

# SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
MATERIELS ET METHDES.....	8
A. Matériels.	8
I. Matériel Animal : <i>Pratylenchus coffeae</i> spp.....	8
I.1. Position systématique du genre <i>Pratylenchus</i> .....	8
I.2. Biologie de nématodes.....	8
I.3. Symptomatologie.....	9
I.4. Distribution géographique.....	9
I.5. Populations testées.....	9
II. Matériel végétal.....	10
II.1. Les caféiers.....	10
II.1.1. Origine et distribution géographique.....	10
II.1.2. Taxonomie et biologie de la plante.....	10
II.1.3. Principaux cultivars de la caféiculture.....	10
II.1.4. Cultivars utilisés dans nos essais.....	11
II.2. Les bananiers.....	11
II.2.1. Origine et distribution géographique.....	11
II.2.2. Taxonomie et biologie de la plante.....	12
II.2.3. Principaux cultivars de la production de bananes.....	12
II.2.4. Cultivars utilisés dans nos essais.....	12
B. Méthodes	13
I. Expérimentations <i>in planta</i> .....	13
I.1. Etude du pouvoir pathogène du complexe <i>P.coffea</i> .....	13
I.1.1. Inoculation des expérimentations.....	13
I.1.2. Déroulement et suivi des essais.....	13
I.1.3. Extraction et comptage des nématodes.....	14
I.2. Traitement et analyse des données.....	14
II. Caractérisation biochimique : focalisation isoélectrique.....	15
II.1. Principe de la focalisation isoenzymatique.....	15
II.2. Isoenzymes testées en isofocalisation.....	15
II.3. Analyse des gels d'isofocalisation.....	15
RESULTATS	16
I. Caractérisation du pouvoir pathogène de quelques isolats de <i>P.coffeae</i> spp. in	16
planta.....	16
I.1. Détermination des paramètres d'études.....	16
I.1.1. Expérimentations sur bananiers.....	16
I.1.2. Expérimentations sur caféiers.....	18
I.2. Caractérisation du pouvoir pathogène de plusieurs isolats de <i>P.coffeae</i> spp....	19
I.2.1. Etude du pouvoir pathogène d'isolats de <i>P. coffeae</i> spp. sur bananiers.	19
I.2.2. Etude du pouvoir pathogène d'isolats de <i>P coffeae</i> sur caféiers.....	21
I.2.3. Détermination d'une éventuelle relation spécifique hôte -d'origine	
des isolats et leur pouvoirs pathogène sur bananier caféier. .	22
II. Caractérisation biochimique d'isolats de <i>P.coffeae</i> spp.....	23
III. Criblage variétal du genre <i>Coffeae</i> aux attaques de nématodes du complexe <i>P.</i>	24
<i>coffae</i> .....	
DISCUSSION.....	25
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	29
BIBLIOGRAPHIE.....	30
ANNEXES .....	

## INTRODUCTION

Les grandes productions agronomiques mondiales que représentent la culture du café et de la banane sont d'une importance économique et sociale fondamentale pour les pays de la zone intertropicale.

Le café est le premier produit agricole d'exportation et la seconde production mondiale après le pétrole, avec 110,4 millions de sacs en 2001 (bulletin des matières premières, OIC). Deux espèces ont une importance économique : *Coffea arabica*, et *C. canephora*. La caféiculture de l'Amérique Latine et des Caraïbes fournit plus de 65% de la production mondiale. De même, l'« industrie bananière » s'est largement développée au cours du dernier siècle. De nos jours, la production mondiale est estimée à 85 millions de tonnes, dont 98% est fournie par des pays en développement. La banane d'exportation, avec seulement 12% de la production de bananes, représente un des piliers de l'économie de pays pour l'Amérique Latine et l'Afrique.

Même si la culture à grande échelle de ce type de productions participe de manière significative au développement de ces pays, l'intensification de ces monocultures a conduit inévitablement à des contraintes sérieuses d'ordre phytosanitaire. De nombreux efforts concernant la protection des cultures par la recherche de méthodes de lutte ont été réalisés au niveau des maladies et des pathogènes les plus connus (champignons, virus, bactéries). Paradoxalement, les nématodes phytophages ont été longtemps insoupçonnés, souvent sous-estimés voire méconnus. Or par les dommages extrêmement conséquents qu'ils occasionnent dans le monde, ils sont responsables de pertes agronomiques de plusieurs millions de dollars chaque année.

Les principaux genres de nématodes phytopathogènes des caféiers sont *Meloydogyne spp.* et *Pratylenchus spp.*, pouvant engendrer des pertes évaluées à près de 15% à l'échelle mondiale mais affectant particulièrement les zones de production au Mexique, en Amérique Centrale et dans les Caraïbes (Sasser, 1979). D'autre part, les nématodes se rencontrent dans la globalité des régions bananières (Stover, 1972). Plus de 140 espèces de nématodes inféodées à des degrés divers aux Musacées ont été recensées. Certaines espèces de nématodes sont même constamment associées à cette culture : *Hoplolaimus pararobustus*, *Helicotylenchus multicinctus*, des espèces particulières de *Pratylenchus* et *Meloydogyne*, *Rotylenchulus reniformis* et *Radopholus similis*.

Parmi tous ces nématodes parasites des bananiers cultivés, *Radopholus similis* est considéré comme le plus répandu et le plus dévastateur (Sarah, 1989). En outre, deux principaux genres affectent à la fois les régions caféières et bananières dont le genre *Pratylenchus spp.* d'une importance économique mondiale considérable. Ainsi, l'espèce la plus citée à la fois sur caféiers (Campos et al., 1990 ; Villain et al., 1999, 2000) et sur bananiers (Sarah, 1989, 2000 ; Gowen et Quénéhervé, 1990) est *Pratylenchus coffeae*. C'est pourquoi une Action Thématique Programmée (ATP) de caractérisation et de mise au point d'outils d'identification du complexe *P. coffeae* a été proposée afin de clarifier les statuts pathogéniques et taxinomiques des ces diverses populations. L'objectif final de cette étude est la gestion efficace et durable des caféières et des bananeraies par la mise en place de stratégies de lutte intégrée (variétés résistantes, rotation des cultures...).

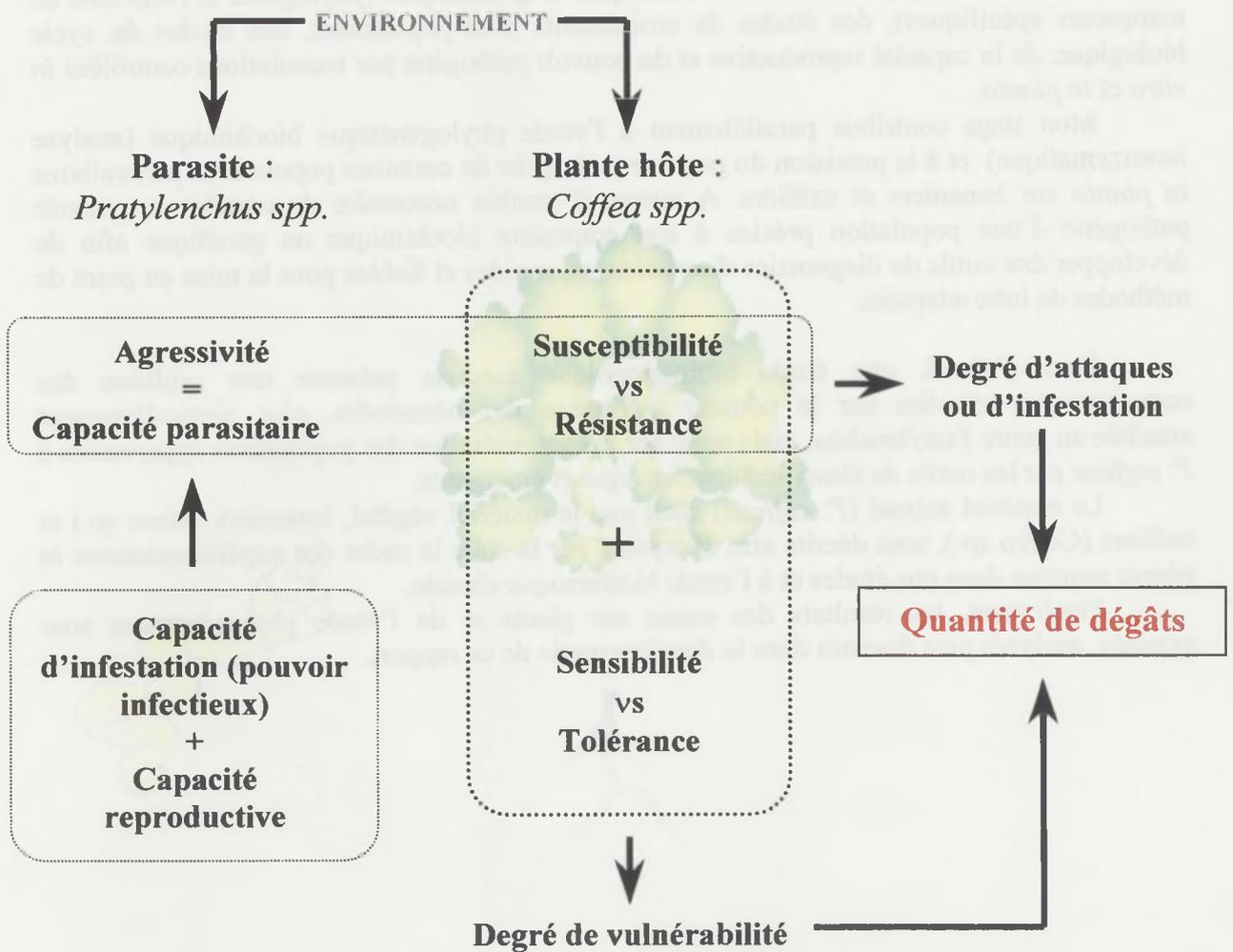
Le projet porte sur des populations de nématodes originaires du bassin Caraïbe (Amérique Centrale et Arc Antillais) et d'autres, d'origine variée, collectées au cours de prospections dans les principales régions caféières et bananières (Brésil, Hawaï, Afrique, Asie). Plusieurs niveaux d'études participent à la caractérisation des nématodes apparentés à *P. coffeae* : des études morphoanatomiques par morphométrie classique et microscopie électronique à balayage, des études biochimiques et génomiques (phylogénie et recherche de marqueurs spécifiques), des études de croisements inter-populations, des études du cycle biologique, de la capacité reproductive et du pouvoir pathogène par inoculations contrôlées *in vitro* et *in planta*.

