTRATION (ml)	GEL DE MIGRATION (ml)
Acrylamide-bisacrylamide	2,5	10
Tampon A pH 6,8	5	-
Tampon B pH 8,8	-	3,75
S D S 10%	0,2	0,3
Ammonium persulfate 1,5 %	1	1,5
Eau distillée	11,3	14,45
Temed	0,02	0,02

Acrylamide-bisacrylamide = 30g d'acrylamide et 0,8g de bisacrylamide dans un volume total de 100 ml d'eau distillée.

Tampon A pH 6,8 : 6 g de Tris sont dissouts dans 40 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 par addition de 48 ml d'HCl 1 M et le volume est complété à 100 ml par addition d'eau distillée

Tampon B pH 8,8 : 36,3 g de Tris dans 48 ml d'HCl 1M et le volume est complété à 100 ml par addition d'eau distillée

2 - Migration

L'électrophorèse a lieu en tubes (10 x 0,6 cm ou 7 x 0,5 cm) avec un tampon d'électrophorèse - Tris glycine (3,03 g de Tris; 14,4 g de Glycine et 1 g de SDS dissous dans un volume final de 1 000 ml d'eau) pH 8,3. Un courant de 3 mA est appliqué par tube. Le Bleu de bromophénol contenu dans le tampon de dissolution des protéines permet de suivre la migration qui dure 4 heures avec les tubes de 10 cm et 2 heures 30 avec ceux de 7 cm.

3 - Révélation

Après la migration , les gels sont récupérés selon la technique

décrite par DAVIS (1964) puis colorés au Bleu de Coomassie R 250 avant d'être décolorés selon la méthode de FAIRBANKS *et al.*, (1971) (voir tableau III). Pour les gels dont la concentration en acrylamide dépasse 10%, nous avons évité de casser les tubes pour les récupérer. En insufflant de l'air sous pression grâce à une pompe à vide dans les tubes, les gels sortent sans se briser. Après décoloration, seules les protéines auront retenu la coloration. Les électrophorégrammes réalisés ensuite avec un densitomètre sur ces gels permettent l'exploitation des résultats.

Tableau III - Bains de coloration et décoloration des gels de polyacrylamide

SOLUTIONS	COLORATION		DECOLORATION	
	Bain à 0,5% (1 nuit)	Bain à 0,05% (6 à 9h)	Bain à 0,01% (1 nuit)	Acide acéti- que (3x3h)
Bleu de Coomassie (R 250 MERCK)	0,5g	0,05g	0,01g	-
Isopropanol	250ml	100ml	-	-
Acide acétique	100ml	100ml	100ml	100ml
Eau distillée	650ml	800ml	900ml	900ml

b) Méthode préparative

Afin de récupérer directement les bandes protéiques lors des électrophorèses en vue de leur purification et de leur utilisation en immunologie nous avons conçu un appareil d'électrophorèse préparative pour plusieurs tubes simultanés. Cet appareil est dérivé de celui utilisé en électrophorèse analytique, avec le remplacement de la cuve unique, contenant l'anode au bas des tubes par des godets contenant chacun son électrode pour chaque tube. Le remplissage des godets par le tampon de migration se fait par un système de vases communicants. Deux ml de tampon sont introduits dans chaque godet grâce à une pompe péristaltique commandée de manière temporisée (Voir figure 2).

Le retrait des fractions protéiques commence lorsque le bleu marqueur de la migration se trouve au bas du tube presque en contact avec le tampon. Le recueil des fractions protéiques est réalisé grâce à un collecteur de fractions multiples simultanés que nous avons mis au point. A la fin de l'électrophorèse, les équivalents protéiques de chaque fraction sont déterminés au spectrophotomètre UV à 280 nm. La courbe d'étalonnage a été faite par rapport à une gamme de concentrations de lysosyme.

E.2. Filtration sur gel de Séphadex

Pour séparer selon le poids moléculaire les protéines contenues dans les bandes d'électrophorèse des filtrats de champignons et des diffusats de plantes recueillies selon la méthode préparative d'électrophorèse, nous avons procédé au tamisage moléculaire de ces fractions protéiques sur gel d'agarose. La filtration des extraits protéiques sur une colonne de Séphadex appropriée permet le fractionnement des molécules de ces extraits selon leur volume et leur masse moléculaire qui détermine la vitesse de migration dans la colonne.

Les grosses molécules ne pénètrent jamais dans les pores du gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites y pénètrent au contraire et se déplacent alors lentement.

A chaque gel correspond un domaine de fractionnement dont l'intervalle de masse moléculaire correspond à sa zone de séparation.

Après concentration au Rotavapor Buchi, les fractions recueillies par électrophorèse sont introduites dans une colonne de Séphadex G.75.

Cette colonne équilibrée dans de l'eau distillée contenant du SDS à 1 % et du NaN_3 à 0,02 %, permet la séparation des protéines dont les masses moléculaires se situent entre 6 000 et 40 000 daltons.

Les concentrations des protéines ainsi séparées sont déterminées par le spectrophotomètre.

F - METHODES IMMUNOLOGIQUES ET SEROLOGIQUES

F.1. - L'hypersensibilité retardée chez la souris

L'introduction d'un antigène dans un animal provoque au sein de cet animal un ensemble de réactions immunitaires qui sont soit cellulaires, soit humorales. Les réactions cellulaires correspondent à l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'antigène immunisant et leur mémoire est mise en place lors de ce premier contact. Lors d'un second contact, les lymphocytes T cytotoxiques détruisent les cellules ayant pris en charge l'antigène et produisent une inflammation. Cette inflammation est maximale 24 heures après ce second contact d'où le nom d'hypersensibilité retardée.

Nous avons utilisé cette réponse sur des souris pour l'étude de la spécificité des protéines des plantes et des champignons.

Les travaux de PARISH et LIEW (1972) définissent les conditions favorisant la manifestation de la réaction d'hypersensibilité retardée :

- immunisation avec des antigènes à faible dose
- immunisation par la voie sous cutanée

F.2. - L'immunisation

a) Méthode directe

Cent microlitres d'extraits protéiques de plantes ou de champignons recueillis en électrophorèse selon la méthode préparative sont injectés quotidiennement pendant 5 jours à des souris mâles de la lignée SWCF 30 fournies par le Centre d'élevage Janvier (ST BERTHEVIN MAYENNE). Les injections ont lieu par la voie sous cutanée au niveau du cou.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé le Cyclophosphamide ou Endoxan sur les souris pour augmenter la réponse immune de ces souris. Cet antibiotique a la propriété d'inhiber la réaction des lymphocytes supprimeurs, améliorant ainsi l'expression de la réponse (AKIO *et al*, 1976). L'antibiotique utilisé à la dose de 50 mg/kg de souris est injecté intrapéritonéalement 48 heures avant le début de l'immunisation.

Nous avons utilisé des doses définies de protéines que nous préciseront ultérieurement dans la présentation des résultats compte tenu de leur variabilité selon les expériences. Dans tous les cas, les protéines sont diluées dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7 avant leur injection dans les souris

b) La double immunisation

Les travaux de PARISH et LIEW (1972) montrent que certaines doses d'antigènes entraînent la réaction de tolérance chez l'animal immunisé. Cette réaction ne signifie pas que l'animal ne reconnaît pas l'antigène qui a servi à l'immuniser mais que cette reconnaissance se traduit par une inhibition spécifique des réponses cellulaires et humorales de rejet. Nous avons utilisé cette propriété pour comparer les fractions protéiques des plantes traitées. Dans un premier temps l'immunisation se fait avec une dose tolérogène d'une bande protéique donnée. Après les 5 injections quotidiennes suivie d'une révélation d'épreuve s'avérant négative, cet antigène est remplacé par un autre, supposé très voisin, injecté à une dose de l'ordre de 10 à 100 fois inférieure à la première (BARAKAT, 1985) et cette nouvelle immunisation est réalisée en 5 fois également. Les doses seront précisées pour chaque expérience.

F.3. - La révélation

Elle a lieu 48 heures après la dernière injection immunisante, avec les solutions protéiques des plantes ou des parasites précipitées au TCA et reprises dans du tampon Tris-HCl pH 6,8.

Cinquante microlitres de solution protéique sont injectés dans les bourrelets plantaires d'une patte postérieure de chaque souris. Dans l'autre patte, servant de témoin, la même quantité de tampon Tris-HCl est injectée. Cinq souris constituent les 5 répétitions de chaque traitement.

L'hypersensibilité est évaluée 24 heures après la révélation par la mesure du gonflement de chaque patte à l'aide d'un micromètre de précision (Mitutoyo) à affichage digital. La technique qui consistait à couper les pattes des souris pour les peser et mesurer (KITAMURA, 1980) après les avoir sacrifiées, a été éprouvée puis abandonnée.

Les souris sont introduites dans un tube de contention de 15 cm de long et 3 cm de diamètre ayant une ouverture latérale permettant l'accès aux pattes postérieures en tirant sur la queue et en la maintenant le long de la paroi externe du tube.

Nous avons utilisé le *t* de Student pour l'interprétation des résultats en complément du calcul des intervalles de confiance sur les données (différence en mm entre patte traitée et patte témoin). L'intervalle de confiance permet la comparaison entre pattes traitées et témoins et donc la détermination de la positivité d'une réponse, le test de Student ou l'analyse de la variance, parfois pratiquée, permettent de comparer entre eux des traitements révélateurs par divers antigènes.

F-4 L'immunodiffusion

Sur certains lots de souris les sérums ont été prélevés à l'issue des expériences. Les antigènes constitués par les précipités protéiques des diffusats des feuilles ou des filtrats de culture des champignons dissouts dans du tampon Tris-HCl pH 6,8 ont ainsi pu être comparés par la double diffusion en gélose selon OUCHTERLONY (1958). Le milieu de diffusion, repris chez SAYED *et al*, (1976), est composé de 2% d'agar noble dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,1, contenant 0,02% d'NaN₃ pour prévenir les contaminations. L'incubation est réalisée à la température du laboratoire, les lignes de précipitation apparaissent après quelques jours progressivement, le résultat final est enregistré après environ 2 semaines.

DEUXIEME PARTIE :

**ETUDE DES POSSIBILITES D'AMELIORATION DE LA
LUTTE
CONTRE LA MALADIE DES TACHES BRUNES DU NIEBE
AU BURKINA-FASO**

CHAPITRE I :

**UTILISATION DU PELTAR DANS LA LUTTE CONTRE
LA MALADIE DES TACHES BRUNES DE NIEBE**

INTRODUCTION

Comme son nom l'indique, cette maladie se traduit par la formation de taches brunes sur les tiges, les gousses et les graines de niébé. Les symptômes sur feuilles sont rares. Le pathogène contamine les semences qui transmettent alors la maladie à la génération suivante. Les premiers symptômes apparaissent sur les plantules au niveau du sol (collet) (EMECHEBE et Mc DONALD, 1979) et comme dans les cas de l'antracnose du piment due au même pathogène, il se développe alors sur les plantules mortes des fructifications et des spores du champignon qui constituent une source potentielle d'inoculum pour la propagation de la maladie au champ (GROVER et BANSAL, 1970).

EMECHEBE (1981) montre que le semis de graines saines pourrait constituer une méthode simple pour contrôler la maladie et ceci en relation avec le rôle important joué par les infections primaires dans la propagation.

A - CHOIX DU PELTAR

Nous avons entrepris en 1983 de vérifier si l'utilisation de semences saines de niébé constitue effectivement un des meilleurs moyens de lutte grâce au traitement par un fongicide, de semences contaminées ou non. Plusieurs auteurs ont montré l'efficacité de quelques fongicides sur *C. capsici* (GROVER et BANSAL, 1970 ; KADU *et al.*, 1977 ; CHAUHAN et DUHAN, 1977).

Le choix du Peltar comme fongicide s'explique par son utilisation dans la lutte contre l'antracnose du haricot due au *Colletotrichum lindemuthianum* et par le fait qu'il renferme 2 matières actives (manèbe + Thiophanate-méthyl). Le manèbe, fongicide de contact constitue un bon moyen de limiter les risques d'apparition de résistance liée à l'utilisation de Thiophanate-méthyl, fongicide systémique devant assurer une protection durable de la plantule. Si le produit s'avérait efficace, son utilisation à long terme entrainerait moins aisément le phénomène de résistance du pathogène, comme c'est le cas pour plusieurs champignons, dont plusieurs espèces de *Colletotrichum* (TU et Mc NAUGHTON, 1980 ; REDDY *et al.*, 1981). L'efficacité du Peltar a été appréciée par une démarche qui a comporté 3 étapes.

B - EFFET DU PELTAR SUR LA CROISSANCE *in vitro* DU *C. CAPSICI*

Quatre doses du fongicide plus un témoin ont été utilisées pour leurs effets sur la croissance du pathogène.

Les quantités nécessaires de Peltar ont été introduites de manière stérile dans le milieu de culture gélosé B avant de le couler en boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Un explantat mycelien de 6 mm de diamètre provenant d'une culture âgée d'une semaine environ est déposé au centre de la boîte et les boîtes sont mises à l'étuve à la température de 30° C avec 4 répétitions par traitement (les doses utilisées ont été 0, 10, 100, 200, 500 ppm de m.a.) Les isolats issus du niébé C. 2017 et CTN ont servi dans cette étude. Nous avons mesuré la croissance radiale des isolats tous les jours pendant une semaine.

Tableau IV Effets du Peltar sur la croissance *in vitro* de deux isolats de *Colletotrichum capsici* sur milieu gélosé B à 30°C

SOUCHES	TRAITEMENTS	CROISSANCE radiale (mm) ± IC seuil 0,05
C 2017	Témoin 0 ppm	32 ± 2,52
	10 ppm	0
	100 ppm	0
	200 ppm	0
	500 ppm	0
CTN	Témoin 0 ppm	27,75 ± 0,76
	10 ppm	2,33 ± 1,58
	100 ppm	0
	200 ppm	0
	500 ppm	0

Toutes les doses du produit ont un effet inhibiteur sur la croissance des 2 isolats sauf pour l'isolat CTN où on note une très faible croissance à 10 ppm. Les doses 100 et 200 ppm ont été retenues pour une étude de l'effet du Peltar sur la germination des semences de niébé contaminées par le *C. capsici*.

C - EFFET DU PELTAR SUR LA GERMINATION DES SEMENCES DE NIEBE CONTAMINEES PAR LE *C. CAPSICI*

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour le traitement des semences :

- pralinage

- trempage durant un temps relativement court.
- imbibition des semences

Le Thiophanate méthyl étant un systémique, l'imbibition des semences semble être la voie la plus indiquée pour une meilleure activité du produit. Nous avons adopté cette méthode.

Première expérience

Nous avons trempé les graines de la variété KVX-30-351-3K totalement contaminées par le pathogène après dissolution du Peltar dans de l'eau. Les concentrations de 100 et 200 ppm ont été utilisées avec un traitement témoin. Le semis intervient aussitôt après le trempage des graines pendant une nuit et est réalisé dans un mélange tourbe-vermiculite sans séchage préalable. Deux semaines après le semis, les résultats suivants ont été enregistrés.

Tableau V Effet du Peltar sur la germination de graines de niébé contaminées par *C. capsici*

	0 ppm		100 ppm		200 ppm	
	(%)		(%)		(%)	
Nombre de graines semées	72	(100)	72	(100)	67	(100)
Nombre de graines germées	0	(0)	12	(17)	30	(45)
Nombre de plantules saines	0	(0)	7	(10)	20	(30)

On remarque que le produit permet la germination d'environ la moitié des graines fortement attaquées et que l'effet escompté est lié à la concentration. L'effet se prolonge sur les deux tiers des plantes ayant réussi la germination. On peut penser que les graines trop contaminées ont été tuées avant la levée. Cette hypothèse est très probable eu égard aux symptômes qu'elles présentaient (coloration brun pourpre ou brun noir).

Deuxième expérience

Nous avons repris la même expérience avec 2 variétés de niébé présentant des états sanitaires différents. La première KVX-30-351-3K possède des graines contaminées à 100 % par *C. capsici* et la seconde IAR-48 présente des graines apparemment indemnes du pathogène. L'état sanitaire de nos semences a été vérifié par une analyse sanitaire. L'objectif visé dans cette deuxième expérience par l'utilisation des semences saines

est de voir si le Peltar n'a pas un effet négatif sur la faculté germinative de ces semences. Quinze graines ont été semées par pot pour chaque traitement avec 3 répétitions par traitement.

Les observations ont porté sur le nombre de plantules levées 1, 2 et 3 semaines après le semis.

Le nombre total de plantules vivantes pour les 2 variétés en fonction des doses du fongicide durant ces 3 semaines figure dans le tableau ci-dessous.

Tableau VI Effet global du Peltar sur la germination et la croissance du niébé issu de graines contaminées ou non par *C. capsici*

Variétés	Doses de fongicide									Total			
	0 ppm			100 ppm			200 ppm			1	2	3	
	Semaines	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
IAR 48		29	37	36	25	39	37	36	45	43	90	121	116
KVX 30 351-3K		8	1	0	23	21	22	21	19	21	52	41	43

L'observation des totaux pour chaque variété permet de constater que le maximum de plantules dans nos conditions expérimentales est observé 2 semaines après le semis avec la variété IAR-48. Le taux de germination à cette période est de 89,62 % (121/135). Trois semaines après le semis, le taux des plantules saines représente 80 % par rapport au nombre total de graines semées (116/135).

Si on observe les résultats obtenus avec la KVX-30-351-3K, on constate un faible pourcentage de germination à la première semaine (52/145). A la troisième semaine, nous n'avons plus que 43 plantules saines. Ces résultats concordent avec ceux d'EMECHEBE (1981) qui montre que l'utilisation de semences contaminées donne des plantules malades ou annule la germination.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux résultats de la troisième semaine portant sur le nombre de plantules saines pour tenter de déceler un éventuel effet secondaire du Peltar sur la germination et la croissance du niébé (Tableau VII).

L'analyse statistique de ces résultats permet de montrer que, dans la variété non contaminée, le Peltar n'a aucun effet sur la germination des semences. En effet, le taux moyen de germination des 3 niveaux de traitement qui est de 86 % n'est pas significativement différent du taux de

germination normal des semences de cette variété (80 à 90 %).

Tableau VII Effet du Peltar sur la germination et la croissance de plantules de niébé trois semaines après le traitement de semences.

Doses (ppm)	Variété I A R 48				Variété K V X 30 351-3K			
	0	100	200	Total	0	100	200	Total
Répétitions								
1	10	11	14	35	0	9	12	21
2	12	15	15	42	0	7	5	12
3	14	11	14	39	0	6	4	10
Total	36	37	43	116	0	22	21	43

Dans la variété contaminée, on retrouve environ la moitié des plantes sauvées par les traitements 100 et 200 ppm. Ceci constitue une répétition des résultats de la première expérience.

Conclusion :

Le Peltar a une action défavorable sur la croissance des isolats de *C. capsici* agent de la maladie des taches brunes du niébé. Il permet ainsi à faibles concentrations de sauver 50 % de plantules issues de semences gravement contaminées par le pathogène.

Ces quelques observations intéressantes nous ont poussé à voir son effet au champ car les résultats du laboratoire ne vont pas toujours dans le même sens que ceux observés dans la culture ne serait-ce que parce que la semence n'est pas la seule source d'inoculum possible.

D - EFFET DU PELTAR DANS UN ESSAI AU CHAMP

Cette étude a commencé en 1983 à la Station de Kamboinsé en utilisant une variété de niébé reconnue sensible à la maladie des taches brunes et plusieurs doses de Peltar en traitement des semences. Dans un premier essai la germination des semences a été très mauvaise en raison de la durée trop longue de traitement des graines si bien que nous n'avons pas enregistré de résultats. Pendant ce traitement des bactéries se sont développées entraînant sous le climat tropical une forte altération de la faculté germinative. Durant la campagne 1984, la même expérience a été reprise avec les doses suivantes :

n° du traitement	Doses de Peltar:
1	: 0 ppm de matière active (témoin)
2	: 100 ppm de m.a.
3	: 200 ppm de m.a.
4	: 500 ppm de m.a.

Environ cinq cents graines de niébé ont été trempées pendant une heure dans 400 ml d'eau contenant les différentes concentrations du fongicide. Puis les graines ont été retirées de la solution, mises à sécher avant d'être semées. La variété utilisée est la IT 82 E-77.

Quatre lignes de 4 mètres de long chacune ont été utilisées par traitement avec une ligne infestante intercalaire entre chaque traitement. Chaque traitement a été répété 3 fois. Le semis des lignes infestantes est intervenu le 20 juillet 1984 suivi 2 semaines plus tard (3 Août 1984) de celui des lignes expérimentales. La densité de semis observée était de 50 cm entre les lignes et 50 cm entre les poquets avec 2 graines par poquet. Le démariage à un plant par poquet des plants des lignes expérimentales est intervenu après la levée.

Les résultats enregistrés portent sur l'influence du Peltar sur le peuplement, le degré de sévérité de la maladie et sur le rendement.

Tableau VIII Influence du Peltar en traitement de semences sur le peuplement issu d'un lot de semences d'une variété de niébé sensible à *C. capsici*

TRAITEMENTS	Nombre de plantes dans les deux lignes centrales				
	Répétition	1	2	3	TOTAL
0 ppm		10	11	18	39
100 ppm		18	12	18	48
200 ppm		18	13	18	49
500 ppm		17	18	18	53

D.1. - Influence sur le peuplement (Tableau VIII)

Les résultats de la troisième répétition montrent que quel que soit le niveau de traitement, il peut n'exister aucune différence. (18 plantes pour un maximum de 18). Ceci peut s'expliquer par le fait que la

pluviométrie a été très défavorable après la mise en place de l'essai. Le niveau de contamination à partir des graines infestées est resté assez bas et surtout très hétérogène. Le calcul des limites des intervalles de confiance au seuil 0,05 sur les pourcentages de peuplement des plantes en fonction des traitements permet de conclure que seul le traitement de 500 ppm diffère du témoin (Tableau IX) par un meilleur pourcentage de peuplement.

Tableau IX - Pourcentages moyens de peuplement et leur limites de confiance sur un lot de semences de niébé traité au Peltar

TRAITEMENTS	Pourcentages moyens de PEUPEMENT	Limites des Intervalles de CONFIANCE (seuil 5%)
0 ppm	72,22	58 - 83
100 ppm	88,88	79 - 95
200 ppm	90,70	80 - 97
500 ppm	98,14	90 - 99

D.2. - Effets sur le rendement (Tableau X).

Tableau X - Effet de différentes doses de traitement des semences au Peltar sur deux composantes du rendement d'une variété de niébé semée sur des parcelles infestées par *C. capsici*.

N° des BLOCS	Doses des TRAITEMENTS	Poids des gousses par plante (en g)	Poids des graines par plante (en g)
1	Témoin 0 ppm	11	7,9
	100 ppm	10,4	5,7
	200 ppm	7,2	5,4
	500 ppm	15,1	8,4
2	Témoin 0 ppm	18,2	13,1
	100 ppm	27,1	18,2
	200 ppm	8,8	6,2
	500 ppm	13,8	8,3
3	Témoin 0 ppm	18,8	12,5
	100 ppm	21,6	14,9
	200 ppm	15,3	8,7
	500 ppm	20,5	13,6

Le rendement a été estimé à la récolte (17-10-84) par la mesure du poids des gousses et des graines récoltées sur les plantes des 2 lignes centrales de chaque traitement (Tableau X).

L'analyse de variance sur ces résultats (Tableau XI) montre qu'il n'y a aucun gain de poids par plante sous l'effet du traitement fongicide.

Tableau XI - Résultats de l'analyse de variance correspondant aux données du Tableau X

Variation	F calculé	F théorique	Signification
Blocs	4,193	5,14	N S
Variétés	2,61	4,76	N S

Une hypothèse peut être avancée pour expliquer ces résultats. On peut penser que l'effet systémique du produit est de courte durée si bien qu'il n'empêche pas la manifestation de la maladie sur les gousses à leur maturité comme ce fut le cas dans cet essai.