Mon stage contribue parallèlement à l'étude phylogénétique biochimique (analyse isoenzymatique) et à la précision du pouvoir pathogène de certaines populations particulières *in planta* sur bananiers et caféiers. A terme, il semble nécessaire de corrélérer le pouvoir pathogène d'une population précise à son empreinte biochimique ou génétique afin de développer des outils de diagnostics discriminants, rapides et fiables pour la mise au point de méthodes de lutte adaptées.

Tout d'abord, une étude bibliographique succincte présente une synthèse des connaissances actuelles sur le pouvoir pathogène des nématodes, plus particulièrement attachée au genre *Pratylenchus*, mais aussi sur la caractérisation des populations apparentées à *P. coffeae* par les outils de classification classique et émergents.

Le matériel animal (*P. coffeae*) ainsi que le matériel végétal, bananiers (*Musa sp.*) et caféiers (*Coffea sp.*), sont décrits afin d'exposer par la suite le cadre des expérimentations *in planta* requises dans nos études et à l'étude biochimique choisie.

Finalement, les résultats des essais sur plants et de l'étude phylogénétique sont exposés, analysés puis discutés dans la dernière partie de ce rapport.



**Figure 1** : Schéma des relations hôte-parasite dans le cas de *Pratylenchus spp.* – *Coffea sp.*  
 D'après Bos & Parlevliet, 1995. Source : Villain L., 2000 (thèse)

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La nécessité d'études sur la taxinomie, le pouvoir pathogène des nématodes et les interactions biochimiques plante-nématode, est issue d'une prise de conscience relativement récente de l'importance des ravages causés par ces phytoparasites. L'absence de symptômes aériens typiques a longtemps contribué à l'ignorance même de ce type de ravageurs, généralement englobés dans la « fatigue des sols ». La compréhension des relations plante-nématode et des mécanismes de résistance permet la mise en place de moyens de lutte efficaces et ciblés.

La mise en place relativement récente d'études sur les nématodes a été confrontée à l'absence d'une terminologie adaptée aux relations hôte-nématode, leur mode de parasitisme étant très différent de celui des autres micro-organismes. Trudgill (1986), Cook et Evans (1987) ont été les premiers à proposer une qualification de la résistance d'une plante vis à vis d'un nématode par la capacité de l'hôte à empêcher le développement et la reproduction du nématode. Plus récemment, Shaner et al. (1992) ont défini le pouvoir pathogène comme la capacité d'un micro-organisme à induire une maladie. Le pouvoir pathogène se dissocie en deux composantes : d'une part la capacité parasitaire ou « agressivité », composante quantitative qui s'évalue à la fois par les taux de pénétration (pouvoir infectieux) et de multiplication dans l'hôte (capacité reproductive) ; et d'autre part la virulence, composante qualitative qui traduit la capacité intrinsèque d'un pathogène à causer des symptômes. Par définition, la virulence est ce qui rend un parasite pathogène. Le terme de virulence en nématologie est donc exclusivement réservé aux nématodes endoparasites sédentaires (relations gène pour gène). En 1995, Bos et Parlevliet ont réalisé une synthèse des concepts utilisés dans la totalité des disciplines de la phytopathologie afin de proposer une terminologie applicable quelle que soit la nature du parasite (cf. fig. 1 ci-contre).

Les nématodes phytoparasites, par les dommages qu'ils occasionnent aux tissus végétaux, et en particulier aux racines, constituent une composante importante de la fertilité. Le détournement des produits du métabolisme cellulaire de l'hôte pour les sédentaires ou la destruction directe des tissus pour les migrants entraîne inévitablement des dysfonctionnements de la nutrition hydrique et minérale des plantes, mesurable respectivement par la teneur en matière sèche et l'assimilation des principaux éléments minéraux (Lacoeuilhe et Guérout, 1976). Toutefois, les déficiences nutritionnelles majeures observées sur les plants fortement infestés suffisent généralement à expliquer le ralentissement de la croissance et du développement ainsi que les pertes de production (Trudgill, 1992).

La plante réagit très rapidement à la tentative d'invasion d'agents pathogènes. Les mécanismes de défense induits chez le végétal se caractérisent par un bouleversement du métabolisme. Dans le cas général, plusieurs mécanismes de défense sont mis en place au moment de l'infection que sont une réaction dite « hypersensible » qui se traduit par l'apparition de nécroses des tissus autour du site d'infection, un renforcement de la paroi cellulaire pour limiter la progression de l'agresseur, l'accumulation de protéines « PR » (pathogenesis related), et enfin l'induction des voies de biosynthèse des métabolites secondaires. Ainsi, en nématologie phytoparasite, la plupart des études concernant la relation hôte-pathogène tend à appréhender les relations biochimiques qui gouvernent les mécanismes de résistance des plantes vis à vis d'une invasion de nématodes.

La réponse des plantes aux parasites dépend non seulement de la composition chimique des plantes ou des tissus affectés, mais aussi de la composition quantitative et qualitative des sécrétions des nématodes exprimée par un « pathotype ». De plus, le type de parasitisme, sédentarité, endo- ou ecto migration, est déterminant pour le pouvoir infectieux.

L'existence d'une reconnaissance de type gène pour gène entre la plante et le nématode a été suggérée par Jones en 1974 et Sidhu l'année suivante, concernant les endoparasites sédentaires, particulièrement les nématodes à kystes ( genres *Heterodera* et *Globodera*) et à galles ( genre *Meloydogyne*), qui modifient les cellules de l'hôte pour se nourrir, se développer et assurer une reproduction. Différemment, seuls quelques rares ectoparasites provoquent une réponse cellulaire spécifique de la plante, ces nématodes n'établissant pas de relations durables avec leur hôte végétal. De la même façon, la relation entre la plante et la majorité des endoparasites migrants, auxquels appartient le genre *Pratylenchus*, est moins spécialisée.

Malgré un nombre important d'espèces du genre *Pratylenchus*, il est possible de mettre en évidence de grands mécanismes communs à toute introduction de ce type de nématode dans une plante. Les nématodes phytoparasites causent des dommages mécaniques assimilables à une blessure avec leur stylet. De plus, ils sécrètent des enzymes digestives de type cellulase, protéase, amylase (Dorpkins, 1963) qui hydrolysent la paroi végétale. La résistance ou plutôt réaction d'incompatibilité des plantes aux nématodes est due, dans certain cas, à des substances répulsives pour le parasite mais donc pratiquement jamais à l'existence de barrières s'opposant à sa pénétration ou au manque d'éléments nutritionnels dans la plante hôte. Au niveau cellulaire, des observations histopathologiques concernant les réactions d'incompatibilité aux nématodes montrent des changements dans la forme et la taille du noyau, la densité du cytoplasme, la finesse des parois cellulaires (Hung & Rhode, 1973 ; Muse, 1969 ; Rebois et al., 1975).