Cependant, l'examen détaillé des résultats révèle que le traitement 200 ppm est particulièrement dépressif sur les composantes du rendement dans toutes les répétitions. Cet effet ne se manifestant pas pour le peuplement, comme nous l'avons vu précédemment, il convient de s'interroger sur les causes possibles de cet échec.

Une cause pathologique semble peu probable au vu des bons résultats sur le rendement par parcelle des doses 100 ppm et 500 ppm. Il faut plus probablement incriminer un mauvais séchage des graines après le traitement pour le lot 200 ppm ou une mauvaise température de traitement ce qui aurait conduit à une altération des conditions physiologiques du développement des plantes.

En comparant les indices de rendement par parcelle obtenus en multipliant les poids de gousses et de graines par plante, par les nombres de plantes récoltées on peut apprécier l'effet des traitements fongicides des semences sur le rendement (Tableau XII).

Les augmentations de rendement liées aux traitements peuvent être considérables, particulièrement pour la dose de traitement la plus faible. Cependant, il convient de souligner un effet indésirable du Peltar qui semble augmenter en fonction de sa dose d'emploi et de manière importante (+ 15 à + 25 %) la part des cosses dans le rendement total par parcelle.

Tableau XII-Effet d'un fongicide (Peltar) en traitement de semences sur les rendements moyens par parcelle en gousses (cosse+graine) et graines et sur la part des cosses.

		Doses du traitement des semences au Peltar			
		Témoin 0	100 ppm	200 ppm	500 ppm
Poids des gousses	Rendement moyen en g/parcelle	216,2	300,4	173,1	291,4
	% du témoin	100	139	80	135
Poids des graines	Rendement moyen en g/parcelle	149	196,4	111,5	179
	% du témoin	100	132	75	120
Part des cosses	Poids / parcelle	67,2	104	61,6	112,4
	% du poids des gousses / parcelle	31	34,6	35,6	38,6

L'examen de la proportion moyenne des cosses par plante dans les divers traitements et répétitions confirme l'observation précédente (tableau XIII).

Tableau XIII - Importance relative des cosses par plante pour divers traitements de semences de niébé par le Peltar

Traitements	Blocs	Poids moyen de cosse / plante				Pourcent du poids des gousses
		1	2	3	Moy.	
Témoin 0 ppm		3,1	5,1	6,3	4,8	30
100 ppm		4,7	8,9	6,7	6,8	34,5
200 ppm		1,8	2,6	6,6	4,3	41,3
500 ppm		6,7	5,5	6,9	6,4	38,8

Le traitement par 200 ppm de Peltar a donc un effet secondaire négatif en faisant augmenter la part des cosses de plus de 35 % ($11,3/30=0,38$). Cette observation est à rapprocher des propriétés de régulateur de croissance des benzimidazoles le produit actif du Thiophanate étant le B M C (Benzimidazole carbamate). Aux doses employées l'effet indésirable

pourrait être une diminution de la fécondité, induite par la présence du produit systémique dans la jeune plante au moment de l'induction florale.

E - Conclusion

Le Peltar (Manèbe + Thiophanate-méthyl) est un fongicide très efficace inhibant la croissance de *C. capsici* pathogène responsable de la maladie des taches brunes du niébé. Agissant à faible dose (< 500 ppm) en traitement des semences, il peut être recommandé dans la lutte contre le pathogène car il améliore la germination des semences contaminées permettant une augmentation de rendement grâce à une meilleure densité de peuplement des plantes au champ.

Cependant, pour envisager une protection efficace contre le développement de l'épidémie au cours de la saison il conviendrait de faire au moins un traitement complémentaire en cours de végétation. Une étude des effets secondaires liés aux doses d'emploi serait en outre nécessaire avant de préconiser le fongicide car nous avons pu observer une diminution importante de la part des graines dans la récolte pour les doses les plus élevées.

**CHAPITRE II : ETUDE DE LA RESISTANCE VARIETALE DU NIEBE
CONTRE LA MALADIE DES TACHES BRUNES**

INTRODUCTION

Les expériences précédentes nous ont permis de conclure que le Peltar pouvait être recommandé en traitement des semences de niébé contre *C. capsici*, car en réduisant les dégâts sur jeunes plantules, il permet une augmentation du peuplement des plantes au champ. Le produit n'empêche cependant pas la manifestation ultérieure de la maladie sur les gousses, il serait plus intéressant de combiner ce traitement fongicide à l'emploi de variétés ayant un niveau de résistance acceptable.

A la suite du signalement de la maladie des taches brunes du niébé au Nord Nigéria et au Burkina-Faso, ALLEN *et al.*, (1981) ont mis au point une échelle de notation permettant l'identification de variétés résistantes au champ.

En 1983, nous avons entrepris une étude portant sur la comparaison du comportement de 9 variétés de niébé face à la maladie des taches brunes. Nous avons utilisé la même méthode d'évaluation qu'ALLEN *et al.* (1981). Cet essai a été implanté à Kamboinsé.

Parallèlement à ces travaux et en vue de trouver une technique rapide de criblage des variétés de niébé, nous avons mené au Laboratoire des études d'inoculation sur plantules en serre. Une corrélation entre ces derniers résultats et ceux du champ est cherchée.

A - ESSAI AU CHAMP

L'essai a été implanté le 4 juillet 1983 par le semis des lignes infestantes de bordure. Les graines de la variété KVX-30-351-3K ont été utilisées pour ce semis. Les lignes expérimentales ont été semées 3 semaines plus tard mais le semis a dû être repris 10 jours plus tard à cause d'une mauvaise levée liée à la sécheresse. Cet essai comporte 2 répétitions. L'évaluation de la maladie est intervenue à la maturité des gousses le 1er Octobre 1983 soit deux mois après le semis.

Nous avons calculé les indices moyens des différentes variétés selon la formule de la page 21. Le calcul a porté sur un total de 18 plantes possibles par variété et par répétition. Dans les parcelles où il manquait des plantes à la maturité, les manquantes ont été affectées de la note maximale de sévérité (5) car elles sont mortes à la suite d'attaques très précoces. Le tableau XIV permet de comparer les variétés d'après les indices moyens après la transformation angulaire.

Tableau XIV Evaluation à la maturité des gousses de la sensibilité de 9 variétés de niébé vis-à-vis la maladie des taches brunes. Indices de maladie après transformation arc-sinus. Expérimentation à la station de KAMBOINSE au BURKINA FASO

VARIETES	ARC-SINUS INDICE DE MALADIE		
	Bloc N° 1	Bloc N°2	Moyenne
TVU 2027-1-11	90	90	90
KVX 30_351_3K	76,46	80,43	78,44
SUVITA-2	31,85	47,40	39,62
TVX 3236	29,08	38,68	33,88
MOUGNE	30	35,68	32,84
IAR-48	30	33,74	31,87
VITA-4	39,70	22,02	30,86
TVX 1999-01F	32,79	23,75	28,27
KN1	28,17	21,16	24,66

L'analyse de variance correspondant aux données du tableau XIV montre que les différences entre les variétés sont hautement significatives.

	F calculé	F théorique	
Variation Blocs:	0,024	5,32(5%)	N S
Variation Variétés:	21,44	6,03(1%)	H S

La comparaison des moyennes (test de DUNCAN) a permis d'obtenir le classement suivant :

TUV 2027-1-11 = KVX-30-351-3K différent de:

KN-1-TV X 3236-VITA-4-TVX 1999-01F-IAR-48-Mougne-Locale Gorom.

Il ressort en conclusion de ce premier travail réalisé lors de la campagne pluvieuse 1983 à Kamboinsé que les variétés TUV 2027-1-11 et KVX 30-351-3K se détachent nettement des autres par une très grande sensibilité à la maladie des taches brunes. Les autres variétés sont plus résistantes et ne se distinguent pas l'une de l'autre.

B - TESTS DU POUVOIR PATHOGENE SUR LES PLANTES EN SERRE

Avant de présenter nos travaux, il est nécessaire de faire le point sur les caractéristiques des souches que nous avons utilisées. Après avoir analysé dans l'étude bibliographique la systématique et la biologie de *C. capsici*, nous donnerons ici les principales caractéristiques culturales de nos souches sur milieux gélosés B et PDA à la température de 30° C. Ces

Tableau XV : Caractères cultureux des isolats de *Colletotrichum* en culture pendant une semaine sur milieu P D A à la température de $28 \pm 1^\circ \text{C}$

Caractères Isolats	Nature du mycélium	Couleur du mycelium	Acervules	Sporulation	Longueur des conidies en μ	Croissance mycélienne
C.2017	Ras	Crème à bordure gris-noir	Petits confluents	Abondante	$24,89 \pm 0,67$	$9,56 \pm 0,22$ mm/jour
CTN	bord ras-Centre cotonneux	Crème à bordure gris-clair	Petit non confluents	Faible	$24,71 \pm 0,76$	$9,11 \pm 0,68$ mm/jour
CPA	Ras	Crème à bordure brun-noir	petits	Faible	$26,95 \pm 0,69$	$7,93 \pm 0,78$ mm/jour

Tableau XVI : Caractères cultureux de isolats de *Colletotrichum* après culture d'une semaine sur milieu gélosé B à la température de 30°C

Caractères Isolats	Nature du mycelium	Couleur du mycelium	Acervules	Sporulation	Longueur des conidies (μ)	Croissance mycélienne
C. 2017	Ras	Bord crémeux Masse conidienne rosée	Petits confluents	Abondante	Voisine de 26,6	$9,94 \pm 0,61$ mm/jour
CTN	Bord ras-Centre cotonneux	Masse conidienne rosée Mycelium gris	Grands en glomérules	Abondante	" " "	$9,41 \pm 0,35$ mm/jour
CPA	Aérien	Masse conidienne rosée Mycelium légèrement rosé	Grands en glomérules	Moyenne	" " "	$8,94 \pm 0,88$ mm/jour
P2	Bord ras-Centre cotonneux mais pas dense	Masse conidienne rosée Mycelium rosé	Grands en glomérules	Moyenne	" " "	$8,41 \pm 0,75$ mm/jour
P3	Bord ras-Centre cotonneux mais pas dense	Masse conidienne rosée Mycelium rosé	Grands en glomérules	Moyenne	" " "	$9,97 \pm 0,90$ mm/jour

caractères sont ceux utilisés par d'autres auteurs (BANNEROT, 1965; RAYNAL, 1970 ; LOURD *et al.*, 1979) dans des études de divers isolats de *Colletotrichum*.

Signalons que *Colletotrichum capsici* (Syd.) BUTLER et BISBY et *C. truncatum* (Schw.) sont les 2 espèces impliquées dans la transmission de la maladie des taches brunes du niébé (EMECHEBE et McDONALD, 1979).

Colletotrichum truncatum provoque une forme très modérée de la maladie entraînant un taux de contamination des semences de 0 à 7% alors que cette proportion atteint 100% par *C. capsici* pour un lot de semences présentant les symptômes de la maladie (EMECHEBE et McDONALD, 1979). Une troisième espèce de *Colletotrichum* que l'on trouve sur le niébé est *C. lindemathianum* dont les manifestations au champ sont différentes de celles dues au *C. capsici* (EMECHEBE, 1981) et qui donne essentiellement une maladie des tiges dans les régions de culture de la plante à forte pluviométrie (ONESIROSAN et BARKER, 1971).

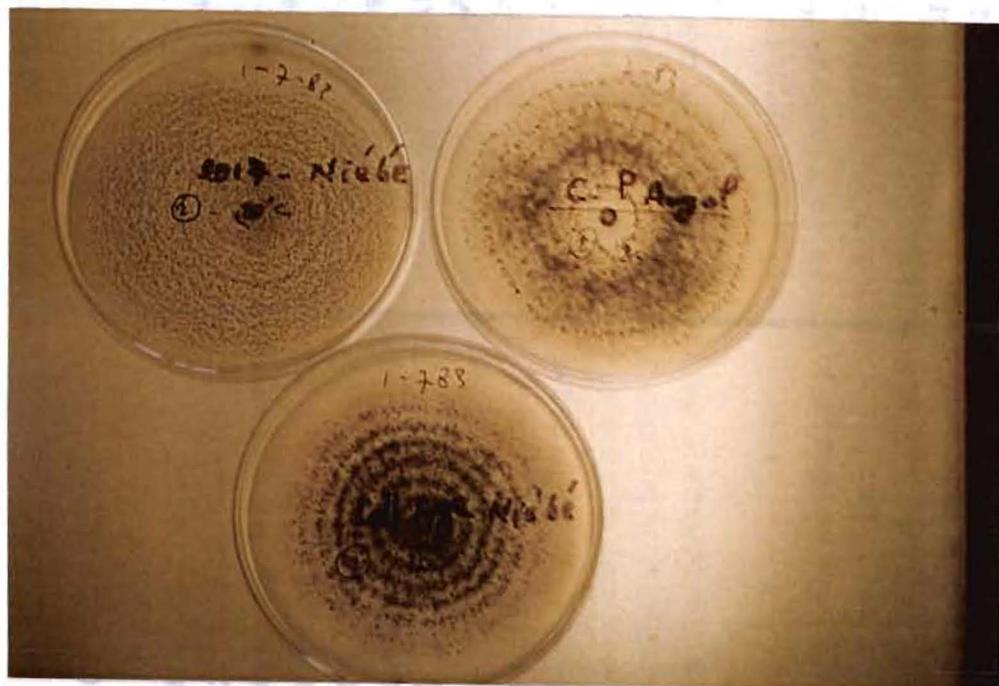
B.1. - Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats

C 2017 et CTN isolats issus de niébé présentent des différences morphologiques importantes aussi bien sur milieu gélosé B que sur PDA. Les principaux caractères culturels que nous avons notés pour ces 2 isolats figurent dans les tableaux XV et XVI. Dans le tableau XVI figurent également les descriptions d'isolats de *C. capsici* issus du pois d'Angole et du piment. Comme LOURD *et al.* (1979) dans une étude des caractéristiques morphologiques et culturales d'isolats de *C. gloeosporioides* (PENZ) agents d'antracnose en Côte d'Ivoire, nous remarquons la grande variabilité morphologique de nos différents isolats (voir photo).

La température maximale de croissance qui est souvent un critère principal dans la détermination des espèces de *Colletotrichum* (LOURD *et al.*, 1979) et autres espèces de champignon (VALAVEILLE, 1983) ne permet pas la séparation des 2 isolats de niébé. Ils ont leur optimum de croissance diamétrale voisine de 9 mm/jour à la température de 28 +/- 1° C sur milieu PDA. Cette croissance est ralentie à 25° C (voisine de 6 mm/jour) et plus nettement à 35° C (4 mm/jour). Sur milieu gélosé B, l'optimum de croissance avoisine 9,5 mm/jour et se situe à 30° C.

Du point de vue dimensions de spores, il est également difficile de séparer les 2 isolats de niébé. Leurs spores ainsi que les spores des autres isolats de *C. capsici* font entre 24 et 26,6µ de long.

L'isolat C. 2017 diffère essentiellement de l'isolat CTN par la couleur rosée de sa masse conidienne dès le 2ème jour de culture avec un



Isolats C.2017, C P A, C T N de *C. capsici*



Résultats d'inoculation des plantes de la variété TVU 2027-1-11 par les spores des isolats C.2017, C P A et C T N de *C. capsici*.

nombre important d'acervules et de spores. La sporulation est moins importante pour CTN et la masse conidienne apparait plus tard. L'isolat C. 2017 possède les différentes caractéristiques morphologiques et culturales données par EMECHEBE (1981) dans la description du *C. capsici*, principal agent pathogène de la maladie des taches brunes au Nord Nigéria. Aussi nous l'avons classé comme *C. capsici*.

Le deuxième isolat (CTN) bien que ne présentant pas les mêmes caractéristiques culturales que C. 2017 est probablement une souche de *C. capsici*. En effet, le test de pathogénécité avec ces 2 isolats plus l'isolat C.P.A. sur la variété TVU 2027-1-11 montre la grande agressivité de CTN par rapport à C. 2017 (voir photo). CTN étant plus agressif que C. 2017 est loin d'être un *C. truncatum* car ce pathogène ne provoque que des symptômes très modérés sur niébé (EMECHÉBE et Mc DONALD, 1979). Il convient également de souligner que ces 2 isolats de niébé ne répondent pas à la description de *C. lindematianum* (ONESIROSAN et BARKER, 1971) qui a des spores plus petites, 12-20 x 4,1-5,8µ.

B.2. - Mesure du pouvoir pathogène sur les plantes en serre

a) Choix d'une méthode d'inoculation

Une des techniques les plus utilisées en conditions contrôlées pour l'inoculation des plantes par les *Colletotrichum* est la pulvérisation fine sur ces plantes, d'une suspension dans l'eau, de conidies obtenues à partir de culture pures (RAYNAL, 1977, CARUSO et KUC, 1977 ; SUTTON DAVID, 1979 ; EMECHÉBE, 1981). Dans les cas de relations hôte parasite où les *Colletotrichum* provoquent des symptômes facilement quantifiables sur feuilles, la technique d'inoculation sur feuilles détachées par des suspensions calibrées de spores du pathogène est très souvent utilisée, par exemple pour le couple concombre/*Colletotrichum lagenarium* (KUBO *et al.*, 1980).

EMECHÉBE (1981) montre que les inoculations artificielles sur tiges et feuilles de plantes de niébé cultivées en serre, âgées de 4 semaines en utilisant des suspensions de spores (5 x 10⁵ spores/ml) et en incubant en atmosphère humide pendant 24 heures, permettent d'obtenir des symptômes identiques à ceux observés au champ sur ces organes. Il est souvent difficile d'obtenir des inoculations homogènes par cette méthode.

Nous avons essayé la technique d'inoculation sur feuilles détachées incubées en chambres humides. Des gouttes calibrées de suspensions de spores (10³-10⁴-10⁵-10⁶ spores/ml) ont été déposées sur les 2 faces de folioles détachées et disposées sur du papier filtre humide dans des boîtes plastiques transparentes. Cette technique est la même

utilisée par ABOU-ZEID (1978) dans l'étude du couple féverole/ *Botrytis fabae*.

Les symptômes que nous avons obtenus après incubation à l'obscurité pendant 24 heures puis exposition à la lumière pendant 72 heures sur ces feuilles détachées ont été difficiles à évaluer. En effet, à la place de taches foliaires bien délimitées, nous avons observé une décoloration brune très diffuse de tout le limbe sans véritable attaque des folioles. Aussi, nous avons utilisé la pulvérisation sur plante entière en serre. Comme EMECHEBE (1981), les premiers symptômes sont apparus 3 jours après inoculation de la variété IAR-48 par une suspension des spores de l'isolat C 2017 à la concentration de 10⁶ spores / ml. Ces symptômes concernent presque exclusivement les tiges.

b) Etude des doses d'inoculum

Dans une première épreuve exploratoire, nous avons effectué les inoculations sur des plants âgés de 3 semaines. Nous avons utilisé 4 doses de suspensions conidiennes sur 10 plants par traitement et 2 répétitions. Au 7^{ème} jour après l'inoculation, une notation des symptômes de chaque plante contaminée a été effectuée. Les résultats enregistrés sont résumés dans la figure 5 où ils apparaissent sous forme de pourcentages de réponses (cf Matériel et Méthodes) avec et sans transformation arc-sinus.

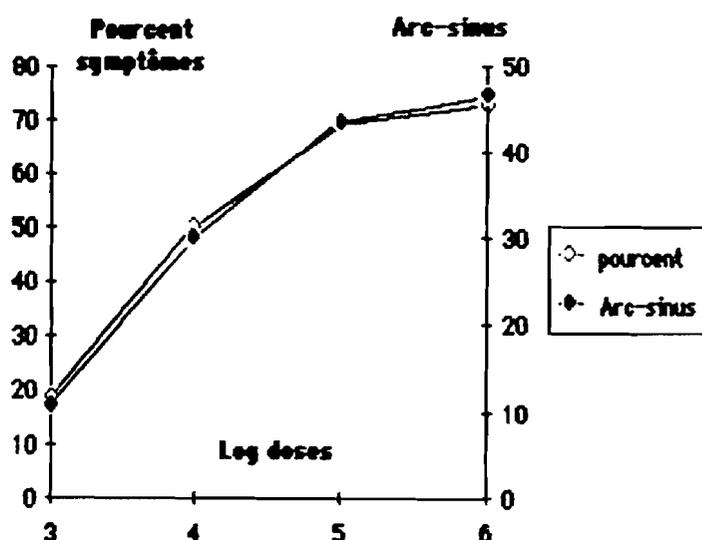


Figure 5 Relations doses- réponses lors de pulvérisations de spores de *Colletotrichum capsici* sur plants de niébé de 3 semaines

Les quantités de symptômes augmentent à peu près proportionnellement aux doses entre 10^3 et 10^5 spores par ml, puis un palier semble être atteint, au moins pour 7 jours d'incubation. La dose 10^5 semble donc la mieux indiquée pour obtenir rapidement des symptômes tout en conservant une réaction normale de l'hôte. Cette dose sera le plus souvent utilisée par la suite.

c) Choix de la période d'incubation avant notation

Sur des lots inoculés par une gamme de doses autour de 10^5 spores par ml et incubés dans des miniserres, des notations de maladie ont été effectuées après 7 et 14 jours d'incubation. Les résultats montrent (figure 6) que les vitesses d'expression varient beaucoup en fonction des doses au cours des deux semaines de l'expérience. La durée d'incubation optimale pour l'obtention du maximum de symptômes avec entre 10^4 et 5×10^5 spores par ml semble être voisine de 2 semaines.

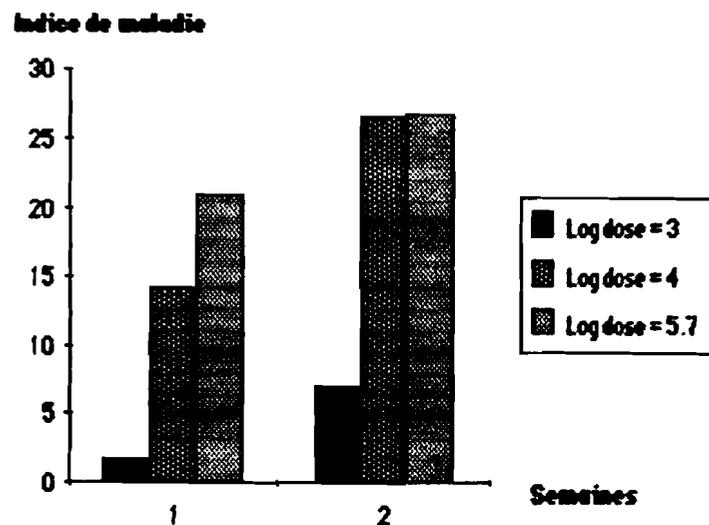


Figure 6 Evolution des symptômes pour deux notations espacées d'une semaine après l'inoculation par trois doses de *Colletotrichum capsici* sur niébé

d) Conditions environnementales après inoculation

Une autre observation que nous avons faite au cours de ces travaux concerne les conditions d'environnement après inoculation artificielle des plantes. Selon que l'on utilise les mini-serres ou la housse plastique, l'importance des symptômes varie. Les indices de maladie sont légèrement plus importants lorsque les plantes sont maintenues en atmosphère humide après inoculation sous housse plastique plutôt que dans les mini-serres. Les housses plastiques maintiennent apparemment plus d'humidité que les mini-serres.

e) Influence de l'état des plantes

Sur les plants de niébé contaminés par le pathogène, le rôle joué par les blessures dans l'expression de la maladie a été étudié. Des lots de diverses variétés ont été inoculés par pulvérisation d'une suspension de spores. Pour la moitié de ces lots les plantes sont privées de leurs systèmes racinaires et maintenues en survie par trempage des bases de tiges inoculées dans l'eau. Les résultats, indices de maladie et effet blessure sont présentés dans le tableau XVII et la figure 7.