Les composés phénoliques sont les facteurs les mieux connus impliqués dans la réponse à un parasite, une corrélation claire entre la résistance des plantes et les composés phénoliques ayant été montrée dans les tissus végétaux. L'effet des composés phénoliques sur le comportement et le métabolisme des nématodes a donc été inévitablement étudié. Rhode, en 1972, fut le premier à suggérer le possible rôle des phénols simples préformés dans l'interaction d'incompatibilité hôte-parasite. La production post-infectionnelle de phytoalexines a souvent été associée à la réaction hypersensible et est généralement considérée comme un important mécanisme de défense vis à vis de nombreux pathogènes dont parfois certains nématodes (Kaplan, 1978 ; Rich et al., 1977 ; Veech, 1978).

L'accumulation de phénols et des produits d'oxydation phénolique a été associée avec le brunissement cellulaire de nombreuses variétés de plantes infestées par différents genres de nématodes phytoparasites (Chang, 1969 ; Giebel, 1970). Ainsi, les quinones ont été citées comme étant les formes les plus toxiques et aussi les plus réactives (Chang, 1969 ; Hung & Rhode, 1973). D'une manière paradoxale, l'acide chlorogénique a été démontré comme un attractif alors que ses produits d'oxydation ont montrés des propriétés repoussantes sur *Pratylenchus penetrans in vitro* (Chang, 1969). De plus, l'acide chlorogénique n'affecte pas la respiration des nématodes à la différence de ses produits d'oxydation qui génèrent des réductions significatives d'assimilation de l'oxygène. Cependant, bien que des taux élevés de phénols constitutifs dans les racines soient positivement corrélés avec la résistance aux nématodes de certains cultivars, ils ne suffisent pas à expliquer totalement la réaction d'incompatibilité (Ponin et al., 1977 ; Rhode, 1972 ; Sidhu & Webster, 1973).

En 1977, Rich, Keen et Thomason ont mis en évidence que l'introduction de *Pratylenchus scribneri* dans les racines du haricot Lima (*Phaseolus lunatus*) génère une réponse hypersensible mais pas dans celle du haricot « croquant » (*Phaseolus vulgaris*). Cette étude suggère que le coumestrol et la psoralidine, synthétisés de novo après inoculation dans les racines du haricot Lima, sont les phytoalexines cruciales pour la résistance hypersensible envers *P. scribneri*.

De plus, l'incubation de faibles concentrations de coumestrol (10-15 µg/mL) pendant 48h avec *P. scribneri in vitro* réduit de moitié la mobilité du nématode mais en aucun cas celle de *Meloydogyne javanica*. Ces expérimentations prouvent le rôle des composés phénoliques dans la résistance des plantes aux nématodes et mettent en évidence une haute spécificité d'interaction d'un ou plusieurs composés phénoliques envers une population de nématode particulière.

Pour certaines plantes, il existe naturellement des résistances à quelques types de nématodes. En effet, d'autres types d'études ont été menées en parallèle sur des Luzernes sensibles ou résistantes à *Pratylenchus penetrans* (Baldrige et al., 1998). Avant infection, le niveau d'ARN messagers des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes est significativement plus important chez les plantes résistantes et décroît après pénétration du nématode. Différemment, les plants sensibles voient leur contenu en messagers augmenter puis diminuer rapidement sans effet direct sur la teneur en isoflavonoïdes. L'analyse des racines des deux types de luzerne les plus résistantes contiennent de façon constitutive les plus forts niveaux en phytoalexines, essentiellement la médicarpine démontrée comme inhibant la mobilité du nématode *in vitro*.

Globalement, ces différentes études ont mis en évidence soit une résistance hypersensible par la synthèse de novo de composés phénoliques (cf. fig. 2), soit une résistance « acquise » par une composition phénolique particulière des plantes. Cependant, il a été démontré que la résistance du bananier à *Radopholus similis* repose sur des facteurs à la fois constitutifs et induits (Valette, 1996) : d'une part, les plantes résistantes possèdent continuellement des taux élevés de flavonoïdes, de dopamines, de dérivés caféiques, de tanins catéchiques et de lignine ; d'autre part, des composés phénoliques synthétisés de novo s'accumulent dans du matériel riche en pectine associé aux parois cellulaires à proximité du nématode contribuant à limiter la multiplication et la progression du nématode dans les tissus hôtes. Le dépôt de composés phénoliques (lignines), d'esters tels que la subérine, de polysaccharides et de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) participent au renforcement de la paroi cellulaire, phénomène commun à toute infection par un agent pathogène (Benhamou, 1996).

Cependant, l'étude des mécanismes relationnels entre la plante hôte et le nématode ne peut avoir lieu que si le pathogène est préalablement bien identifié et que la composition biochimique initiale du végétal est déterminée. C'est pourquoi il est nécessaire de caractériser de façon précise à la fois le statut taxinomique et le pouvoir pathogène d'une population de nématodes *in vitro* et *in planta*.

En ce qui concerne le genre *Pratylenchus*, peu d'études ont été réalisées tant sur le point de l'étude phylogénique des nombreuses espèces que sur l'étude des symptômes occasionnés sur les cultures. Les premières études sur les phytoparasites souterrains ont émergé au milieu du XX<sup>e</sup> siècle mais principalement sur les nématodes engendrant des dégâts visibles tels que les galles ou les kystes sur les racines.

Si la famille des *Pratylenchidae* contient huit genres qui diffèrent les uns des autres par un grand nombre de caractères, le genre *Pratylenchus* est considéré comme sténomorphique avec de nombreuses espèces morphologiquement très similaires (Luc, 1987). Pour cela, des études basées non seulement sur la morphologie mais aussi sur le génome et la biologie (reproduction et pouvoir pathogène) doivent permettre de clarifier les statuts taxinomique et pathogénique de populations de *Pratylenchus coffeae* spp., parasites majeurs le plus cités sur caféiers et bananiers dans le bassin Caraïbes et en Amérique Centrale. L'espèce type a été décrite en 1898 par Zimmerman à partir d'une population prélevée sur racines de caféiers sur l'île de Java (Indonésie). Depuis lors, plusieurs espèces très proches ont été découvertes :

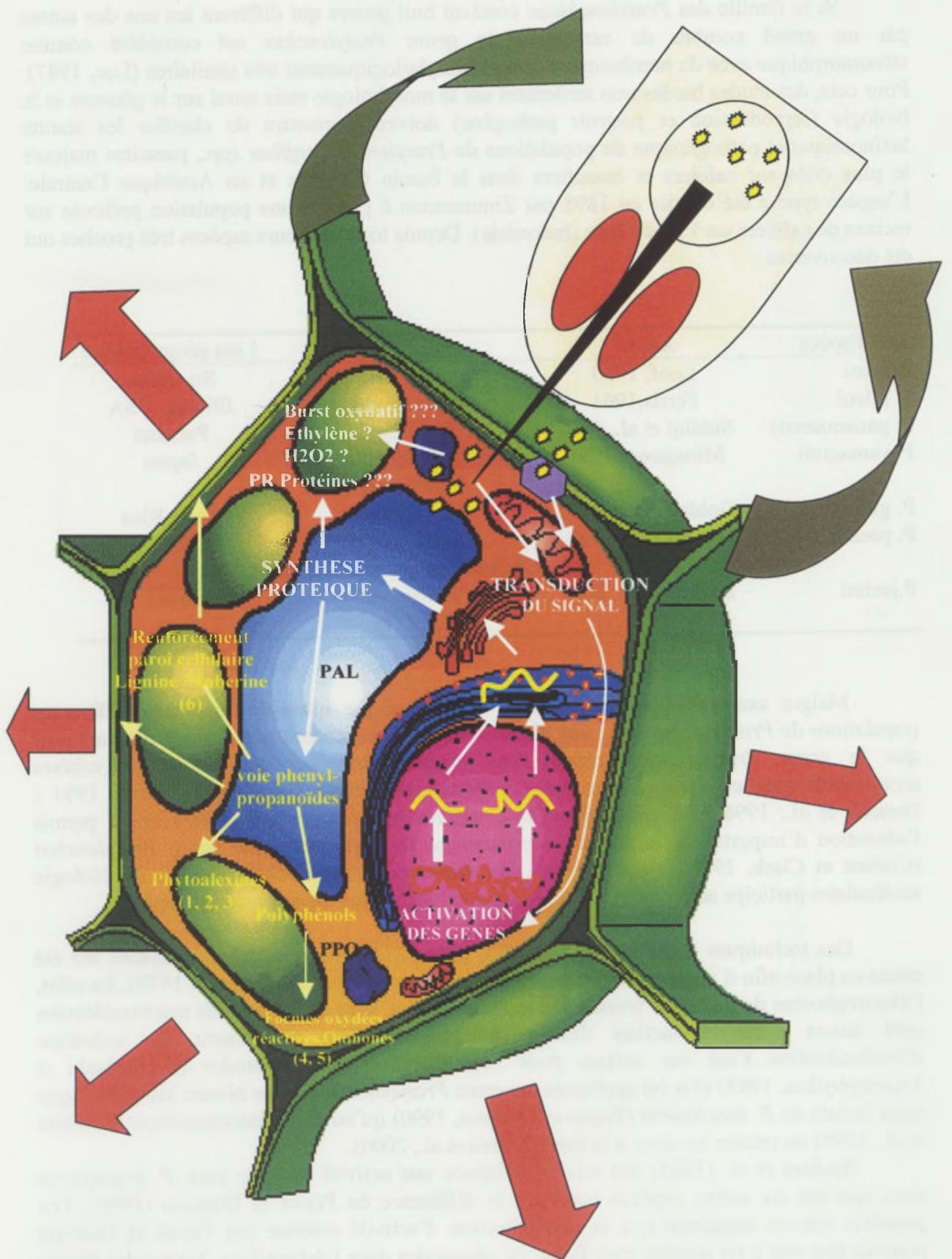
Espèce	Auteur	Hôte	Lieu géographique
<i>P. loosi</i>	Loof, 1960	<i>Camellia sinensis</i>	Sri Lanka
<i>P. alleni</i>	Ferris, 1961	<i>Glycine max</i>	Illinois, USA
<i>P. panamaensis</i>	Siddiqi et al., 1991	<i>Coffea</i> sp.	Panama
<i>P. yamagutii</i>	Minagawa, 1991	<i>Weigela middendorffiana</i>	Japon
<i>P. gutierrezi</i>	Golden et al., 1992	<i>Alnus crispa</i>	Costa Rica
<i>P. pseudocoffeae</i>	Mizukubo, 1992	<i>maximowiczii</i>	
		<i>Coffea arabica</i>	Japon
		<i>Chrisanthemum morifolium</i>	
<i>P. jaehni</i>	Inserra et al., 2001	<i>Artemisia feddei</i>	Brésil
		<i>Citrus</i> sp.	

Malgré une possible identification morphologique interspécifique des différentes populations de *Pratylenchus* spp., une discrimination est cependant très difficile d'autant plus que le genre *Pratylenchus* présente une grande variabilité des principaux critères morphométriques en fonction des facteurs environnementaux (Luc, 1987 ; Loof, 1991 ; Duncan et al., 1998). En effet, même si le microscope électronique à balayage a permis l'obtention d'importantes informations concernant la phylogénèse du genre *Pratylenchus* (Corbett et Clark, 1973), l'introduction des nouveaux outils biochimiques ou de biologie moléculaire participe activement à l'identification inter- et intraspécifique des espèces.

Des techniques d'analyse de protéines, plus particulièrement des isoenzymes ont été mises en place afin d'appuyer les méthodes de taxonomie classiques (Hussey, 1979). En effet, l'électrophorèse de protéines fournit des résultats fiables étant donné que ces macromolécules sont issues d'une traduction directe du génome. Plus récemment, la technique d'isofocalisation s'est vue utilisée pour l'identification des nématodes (Esbenshade et Triantaphyllou, 1985) et a été appliquée au genre *Pratylenchus* tant au niveau intraspécifique entre isolats de *P. brachyurus* (Payan et Dickson, 1990) qu'au niveau interspécifique (Ibrahim et al., 1995) ou encore les deux à la fois (Andrés et al., 2000).

Ibrahim et al. (1995) ont mis en évidence une activité estérase pour *P. brachyurus* ainsi que les six autres espèces testées à la différence de Payan et Dickson (1990). Les premiers auteurs suggèrent que la non détection d'activité estérase par Payan et Dickson pourrait être due à un nombre trop faible de nématodes dans l'échantillon. Toutes ces études ont testé un panel d'isoenzymes dont quatre ressortent adaptées à l'étude du genre *Pratylenchus* : la malate déhydrogénase (MDH), la phosphoglucoisomérase (PGI), la phosphoglucomutase (PGM) et finalement l'estérase (EST).

D'autre part, la plus forte variabilité intraspécifique a été décelée entre les isolats de *P. coffeae*. Ainsi trois isoenzymes, MDH, PGI et PGM, apparaissent particulièrement adaptées



 Signalisation intercellulaire (induction des gènes de défense, synthèse de phytoalexines)  
 Limitation de la pénétration du nématode (modification des parois, molécules toxiques)

**Figure 2 :** Schéma hypothétique des mécanismes induits de résistance à *Pratylenchus* spp.

à l'analyse du complexe *P. coffeae* (Andrés et al., 2000) bien que ces derniers travaux traduisent la difficulté de caractérisation et la diversité phylogénique du complexe *P. coffeae*.

Toutefois, même si les techniques par électrophorèse de macromolécules sont encore couramment utilisées pour la caractérisation inter et intraspécifique, elles présentent deux inconvénients majeurs : d'une part, la présence et la concentration des molécules peut dépendre directement du stade de développement des nématodes dans le cycle biologique ; d'autre part, l'analyse se restreint à la traduction des séquences codantes c'est à dire seulement à 15 ou 20% du génome. Ainsi, seule une petite partie de la variabilité potentielle de l'ADN entre espèces de nématodes ou isolats est accessible par ce type de méthodes (Burrows, 1990). La biologie moléculaire a permis d'analyser directement la source primaire de la variabilité biologique qu'est l'ADN et donc d'accéder à la totalité de la variabilité intrinsèque des nématodes. De plus, ces méthodes sont indépendantes du stade de développement du nématode et potentiellement très discriminantes.

Les techniques moléculaires telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction) offrent de nouvelles possibilités pour discriminer les espèces par leurs différences génétiques. En ce qui concerne le genre *Pratylenchus*, la technique d'amplification de l'ADN au hasard (RAPD-PCR) a été utilisée par Pinochet et al. en 1994 pour comparer des populations de *P. vulnus*. Cette méthode est cependant critiquable car présente parfois un manque de reproductibilité et de fiabilité due au hasard et aux conditions expérimentales. C'est pourquoi une recherche de séquences polymorphes et d'amorces spécifiques de ces éventuelles séquences, a été entreprise et a permis la mise en place de techniques de discrimination plus fiables.

Ainsi, les régions ITS (Internal Transcribed Spacer) ont démontré un fort pouvoir polymorphique au sein des nématodes et par conséquent représentent un intérêt pour l'identification des espèces de nématodes (Vrain et al., 1992 ; Ferris et al., 1993). Plus particulièrement, l'analyse par PCR-RFLP des ITS de l'ADN ribosomique de la région 18-26S a montré la plus forte capacité de discrimination interspécifique entre les populations *P. loosi*, *P. penetrans*, *P. coffeae*, *P. vulnus*, *P. brachyurus*, *P. crenatus*, *P. neglectus*, *P. zaeae* et *Pratylenchus sp.* qui est une population morphologiquement indistinguable de *P. coffeae* (Orui, 1996 ; Uehara et al., 1997 ; Orui & Mizukubo, 1999).

La technique RFLP est actuellement utilisée comme méthode fiable de diagnostic pour la caractérisation de différentes espèces du genre *Pratylenchus*. La technique PCR a permis d'amplifier des régions ITS discriminantes et a mis en évidence de grandes différences de taille des fragments obtenus allant de 900 à 1250 bp approximativement. Il est cependant nécessaire de souligner que dans le cas de la discrimination intraspécifique du complexe *P. coffeae*, au minimum trois endonucléases ont du être utilisées afin de séparer les trois populations testées. Ces techniques semblent donc être très adaptées au niveau de la discrimination interspécifique mais très lourde de mise en oeuvre en ce qui concerne la caractérisation intraspécifique.

C'est pourquoi, il demeure important d'utiliser des méthodes simples et néanmoins discriminantes fiables telles que la focalisation isoélectrique d'isoenzymes pour la discrimination intraspécifique du complexe *P. coffeae*. D'autre part, la technique AFLP, fondée conjointement sur le polymorphisme de site de restriction et l'hybridation arbitraire, apparaît adaptée à la discrimination intraspécifique des nématodes (Hervé, 1997) et par conséquent intéressant pour la caractérisation du complexe *P. coffeae*.

# MATERIELS ET METHODES

## A. Matériels

### I. Matériel animal : *Pratylenchus coffeae* spp.

De tous les organismes pluricellulaires, les nématodes sont les animaux les plus abondants et les plus répandus sur le globe. Ils appartiennent à l'embranchement des némathelminthes. Ce sont des vers allongés, uniquement dépendants de l'eau. Les nématodes phytophages occasionnent des dommages considérables aux plantes cultivées. La monoculture, favorisant certaines espèces de l'hôte cultivé, augmente d'autant plus les pertes de rendement. La majorité des nématodes phytoparasites appartient à l'ordre des Tylenchides.