Tableau XVII Comparaison de quelques variétés de niébé pour leur sensibilité à *Colletotrichum capsici* et à l'effet blessure.

VARIETES	Plantes entières	Plantes coupées	Différences = Effet blessure
TVU 2027-1-11	47,5	78,75	31,25
VITA-4	38,43	56,25	17,82
IAR-48	7,18	35	27,82
TVX 1999-01F	6,53	16,25	9,72
MOUGNE	3,84	28,75	24,91

Pour les mêmes variétés, les indices de maladie sont plus importants lorsque les plantes sont privées de leurs racines avant d'être inoculées. Les variations se font dans le même sens c'est à dire que les plus résistantes en conditions normales restent en moyenne les plus résistantes après blessures et vice versa. Cependant un comportement particulier est à signaler pour la variété VITA 4 qui dans l'essai au champ s'est montrée plutôt résistante. Dans les conditions de cette expérience sa sensibilité est

voisine de celle de la variété très sensible TVU 2027. Ce résultat pourrait être lié aux conditions *in vitro* ou à un caractère particulier de l'isolat utilisé comme inoculum. Pour TVU 2027 il y a bien conjonction de facteurs défavorables :

- sensibilité au champ
- sensibilité au laboratoire
- effet blessure important

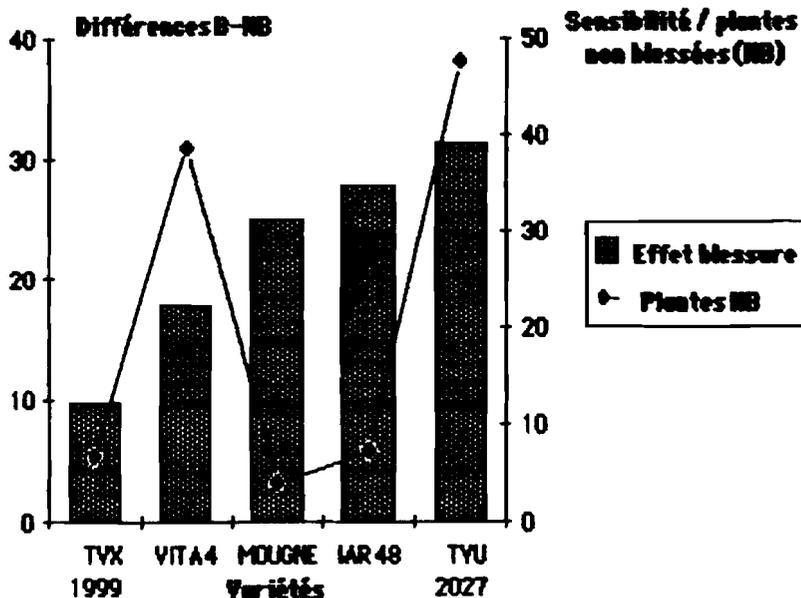


Figure 7 : Comparaison de l'effet blessure et de la sensibilité de cinq variétés de niébé inoculées par *Colletotrichum capsici*

f) Etude de la variabilité du pouvoir pathogène et de la sensibilité variétale

Nous avons donc tenu compte de tous les facteurs analysés précédemment pour l'étude du comportement de quelques variétés de niébé vis à vis de 2 isolats de *Colletotrichum* impliqués dans la manifestation de la maladie des taches brunes. Un troisième isolat provenant du pois d'Angole a été joint aux 2 premiers dans cette étude.

Après inoculation par pulvérisation des tiges et des feuilles, les plantes ont toutes été maintenues en atmosphère humide sous housse plastique. La notation a lieu au quatorzième jour après inoculation selon notre échelle de laboratoire. Pour chacune des 5 variétés, 10 plantes sont utilisées par traitement et chaque traitement répété 3 fois. Pour des raisons techniques, nous n'avons pu utiliser que 5 variétés qui ont été choisies car elles sont très prometteuses du point de vue production au Burkina Faso.

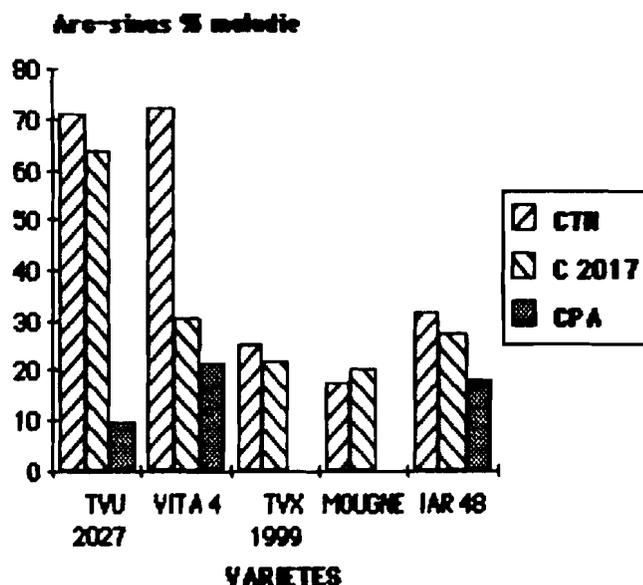


Figure 8 Comparaison de la sensibilité de cinq variétés de niébé vis à vis de trois isolats de *Colletotrichum capsici*. Inoculation par pulvérisation sur plantes de 3 semaines en serre.

La figure 8 illustre les valeurs des indices moyens de maladie (arc-sinus X pourcent) de chaque variété pour les 3 isolats utilisés. L'analyse de variance effectuée sur ces résultats permet de remarquer que les niveaux de pouvoir pathogène des isolats sont différents, de même que les niveaux de résistance des variétés utilisées. L'interaction isolat /variété étant hautement significative, nous avons donc classé les variétés en fonction des isolats utilisés et les isolats en fonction des variétés.

Origine de la variation	F calculé	F 0,05	F 0,01	S?
Blocs	2,15	4,46		NS
Variétés	60,71	3,84	7,01	HS
Isolats	44,26	3,49	5,85	HS
Interaction VxI	8,03	2,45	3,56	HS

Tableau XVIII Classement de l'agressivité de trois isolats de *Colletotrichum* sur cinq variétés de niébé

	VARIETES TVU 2027	VITA 4	TVX 1999	MOUGNE	IAR 48
ISOLATS					
CTN	70,86	72,20 •	24,99	17,45	31,53
C 2017	63,76	30,40	21,75	19,98	27,01
CPA	9,63 •	21,01	0,00 •	0,00 •	17,83

Il ressort du tableau XVIII que quelle que soit la variété utilisée, les souches se classent toujours dans le même ordre. Il n'y a donc pas d'interaction différentielle complète et par conséquent pas de véritable relation verticale. Les variétés TVX 1999-01F et Mougne sont les plus résistantes aux isolats utilisés et présentent une résistance de type horizontal c'est-à-dire probablement stable. Cependant, dans l'analyse de variance l'interaction souche/variété est hautement significative, il convient de se demander pourquoi ? Il est probable que l'introduction d'un isolat provenant du pois d'Angole intervient pour beaucoup dans cette relation. Cette souche n'est pas agressive sur deux variétés. Pour ce qui concerne l'agressivité moyenne des souches nous constatons de très grandes différences entre elles.

Tableau XIX Comparaison des classements de la sensibilité des variétés de niébé par trois isolats de *Colletotrichum*

VARIETES	I S O L A T S		
	C 2017	C TN	C PA
V1 - TVU 2027-1 11			
V2 - VITA 4			
V3 - TVX 1999-01F			
V4 - MOUGNE	V1 63,16 •	V2 72,20	V2 30,40 •
V5 - IAR 48	V5 27,01	V1 70,86	V5 17,83 •
	V3 21,75	V5 31,53 •	V1 9,63 •
	V2 21,01	V3 24,99 •	V3 0,00
	V4 19,98	V4 17,45 •	V4 0,00

La comparaison des isolats issus du niébé et du pois d'Angole permet de constater qu'ils ne classent pas les variétés dans le même ordre. Il y a donc une interaction partielle signifiant l'existence de relation verticale partielle (VAN DER PLANK, 1968). L'isolat C-2017 différencie des 4 autres variétés, la variété TVU 2027-1-11 qui présenterait donc une sensibilité de type vertical. Cette observation est très intéressante car elle recoupe le résultat enregistré lors des études de comparaison variétale au champ. L'isolat CTN permet aussi de différencier la variété TVU 2027-1-11 des variétés TVX 1999-01F, Mougne, et IAR-48 mais pas de VITA-4. Ici encore on note une sensibilité accusée de VITA-4 qui semble bien correspondre à l'existence, dans les populations de *Colletotrichum* d'une assez grande variabilité permettant de s'adapter à diverses variétés ou espèces cultivées.

En ne considérant que les résultats obtenus avec l'isolat C-2017, on peut calculer la corrélation entre les mesures de sensibilité au champ et au

laboratoire sur les cinq variétés éprouvées dans les deux conditions. La corrélation est significative ($r = 0,988$, figure 9) et justifie la proposition d'une épreuve de laboratoire précoce utilisable dans la sélection variétale pour la résistance à *C. capsici*. Soulignons toutefois la nécessité de bien contrôler dans ces expérimentations la représentativité des isolats du champignon utilisés comme inoculum

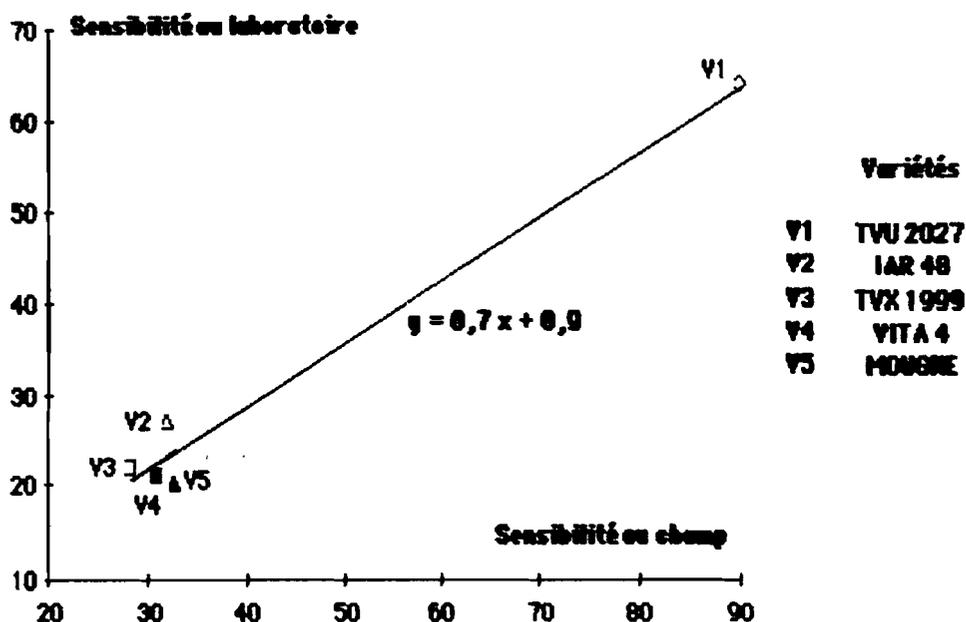


Figure 9 Corrélation entre les mesures de la sensibilité variétale du niébé vis à vis de *Colletotrichum capsici*, au laboratoire sur jeunes plantes de 3 semaines et au champ à la récolte.

En conclusion, les indices de plasticité qui s'expriment dans le pouvoir pathogène des souches de *Colletotrichum* incitent à rechercher des mécanismes de résistance horizontale plutôt que verticale, c'est-à-dire à retenir dans les programmes de sélection des plantes moins sensibles mais jamais de plantes indemnes. La bonne corrélation qui existe entre les résultats au champ sur plantes adultes et au laboratoire sur plantes de 3 semaines autorisera un criblage rapide des variétés tout en permettant le contrôle des conditions expérimentales et la recherche de caractères de résistance partielle différents et additifs (effet blessure, effet radiation, sporulation...)

TROISIEME PARTIE :

**ETUDES ELECTROPHORETIQUES ET IMMUNOLOGIQUES
DES PROTEINES DE L'INTERACTION NIEBE-COLLETOTRICHUM**

**CHAPITRE I : SEPERATION SUR GELS DE POLYACYLAMIDE DES
PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES INTERACTIONS
NIEBE-COLLETOTRICHUM**

Les premiers travaux du laboratoire sur l'implication des protéines nouvelles dans les interactions hôte-parasites ont porté sur le couple Féverole -*Botrytis* (GIRI, 1983, VEDIE, 1984). Les protéines nouvelles mises en évidence après traitement des plantes de féverole par les spores des *Botrytis* ou leurs filtrats de culture que l'on sait éliciteurs de résistance (SANKARA, 1981) ont été observées aussi bien avec les variétés sensibles que résistantes.

Ces résultats constituent une originalité car la plupart des auteurs qui se sont intéressés à cet aspect des relations hôte-pathogène n'ont observé la présence de protéines PR ou b que dans les plantes infectées par divers organismes et manifestant une réponse du type réaction hypersensible (de WIT et BAKKER, 1980 ; GIANINAZZI, 1981 ; KASSANIS, 1981 ; REDOLFI, 1983). La différence entre les résultats du laboratoire et ceux de ces auteurs proviendrait probablement des types d'extraction des protéines. En effet, tous les auteurs font une extraction des protéines totales des feuilles par broyage des tissus dans un tampon acide pH 2,8 alors que les extractions au laboratoire ne portent que sur les protéines extracellulaires des feuilles, probablement des protéines associées aux membranes.

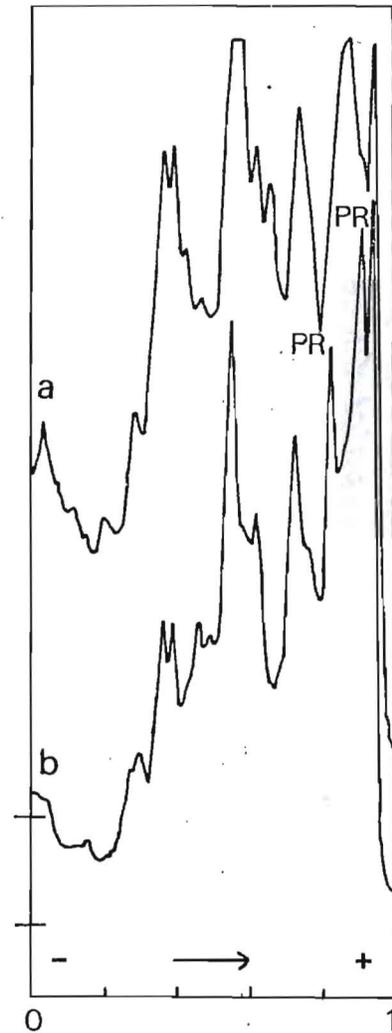
Par rapport à ces résultats, il a paru intéressant d'entreprendre une analyse de ce type de protéines dans notre cas de couple hôte-pathogène en l'occurrence le couple niébé-*C. capsici* afin de voir si l'apparition des protéines nouvelles se répétait avec un autre couple que celui de la féverole et du *Botrytis*. En outre il s'agit d'en tirer toutes les applications utiles dans le cadre de la reconnaissance hôte-parasite, et ceci parce que les protéines nouvelles semblent être spécifiques soit de l'hôte, soit de l'agent pathogène.

A - ANALYSE PAR ELECTROPHORESE DES PROTEINES SOLUBLES EXTRAITES DES FEUILLES DE NIEBE TRAITES OU NON PAR *C. CAPSICI*

A.1. - Etude quantitative des protéines

L'évaluation des équivalents protéiques (équivalents lysozyme) contenus dans les diffusats témoins et traités a permis de noter des différences quantitatives entre ces 2 types de diffusats et ceci pour toutes les variétés de niébé utilisées. Les diffusats traités sont 2 à 4 fois plus concentrés que les témoins et cette tendance notée à l'extraction se maintient après précipitation à l'acide trichloracétique et reprise des culots dans du tampon Tris-HCl pH 6,8 sans colorant.

A



B



Figure (10) : Electrophorégrammes des protéines extracellulaires extraites des feuilles de niébé (variété TVU 2027-1-11) et séparées sur gels de polyacrylamide à 7,5 %.

A : Feuilles pulvérisées 1 semaine auparavant par a) l'eau ; b) une suspension des spores de *C. capsici* isolat CPA. Les nouvelles protéines sont indiquées par les lettres PR.

B : Gels d'électrophorèse sur polyacrylamide à 7,5 % avec la variété TVU 2027-1-11 inoculée par les isolats C.2017 et CTN de *C. capsici*

Nous avons tenu compte de cette observation dans la recherche des différences qualitatives entre les protéines des diffusats traités et témoins en vue d'une comparaison rigoureuse entre les résultats enregistrés. En effet, comme le montre CONEJERO et SEMANCIK (1977), le dépôt d'une faible quantité de protéines de plantes (< 75 µg équivalent lysozyme) entraîne souvent la non visualisation de certaines bandes protéiques par la coloration au bleu de Coomassie rendant les comparaisons erronées. Nous avons donc utilisé dans la plupart de nos expériences plusieurs dépôts des échantillons protéiques des diffusats traités et témoins correspondant à des quantités différentes de protéines et les comparaisons portent sur les meilleurs gels.

A.2. - Etude qualitative des protéines

a) Présence de protéines nouvelles

Dans une première expérience, les protéines solubles des diffusats des feuilles de plantes âgées de 3 semaines de la variété TVU 2027-1-11 ont été obtenues après inoculation par une suspension des conidies des isolats C. 2017, CPA et CTN. Les diffusats sont produits, une semaine après l'inoculation, par infiltration sous vide d'une solution saline de NaCl à 0,5 M et centrifugation sur grille. Ces diffusats sont ensuite précipités à l'acide trichloroacétique, les culots protéiques sont repris par du tampon Tris-HCl pH 6,8 contenant du SDS et du mercaptoéthanol et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %.

L'observation des gels (figure 10 B) permet de constater l'existence d'une bande protéique supplémentaire très nette pour les diffusats traités par rapport au diffusat témoin. Les électrophorégrammes des protéines du diffusat TVU 2027-1-11/CPA (variété TVU 2027-1-11 traitée par les conidies de l'isolat CPA) et du diffusat TVU 2027-1-11/Témoin (fig. 10 A) révèlent bien la bande protéique supplémentaire de mobilité relative ou Rf voisine de 0,93. Cette valeur est du même ordre que la valeur d'une des protéines nouvelles mises en évidence dans le cas du couple féverole -*Botrytis* (0,94). On remarque également la présence d'une nouvelle bande au Rf 0,84.

Il ressort de cette première analyse que lors de l'interaction du niébé et de *Colletotrichum capsici*, de nouvelles protéines font leur apparition. Ces protéines correspondent sans doute aux protéines PR (Pathogenesis related proteins) mises en évidence par COUTTS (1978) sur niébé mais aussi par ANTONIW et PIERPOINT, 1978 ; ANTONIW *et al.*, 1980 et décrites par d'autres auteurs dans des interactions de plantes avec des virus, des champignons, des bactéries et des nématodes.

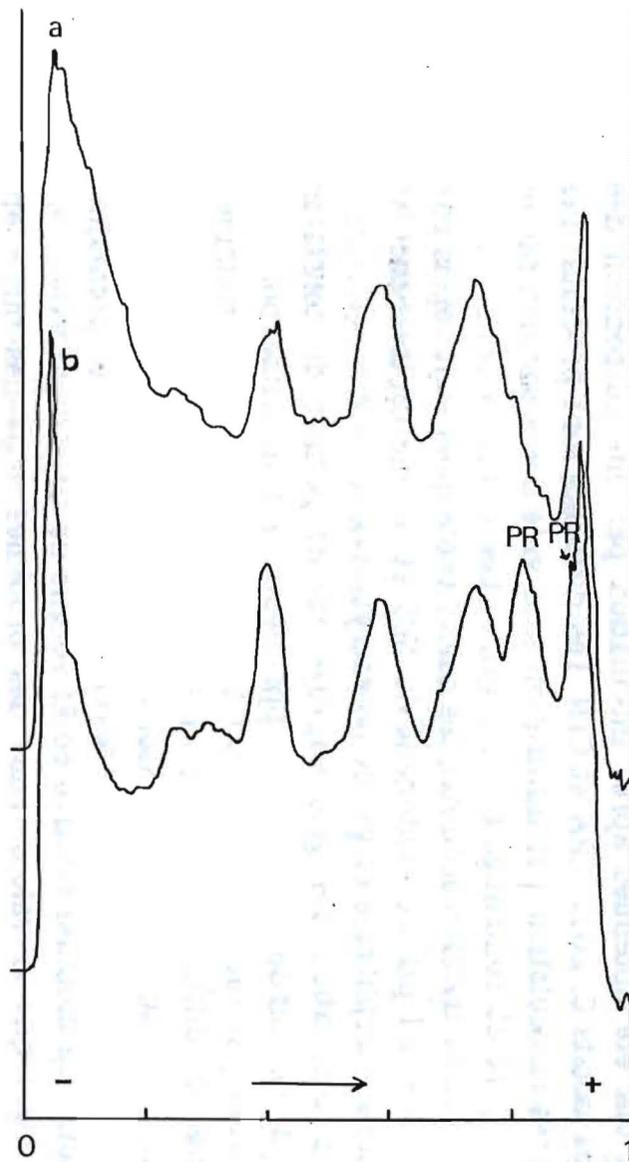
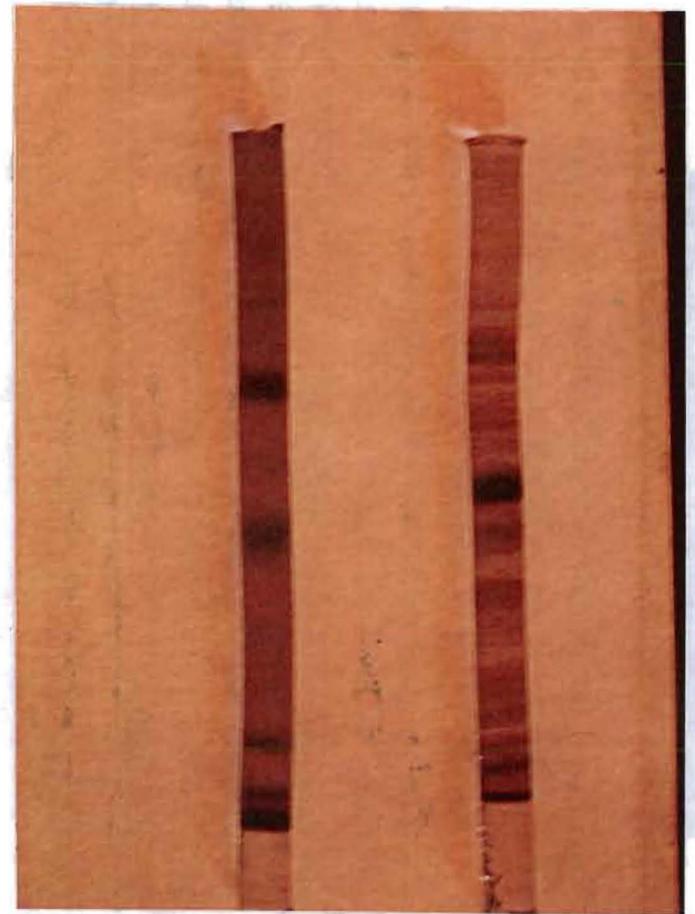


Figure (11) :

A : Electrophorégrammes des protéines solubles extraites des feuilles de niébé (variété TVU-2027-1-11) et séparées sur gels de polyacrylamide à 10 %.

a) Pulvérisation des feuilles par l'eau ;
 b) Inoculation par les spores de C.2017.



B : Gels d'electrophorèse sur polyacrylamide à 10 % avec la variété Locale Gorom de niébé.

b) Variation de la production de protéines nouvelles avec l'hôte et la concentration en acrylamide

La plupart des auteurs utilisent pour la séparation des protéines des plantes des gels de concentration en acrylamide à 10 %. Nous avons aussi utilisé cette concentration dans la recherche de protéines PR. Les divers états de résistance des variétés de niébé face à la maladie des taches brunes ont également été pris en considération.

Les protéines solubles des diffusats traités ou non des variétés TVU 2027-1-11 et Locale Gorom ont donc été utilisées sur des gels de polyacrylamide à 10 %. Les inoculations des plantes ayant fourni les extraits dits "traités" ont été effectuées par l'isolat C. 2017. L'analyse des électrophorégrammes correspondant à la séparation de ces protéines révèle une différence dans les profils protéiques des échantillons traités par rapport à ceux des échantillons témoins (fig. 11 A pour Locale Gorom, fig. 11 B pour TVU 2017-1-11). Pour les deux variétés la même bande est observée, mais les autres bandes peuvent différer d'une variété à l'autre y compris sur les gels témoins. Lorsqu'on augmente la concentration en polyacrylamide passant de 10 à 12 %, la bande frontale (BF) diminue beaucoup d'intensité et parallèlement un nombre plus important de bandes protéiques nouvelles est mis en évidence dans le bas des gels qui correspond à la zone des protéines de faibles poids moléculaires (fig. 12). Une analyse similaire sur gels à 7,5% des diffusats IAR-48 / C.2017 et IAR-48/Témoin (fig 13) permet également la mise en évidence de bandes protéiques PR, à nouveau les profils des autres parties des gels diffèrent des variétés précédentes. Ces différences de profils sur les échantillons témoins suggère une analyse plus approfondie.

c) Comparaison des profils protéiques de cinq variétés de niébé

Les cinq profils présentés sur la figure 14 montrent des caractères assez variables mais le calcul des Rf permet d'identifier 33 bandes différentes. Le calcul des indices de similitudes entre variétés, en utilisant comme élément la présence ou l'absence d'une bande d'un Rf donné, permet de comparer deux à deux l'ensemble des variétés.

La figure 15 représente les regroupements des variétés pour les 3 classes d'indices de similitude retenues : 61-100 %, 50-60 %, <50 %. Il apparaît que les 3 variétés TVU 2027, VITA 4, LOCALE GOROM, se ressemblent beaucoup, la variété KN-1 peut être rapprochée de ce groupe par ses similitudes avec TVU 2027. La variété IAR 48, plus éloignée des 4 autres présente quelques traits communs avec LOCALE GOROM. Soulignons que cette comparaison, réalisée sur les meilleurs profils obtenus pour

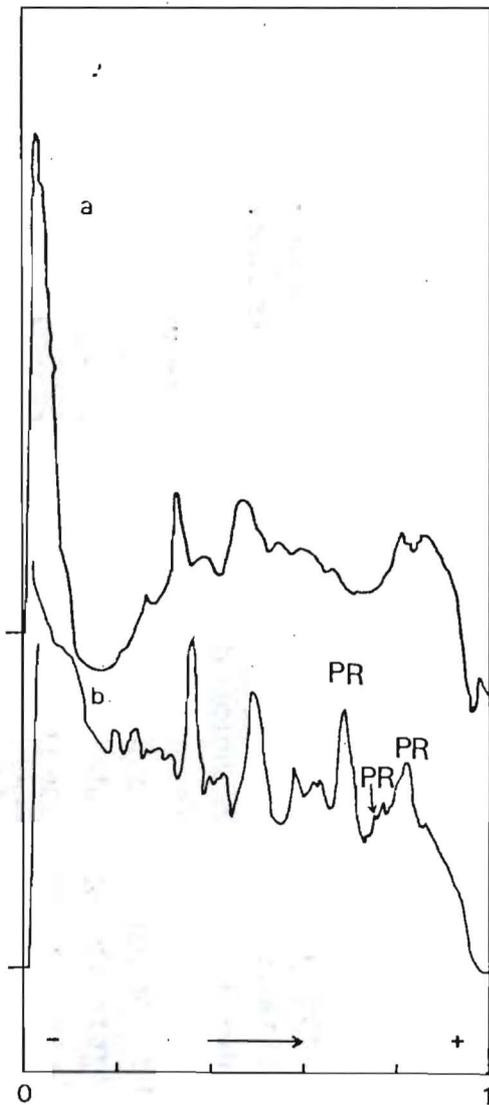


Figure (12) : Electrophorégrammes des protéines solubles extraites des feuilles de niébé (variété Locale Gorom) et séparées sur gels de polyacrylamide à 12 %
 a) Plantes témoins (Eau)
 b) Plantes traitées en pulvérisation par une suspension de spores de l'isolat C-2017 de *C. capsici*.

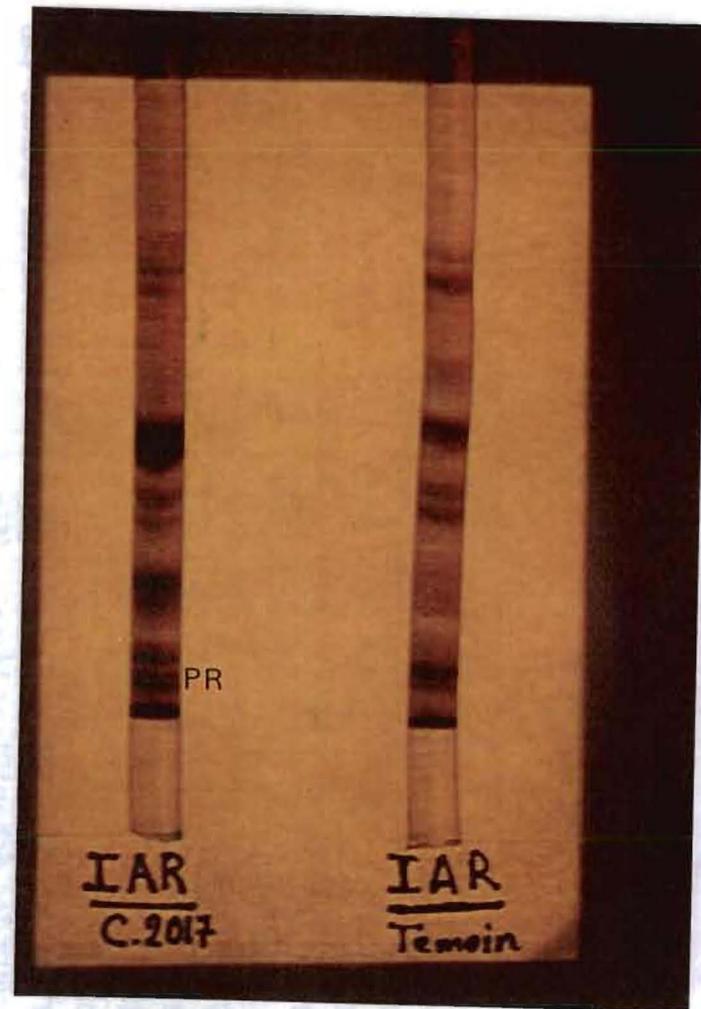


Figure (13) : Gels d'electrophorèse sur polyacrylamide à 7,5 % avec la variété IAR-48 de niébé.

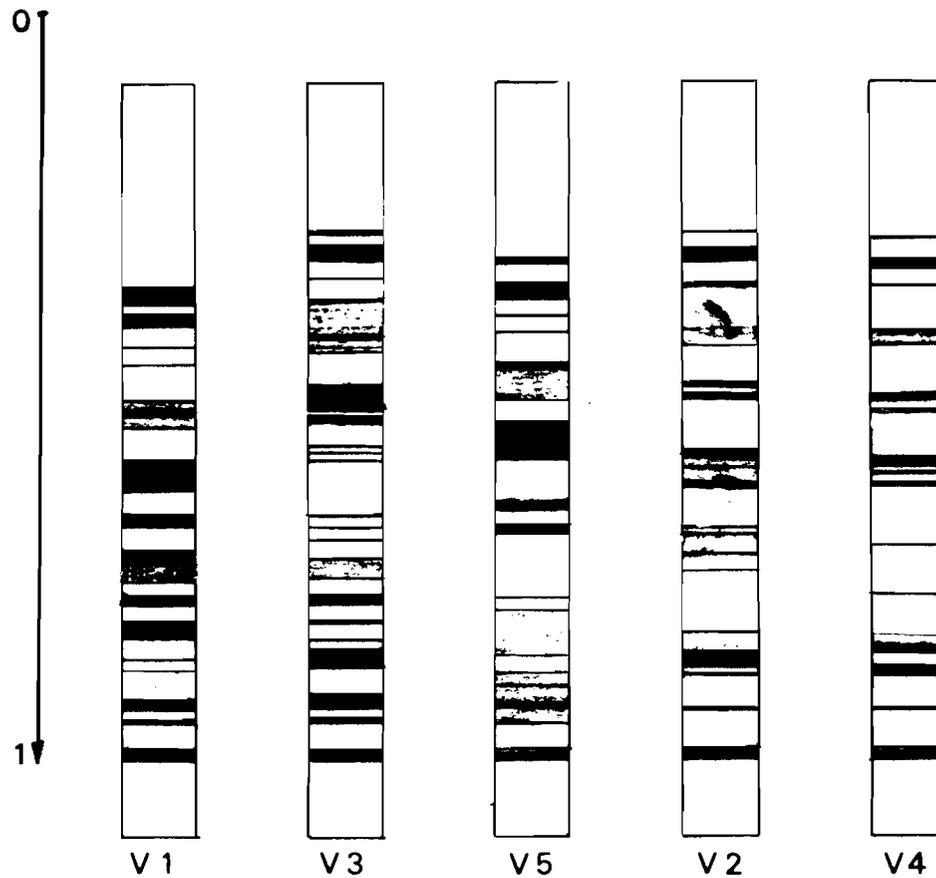


Figure (14) : Profils électrophorétiques sur gels de polyacrylamide à 10 % des protéines des diffusats de 5 variétés de niébé.

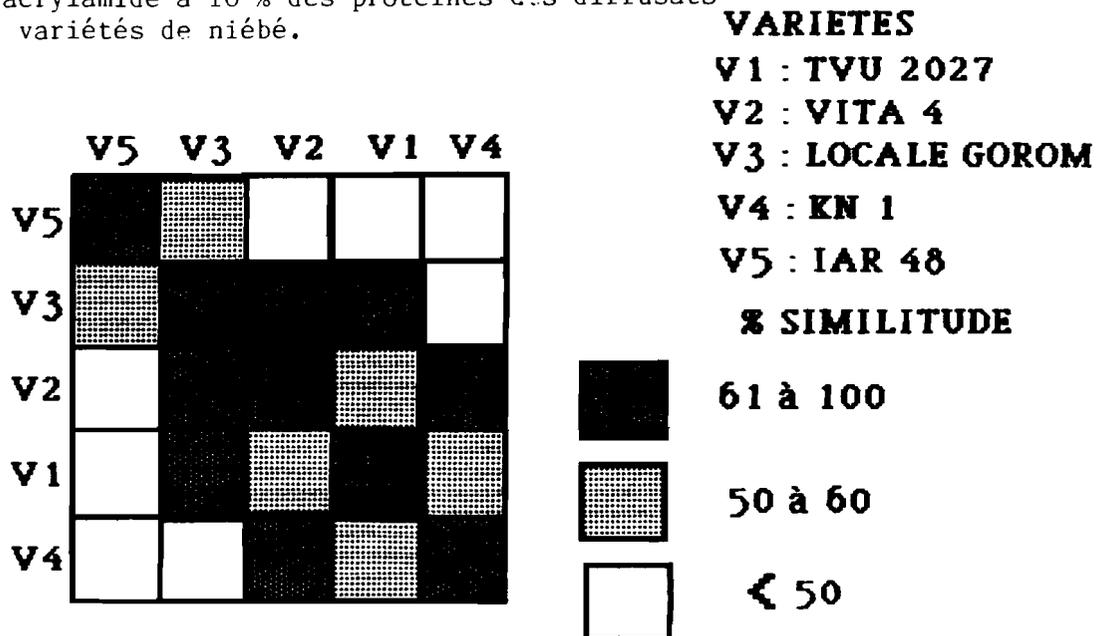


Figure 15 Regroupement de cinq variétés de niébé en fonction des pourcentages de similitude calculés pour 33 bandes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines de diffusats de feuilles

chacune des variétés, concerne des protéines solubles extraites sans broyage des tissus foliaires.

Conclusion

De ces premières analyses, il ressort que quel que soit l'état de sensibilité ou de résistance des variétés de niébé, l'interaction avec le *C. capsici* entraîne toujours la formation de nouvelles protéines. Les principaux changements interviennent surtout dans les zones de Rf comprises entre 0,84 et 0,94 sur gel à 10 % d'acrylamide et en conditions dénaturantes. Il convient de remarquer que dans le cas de l'interaction entre le niébé et le virus de la nécrose du tabac, COUTTS (1978) trouve 4 nouvelles protéines de Rf 0,95 ; 0,925 ; 0,79 et 0,755. Les nouvelles protéines mises en évidence après infection des plants de niébé par *C. capsici* ont leurs Rf se situant dans la zone des valeurs obtenues par COUTTS. Les Rf des différentes bandes protéiques ont été calculés par rapport à la bande frontale bien importante avec les gels d'acrylamide de 7,5 et 10 % de concentration. Cette bande correspond bien à une bande protéique pour les raisons suivantes :

- Le bleu marqueur qui permet de suivre la migration a une mobilité relative plus grande que celle de cette bande frontale et est éliminé après décoloration des gels. Ceci se vérifie en marquant une encoche au niveau de bleu marqueur. A la décoloration, aucune coloration n'existe au niveau de l'encoche et toutes les bandes protéiques se situent au dessus de cette encoche.

La bande frontale a une migration voisine de celle du bleu de bromophénol lors de la séparation des protéines solubles du niébé mais ne coïncide pas avec elle comme dans le cas de la féverole (VEDIE, 1984). Une électrophorèse à 7,5 % avec le lysozyme qui est une protéine du poids moléculaire de 14 900 daltons en présence du bleu marqueur nous a permis de constater que le bleu de bromophénol se situe entre 2 bandes, la bande la plus mobile correspondant probablement à des produits de dégradation du lysozyme commercial et actif que nous utilisons. Ceci nous permet de dire que la bande protéique frontale des électrophorégrammes avec les diffusats de niébé contient des protéines dont le poids moléculaire peut atteindre près de 12000 daltons.

A-3 Influence du mode de traitements des plantes sur la production des protéines nouvelles

La plupart de nos extractions jusqu'à présent ont été faites à

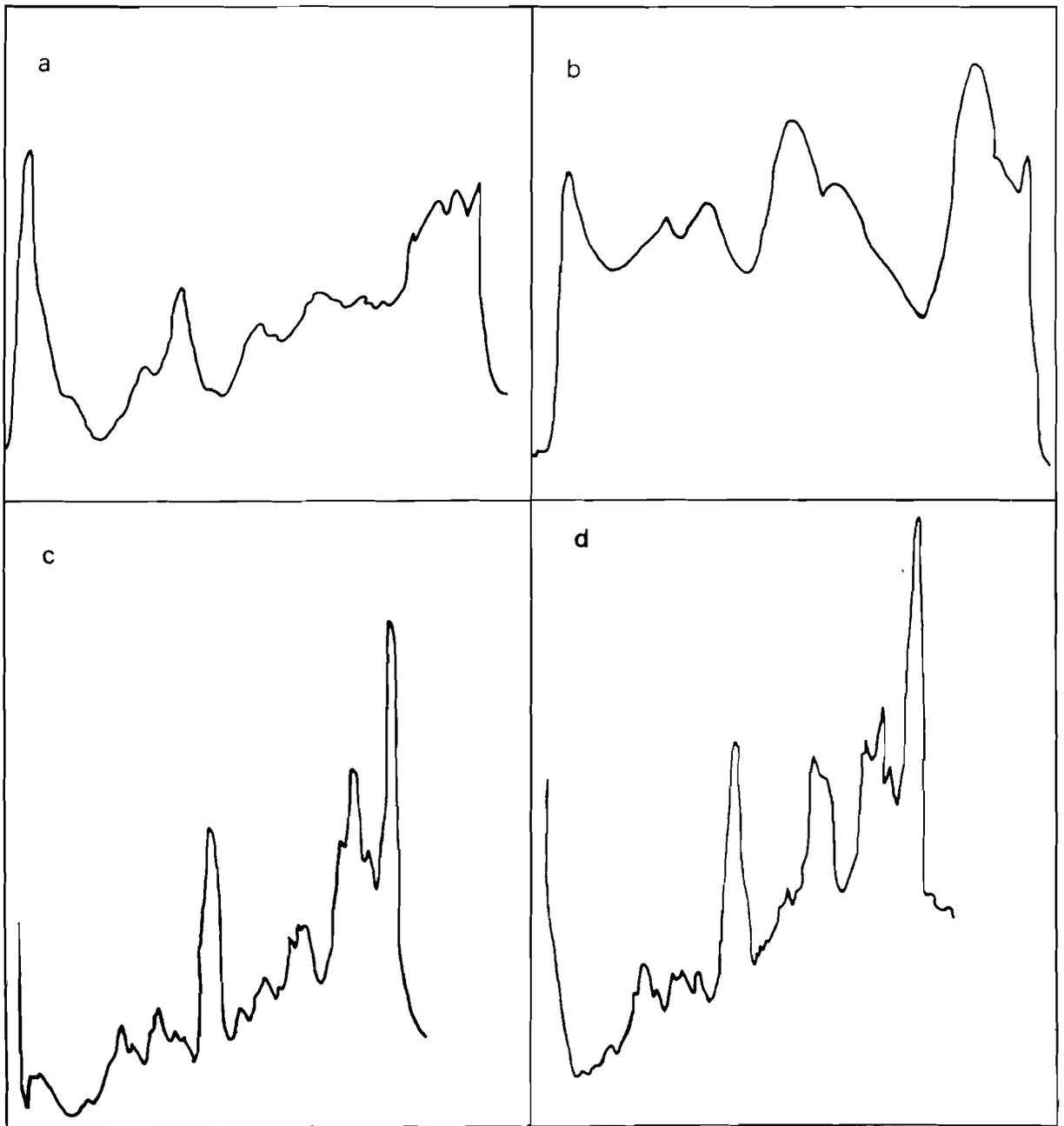


Figure (16) Electrophorégrammes des protéines solubles des extraits de feuilles de *Vigna unguiculata* et séparées sur des gels de polyacrylamide
a et b : Protéines de la variété Locale Gorom infiltrée 3 jours auparavant par l'eau et le filtrat de l'isolat C-2017 de *C. capsici* après séparation des protéines sur gel à 10 %.
c et d : Protéines de la variété TVU 2027-1-11 infiltrée 5 jours auparavant par l'eau et le filtrat de l'isolat C-2017 de *C. capsici* après séparation des protéines sur gel à 7,5 %.

partir des feuilles issues de plantes inoculées par des suspensions conidiennes du champignon. Nous avons aussi cherché à voir si le contact des plantes et d'une substance élicitrice de résistance en l'occurrence le filtrat de culture du champignon permettrait la mise en évidence de changements quantitatifs et qualitatifs au niveau des protéines extraites.

L'analyse des protéines extracellulaires des feuilles de niébé à partir des plants de niébé traités par trempage des tiges dans les filtrats de culture de *C. capsici* n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque différence avec les protéines solubles des mêmes variétés de niébé traitées par trempage dans de l'eau distillée.

Nous avons aussi procédé à des infiltrations sous vide du filtrat de culture de l'isolat C. 2017 dans les feuilles de 2 variétés de niébé, l'eau distillée remplaçant le filtrat dans les témoins. Trois concentrations du filtrat, dilué au 1/10, dilué au 1/3 et non dilué, ont servi pour les traitements. Après infiltration, les plantes dont les racines ont été coupées sont maintenues 3 à 5 jours dans de l'eau distillée avant d'être à nouveau infiltrées par de l'eau salée (0,5 M) en vue de l'extraction des protéines solubles. La séparation de ces protéines sur des gels d'électrophorèse a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Aucun changement tant quantitatif que qualitatif n'est perceptible entre les protéines issues des plantes traitées par les filtrats dilués au 1/10 ou au 1/3, et leur témoin respectif.

- Pour la variété Locale Gorom infiltrée par du filtrat non dilué, on constate (fig. 16 a et b) un renforcement des bandes protéiques de Rf 0,51 et 0,87 sur des gels à 10 %. On observe donc pour la première fois un changement dans la zone de Rf 0,50.

- Pour la TVU 2027-1-11 infiltrée par le filtrat non dilué (fig 16 c et d) on note aussi le renforcement d'une bande de Rf 0,66 sur des gels à 7,5 % de polyacrylamide.

Par rapport à ces résultats, on peut dire que le traitement des plantes de niébé par infiltration du filtrat de culture non dilué de *C. capsici* dans les feuilles entraîne un changement au moins quantitatif dans les protéines des diffusats de plantes traitées par rapport aux témoins. Ce changement quantitatif se traduit par un renforcement de certaines bandes protéiques qui est peut être dû à la superposition de bandes nouvelles mais les figures obtenues sont moins nettes que lors des traitements par suspension de spores vivantes.

Cette technique de traitement des feuilles ne nous a donc pas paru appropriée dans la recherche de protéines nouvelles. Nous avons poursuivi nos travaux en traitant les plantes par des suspensions conidiennes du champignon.

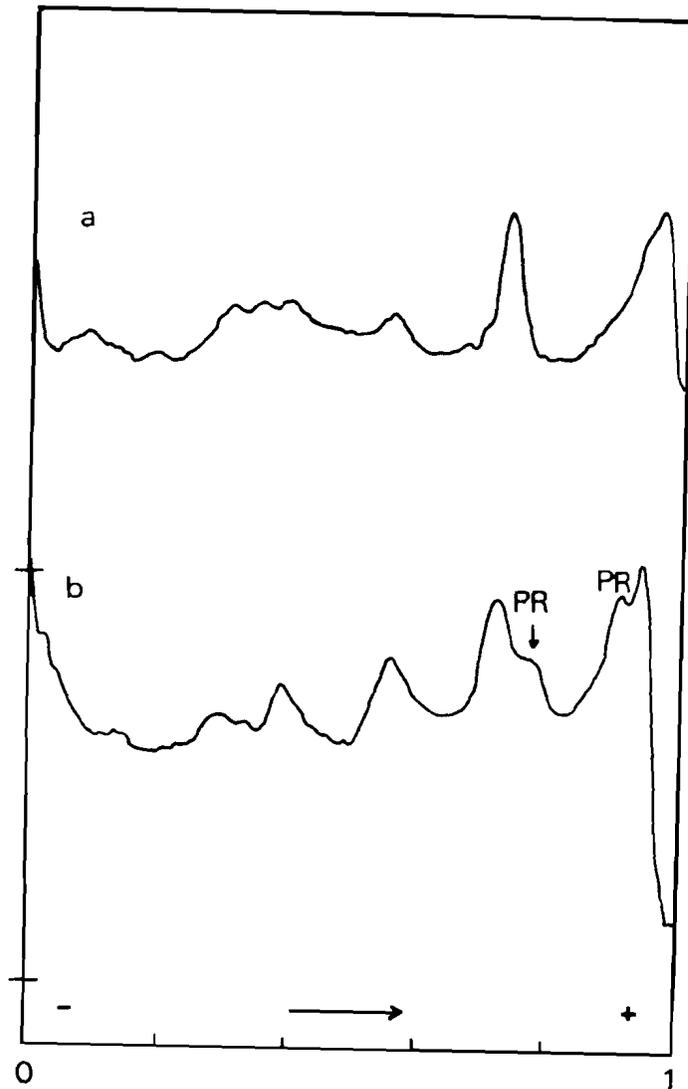


Figure (17) : Electrophorégrammes des protéines extracellulaires des feuilles de niébé (variété IAR-48) après séparation sur gels de polyacrylamide à 10 %. Les protéines ont au préalable subi une digestion enzymatique par la trypsine
a) Protéines de plantes non inoculées (témoin)
b) Protéines de plantes inoculées par une suspension des spores de l'isolat C.2017.