#### I.1. Position systématique du genre *Pratylenchus* :

Phylum : Nemata ou Nematoda

Ordre : Tylenchida, Thorne 1949

Sous-ordre : Tylenchina, Chitwood & Chitwood 1950

Super-famille : Hoplolaimoidea, Filip'jev 1934

Famille : Pratylenchidae, Thorne 1949

Sous-famille : Pratylenchinae, Thorne 1949

Genre : *Pratylenchus*, Filip'jev 1936

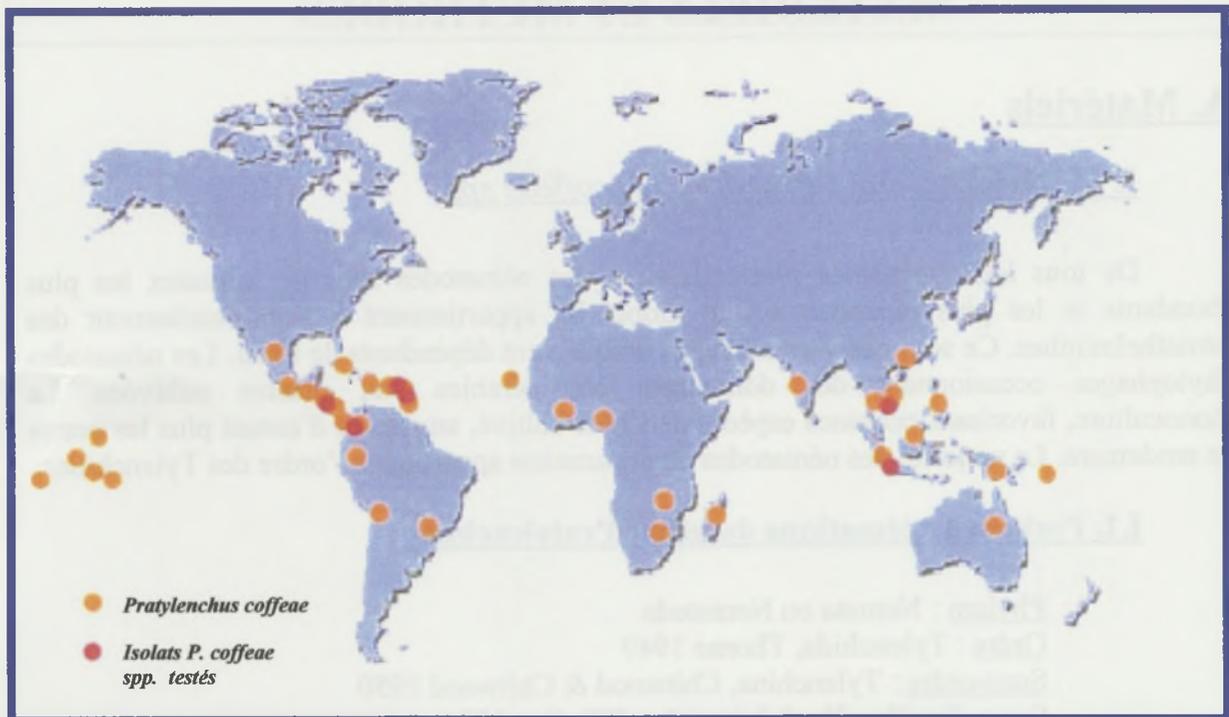
Espèce type : *P. pratensis*, (de Man, 1880) Filip'jev 1936

La famille des *Pratylenchidae* comprends huit genres distincts les uns des autres par un grand nombre de caractères dont *Pratylenchus* (Luc, 1987). La sous-famille des *Pratylenchinae* Thorne (1949) est constituée des formes migratrices à la différence des *Nacobbinae* Chitwood (1950) qui contiennent les formes sédentaires. Au sein des genres, les différentes espèces étant difficilement identifiables car très similaires, il en résulte une grande confusion dans la caractérisation du parasite concerné. C'est ainsi que l'espèce *P. coffeae* a subi de nombreuses synonymisations (tab. 1), son identification étant mal définie et confuse.

#### I. 2. Biologie du nématode :

A l'intérieur du genre *Pratylenchus*, l'identification des espèces est basée essentiellement sur des critères morphologiques et morphométriques des individus. Les principaux critères discriminants utilisés sont : la longueur du stylet, la forme de la partie postérieure des femelles (queue) ou de la spermathèque, mais aussi de manière plus précise par microscopie électronique la configuration du premier anneau céphalique et du disque labial selon la classification de Corbett et Clark en 1983, l'étude anatomique des organes sensoriels (Trett et Perry, 1985).

L'espèce *P. coffeae* fut décrite pour la première fois en 1898 par Zimmermann à partir d'une population prélevée sur racines de caféiers sur l'île de Java en Indonésie. Le phénotype des queues des femelles *P. coffeae* est cylindrique et l'extrémité distale est tronquée ou légèrement arrondie (cf. annexe 1). Cette espèce est caractérisée par un anneau céphalique sans aucune division et appartient ainsi au groupe I défini par Corbett et Clark (Baujard et al., 1990). D'autre part, *P. coffeae* est une espèce bisexuelle à reproduction amphimictique obligatoire. Les œufs sont déposés dans les racines ou dans le sol. Cette espèce semble diploïde avec un nombre de chromosomes  $n = 6$  pour les femelles comme pour les mâles.



**Figure 3** : Distribution *P. coffeae* à travers le monde.  
(D'après J. Bridge). Source INIBAP

Code population	Pays d'origine	Région	Parcelle	Plante hôte
P. GTM 01	Guatemala	Moca	Los Planes	<i>C. arabica</i>
P. GTM 02	Guatemala	Chitalon		<i>C. canephora</i>
P. GLP 02	Guadeloupe	Capestere	Bassal 2	Bananier
P. GLP 03	Guadeloupe	Capestere	Monbin 1	Bananier
P. MTQ 02	Martinique	Morne Rouge		Bananier
P. VNM 04	Vietnam			Café
P. IDN	Indonésie			Café
P. COL 01	Colombie	Chinchina		Plantain

**Tableau 2a** : Isolats utilisés dans les tests d'agressivité *in planta*

Code population	Pays d'origine	Région	Parcelle	Plante hôte
P. GTM 04	Guatemala	Buena Vista		<i>C. arabica</i>
P. GLP 01	Guadeloupe	Capestere	Savane 1	Bananier
P. HTI 03	Haïti			Plantain
P. VNM 02	Vietnam			Café
P. VNM 04	Vietnam			Café
P. ESP ( <i>P. zae</i> )	Espagne			Tomate
P. CIV référence ( <i>P. brachyurus</i> )	Côte d'Ivoire	Anguédoudou		Ananas

**Tableau 2b** : Isolats supplémentaires utilisées en isofocalisation



**Figure 4 :** Implantation géographique du genre Coffea

GENRE	ESPÈCE	VARIÉTÉ
COFFEA	ARABICA	MUNDO NOVO MARAGOGYPE * BOURBON TIPICA MOKA JAVA CATURI CATURRA ** CATIMOR ***
COFFEA	CANEPHORA	ROBUSTA KOUILLOU NIAOUTI CONILLOX
COFFEA	LIBERICA	EXCLISA (hybride de Robusta)
COFFEA	EUGENIODES	
COFFEA	STENOPHYLLA	
COFFEA	CONGENSIS	CONGUSTA (hybride de Robusta)

\* La variété "maragogype" est caractérisée par de très grandes graines. Les grains dits "caracol" proviennent des cerises dans lesquelles s'est développée une graine au lieu de deux, la seconde ayant avorté.  
\*\* Autres : Carmica, San Bernardo, San Ramon, Vabalobos, Villa Sarchi, Paras, Blue Mountain.  
\*\*\* Considéré comme Arabica ; obtenu au départ par hybridation de Robusta et d'Arabica, il a essentiellement des caractères d'Arabica.



Coffea Arabica



Coffea Arabica Bourbon



Coffea Canephora Robusta

**Figure 5 :** Classification botanique des caféiers. Source : Groupe Nestlé, France

### I. 3. Symptômatologie :

Toutes les espèces du genre *Pratylenchus* sont des **endoparasites migrants** c'est à dire des nématodes pouvant sortir de la racine à tout moment de leur cycle pour vivre temporairement dans le sol et parasiter de nouvelles racines. Ce type de nématodes provoquent des lésions profondes dans la racine. Cela se traduit par une destruction complète du parenchyme cortical, engendrant des nécroses généralisées, et un détachement du cortex racinaire, ne laissant en place que le cylindre central. Les espèces du genre *Pratylenchus* les plus répandues sur caféiers (*Coffea sp.*) sont *Pratylenchus coffeae* et *P. brachyurus*. D'autre part, les nématodes *P. coffeae* et *P. goodeyi* sont deux déprédateurs majeurs des bananiers (*Musa sp.*). L'espèce *P. coffeae*, est ainsi non seulement l'espèce la plus citée sur caféiers mais constitue également un parasite important d'hôtes tels que *Musa sp.* (Gowen & Quénéhervé, 1990), *Citrus sp.* (Duncan & Cohn, 1990), *Solanum tuberosum* (Jatala & Bridge, 1990) ou encore des adventices (Loof, 1991)...

### I. 4. Distribution géographique :

Le genre *Pratylenchus* comprend un certain nombre d'espèces considérées comme des ravageurs majeurs de cultures d'intérêt économique en zone tropicale et subtropicale. *P. coffeae* est probablement originaire des îles du Pacifique et des pays limitrophes mais s'est répandu dans le monde entier, certainement avec le matériel végétal commercial (cf. fig 3).

Dans les îles du Pacifique, *P. coffeae* est la principale espèce de nématodes s'attaquant à la fois aux bananiers diploïdes et triploïdes. En Asie du Sud-Est, il est le nématode majeur parasitant Pisang Awak (*Musa ABB*). En Amérique Latine, cette espèce est particulièrement dévastatrice pour les cultivars Cavendish (*Musa AAA*). Sur le continent africain, *P. coffeae* est largement répandu, provoquant des ravages dans les plantations de bananiers plantains d'Afrique du sud et du Ghana (jusqu'à 60% de perte).

### I. 5. Populations testées :

Les populations de nématodes du genre *Pratylenchus* utilisées dans nos études proviennent de prospections antérieures dans les principales zones de production de caféiers et de bananiers. Ces échantillons sont envoyés à Montpellier afin d'être maintenus en élevage au laboratoire. Chaque isolat est répertorié et codé selon son origine géographique.

En ce qui concerne les études d'agressivité *in planta*, seules huit populations ont été testées de par la lourdeur de la mise en œuvre et du traitement des expérimentations. Un choix particulier d'isolats a donc été défini (cf. tab. 2a) avec des populations à la fois proches géographiquement (même pays) mais aussi des isolats de pays éloignés afin de cerner au mieux la diversité mondiale (cf. tab. 2b).

Cependant, le laboratoire ayant de nombreuses populations en élevage, l'étude isoenzymatique s'est effectuée sur un plus grand nombre d'isolats (cf. tab. 2b). En effet, la technique pouvant tester jusqu'à une cinquantaine d'échantillons par manipulation, il semblait intéressant de traiter davantage de populations dont certaines sont plus ou moins géographiquement rapprochées de nos isolats testés en agressivité. Une population de nématodes n'appartenant pas au complexe *P. coffeae spp.* est ajoutée pour l'étude, cette population étant la référence bibliographique nécessaire à toute étude isoenzymatique : *P. brachyurus*.

## II. Matériel végétal

### II.1. Les caféiers :

Actuellement, plus de cinquante espèces sont répertoriées, correspondant à un très grand nombre de variétés de caféiers et appartenant toutes au genre *Coffea*. Seules deux espèces majeures ont une importance économique : *Coffea arabica*, adapté aux régions tropicales d'altitude allant de 500 à 2000 mètres et *C. canephora*, adapté à des régions tropicales de faibles altitudes.

#### II. 1.1. Origine et distribution géographique :

Concentré initialement dans l'Est de l'Afrique, le caféier s'est peu à peu propagé. Gagnant tout d'abord la ceinture tropicale, l'homme l'implanta dans le monde entier. *Coffea arabica* est cultivé sur les hauts plateaux d'Afrique de l'Est, en Amérique Latine et dans certains pays d'Asie. *C. canephora* est cultivé en Afrique de l'Ouest et Centrale, en Amérique Latine essentiellement au Brésil, et dans les pays asiatiques tels que l'Indonésie et le Vietnam.

#### II. 1.2. Taxonomie et biologie de la plante :

Règne : Végétal  
Sous-règne : Angiospermae  
Classe : Dicotyledoneae  
Sous-Classe : Sympetalae  
Ordre : Rubiales  
Famille : Rubiaceae  
Genre : *Coffea*  
Sous-Genre : *Eucoffea*  
Espèces : *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica*...

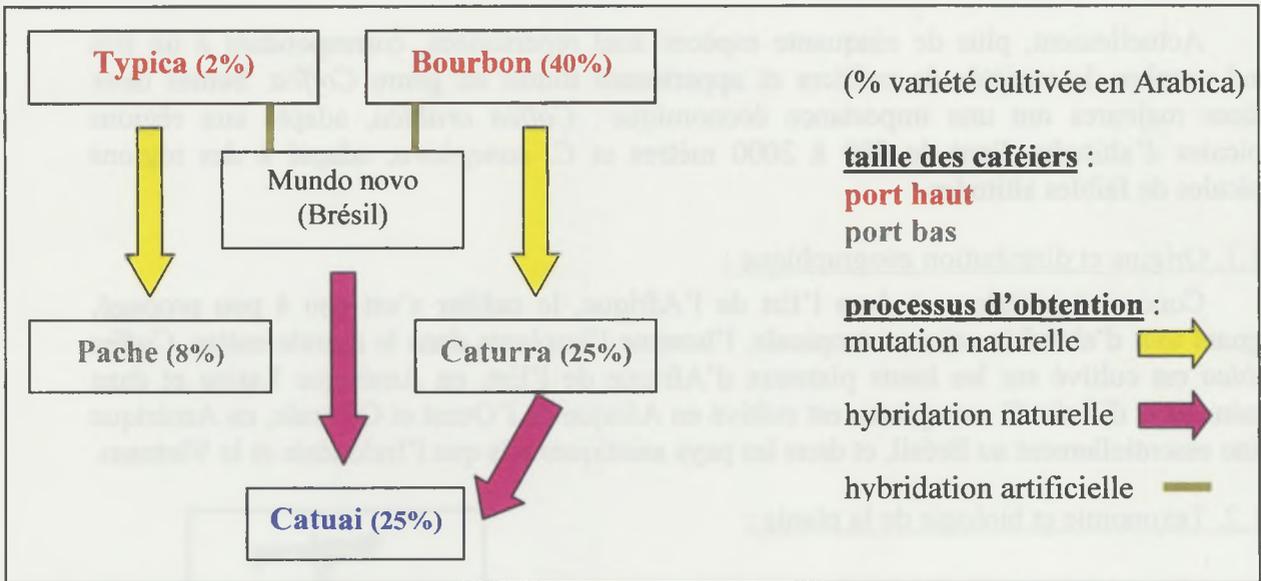


Les caféiers sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des Rubiacées dont la plupart des espèces sont des arbres ou des arbustes. Ils peuvent atteindre jusqu'à 15 mètres de haut à l'état sauvage. Dans les plantations, il n'excède pas les 2 ou 3 mètres pour faciliter l'exploitation. Cet arbuste possède des feuilles vertes, très brillantes, de forme oblongue, nervurées de façon régulière et opposées. Blanches et très odorantes, les fleurs de caféiers se développent à la base des feuilles. Les fruits qui en naissent sont ovales ou ronds, nommés « cerises ». Ces fruits, verts à l'origine, nécessitent entre 8 à 12 mois pour arriver à maturité et prendre une coloration rouge. Chaque cerise contient deux graines ovales, disposées face à face, qui donneront les futurs grains de café.

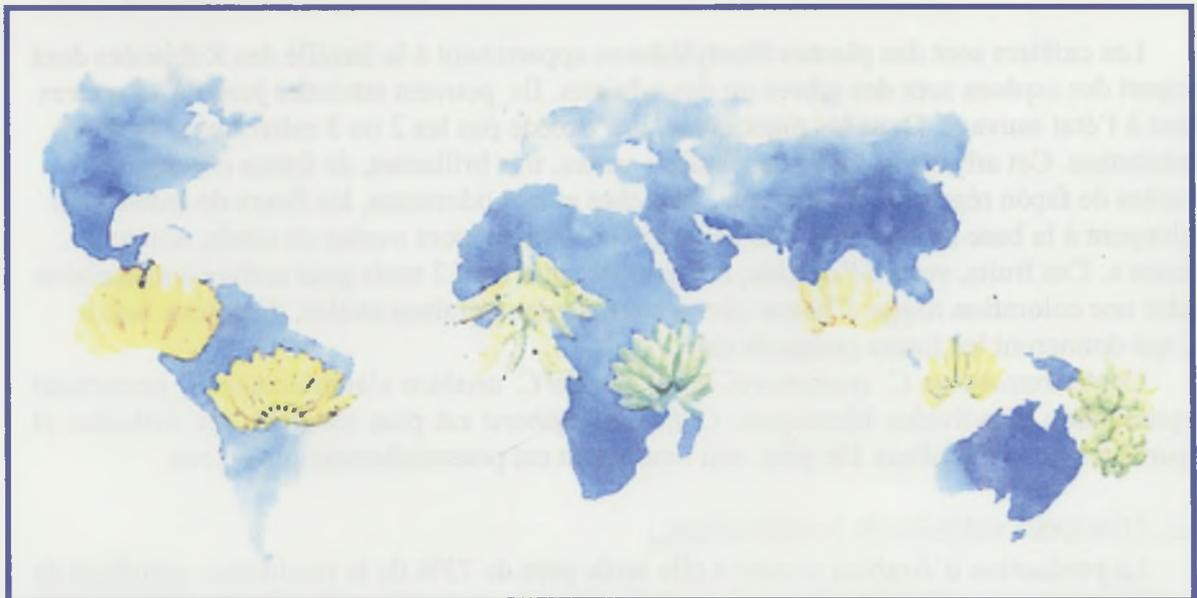
Contrairement au *C. canephora*, les fleurs de *C. arabica* s'autofécondent, permettant la reproduction d'individus identiques. *Coffea canephora* est plus résistant aux maladies et aux parasites que *C. arabica*. De plus, son rendement est potentiellement plus élevé.