A-4 Digestion enzymatique des protéines nouvelles de *V. unguiculata*

Plusieurs auteurs PIERPOINT (1983), AHL (1983) REDOLFI et CANTISANI (1984) ont montré que les nouvelles protéines (PR, b ou PS) mises en évidence dans les cas de réaction hypersensible avec les couples tabac - virus et haricot - virus sont très résistantes à la protéolyse.

Après traitement par la Trypsine ou un mélange de Trypsine et de Chymotrypsine des protéines solubles des dites plantes, traitées ou non par les virus, ils ont montré que dans le second cas toutes les protéines sont plus ou moins digérées alors que dans le premier cas, il reste encore des bandes visibles sur les gels de polyacrylamide dont certaines correspondent aux nouvelles protéines PR initialement mises en évidence.

Nous avons, dans le cas du couple niébé - *Colletotrichum* cherché à voir si les nouvelles protéines mises en évidence possédaient cette propriété.

Après extraction des diffusats de feuilles de la variété IAR-48, saines ou inoculées 7 jours auparavant par les spores de l'isolat C. 2017, les protéines obtenues par précipitation au TCA sont incubées à 25° C pendant 4 heures en présence de Trypsine dissoute dans du tampon Tris-HCl à pH 8 (100 µg de Trypsine pour un culot protéique provenant de 5 ml de diffusat).

L'électrophorèse des extraits après ces traitements sur des gels de polyacrylamide à 10 % permet de noter (fig. 17) une diminution nette de l'importance des pics situés dans la zone de Rf comprise entre 0 et 0,8 aussi bien dans les extraits de plantes saines que dans ceux de plantes inoculées. Entre les Rf 0,8 et 1, on note 4 pics importants dans les extraits traités pour seulement 2 pics dans les témoins. Une électrophorèse uniquement avec la Trypsine a permis de révéler que ces 2 derniers pics correspondent à la Trypsine. Les nouvelles protéines sont caractérisées par les lettres PR et correspondent très bien aux 2 protéines nouvelles mises en évidence initialement.

Pour conclure, nous pouvons souligner que les protéines nouvelles mises en évidence à la suite de l'interaction niébé - *Colletotrichum* résistent très bien à la digestion par la trypsine. Elles ressemblent de ce point de vue aux protéines PR, b, PS décrites respectivement par PIERPOINT (1983), AHL (1983), REDOLFI et CANTISANI (1984).

La différence entre le nombre de nouvelles protéines mises en évidence à la suite de l'interaction niébé - *Colletotrichum*, la valeur de leur Rf sur les électrophorégrammes par rapport aux protéines PR, b ou PS des auteurs ci-dessus provient probablement de la nature de la plante et

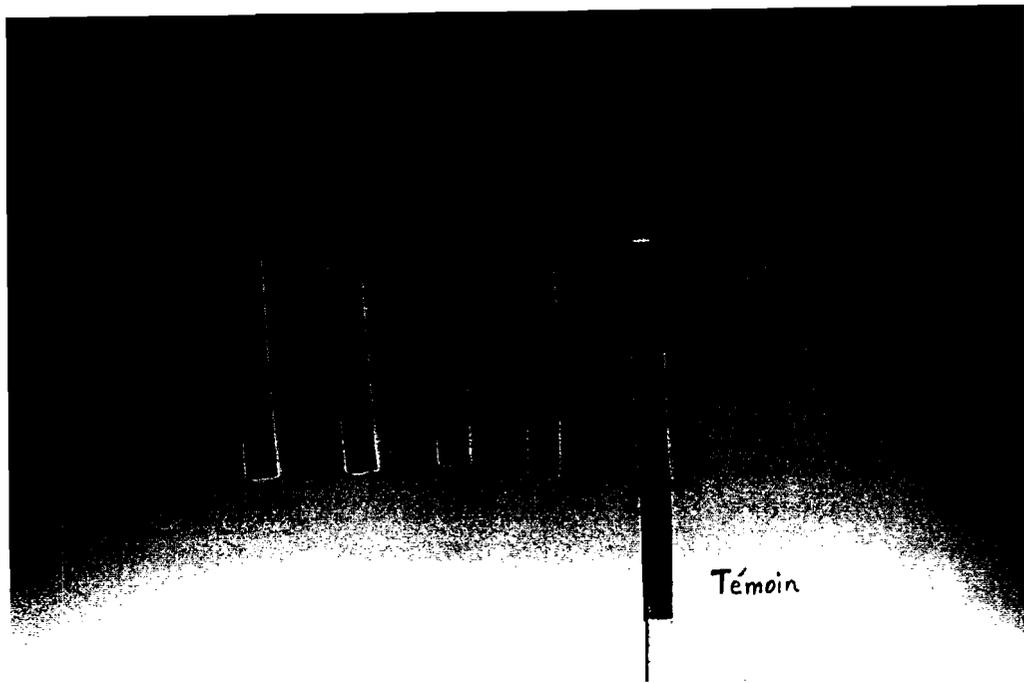


Figure (18) : Gels d'electrophorèse sur polyacrylamide selon la méthode préparative plus un témoin en electrophorèse analytique avec la variété Locale Gorom de niébé.

du type d'extraction et de l'utilisation de conditions électrophorétiques dénaturantes. En effet, GIANINAZZI *et al.* (1977) ne détectent pas de bandes protéiques dans les portions distales des gels (Rf 0,5 à 1) pour les extraits de tabac ou de haricot non inoculés (témoins). De même, COUTTS (1978), pour les extraits de niébé n'en trouve pas dans la zone de Rf 0,6-1.

Nous avons appliqué notre méthode d'extraction sur des feuilles de tabac non inoculées ce qui a permis de montrer la présence de bandes protéiques sur toute la longueur du gel comme pour le niébé. La méthode d'extraction est donc responsable des caractères de nos électrophorogrammes. Des protéines nouvelles sont donc bien mises en évidence dans les interactions niébé-*Colletotrichum*. Les plus caractéristiques de ces protéines ont des Rf de 0,84 et 0,93 sur des gels de polyacrylamide à 10 %.

A-5 Electrophorèse préparative sur les diffusats des plantes

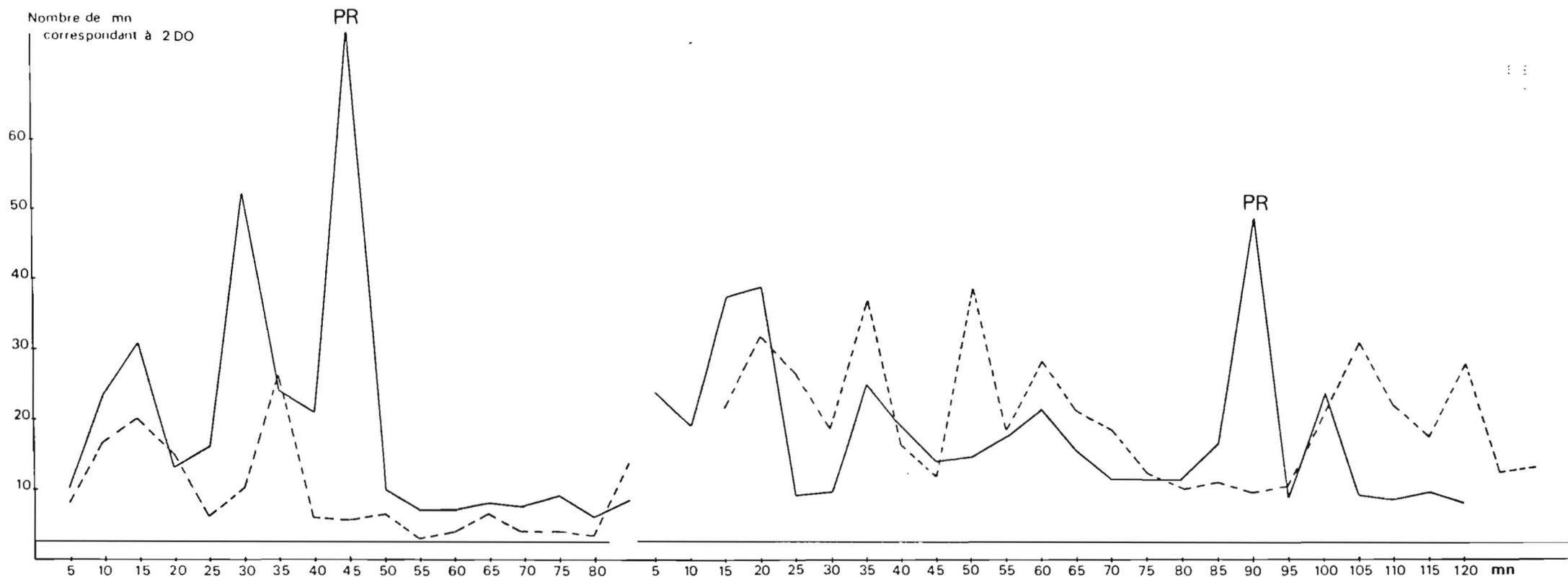
Afin de récupérer les protéines contenues dans les bandes protéiques en quantités suffisantes et débarrassées du polyacrylamide en vue de leur purification et de leur utilisation en immunologie, nous avons conçu un appareil d'électrophorèse préparative selon le schéma descriptif contenu dans le chapitre matériel et méthodes.

Le remplissage des réservoirs anodiques qui, au moment de la conception du dit appareil se faisait de manière manuelle a par la suite été automatisé par un système de vases communicants.

Le prélèvement fractionné des éluats des réservoirs anodiques se fait à des intervalles de temps constants (5 min.) à l'aide de la pompe péristaltique multicanaux. Les fractions sont recueillies dans un collecteur de fractions multiples linéaire.

Dans un première expérience d'électrophorèse préparative avec les protéines solubles de la variété Locale Gorom non traitée, nous avons cherché à voir si les pics d'élution récoltés et révélés par analyse au spectrophotomètre à UV (280 nm) correspondaient aux bandes protéiques en électrophorèse analytique.

La figure 18 permet de déterminer le nombre de bandes protéiques recueillies 2 heures environ après le début du prélèvement des fractions. Le nombre et la position des pics recueillis correspond sensiblement au nombre et à la position des bandes protéiques révélées par électrophorèse analytique dans la première partie des gels. Les bandes non éluées peuvent être mises en correspondance avec celles de la partie supérieure du gel témoin. Elles sont naturellement plus étalées puisqu'elles ont subi deux heures de migration supplémentaires.



Légende : TVU 2027-1-11 / C.2017 —
 TVU 2027-1-11 / Témoin - - - -

IAR-48 / C.2017 —
 IAR-48 / Témoin - - - -

Figure (19) A Tracé électrophorétique des éluats obtenus par prélèvements temporisés à la sortie des gels de polyacrylamide pour des protéines solubles des diffusats de la variété TVU 2027-1-11 traitée 2 jours auparavant ou non par une suspension des spores de l'isolat C.2017 de *C. capsici*.

(19) B Tracé densitométrique des éluats obtenus par prélèvements temporisés à la sortie des gels de polyacrylamide pour des protéines solubles de la variété IAR - 48 traitée 5 jours auparavant ou non par une suspension de spores de l'isolat C.2017 de *C. capsici*.

Parmi les protéines solubles des feuilles des variétés TVU 2027-1-11, IAR-48 traitées par C. 2017 et leur témoin respectif, nous avons enregistré (fig. 19 A et B) la présence d'au moins une bande PR bien individualisée dans les diffusats traités des 2 variétés, ce qui correspond probablement à la protéine PR de Rf 0,93 déjà mise en évidence en électrophorèse analytique pour ces 2 variétés.

B - ELECTROPHORESE DES PROTEINES DE *COLLETOTRICHUM* spp.

B-1 Protéines du filtrat

Les divers isolats de *C. capsici* et d'autres espèces de *Colletotrichum* ont été cultivés dans le milieu défini B liquide pendant une dizaine de jours. Les filtrats de culture ainsi obtenus sont précipités au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à saturation et les culots protéiques sont repris dans du tampon Tris-Glycine pH 8,3 contenant du SDS. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide de ces différents culots permet la séparation d'une série de bandes protéiques pour chaque échantillon.

Il ressort (figure 20) des variations importantes pour deux isolats de *C. capsici*, un isolat de *C. lindemuthianum* et un isolat de *C. destructivum* dans le nombre des bandes protéiques et leurs positions sur les gels. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par SAYED *et al* (1976) avec *Fusarium oxysporum*. En effet, cette équipe, outre la séparation des espèces de *Fusarium* qu'elle signale, réussit par analyse électrophorétique la séparation des formes *udum*, *vasinfectum* et *ciceri* de *F. oxysporum*. Sur l'ensemble des bandes de Rf différents obtenues pour 3 isolats de *C. capsici*, et 1 isolat de chacune des 4 espèces *C. indicum*, *C. gossypii*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* 31 bandes différentes ont été caractérisées. Une analyse de similitude a pu être réalisée comme pour les diffusats. Les résultats (figure 21) permettent de regrouper les isolats de *C. capsici* du niébé avec *C. lindemuthianum* et *C. gossypii*. Proche de ce groupe principal se trouvent réunis l'isolat du pois d'Angole et *C. trifolii*. La souche de *C. indicum* est très différente des autres espèces.

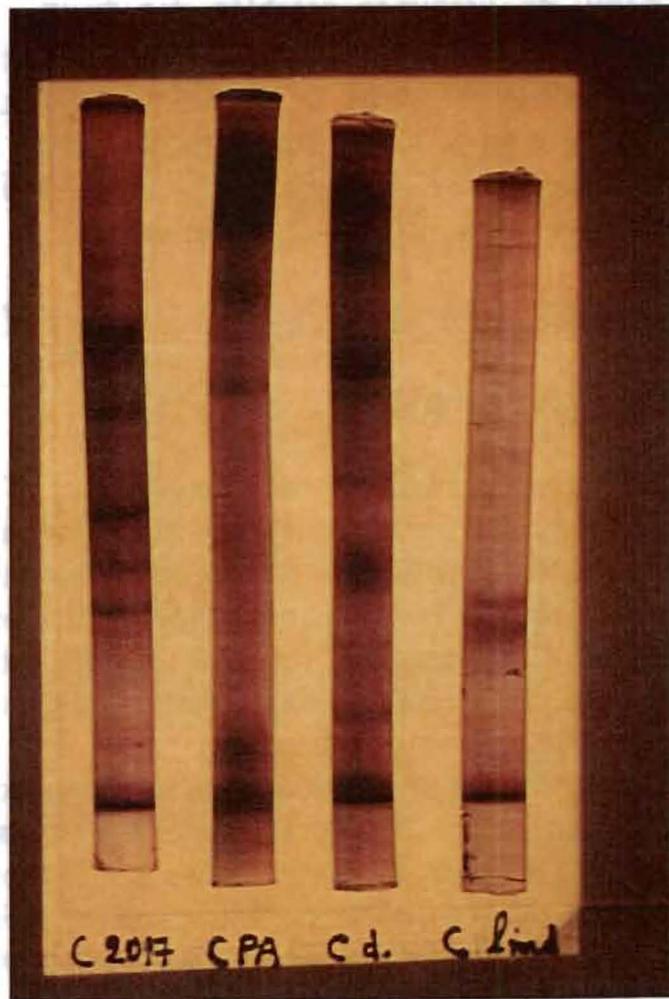
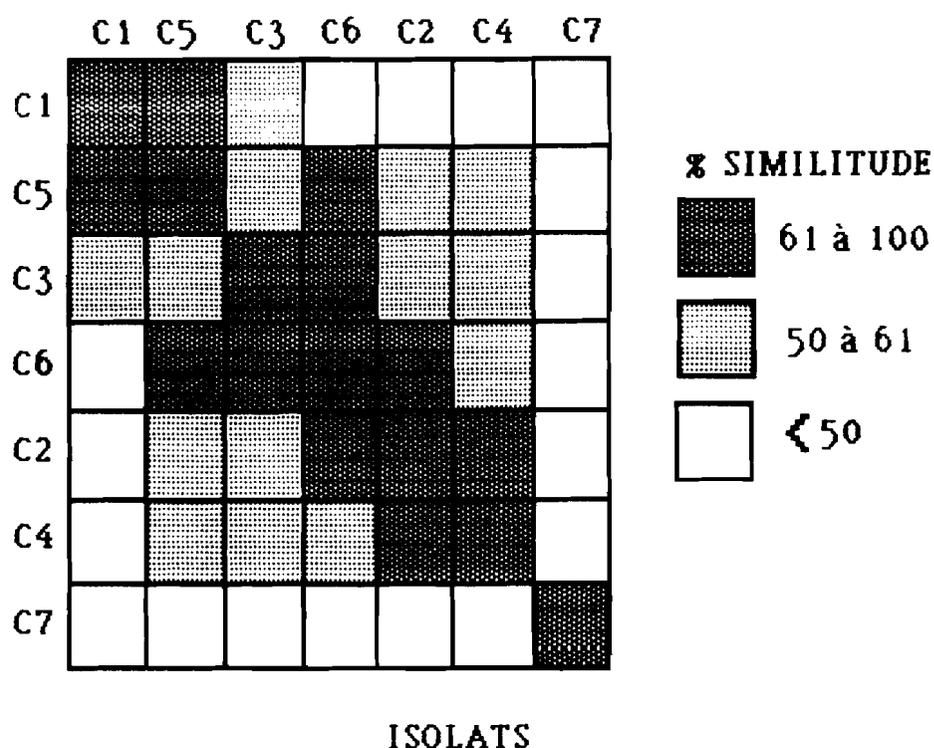


Figure (20) : Gels d'electrophorèse à 10 % de polyacry-
mide des protéines des filtrats de culture pour 2
isolats de *C. capsici* (C.2017 et C.P.A.), un isolat
de *C. destructivum* et un isolat de *C. lindemuthianum*.



- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| C1 : <i>C. capsici</i> CPA | C4 : <i>C. lindemuthianum</i> |
| C2 : <i>C. capsici</i> CTN | C5 : <i>C. trifolii</i> |
| C3 : <i>C. capsici</i> C 2017 | C6 : <i>C. gossypii</i> |
| | C7 : <i>C. indicum</i> |

Figure 21 Regroupement de sept isolats de *Colletotrichum* en fonction des pourcentages de similitude calculés pour 31 bandes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des protéines des filtrats de culture

B-2 Protéines du mycelium

Cependant, les auteurs précédents ont aussi utilisé les protéines du mycélium des champignons. La technique d'extraction des protéines du mycélium nécessite un traitement spécial. Ces mycéliums doivent subir une congélation d'au moins 24 heures avant extraction. Cette extraction se fait par broyage dans un mortier contenant du tampon phosphate 0,1 M. pH 7 avec 1 gramme de sable fin (Fontainebleau) pour 4 grammes de mycélium. Le surnageant recueilli après broyage et centrifugation est précipité au sulfate d'ammonium, concentré et dialysé avant d'être repris dans du tampon Tris-Glycine pH 8,3 contenant du SDS pour électrophorèse.

Cette technique permet la mise en évidence d'un nombre de bandes protéiques voisin de celui obtenu dans l'électrophorèse des filtrats

des mêmes échantillons mais les bandes ne sont pas les mêmes. Là aussi, des différences existent entre 3 isolats de *C. capsici* mais elles sont beaucoup moins nombreuses que pour les extraits de filtrats.

Conclusion :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines des filtrats de culture des *Colletotrichum* permet non seulement la séparation des différentes espèces de ce genre mais aussi de certains isolats de *C. capsici*. Comme pour les protéines extracellulaires de plantes, une bande majeure est obtenue au voisinage du front de migration du colorant traceur lors d'électrophorèse en gels à 10% d'acrylamide.

**CHAPITRE II : ETUDES IMMUNOLOGIQUES DES PROTEINES DES
INTERACTIONS NIEBE - *COLLETOTRICHUM CAPSICI***

Introduction

En vue d'une étude des éventuelles spécificités des différentes molécules protéiques des diffusats et des filtrats de culture, nous avons utilisé la technique immunologique par hypersensibilité retardée sur des souris.

L'hypersensibilité retardée est due à la sensibilisation des lymphocytes T. La rencontre entre les lymphocytes sensibilisés et l'antigène spécifique réintroduit dans l'organisme conduit d'une part à la différenciation de lymphocytes T cytotoxiques (lorsque l'antigène est cellulaire) et d'autre part à l'élaboration de substances non immunoglobuliniques appelées lymphokines (EUZEBY, 1980). Ces lymphokines, douées de nombreuses activités, provoquent principalement un afflux et une activation des macrophages d'où la constitution, en 24 heures d'un infiltrat de cellules mononucléées caractéristiques de cet état d'hypersensibilité retardée. Cet infiltrat cellulaire est responsable de l'induration et du gonflement des pattes des souris 24 heures après leur révélation par le même antigène qui a servi à l'immunisation.

PARISH et LIEW (1972) définissent les conditions expérimentales pour la réussite de ce type d'immunisation qui sont l'utilisation de très faibles doses d'antigènes injectées aux souris par voie sous cutanée. MITCHINSON (1968) avait établi une carte de la réponse anticorps en fonction des doses et des durées d'immunisation, les travaux de PARISH et LIEW (1972) ont montré, pour une durée d'immunisation donnée, une opposition entre les intensités des réponses anticorps et hypersensible sur une large gamme de concentrations antigéniques. Les caractères des réponses pour une dose donnée varient par ailleurs avec le poids moléculaire de la protéine utilisée. Deux zones de concentrations induisant une tolérance immunitaire sont définies par l'arrêt de la production d'anticorps, elles correspondent à 2 maximums de la réponse en hypersensibilité retardée séparés par un minimum ou zone de tolérance à ce dernier type de révélation.

Travaillant avec des protéines de nature différente de celles des auteurs ci-dessus, il nous a semblé nécessaire de définir dans un premier temps toutes les conditions expérimentales garantissant une meilleure expression de la réaction d'hypersensibilité retardée pour les protéines des filtrats de culture de champignons et des diffusats de plantes.

A - MISE AU POINT DES TECHNIQUES D'IMMUNOLOGIE

A.1. - Détermination de la dose immunisante

Quatre doses de protéines solubles des feuilles de la variété IAR-48, provenant de plants de 3 semaines non inoculés par le champignon, ont été utilisées comme antigènes immunisants. Les protéines recueillies après électrophorèse préparative sont ensuite diluées par du tampon phosphate 0,1 molaire pH 7 afin d'obtenir les concentrations de 7 µg/ml, 700 ng/ml, 70 ng/ml et 700 pg/ml. Les protocoles d'immunisation et de révélation se trouvent dans le chapitre matériel et méthodes. Les résultats suivants portent sur le gonflement des pattes des souris 24 h après la révélation par le même antigène à la concentration de 70 µg/ml ont été enregistrés (tableau XX).

Tableau XX Intensités des réponses immunitaires en Hypersensibilité retardée chez des souris immunisées par différentes doses d'extrait protéique de la bande frontale d'électrophorèse de diffusat de la variété de niébé IAR 48.