#### II. 1.3. Principaux cultivars de la caféiculture :

La production d'Arabica couvre à elle seule près de 75% de la production mondiale de café. Initialement au sein de l'espèce *C. arabica*, c'est la variété Typica, originaire de l'île de Java, qui a contribué à l'implantation de la caféiculture en Amérique Centrale. Elle fut supplantée depuis les années 1950 par la variété Bourbon, actuellement la variété la plus largement implantée dans le monde du fait de sa grande productivité, de sa rusticité appréciée par les petits producteurs et la qualité organoleptiques de ses grains. Différemment, l'Arabica Moka, originaire d'Ethiopie, donnant des grains de grande qualité, tend à se raréfier de nos jours (cf. fig. 5).



**Figure 6 :** Schéma d'obtention des différentes variétés cultivées de Coffea arabica



**Figure 7 :** Répartition géographique des zones de production bananière mondiale

La variété Caturra, possédant un gène de nanisme, provient d'une mutation de la variété Bourbon (Carvalho et al. 1991). Cette variété est actuellement la plus répandue en Amérique Latine. La variété Catuaï, hautement productive, est issue d'un croisement inter-variétal entre Mundo Novo et Caturra (cf. fig. 6).

Découvert à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, l'espèce *Coffea canephora* représente 25% de la production mondiale. Sa culture est surtout pratiquée en Afrique, en Indonésie et au Brésil. Outre le Robusta, *C. canephora* comprends d'autres variétés tels que le Kouilou, cultivé à Madagascar, le Conillon, en culture au Brésil ou encore le Niaouli. L'analyse du polymorphisme enzymatique chez *C. canephora* a révélé deux groupes génétiques : les « Guinéens », originaires d'Afrique de l'Ouest et les « Congolais », originaires d'Afrique Centrale. Par la suite, Montagnon et al. (1992) par cette même technique puis (Dussert et al., 1999) par RFLP ont montré que le groupe congolais se répartissait en deux sous-groupes : d'une part, les variétés ou populations améliorées originaires du Gabon et du Sud de Congo (SG1), et d'autre part, les génotypes sauvages d'Afrique Centrale (SG2).

D'autres espèces telles *C. liberica* et *C. racemosa* sont exploitées à petite échelle dans certains pays (Guinée, Malaise, Mozambique).

#### II. 1.4. Cultivars utilisés dans nos essais :

Du fait de sa grande diffusion, la variété Catuaï a été utilisée dans diverses études sur les nématodes parasitant les caféiers en Amérique Centrale. Ces études l'ont révélé très sensible aux différentes populations et particulièrement à *Pratylenchus spp.* (Anzueto, 1993). C'est pourquoi, cette variété a été retenue comme matériel génétique sensible représentant *C. arabica* dans nos expérimentations destinées à l'évaluation de l'agressivité des isolats.

La diffusion de variétés introgressées avec des gènes de résistance extérieurs s'est heurtée à plusieurs problèmes majeurs dont principalement une qualité organoleptique médiocre. Il s'est donc avéré nécessaire de se tourner vers la sélection de porte-greffes résistants en utilisant plus particulièrement le matériel génétique de *C. canephora*. Ainsi, un essai de criblage variétal a été entrepris sur *C. canephora* avec des populations de *P. coffeae* très agressives. Pour cette étude, trois cultivars les plus éloignés génétiquement ont été sélectionnés. Il s'agit d'un Guinéen, d'un Congolais SG1 (Kouilou) et d'un Congolais SG2.

Tous les cultivars utilisés dans les essais sont fournis par la CIRAD-CP.

## II. 2. Les bananiers :

Plus de trente espèces de bananiers ont été recensées, regroupées sous l'unique genre « Musa ». Deux grandes filières de production se distinguent : celle des bananiers en culture pure, dont les fruits sont destinés à l'exportation, et celle des bananiers en polyculture, destinés à une consommation personnelle ou l'approvisionnement des marchés locaux.

### II. 2.1. Origine et distribution géographique :

La région Asie-Pacifique est le berceau du genre Musa où la diversité des bananiers est maximale et constitue ainsi une source considérable de diversité pour les espèces sauvages et cultivées. Les bananiers sont cultivés dans plus de cent vingt pays des zones tropicales et subtropicales, sur les cinq continents (cf. fig. 7). Des bananiers diploïdes, proches des formes sauvages, sont encore cultivés en Asie du Sud-Est. Sur les autres continents, ce sont les cultivars triploïdes (Plantains, Figue-Pomme, Poyo, Gros Michel) qui sont les plus répandus.

PARENTS	EVOLUTION	GENOMES	GROUPES	SOUS-GROUPES	VARIETES	IMPORTANCE ECONOMIQUE	
<i>Musa acuminata</i> Colla AA  X  <i>Musa balbisiana</i> Colla BB	Hybridation	Diploïdes	AA		Figue sucrée Psang Mas	<b>Bananes à cuire et bananes dessert :</b> Pisang Mas est la seule variété en terme de superficie cultivée et de consommation.	
			AB		Ney poovan	<b>Bananes dessert :</b> Groupe de variétés connus sous le nom Ney pooyan, les bananes ne sont pas très importantes sur le plan alimentaire.	
	Polyploïdie	Triploïdes	AAA	Gros Michel	Gros Michel		<b>Bananes dessert :</b> Ce groupe comprends les bananes d'exportation. La banane Cavendish a peu à peu remplacé la banane Gros Michel et est devenue la première banane d'exportation.
				Cavendish	Dwarf cavendish Giant cavendish Poyo ou Robusta Pisang masak hijau		
				Red	Red Green red		
			Yangambi	Yangambi		<b>Bananes à cuire :</b> Nettement différentes des autres bananes du groupe AAA, les bananes des hautes terres d'Afrique de l'Est constituent un aliment de base.	
			Plantain	Type "French plantain" Type "Horn plantain"			
AAB		Pisang kelat Mysore Silk Pome Maia maoli		<b>Bananes dessert et à cuire :</b> Ce groupe est essentiellement originaire d'Inde. Les bananes dessert Mysore et Silk sont les plus représentatives. La banane Maia maoli est un groupe mystérieux, présent presque exclusivement en Polynésie.			
		Bluggoe Pisang awak		<b>Bananes à cuire :</b> Les origines de ce groupe sont vagues même si le Sud de l'Inde et l'Indochine sont des sources importantes de diversité. La banane Bluggoe est cultivée à l'échelle mondiale alors que Pisang awak se limite à la Thaïlande.			
	Tétraploïdes	ABBB		Klue teparod			

**Tableau 3 :** Evolution et classification du genres Musa avec les principales caractéristiques des variétés majeures

## II. 2.2. Taxonomie et biologie de la plante :

Règne : Végétal  
Sous-règne : Angiospermes  
Classe : Monocotyledones  
Ordre : Zingiberales  
Famille : Musacées  
Genre : Musa  
Section : Eumusa



Le genre *Musa* est composé de quatre sections : *Australimusa* , *Callimusa*, *Rhodochlamys* et *Eumusa*. Cette dernière section regroupe presque tous les bananiers cultivés, *Callimusa* et *Rhodochlamys* ayant un intérêt purement ornemental, *Australimusa* étant essentiellement cultivé pour ses fibres.

Les bananes comestibles sont issues, pour l'essentiel, de deux espèces sauvages diploïdes séminifères *Musa acuminata* Colla et *M. balbisiana* Colla de génôme AA et BB respectivement. Les variétés actuelles sont en général des clones triploïdes stériles résultant de plusieurs processus génétiques tels que l'hybridation, la polyploïdie, la parthénocarpie et la stérilité gamétique (cf. tab. 3).