Doses immunisantes	Nb. Répétitions	Inflammation (mm)	I.C. 95%	S?
700 ng/jour	5	0,298	0,083	S
70 ng/jour	5	0,261	0,081	S
700 pg/jour	5	0,301	0,274	NS
70 pg/jour	4	0,107	0,086	NS

(électrophorèse à 10% d'acrylamide ; révélation par des diffusats entiers dosant 7 µg/ml d'équivalent protéine)

Les trois doses d'immunisation les plus fortes conduisent à des gonflements très manifestes par rapport à la quatrième dose. Le calcul des différents intervalles de confiance montre que seuls les résultats des 2 premières doses les plus fortes sont significatives. En effet, l'intervalle de confiance sur les résultats de la troisième dose est si important qu'il annule la positivité de ce résultat surtout quand on tient compte de la valeur de l'intervalle calculé sur l'épaisseur moyenne des pattes de souris témoins qui se situe entre 0,05 et 0,10 mm. En d'autres termes, lorsque la valeur de l'épaisseur moins l'intervalle de confiance est inférieure à 0,10

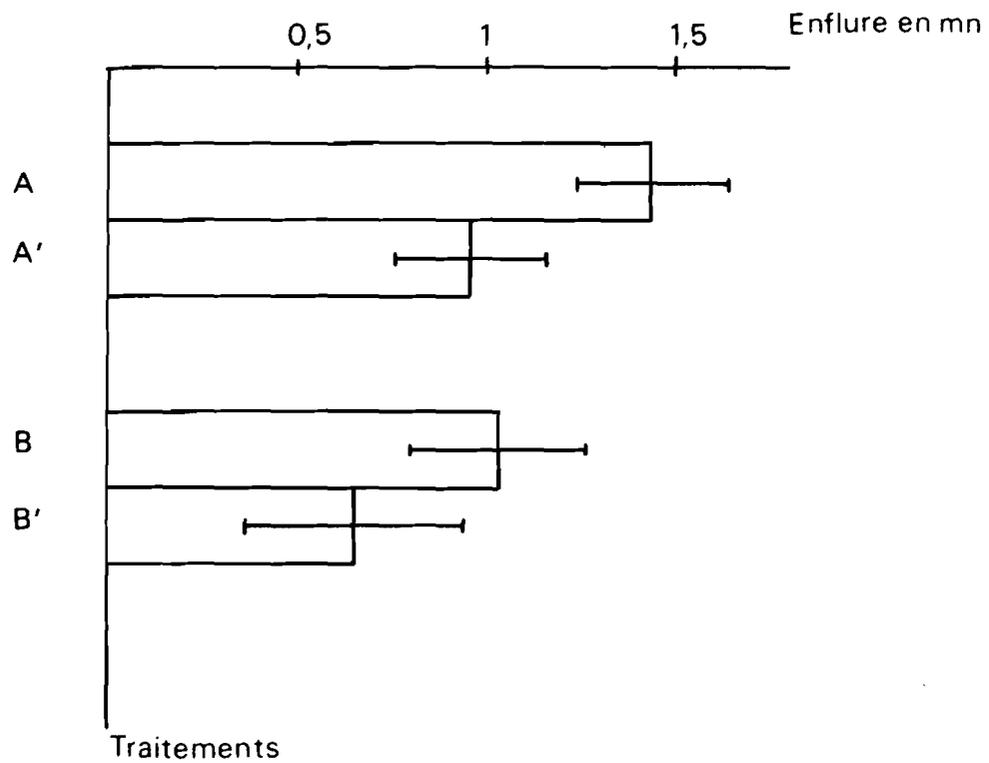


Figure (22) : Réponses immunologiques de souris immunisées en hypersensibilité retardée par 2 doses de l'extrait protéique de la bande frontale du filtrat de culture de l'isolat C.2017 de *C. capsici* en présence ou non de Cyclophosphamide.

A = dose immunisante de 1 μ g/jour + Cyclophosphamide (50 mg/kg de souris)

A' = dose immunisante de 1 μ g/jour sans Cyclophosphamide

B = dose immunisante de 37 ng/jour + Cyclophosphamide (50 mg/kg de souris)

B' = dose immunisante de 37 ng/jour sans Cyclophosphamide.

mm, le résultat obtenu n'est pas considéré comme significatif.

Par rapport à la courbe de PARISH et LIEW (1972) on peut dire que les 4 doses que nous avons utilisées se situent dans la première partie de la dite courbe correspondant aux doses fortes. En effet, nous constatons entre les 2 premières doses positives et la quatrième dose négative une diminution de la réaction d'hypersensibilité retardée. En poursuivant sur cette courbe, la diminution de la quantité de l'antigène immunisant, on doit observer une augmentation de la réponse cellulaire dans la zone des très faibles doses. Cependant, les réponses individuelles des souris deviennent de plus en plus aléatoires avec les faibles doses, pour des durées d'immunisations raisonnables (cf 700 pg/jour).

Ces résultats suggèrent dans nos conditions expérimentales une immunisation avec des doses de protéines de diffusats de plantes de l'ordre du μg par jour. Une dose de cet ordre est aussi nécessaire pour la réussite des immunisations avec les filtrats de culture du champignon.

Nous remarquons par la même occasion que l'utilisation des antigènes protéiques du diffusat de plante à des doses de l'ordre de 100 pg par jour rend les souris tolérantes à l'immunisation.

La réaction de tolérance à l'inconvénient de masquer la manifestation de la réaction cellulaire. Nous avons cherché à lever cet inconvénient par l'utilisation d'un antibiotique inhibiteur spécifique des lymphocytes T suppresseurs.

A.2. - Utilisation du Cyclophosphamide (Endoxan)

AKIO *et al.* (1976) montrent que le Cyclophosphamide utilisé en injection intrapéritonéale 48 heures avant le début d'une immunisation des souris par le MHSA (Methylated human serum albumin) à des doses comprises entre 15 et 150 mg/Kg de souris permet une augmentation de la réponse par la réaction cellulaire. POLAK et TURK (1974) montrent que le Cyclophosphamide a la propriété de briser la tolérance immunologique auparavant établie avec les antigènes du groupe des dinitrophenyl.

Avec la bande frontale du filtrat de C. 2017, nous avons immunisé les souris selon le protocole expérimental suivant : 2 doses de l'antigène (1 μg et 37 ng/jour) pour deux lots de souris traitées par le Cyclophosphamide et deux lots témoins non traités par l'antibiotique. La moyenne des gonflements des pattes exprimée en mm après la révélation par le même antigène a donné les résultats de la fig. 22.

Pour la forte dose, l'utilisation du Cyclophosphamide entraîne une augmentation de la réponse d'hypersensibilité retardée. De 0,97 mm gonflement des pattes avec les souris non traitées par l'antibiotique, on passe à 1,44 mm d'épaisseur pour les traitées.

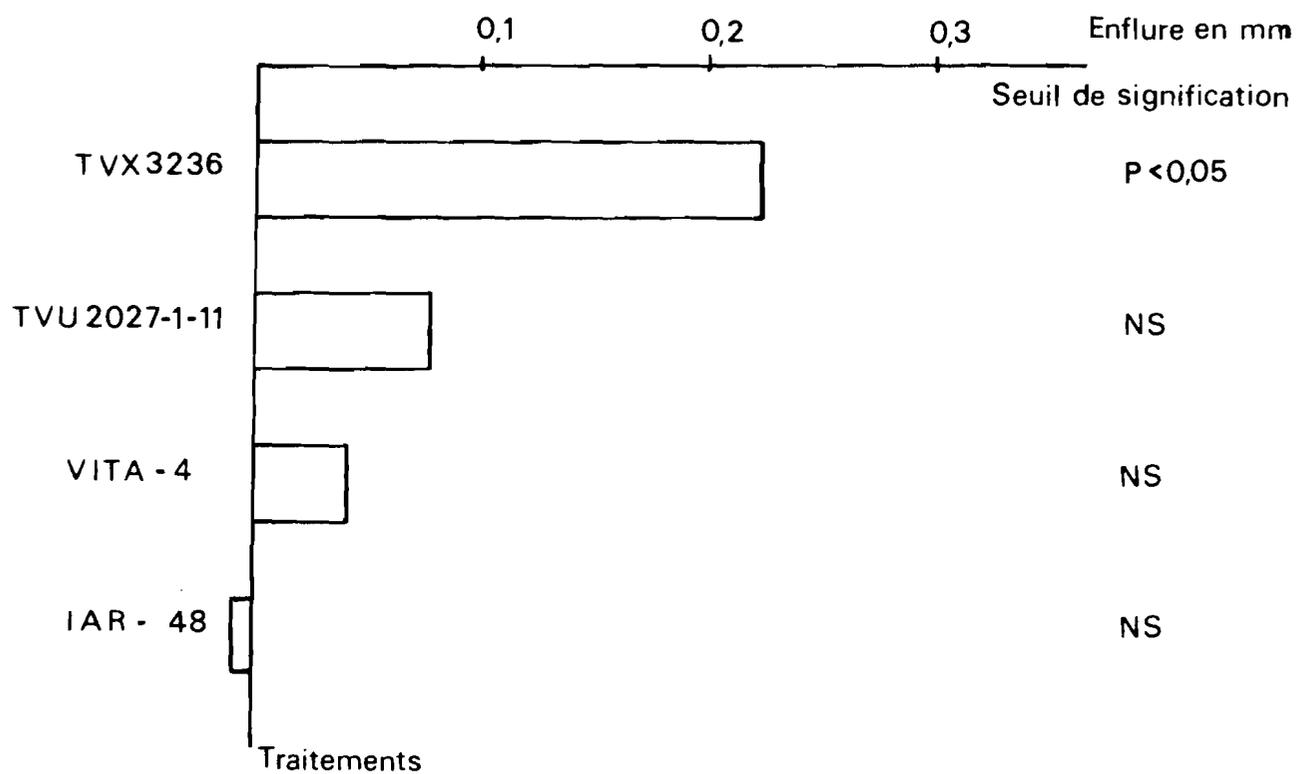


Figure (23) : Différenciation immunologique de 4 variétés de niébé par la réaction d'hypersensibilité retardée contre les protéines de la bande frontale d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (10 %) du diffusat foliaire de la variété TVX 3236. Dose immunisante 700 mg/jour pendant 3 jours.

Pour la faible dose, la tendance à l'augmentation avec les souris traitées s'observe mais les 2 résultats ne diffèrent pas statistiquement.

Il ressort de cette expérience que l'utilisation du cyclophosphamide entraîne une augmentation du gonflement dans la réaction cellulaire, cet agent se comporte comme un adjuvant d'immunisation.

Dans une autre expérience, nous avons établi la tolérance immunologique suite à l'immunisation des souris par de très faibles quantités de protéines de la bande frontale du diffusat de la variété TVX 3236/Témoin, 70 pg/j). Avec le cyclophosphamide utilisé après établissement de la tolérance, une réponse d'hypersensibilité est notée lorsqu'on fait une immunisation de rappel avant de procéder à une deuxième révélation avec le même antigène.

B - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES DES DIFFUSATS DES PLANTES

B.1. Etude des bandes frontales

a) Diffusats témoins

Les fractions protéiques contenues dans la bande frontale de la variété TVX 3236 non traitée ont été recueillies en électrophorèse préparative. Le Cyclophosphamide a été utilisé comme adjuvant d'immunisation avant de réaliser les injections (700 ng/jour) de la fraction antigénique "bande frontale". La révélation a été déterminée dans le but de rechercher d'éventuelles parentés entre variétés de niébé.

Les résultats (figure 23) montrent que l'épreuve par les protéines totales de la variété TVX 3236 donnent une réponse nettement significative par rapport aux épreuves des 3 autres variétés (TVU 2027-1-11, IAR-48 et Vita-4). Par cet exemple, on peut dire que la bande frontale de TVX 3236 contient des antigènes spécifiques de cette variété de niébé. Nous avons cherché à voir si ce résultat pouvait se répéter avec les protéines frontales d'autres variétés de niébé.

Une immunisation directe de 5 jours avec les protéines de la bande frontale de la variété Locale Gorom suivie d'une révélation au 7ème jour par les protéines totales de la dite variété et de 5 autres variétés de niébé a permis d'obtenir les résultats du tableau XXI. Au vu de ces résultats, les protéines totales de 3 des 6 variétés de niébé utilisées en révélation reconnaissent l'antigène immunisant : Locale Gorom (la variété homologue), Vita-4 et TVU 2027-1-11.

Tableau XXI Différentiation immunologique de 6 variétés de niébé par réaction d'hypersensibilité retardée de souris contre les protéines de la bande frontale d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (10%) du diffusat foliaire de la variété LOCALE GOROM

DIFFUSAT DE REVELATION	Inflammation (mm)	Seuil de signification	
LOCALE GOROM (Homologue)	0,222	P < 0,01	HS
MOUGNE	0,104		NS
IAR 48	0,011		NS
KN 1	0,095		NS
VITA 4	0,380	P < 0,0005	HS
TVU 2027-1_11	0,176	P < 0,05	S

La bande frontale de la variété Locale Gorom contient donc au moins un antigène spécifique de la dite variété, associé à des antigènes communs avec d'autres variétés dont Vita-4 et TVU-2027-1-11.

Soulignons que cette observation est tout à fait concordante avec les résultats de la comparaison des électrophorégrammes réalisée antérieurement (fig. 15 p. 52)

Nous avons par la suite cherché à isoler l'antigène spécifique en effectuant une purification sur gel de Séphadex G-75 des protéines de la bande frontale de la variété Locale Gorom, puis en immunisant les souris avec les 2 pics protéiques mis en évidence après cette purification. Ces 2 pics protéiques sont les pics A (de faible poids moléculaire) et B (poids moléculaire plus élevé). Ces pics protéiques ont ensuite servi à immuniser des souris à la doses de 1 µg/j. L'antigène A a servi à révéler les souris immunisées par A et B et vice-versa.

L'analyse de variance effectuée sur les résultats du tableau XXII correspondant aux intensités des inflammations des pattes des souris 24 heures après la révélation a permis d'établir un classement des traitements. Il montre que toutes les réponses sont positives, ce qui traduit l'existence d'une communauté entre ces 2 groupes d'antigènes. Les résultats les plus positifs correspondant aux plus forts grossissements des pattes sont observés pour les révélations faites par les pics A (faible poids moléculaire). Tout se passe comme si la révélation par B mettait en jeu une activité suppresseur plus importante, alors que la révélation par A, au contraire, activerait principalement des lymphocytes cytotoxiques.

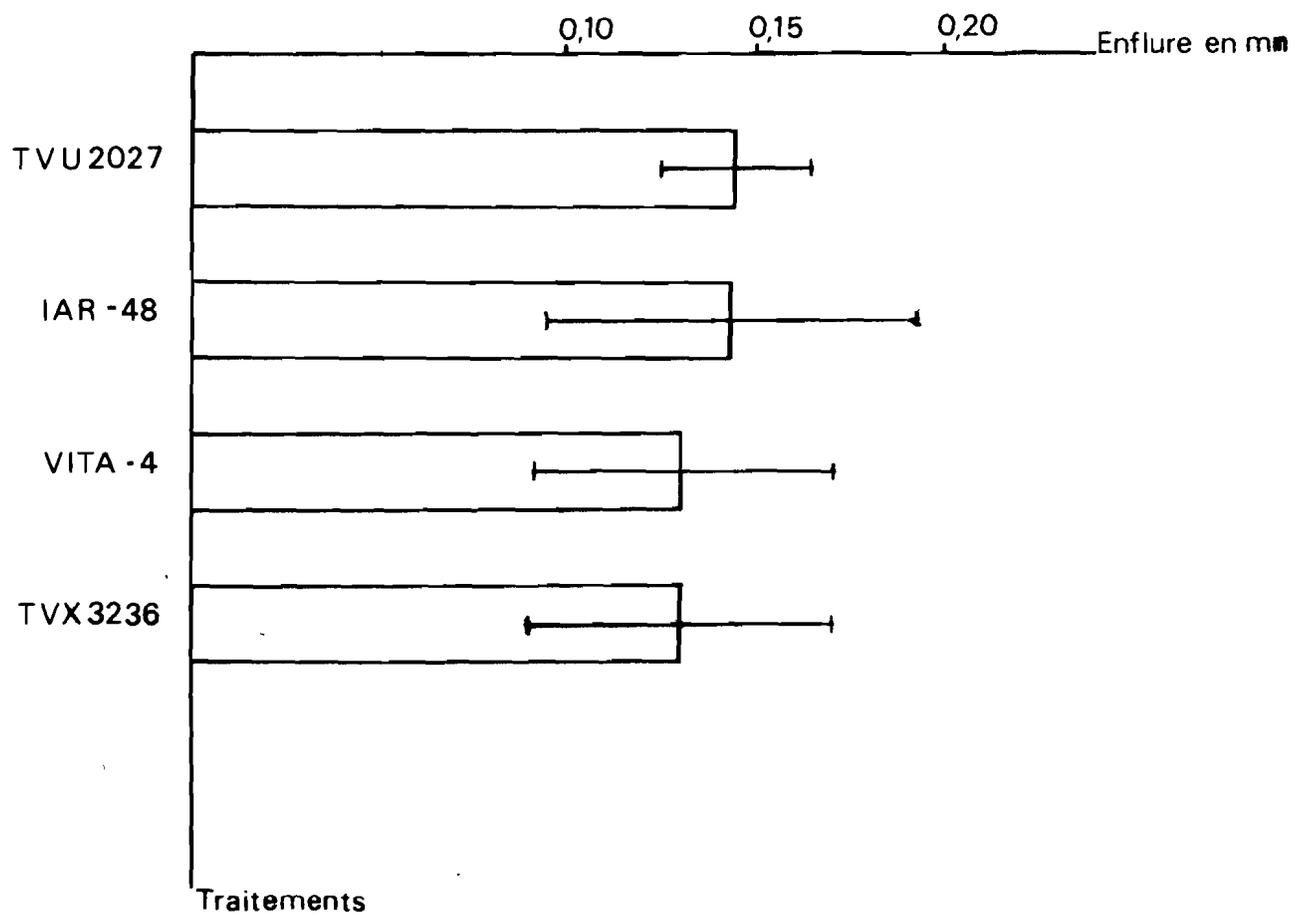


Figure (24) : Réponses immunologiques de souris immunisées en hypersensibilité retardée par les protéines situées en troisième position derrière la bande frontale de la variété TVX 3236 en électrophorèse sur gels de polyacrylamide à 10 %.

Tableau XXII Intensité de l'hypersensibilité retardée chez des souris immunisées par les pics A et B issus de la bande frontale du diffusat de la variété de niébé LOCALE GOROM par séparation sur Sephadex G75. Révélation directe et croisée.

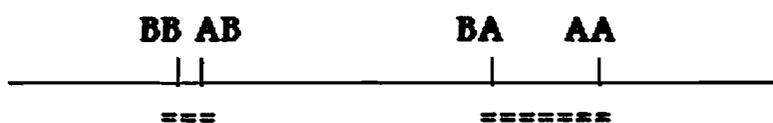
REPETITIONS	TRAITEMENTS			
	AA	AB	BB	BA
1	0,885	0,326	0,258	1,094
2	0,952	0,310	0,456	0,413
3	0,836	0,773	0,806	0,927
4	0,967	0,523	0,608	0,668
5	0,930*	0,440*	0,240	0,916
MOYENNES	0,914	0,474	0,473	0,803

*Données manquantes calculées par la formule de YATES

Les quatre combinaisons de traitement utilisées sont désignées par 2 lettres dont la première correspond à l'antigène immunisant et la deuxième à l'antigène révélateur.

Analyse de la variance

Origine de la variation	F calculé	F théorique	S?
Blocs	1,195	3,36 (0,05)	NS
Traitements	6,26	6,22 (0,01)	HS



Les protéines des bandes frontales sont donc spécifiques de la variété et cette spécificité est plus manifeste avec le pic de faible poids moléculaire contenu dans cette bande. L'existence d'une non spécificité immunologique, que l'on peut mettre en évidence en immunisant avec des protéines contenues dans une bande située en arrière de la bande frontale permet aussi de confirmer que la bande frontale est bien responsable de la spécificité variétale (figure 24).

b) Diffusats de plantes traitées

De la même manière que pour les diffusats témoins, nous avons procédé à l'analyse immunologique des protéines frontales des diffusats de plantes traitées. Dans l'exemple présenté (figure 25) les souris ont subi une immunisation par 5 injections de 100 µl d'une solution de bande

frontale de la variété TVU 2027-1-11 traitée par la souche C.2017 de *Colletotrichum capsici*. Un seul lot de témoins a été utilisé pour l'ensemble de l'expérience. Pour cette raison, les résultats enregistrés portent sur les comparaisons des épaisseurs des pattes par rapport au témoin.

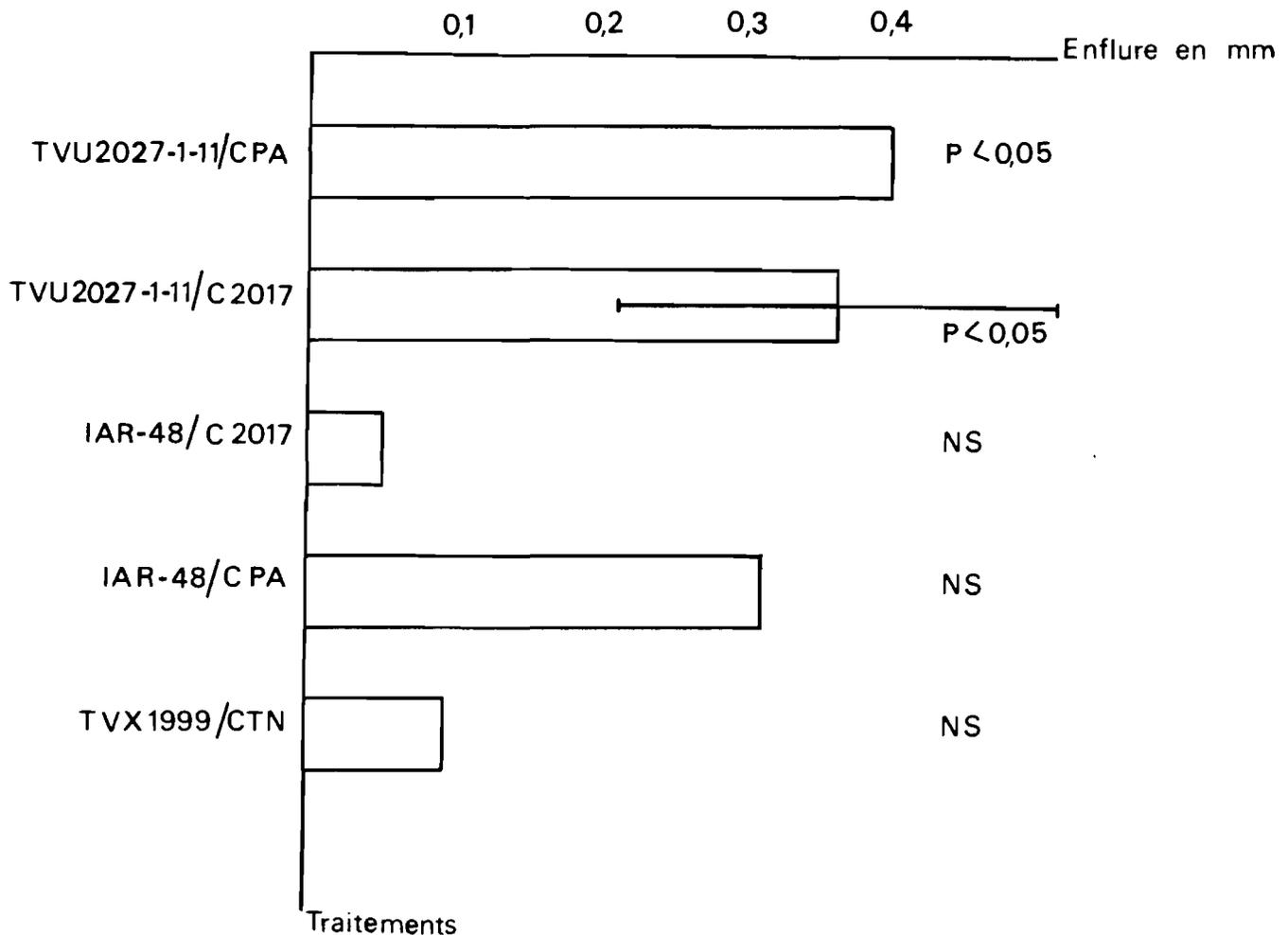


Figure (25) : Réponses immunologiques en hypersensibilité retardée de souris immunisées par les protéines frontales du diffusat de la variété de niébé TVU 2027-1-11 traitée par la souche C.2017 de *C. capsici*.

Les résultats positifs sont notés uniquement pour les diffusats double homologue et homologue par rapport à la variété utilisée lors de la révélation, ils permettent de conclure à la nature antigénique spécifique de variété, des protéines de la bande frontale des diffusats traités. En effet, lorsque la révélation est faite avec les protéines des diffusats double hétérologue (IAR-48/CPA ; TVX 1999-01F/CTN) ou hétérologue par rapport à la variété (IAR-48/C.2017), aucune spécificité n'est décelée.

B.2. - Etude immunologique des bandes P.R.

Pour une première analyse, le phénomène de tolérance immunitaire a été utilisé car les antigènes comparés sont supposés très voisins. Cinq injections, de la fraction P R de la variété IAR-48 traitée par la souche C 2017, à la dose de 1,5 µg/jour ont permis l'établissement d'une tolérance. C'est-à-dire que lors d'une révélation par divers antigènes, homologues ou non (**figure 26**), les réponses inflammatoires ne sont pas significativement différentes de zéro.

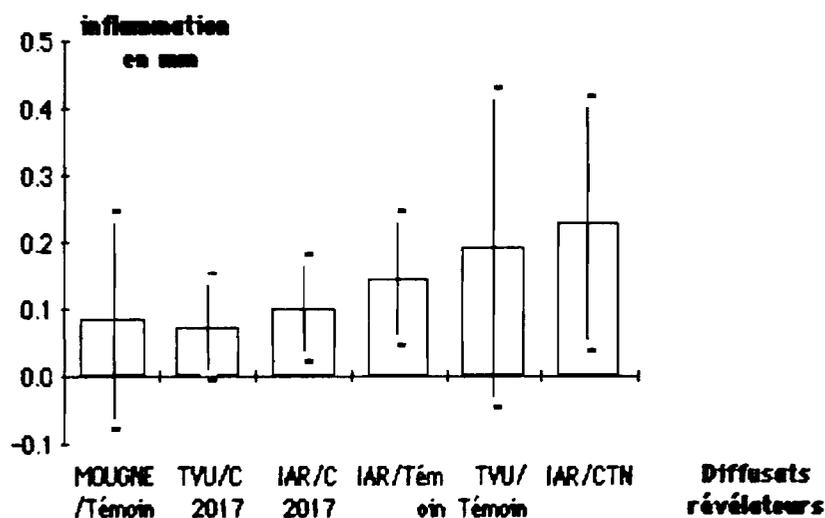


Figure 26 Preuve de l'établissement d'une tolérance immunitaire à la bande PR d'un diffusat de la variété IAR 48 traitée par l'isolat C2017 de *C. capsici*

Une deuxième série d'immunisations avec une dose dix fois moindre (150 ng/jour) a alors été entreprise avec la solution protéique de la bande PR de la variété Locale Gorom traitée par l'isolat CTN en vue de rendre les souris hypersensibles vis à vis d'éventuels antigènes propres à cette bande tout en éliminant l'effet des antigènes communs à d'autres variétés de niébé.

L'analyse statistique des résultats de la (**figure 27**) permet le classement des moyennes des inflammations des pattes et la mise en évidence de deux groupes de réponses .

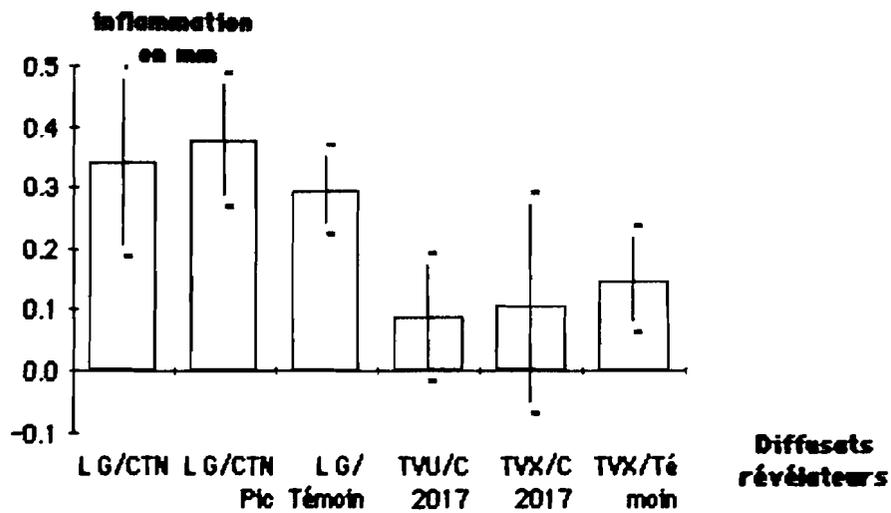


Figure 27 Réponses inflammatoires de souris immunisées par une bande PR de la variété Locale Gorom (LG) traitée par un isolat de *C. capsici* (CTN). Les souris ont d'abord été rendues tolérantes à une bande PR de IAR 48/C 2017 (fig 26)

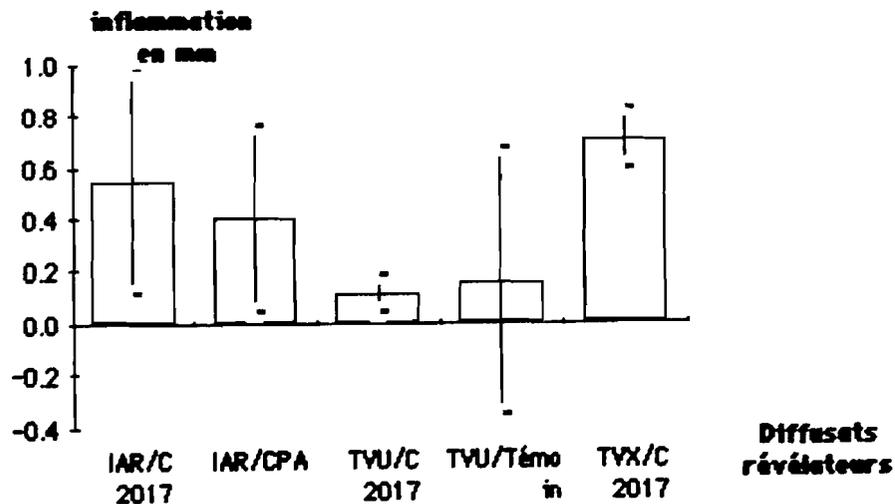
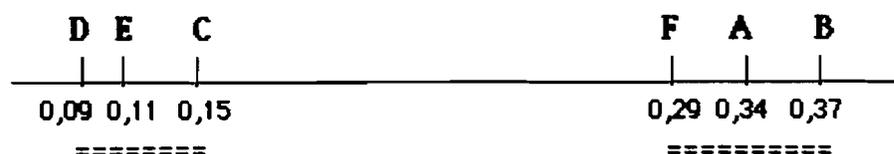


Figure 28 Réponses inflammatoires de souris immunisées par une bande PR de la variété IAR 48 traitée par un isolat de *C. capsici* C 2017.



- le groupe des réponses significativement positives constitué par les diffusats LOCALE GOROM/CTN (A et B) et LOCALE GOROM /témoin (F)

- le groupe des réponses non significativement positives constitué par les diffusats TVU 2027-1-11/C.2017 (D), TVX 1999-01F/C.12017 (E) et TVX 1999-01F/Témoin (C).

Dans les résultats du premier groupe cité, on remarque que la révélation des souris par le pic plus concentré qui a servi à immuniser donne une épaisseur de réponse un peu plus importante en valeur brute que les révélations faites par les diffusats non purifiés.

Une spécificité variétale est donc mise en évidence car les résultats négatifs ne s'observent que pour les variétés hétérologues. Cette expérience montre la grande complexité des relations possibles entre variétés et traitements par les agents pathogènes au niveau des bandes PR. Pour simplifier, nous avons cherché d'abord à révéler une spécificité vis à vis de l'agent pathogène utilisé lors du traitement des plantes.

La spécificité par rapport à la souche de champignon a été établie en utilisant les bandes PR des diffusats de la variété IAR-48 traitée par C.2017 (diffusat IAR-48/C 2017) comme immunogène. La révélation a été effectuée par l'antigène homologue et des diffusats de deux autres variétés : IAR-48/C 2017, IAR/CPA, TVU/C.2017, TVU/Témoin et TVX/C2017 (fig. 28). Les révélations par des diffusats TVU/C 2017, IAR-48/C 2017 et TVX/C2017 répondent positivement alors que TVU/Témoin donne un résultat négatif. Ce qui revient à dire que les souris immunisées ne reconnaissent que la variété du diffusat et/ou la souche de *Colletotrichum* utilisée pour induire le diffusat.

En conclusion, les 2 expériences se complétant, on peut dire que la bande PR des diffusats traités contient 2 types de spécificité :

- une spécificité variétale
- une spécificité concernant la souche qui a servi à traiter la plante.

Ces résultats viennent confirmer ceux trouvés avec les bandes PR dans d'autres couples hôte-parasites (VEDIE, 1984 ; BARAKAT 1985). Quel est le rôle précis de ces protéines dans les relations entre la plante et le parasite? L'hypothèse d'un rôle dans les mécanismes de résistance de la plante est probable mais ces protéines ne sont pas responsables que de la résistance car elles sont présentes aussi dans les plantes sensibles. Elles semblent plutôt intervenir dans le mécanisme de reconnaissance entre l'hôte et l'agent pathogène.

A supposer que ces bandes correspondent à des espèces moléculaires uniques, ce qui semble avoir été démontré par CARR *et al.* 1982, les caractères de leurs spécificités immunologiques semblent indiquer la présence sur ces molécules de domaines constants, caractéristiques des variétés ou des espèces végétales, et de domaines variables, spécifiques des agents pathogènes stimulateurs de leur néoformation.

C - ANALYSE IMMUNOLOGIQUE DES FILTRATS DE CULTURE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines contenues dans les filtrats de culture des *Colletotrichum spp.* a permis par cette technique de différencier les 3 isolats de *C. capsici* (C-2017, CPA et CTN). A partir de ce résultat très intéressant, nous avons entrepris une analyse immunologique sur une bande protéique commune par son Rf à tous ces isolats. Il s'agit de la bande frontale majeure de Rf = 1 et qui est bien individualisée sur tous les gels à 10% d'acrylamide.

Une solution immunisante (1 µg/jour) constituée des protéines de la bande frontale de l'isolat C.2017 a été préparée à partir d'une extraction de gels d'électrophorèse. Quarante huit heures avant le début des immunisations, les souris ont été traitées au cyclophosphamide (50 mg/kg de souris) pour permettre une meilleure expression de la réaction immunitaire. Les révélations sont faites par injection de 50 µl de solution protéique concentrée de filtrat de culture des isolats de C. 2017 (B), CPA (D) et CTN (C) et *C. destructivum* (A) dans une patte arrière. Les résultats ont fait l'objet d'une analyse statistique.

Test de DUNCAN

	D	A	C	B
	0,148	0,154	0,289	0,463
S?	****		-	-

Toutes les souches du champignon sont reconnues par les souris immunisées par l'isolat C 2017 mais on remarque des différences significatives au niveau de l'intensité de ces reconnaissances marquées par les valeurs des gonflements des pattes. La réponse est plus marquée pour la souche homologue C. 2017 (B) qui se différencie nettement des deux autres *C. capsici* (C et D) Ces deux autres sont elles mêmes différentes entre elles, l'isolat du pois d'Angole (D) se rapprochant plus de *C. destructivum* (A).

Cette expérience répétée avec d'autres isolats de *Colletotrichum* a permis la confirmation de ces résultats.

Conclusion :

L'immunologie des bandes frontales protéiques des filtrats de culture de champignon permet une séparation des espèces appartenant au genre *Colletotrichum* et même des isolats différenciés par la morphologie de leur colonie (comme CTN et C 2017) et leur pouvoir pathogène (gamme d'hôte). Les protéines de la bande frontale majeure semblent porter des motifs antigéniques spécifiques des différentes unités taxonomiques à la manière des antigènes majeurs d'histocompatibilité des animaux. On retrouve le même type de spécificité qu'avec les variétés de plantes et ceci dans la même bande frontale.

D ANALYSES SEROLOGIQUES SUR DES PROTEINES DE NIEBE ET DE COLLETOTRICHUM

Les antigènes protéiques utilisés en immunisation à faible dose favorisent la réaction d'hypersensibilité retardée au détriment de la réaction humorale. Néanmoins, il y a toujours une production d'anticorps plus ou moins importante pour les doses plus élevées qui provoquent la tolérance contre l'hypersensibilité retardée (PARISH et LIEW, 1972).

Dans les expériences précédentes, nous avons utilisé des doses d'immunogène des filtrats de champignons ou des diffusats de plantes se situant dans la première partie de la courbe de PARISH et LIEW (1972) marquée, en principe, par une production notable d'anticorps.

Dans le but de compléter les résultats d'hypersensibilité retardée, nous avons réalisé des tests sérologiques par le prélèvement du sang des souris immunisées par les bandes frontales séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 %. Les bandes frontales étant spécifiques de la plante ou du pathogène en hypersensibilité retardée, leur utilisation devrait conduire également à la production de sérums spécifiques.

Nous avons cherché à vérifier cette hypothèse par la réalisation de tests d'immunodiffusion double en milieu gélosé selon la technique d'OUCHTERLONY (1958).

D1 - CAS DES PROTEINES DE PLANTE

Le premier sérum utilisé a été produit après immunisation des souris par la fraction la plus lourde (B) de la bande frontale protéique de diffusat de la variété LOCALE GOROM. Cette fraction a été isolée après filtration sur gel de Séphadex G 75 à partir du pic frontal du diffusat recueilli après électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide à 10 %.

Le sang prélevé sur les souris est centrifugé pendant environ 5 min. à 1 000 tours / min. Le sérum est placé dans le puits central rendu étanche à sa base par une goutte d'Agar. Nous avons utilisé 5 antigènes révélateurs dans les pics périphériques

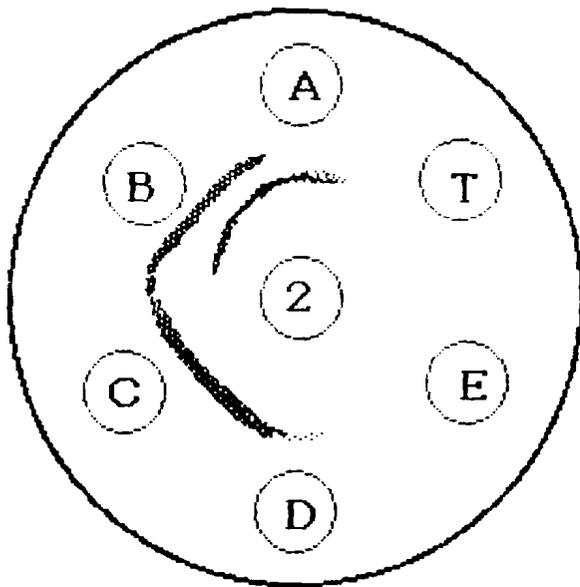
A = Protéines du Pic A (fraction de faible PM issue de la bande frontale de la variété Locale Gorom)

B = Protéines du Pic B (fraction plus lourde issue de la bande frontale de la variété Locale Gorom), antigène homologue.

C = Protéines totales de la bande frontale de la variété TVX 3236

D = Bande protéique n° 4 (en partant du bas des gels) de la variété TVX 3236

E = Diffusat non concentré de la variété TVX 3236.



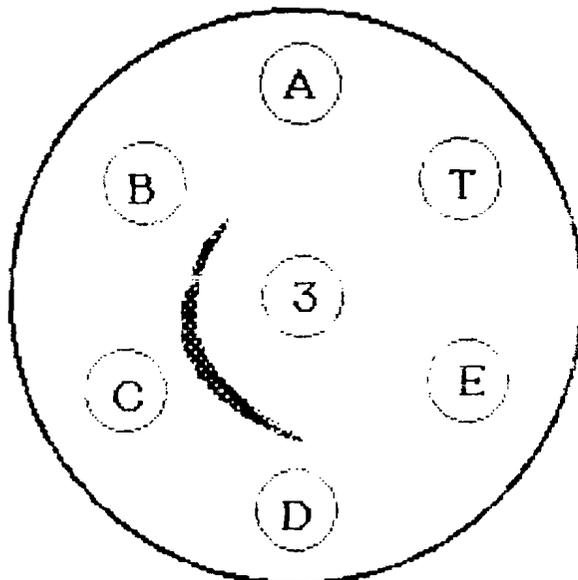
a) serum anti Local Gorom

Antigènes révélateurs

- A Pic A
- B Pic B } Bande frontale de la variété Locale Gorom
- C Bande frontale TVX3236
- D Bande n°4 TVX3236
- E Diffusat TVX3236
- T Tampon phosphate

Antiserums

- 2 Serum anti B
- 3 Serum d'animaux rendus tolérants à Local Gorom puis immunisés par TVX3236 (bande frontale) après traitement par l'Endoxan



b) serum anti- TVX 3236

Figure 29 Immunodiffusions d'immunserums préparés contre des bandes frontales d'électrophorèse en gels d'acrylamide de diffusats de deux variétés de niébé

Un témoin (T) est constitué par le tampon phosphate pH 7,1 de molarité 0,1 M utilisé dans la préparation du milieu gélosé.

Ces différents traitements placés dans les puits périphériques ont donné les résultats de la **figure 29 a**. Les antigènes des pics A et B répondent avec l'antisérum n° 2 anti B par la présence de 2 arcs de précipitation. Ces antigènes contenus dans la bande frontale protéique de la variété Locale Gorom sont probablement encore en mélange à l'issue de la filtration sur gels. Ils pourraient aussi porter des motifs antigéniques communs. Rappelons que cette réaction croisée a déjà été décelée par la réaction d'hypersensibilité retardée. Les protéines de la bande frontale de la variété TVX 3236 (puits C) réagissent avec l'antisérum par la présence d'une seule ligne de précipitation traduisant ainsi l'existence d'une communauté entre les variétés. Cette communauté antigénique se retrouve plus faiblement au niveau des protéines du pic n° 4 de la même variété TVX 3236 (puits D).

La réponse négative observée par le diffusat TVX 3236 (puits E) s'explique par sa faible concentration en protéines. Un autre antisérum a été confronté aux mêmes antigènes révélateurs (**figure 29 b**). Il s'agit de l'antisérum n° 3 issu d'animaux rendus tolérants aux protéines frontales de la variété Locale Gorom, puis immunisés par les protéines frontales de la variété TVX 3236 après traitement par l'Endoxan.

Une seule ligne de précipitation révèle, comme dans le cas précédent, une communauté antigénique entre le pic B de la variété Locale Gorom et la variété TVX 3236 (bandes frontale et n° 4). Cette expérience montre, en outre, qu'une tolérance établie peut être levée par un traitement antisupprimeur au cyclophosphamide (Endoxan) rendant l'animal susceptible d'être à nouveau immunisé par un antigène antérieurement toléré.

L'étude de ces deux antisérums semble montrer qu'il existe entre les deux variétés considérées au moins un système antigénique commun (B). De plus au moins un système antigénique semble spécifique de la variété Locale Gorom (A).

D2 - ETUDE DES PROTEINES DU CHAMPIGNON

Dans une expérience similaire, nous avons utilisé le sérum de souris immunisées par les protéines frontales de filtrat de l'isolat C. 2017 après séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 %. Les antigènes révélateurs utilisés sont constitués par les protéines des filtrats des champignons suivants : *C. destructivum*, *C. lindemuthianum*, et les isolats CPA, CTN et C. 2017 de *C. capsici*. Le témoin est toujours constitué par le tampon phosphate. Après 2 semaines d'incubation, nous

avons représenté les résultats sur la **figure 30**. Il se forme 2 arcs de précipitation en face des puits contenant les protéines de C. 2017 et CTN.

Il y a spécificité par rapport à l'origine d'isolement de la plante marquée par les signes de précipitation des 2 isolats issus de niébé. On retrouve les mêmes résultats en sérologie qu'en hypersensibilité retardée où l'utilisation de la bande frontale de l'isolat C. 2017 en immunisation permet de différencier les isolats de *C. capsici*, issus du niébé de celui issu du pois d'Angole.

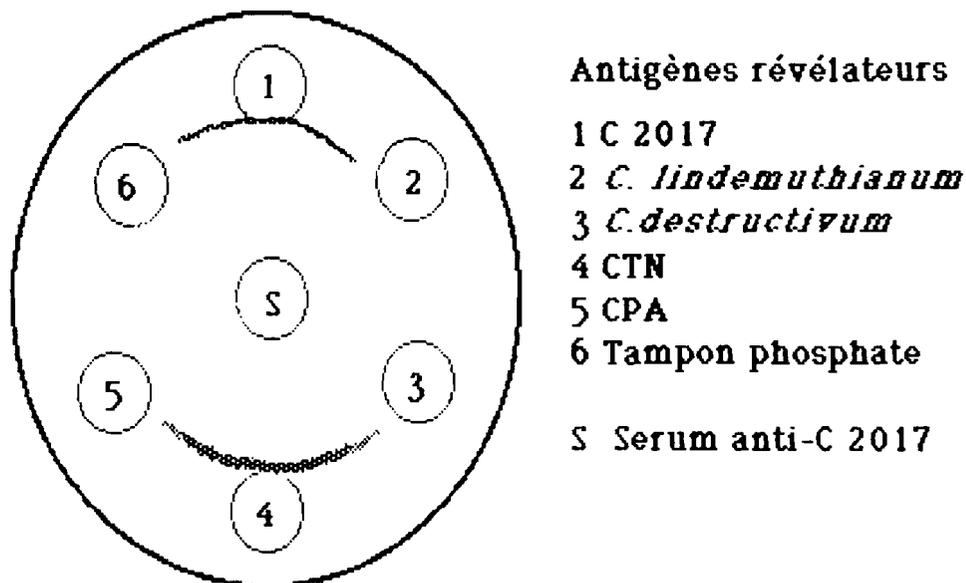


Figure 30 Immunodiffusion pour un serum préparé contre le surnageant de culture de l'isolat C 2017 de *C. capsici*.

Conclusion

Grâce à l'utilisation d'antigènes séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide il a été possible d'obtenir, tant en hypersensibilité retardée (réaction cellulaire) qu'en sérologie (réaction humorale), des réactions spécifiques soit des variétés de niébé soit des souches de champignons isolées sur des hôtes différents.

Les bandes frontales d'électrophorèse de fractions protéiques extracellulaires, puisque recueillies dans les filtrats de culture ou les diffusats de feuilles, contiennent des antigènes spécifiques de souches ou de variétés. Une étude immunologique élargie à un plus vaste ensemble de variétés et de souches serait désormais utile, afin de prouver cette nouvelle voie d'identification des taxons et surtout, grâce à une approche génétique, d'approfondir la connaissance des relations entre hôtes et agents pathogènes.

CONCLUSION GENERALE.

Le souci premier au cours de ce travail a été de proposer une méthode de lutte assez efficace contre la maladie des taches brunes du niébé tout en essayant également de mieux comprendre l'interaction entre la plante et son parasite.

Après une analyse des travaux de plusieurs auteurs, une orientation vers la lutte chimique en traitement des semences a été proposée et critiquée. Cette voie ne constituant pas une garantie totale quant à l'infection des plantes par d'autres sources d'inoculum, la nécessité d'améliorer la résistance variétale s'est imposée, ce qui entraîne la nécessité d'une méthode fiable de mesure de la sensibilité et d'une meilleure connaissance de la biologie de l'interaction hôte-pathogène. C'est pourquoi sont nées les recherches biochimiques, biologiques et immunologiques sur les supports moléculaires de la relation hôte-parasite.

En ce qui concerne le premier point étudié, l'hypothèse de base était de voir si l'utilisation d'un fongicide systémique en traitement des semences permettrait de réduire le taux de la maladie jusqu'au moment de la récolte. Les résultats intéressants enregistrés au laboratoire ont permis de définir une dose efficace du fongicide et ses conditions et limites d'emploi.

L'étude de la résistance variétale du niébé face à la maladie des taches brunes a nécessité la mise au point d'un système de criblage au laboratoire. Au cours de cette étude, les résultats de l'inoculation sur jeunes plantes au laboratoire sont compatibles en général avec ceux du champ pour les mêmes variétés. Cette étude a permis de déceler quelques variétés de niébé moins sensibles à la maladie des taches brunes. La technique de criblage à partir de plantules de niébé âgées de 3 semaines peut être retenue. Toujours dans cette étude, la présence de 2 souches différentes de *C. capsici* sur niébé au Burkina Faso a été décelée.

Pour ce qui concerne le deuxième aspect de ce travail, la synthèse de nouvelles protéines au cours de l'interaction niébé-*Colletotrichum* a pu être démontrée et confirmée à la suite de la digestion enzymatique réalisée sur ces molécules. Une méthodologie et un appareillage ont été mis au point pour séparer et purifier les protéines des diffusats des plantes traitées ou non par les parasites et les filtrats de culture des mêmes parasites. L'utilisation immunologique de ces protéines tant en hypersensibilité retardée (réaction cellulaire) qu'en sérologie (réaction humorale) a permis la mise en évidence d'une spécificité des

protéines de faible poids moléculaire aussi bien pour les souches de *Colletotrichum* que pour les variétés de niébé. De plus, les bandes protéiques nouvelles excrétées par les tissus foliaires du niébé sous l'effet de la stimulation des souches de *Colletotrichum* contiennent des motifs spécifiques de ces souches ainsi que des variétés de niébé. Un résultat fondamental a donc été enregistré. Il concerne la spécificité des motifs antigéniques porté par des protéines de faible poids moléculaire pour différentes unités taxonomiques de plantes et de parasites à la manière des antigènes majeurs d'histocompatibilité des animaux. Ces motifs antigéniques pourraient être utilisés, après purification, pour identifier soit les variétés soit les souches d'agents pathogènes dans des recherches de sélection ou de pathologie.

- ABOU-ZEID N., 1978. - Contribution à la connaissance de la résistance naturelle de *Vicia faba* contre les *Botrytis*. Thèse de Docteur Ingénieur en Sciences Agronomiques. ENSA de Rennes - Université de Rennes I.
- AHL P., 1983. - Aspects génétique et moléculaire de la résistance (Réaction d'hypersensibilité) chez les *Nicotiana*. Thèse de Docteur ès Sciences, Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
- AHL P., CORNU A., GIANINAZZI S., 1982. - Soluble Proteins as genetics markers in studies of resistance and phylogeny in *Nicotiana*. Phytopathology, 72, 80-85.
- AHL P., BENJAMA A., SAMSON A., GIANINAZZI S., 1981. - Introduction chez le tabac par *Pseudomonas syringae* de nouvelles protéines (protéines b) associées au développement d'une résistance non spécifique à une deuxième infection. Phytopath. Z. 102, 201-212.
- AKAI S., FUKUTOMI M., 1980. - Preformed internal physical defenses. Dans "Plant disease V. How plants defend themselves" ; ed. : HORSFALL J.G., COWLING E.B., Academic Press, N.Y., 139-159.
- AKIO MITSUOKA, 1976. - Enhancement of delayed hypersensitivity by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice. Nature, 262,, 77-78.
- ALLEN D.J., EMECHEBE A.M., NDIMANDE B., 1981. - Identification of resistance in cowpea to diseases of the African Savannas. Trop. Agric. 58 (3), 267-274.
- ANDEBRHAN J., COUTTS R.H.A., WAGIH E.E., WOOD R.K.S., 1980. - Induced resistance and changes in the soluble protein fraction of cucumber leaves locally infected with *Colletotrichum lagenarium* or tobacco necrosis virus. Phytopath. Z. 98, 47-52.
- ANTONI W J.F., PIERPOINT W.S., 1978. - The purification and properties of one of the "b" proteins from virus infected tobacco plants. J. Gen Virol. 39, 343-350.

- ANTONIW J.F., RITTER C.E., PIERPOINT W.S., VANLON L.C., 1980. - Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol., 47, 79-87.
- BARAKAT S., 1985. - Essai de caractérisation biologique des bases biochimiques de la spécificité parasitaire dans le couple : *Pseudomonas phaseolicola* (burkh.) Dowson-*Phaseolus vulgaris* L. Thèse de Docteur ès Sciences, Université de Rennes I.
- BANNEROT H., 1965. - Résultats de l'infection d'une collection de haricots par six races physiologiques d'antracnose. Ann. Amélior. Plantes, 15 (2), 201-222.
- BARKER H., 1975. - Effects of virus infection and polyacrylic-acid on leaf proteins. J. Gen. Virol., 28, 155-158.
- BECKMAN C.H., 1980. - Defenses triggered by the invader : physical defenses. Dans : "Plant disease V. How plants defend themselves" ; ed. : HORSFALL J.C., COWLING E.B., Academic Press; N.Y., 225-245.
- BENACERRAF B., 1981. - Role of MHC gene products in immune regulation. Science, 212, 1129-1138.
- BOIS D., 1927. - Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges. tome I. Paul Lechevalier, Paris (Encyclopédie biologique) 593 pp.
- BRENAN J.P.M., 1963. - Geographical relationships of leguminosae". Proc. Fifth Plenary Meeting of AETFAT. Unesco, Paris.
- CAMPBELL C.L., HUANG J., PAYNE G.A., 1980. - Defense at the perimeter : the outer walls and the gates. Dans : "Plant disease V. How plants defend themselves" ; ed. : HORSFALL J.G., COWLING E.B., Academic Press, N.Y., 103-120.
- CARR J.P., ANTONIW J.F., WHITE R.F., WILSON T.M.A., 1982. - Latent messenger RNA in tobacco (*Nicotiana tabacum*). Biochemical Society Transactions, 10, 353-354.

- CARROL R.B., LUKEZIC F.L., 1972.- Induced resistance in alfalfa to *Corynebacterium insidiosum* by prior treatment with avirulent cells. Phytopathology, 62, 55-564.
- CARROL R.B., LUKEZIC F.L., LEVINE Roslyn G., 1972. - Absence of a Common Antigen Relationship between *Corynebacterium insidiosum* and *medicago sativa* as a factor in disease development. Phytopathology, 62, 1351-1360.
- CARUSO F.L., KUC J., 1977. - Protection of watermelon and muskmelon against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, 67 (10), 1285-1289.
- CHARUDATTAN R., DE WAY J.E., 1972. - Common antigens among varieties of *Gossypium hirsutum* and isolates of *Fusarium* and *Verticillium* species. Phytopathology, 62, 230-234.
- CHARYA M.A.S., REDDY S.M., 1981. - Deterioration of Mung (*Vigna radiata* Wilizk) seeds due to certain seed-borne fungi. Indian JBot., 4 (1), 80-82.
- CHAUHAN M.S., DUHAN J.C., 1977. - Efficacy of some systemic and non-systemic fungicidal compounds to control anthracnose and ripe fruit rot of chillies. Pesticides, 12 (12), 17-18.
- CHI-CHANG CHEN , HUN-YUNG HSU, 1968. - Studies on the anthracnose of China fir. Botanical Bulletin of Academia sinica, 9 (2), 89-102.
- CHOPRA B.L., SINGH T.H., PARKASH R., 1975. - Effect of boll rot phase of anthracnose on germination and technological properties of cotton fibre. J. of res. Punjab. Agric. Univ., 12(1), 1-5.
- CHOO Y.S., HOLLAND A.A., 1970. - Direct and indirect fluorescent antibody staining of *Ophiobolus graminis*. *Sacc* in culture and in the rhizosphere of cereals plants. Antonie Leenwenhock, 36, 549-554.
- CHOWDHURY S., 1957. - Studies on the development and control of fruit rot of chillies. Indian Phytopathology, 10 (1), 55-62.

- CONEJERO V., SEMANCI K J. S., 1977.-Analysis of the Proteins in Crude Plant Extrats by Polyacrylamide Slab Gel Electrophoresis Phytopatology, 67, 1424-1426.
- COUTTS R.H.A., 1978. - Alterations in the soluble Protein patterns of tobacco and Cowpea with tobacco necrosis virus. Plant Sci. Lett., 12, 189-197.
- CRUICKSAHNK I.A.M., 1980. - Defenses triggered b the invader : chamilical defenses. Dans "Plant disease". V. How plants defend themselves" ; ed. : HORSFALL J.G., COWLING E.B., Academic Press, N.Y., 247-267.
- DAVIS J.B., 1964. - Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- DOUBLY J.A., FLOR H.H., CLAGETT C.O., 1960. - Relation of antigens of *Melanspora lini* and *Linum usitatissimum* to resistance and susceptibility. Science, 131, 229.
- EMECHEBE A.M., 1981. - Brown Blotch of Cowpea in Northern Nigeria. Samaru J. of Agricultural Research, 1 (1), 20-26.
- EMECHEBE A.M., DONALD D. Mc., 1979. - Seed-borne Pathogenic Fungi and Bacteria of Cowpea in Northern Nigeria. Pans. 25 (4), 401-404.
- EUZEBY J., 1980. - Presentation des états d'hypersensibilité. Le Point Vétérinaire., 10 (47), 51-58.
- FRASER R.S.S., 1981. - Evidence for the occurence of the "pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. Physiol. Plant Pathol., 19, 69-76.
- GIANINAZZI S., 1982. - Antiviral agents and inducers of virus resistance : analogies with interferon. In "Active defense mechanisms in plants". Ed. R. K. S., Wood, 275-298. Plenum Publishing Corporation.
- GIANINAZZI S., AHL P., CORNU A., SCALLA R., CASSINI R., 1980. - First report of host b. Protein apparence in response to a fungal

infection in tobacco. Physiol. Plant Pathol., 16, 337-342.

GIANINAZZI S., KASSANIS B., 1974. - Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. J. Gen. Virol., 23, 1-9.

GIANINAZZI S., MARTIN C., 1975. - A naturally occurring active factor inducing resistance to virus infection in plants. Phytopath. Z., 83, 23-26.

GIANINAZZI S., PRATT H.M., SHEWRY P.R., MIFLIN B.J., 1977. - Partial purification and preliminary characterization of soluble leaf proteins specific to virus infected tobacco plants. J. Gen. Virol., 34, 345-351.

GIANINAZZI S., VALLEE J.C., MARTIN C., 1969. - Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi n. c.* C. R. Acad. Sci. Paris, Série D, 268, 800-802.

GIANINAZZI S., VALLEE J.C., 1969. - Température et synthèse de matériel protéique viral chez le *Nicotiana xanthi n. c.* infecté par le virus de la mosaïque du tabac. C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, 269, 593-595.

GIANINAZZI S., MARTIN C. et VALLEE J.C., 1970. - Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi n. c.* Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. C. R. Acad. Sci. Paris, Série D, 270, 2383-2386.

GIRI M., 1983. - Recherches méthodologiques pour l'étude des protéines dans l'interaction hôte-parasites. Mémoire de D.E.A. d'Agronomie. Option Sciences phytosanitaires. Université de Rennes I.

GESSLER C., KUC J., 1982. - Appearance of a host protein in Cucumber plants infected with virus, Bacteria and Fungi. Journal of Experimental Botany, 33 (132), 58-66.

GROVER R.K., BANSAL R.D., 1970. - Seed-borne nature of *Colletotrichum capsici* in chili seeds and its control by seed dressing fungicides. Indian phytopathology, 23 (4), 664-668.

- HEGDE R.K., SACHCHIDANANDA J., CHENULU V.V., MUNJAL R.L., 1967. - Serology in the Differentiation of physiologic races of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav. Determination of Varietal resistance to disease. Indian Phytopathology, 6, 166-167.
- HINGAND L., LECOZ S., KERLAN C., JOUAN, 1983. - Application de l'immunofluorescence à la détection de *Phoma exigua* var. *foveata* agent de la gangrène de la pomme de terre. Agronomie, 3 (1), 51-56.
- HUXLEY P.A., SUMMERFIELD R.J., 1976. - Effects of daylength and day/night temperatures on growth and seed yield of cowpea cv K 2809 grown in controlled environments. Ann. Appl. Biol., 83 (2), 259-271.
- IRRI, 1975. - Standard evaluation system for rice. international Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- KADU I.K., MORE B.B., UTIKAR B.G., 1977. Laboratory and field evaluation of fungicides against *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler and Bisby the incitant of anthracnose of chilli. Pesticides, 11 (12), 19-20.
- KAISER S.A.K.M., SEN GUPTA P.K., 1976. - Serological and electrophoretic studies of three formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Trans. Br. Mycol. Soc., 67 (1), 33-37.
- KASSAM A.H., 1976. - Crops of the west African semi-arid tropics. International Crops Research Institute of the semi-arid tropics. Hyderabad, Inde.
- KASSANIS B., 1981. - Some speculations on the nature of the natural defense mechanism of plants against virus infection. Phytopath. Z., 102, 277-291.
- KASSANIS B., GIANINAZZI S., WHITE R.F., 1974. - A possible explanation of the resistance of virus-infected tobacco plants to second infection. J. Gen. Virol., 23, 11-16.

- KASSANIS B., WHITE R.F., 1974. - Inhibition of acquired resistance to tobacco mosaic virus by Actinomycin D. J. Gen. Virol., **25**, 323-4.
- KEEN N.T., 1978. - Phytoalexins : efficient extraction from leaves by a facilitated diffusion technique. Phytopathology, **68**, 1237-1239.
- KITAMURA K., 1980. - A footpad weight assay methode to evaluate delayed type hypersensitivity in the mouse. J. Immunol. Methods., **39**, 277-283.
- KLEMENT Z., 1965. - Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phyto-bacterial pathogen. Phytopathology, **55**, 1033-1034.
- KUBO Y., SUZUKI K., FURUSAWA I., YAMAMOTO M., 1982. - Effect of Tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, **72**, 1198-1200.
- LAEMMLI U.K., 1970. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature, **227**, 680-685.
- LING L., LIN K.R., 1946. - On the occurrence of *Colletotrichum capsici* in China. Indian J. Agric. Sci., **14**, 162-167.
- LOURD M., GEIGER J.P., GOUJON M., 1979. - Les *Colletotrichum* agents d'antracnoses en Côte d'Ivoire. I. Caractéristiques morphologiques et culturelles d'isolats de *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. Ann. Phytopathol. **11** (4), 483-495.
- MADHOSINGH C., 1964. - A serological comparison of three *Fusarium* species. Canadian Journal Botany, **42**, 1143-1146.
- MANSFIELD J.W., 1982. - The role of phytoalexins in disease resistance. Dans "Phytoalexins" ; ed. : BAILEY J.A., MANSFIELD J.W., BLACKIE and Son LTD, GLASGOW, 253-288.
- Mémento de l'Agronome, 1980. Ministère Français de la Coopération 699-702.
- MESSIAN C.M., 1981. - Les variétés résistantes. Méthode de lutte contre les maladies et ennemis des plantes. INRA, 374 pp.

- MITCHISON N.A., 1968. - The dosage requirements for immunological paralysis by soluble proteins. Immunology, 15, 509-530.
- MORTON D.J., DUKES P.D., 1966. - Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Plant Disease Reporter, 50 (6), 44-445.
- NORMAND W., 1972. - An economic survey of three villages in Zaria Province. 2. - Input-output study Vol. I Text. Samaru Miscel. Pap. N. 37. Institute for Agricultural Research, Samara, Nigeria.
- ONESIROSAN P.T., BARKER L.N., 1971. - Stem Anthracnose of Cowpeas in Nigeria. Plant Disease Reporter, 55 (9), 820-822.
- OUCHTERLONY O., 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5, 1
- PARISH C.R., LIEW F.Y., 1972. - Immune response to chemically modified flagellin III. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. J. Exp. Med., 135, 298-310.
- PC 31 SAFGRAD, 1983. - Tournées d'inspection de Mais et de niébé du SAFGRAD Newsletter, 9

- PIERPOINT W.S., 1983. - The major proteins in extracts of tobacco leaves that are responding hypersensitively to virus infection. Phytochemistry, 22 (12), 2691-2697.
- POLAK L., TURK J.L., 1974. - Reversal of immunological tolerance by cyclophosphamide through inhibition suppressor cell activity. Nature, 249, 654-656.
- Rapport annuel, 1981. - Programme National Pour L'Amélioration du Niébé Ouagadougou, HAUTE VOLTA.
- Rapport du Centre du Commerce International, 1982. - Niébé et Voandzou. Une perspective pour le développement du Commerce régional en Afrique de l'Ouest. 123 pp.
- RAYNAL G., 1970. - Contribution à l'étude des pourritures de capsules du cotonnier en El Salvador. II. - Comparaison des caractères culturaux et de la morphologie des souches de *Colletotrichum indicum* provenant de El Salvador et de Thaïlande. Coton Fibres Trop., 25, 443-448.
- RAYNAL G., 1977. - Comparaison en contaminations artificielles des pouvoirs pathogènes des *Colletotrichum* isolés en France sur la luzerne. Ann. phytopathol., 9 (2), 193-203.
- RAYNAL G., 1983. - Contribution à l'étude des mycoses de la luzerne et du trèfle violet. Cas de 3 maladies nécrotiques : anthracnose, pepper-spot, sclérotiniose. Possibilités de lutte. Thèse de Docteur d'Etat, Université de Paris Sud-Centre d'Orsay.
- REDDY M. SUGUNAKAR, RAMAPANDU S., RAO A. APPA, 1981. - Development of resistance in *Gloeosporium ampelophagum* and *Colletotrichum capsici* to fungicides. Proc. Indian Acad. Sci., 90 (6), 535-539.
- REDOLFI P., 1983. - Protein changes and hypersensitive reaction in virus-infected Bean leaves. Rivista di Patologia vegetale, S. IV, 19, 7-14.
- REDOLFI P., CANTISANI A., 1984. - Preliminary characterization of new soluble proteins in *Phaseolus vulgaris* cv. saxa reacting hypersensitively to viral infection. Physiol. Plant Pathol., 25, 9-19.

- ROGER L., 1953. - *Phytopathologie des pays chauds. tome II*, Paul Lechevalier, Paris, 2256 pp.
- ROSS A.F., 1961. - Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14, 340-358.
- ROY K.W., 1982. Seedling Diseases caused in Soybean by species of *Colletotrichum* and *Glomerella*. *Phytopathology*, 72 (8), 1093-1096
- SANKARA P., 1981. - Contribution à la connaissance biologique et biochimique de quelques substances impliquées dans les relations hôtes-pathogène du couple *Vicia faba* L. *Botrytis fabae* Sard. Thèse de Doctorat troisième Cycle. Université de Rennes I.
- SCHNATHORST W. C., DEVAY J.E., 1963. - Common antigens in *Xanthomonas malvacearum* and *Gossypium hirsutum* and their possible relationship to host specificity and disease resistance. *Phytopathology*, 53, 1142. (Abstract.)
- SINGH S.R., ALLEN D.J., 1980. - Pests, diseases, resistance, and protection in cowpeas. In Advances in Legume Science, 419-443.
- SINGH K., SRIVASTAVA S.N., SEN C., AGNIHOTRI V.P., 1974. - New diseases of sugarbeet from India. Science and Culture, 40 (50), 196-198.
- SMITH R.W.D.F., CROSSAN D.F., 1958. - The taxonomy, etiology, and control of *Colletotrichum piperatum* (E. & E.) E. & H and *Colletotrichum capsici* (SYD.) B & B.). Plant Disease Reporter, 42 (10), 1099-1103.
- SOMANI R.B., WANGIKAR P.D., SHUKLA V.N., 1975. - A new Stem Canker and Die Back Disease of Pigeon pea. Indian Phytopathology, 28, 436-437.
- SOMANI R.B., WANGIKAR P.D., SHUKLA V.N., 1976. - Stem Canker and Die Back Disease of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). A new report. Journal of Mau, 1 (Addi), 317-318.

- SOMSIRI J., PAIROJ J., PHATAK H.C., 1978. - Serological investigation on *Colletotrichum capsici* and *C. piperatum*. Kasetsart Journal, 12 (2), 96-102.
- STEELE W.M., MEHRA K.L., 1980. - Structure, evolution, and adaptation to farming systems and environments in *Vigna*. In advances in Legume Science, 393-404.
- SUTTON D. C., 1979. - Systemic cross protection in bean against *Colletotrichum lindemuthianum*. Australasian Plant Pathology, 8 (4-5), 4-5.
- TAS P.W.L., PETERS D., 1977. - The occurrence of a soluble protein (E1) in cucumber cotyledons infected with plant viruses. Neth. J. Plant Path., 83, 5-12.
- TU J.C., Mc NAUGHTON M.E., 1979. - Isolation and characterization of Benomyl-resistant biotypes of the Delta race of *Colletotrichum lindemuthianum*. Can. J. Plant sci., 60, 585-589.
- URITANI L., STAHMANN M.A., 1961. - The relationship between antigenic compounds produced by sweet potato in response to black rot infection and the magnitude of disease resistance. Agr. Biol. Chem., 25, 479-486.
- DE VALLAVIEILLE C., 1983. - Structure d'une population phytopathogène sélectionnée sous la pression d'une population hôte perenne : le cas de *Phytophthora sp.* inféodé aux agrumes de la plaine orientale Corse. Thèse de Docteur d'Etat, Université de Paris Sud Centre d'Orsay.
- VAN DER PLANK J.E., 1968. - Disease resistance in plants. N.Y. and London : Academic. 206 pp.
- VAN LOON L.C., 1975. - Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". IV. Similarity of qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. Virology, 40, 199-211.

- VANLOON L.C., 1976. - Specific soluble leaf proteins in virus-infected tobacco plants are not normal constituents. J. Gen. Virol., 30, 375-379.
- VANLOON L.C., VAN KAMMEN A., 1970. - Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology, 40, 199-211.
- VAVILOV N.I., 1935. - "The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants" Chronica Botanica 13. Walt ham, Mass. USA.
- VEDIE R., 1984. - Contribution à la connaissance de l'écologie et de la physiologie de la reconnaissance hôte-parasite dans une maladie du feuillage : le *Botrytis* de la féverole (*Vicia faba* L.). Thèse de Docteur en Troisième Cycle, Université de Rennes I.
- VEDIE R., SEREME P., BRIENS M., LE NORMAND M., 1984. - Présence et spécificité des protéines de réponse (P.R.) induites chez deux légumineuses. 25ème colloque de la SFP, 18 Novembre 1983, Toulouse. Agronomie, 4 (7), 693.
- WARD E.W.B., STOESSL A., 1976. - On the question of elicitors or inducers in incompatible interactions between plants and fungal pathogens. Phytopathology, 940-941.
- WILLIAMS R.J., 1975. - Disease of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Nigeria. Pans, 21 (3), 253-267.
- WILLIAMS R.J., 1977. - Identification of multiple disease resistance in cowpea. Trop Agric., 54 (1), 53-59.
- WIMALAJEEWA D.L.S., DE VAY J.E., 1971. - The occurrence of a common antigen relationship between *Ustilago maydis* and *Zea mays*. Physiol. Plant Pathol., 1, 523-535.
- DE WIT P.J.G.M., BAKKER J., 1980. - Differential changes in soluble tomato leaf proteins after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). Physiol. Plant Pathol., 17, 121-130.

VU :

Le Président de la thèse

VU :

Le Directeur de thèse

VU et APPROUVE

RENNES, le

Le Directeur de l'U.E.R.

VU pour autorisation de soutenance

RENNES, le

Le Président de l'Université de RENNES I,

J.P. CURTES