D'aspect arborescent, le bananier est une plante herbacée dont la tige vraie, appelée improprement rhizome ou bulbe émet de nombreuses racines cylindriques et se ramifie pour donner des rejets, assurant la pérennité de l'espèce par voie végétative. Le pseudo-tronc, formé par l'emboîtement des gaines foliaires peut mesurer de deux à huit mètres (Champion, 1963) . Les feuilles sont émises par le méristème terminal de la tige vraie, qui évolue en bouton floral quand le bananier a émis un certain nombre de feuilles. Chaque pseudo-tige différencie une inflorescence à l'origine d'un régime unique. L'inflorescence est composée de fleurs femelles différenciées en premier, dont l'ovaire se développe en fruit, puis des fleurs mâles différenciées plus tardivement, apparaissant sur la partie terminale de l'inflorescence. La récolte des régimes verts marque le terme de l'existence du bananier.

## II. 2.3. Principaux cultivars de la production de bananes :

D'un point de vue économique, les triploïdes AAA et AAB sont les plus importants : le groupe AAA renferme toutes les variétés douces les plus exportées et les plantains du groupe AAB sont considérés comme plantes vivrières et constituent souvent dans les régions tropicales la base de l'alimentation humaine. Cependant, , ces variétés ne représentent qu'un tiers de la production mondiale par rapport à la culture de bananiers destinés à la consommation locale.

La variété Cavendish, très largement cultivée, est devenue la première banane d'exportation et représente la plus importante valeur économique bananière. Cette variété comprends de nombreux cultivars dont Grande Naine, Poyo et Williams, clones cultivés pour l'exportation. Ces cultivars ne diffèrent entre eux que par des mutations somatiques portant sur la hauteur de la plante ou la conformation des régimes et des fruits.

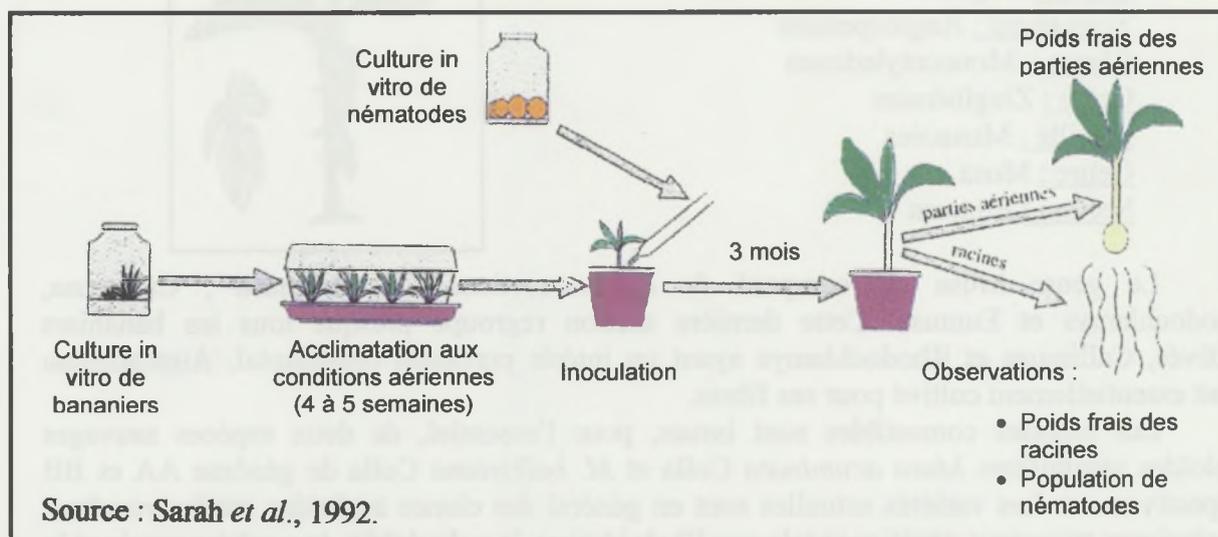
## II. 2.4. Cultivar utilisé dans nos essais :

Sur le plan commercial, le cultivar « Grande Naine » est la plus répandue. Le bananier étant de petite taille, cette variété est moins vulnérable aux cyclones. Elle est aussi exempte de la maladie du « Panama », maladie redoutable du bananier. Ainsi, les tests d'agressivité de nos populations de nématodes ont été réalisés sur la variété « Grande Naine » (clone 902), fournie par Vitropic (Montpellier, France).

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES





**Figure 8** : Schéma récapitulatif des différentes étapes des expérimentations *in planta*

Isolats <i>P. coffeae</i> spp.	Essai bananier	Essai café	Essai 1	Essai 2
<b>GTM 01</b>	✓	✓	.....	✓
GTM 02	✓	.....	.....	✓
<b>GLP 02</b>	✓	.....	✓	✓
<b>GLP 03</b>	✓	.....	✓	✓
<b>COL 01</b>	✓	✓	✓	✓
MTQ 02	✓	.....	.....	.....
VNM 04	.....	.....	✓	.....
IDN	.....	.....	✓	.....

**Tableau 4** : Répartition des isolats de nématodes dans les différents essais *in planta*

Légende : ✓ présence ; Référence inter-essais , Référence café , Référence bananier

## **B. Méthodes**

### **I. Expérimentations *in planta***

Les populations de nématodes en élevage au laboratoire, destinées aux expérimentations, sont maintenues par culture monoxénique *in vitro* sur disque de carottes en flacons stériles selon un protocole inspiré d'O'Bannon et Taylor (cf. annexe 2). Les nématodes sont récupérés sur les parois des flacons avec de l'eau stérile après 1 à 2 mois d'incubation afin d'obtenir un inoculum indemne de contaminations extérieures.

#### **I. 1. Mise en place des expérimentations :**

Pour ce type d'étude, des vitroplants de bananiers et des semis de caféiers ont été repiqués dans des pots d'un volume de 1 dm<sup>3</sup> et placés en cellule climatique (température 27 ± 1°C et photopériode 12h/12h) pendant cinq semaines. En tout, trois essais sur plants ont été mis en place à des dates d'inoculation différentes dans le but de différer les dates d'extraction, cette étape étant lourde de mise en œuvre. Une randomisation totale sur le plan d'expérimentation est réalisée pour chacun des essais. Cette opération a pour but de prévenir d'éventuelles disparités physiologiques entre les plantes d'un même essai. D'autre part, ces essais constituent une première discrimination des variables utiles dans un premier temps aux expérimentations, et dans un second temps, à un éventuel diagnostic symptomatologique.

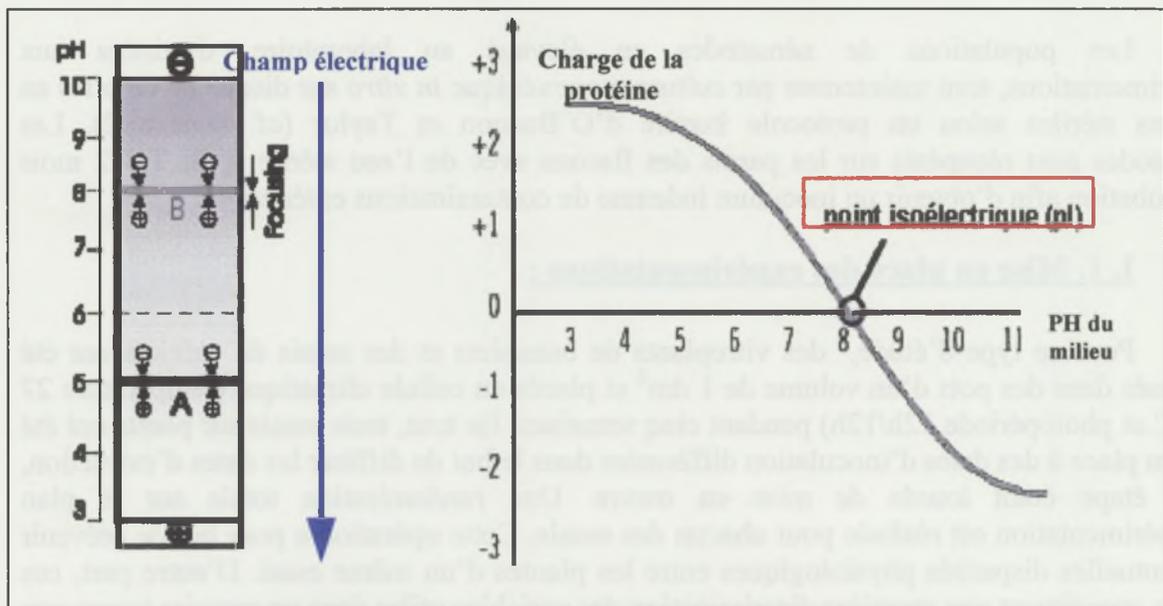
##### I. 1.1. Inoculation des expérimentations :

Pour chaque isolat testé, une suspension de nématodes est prélevée dans les flacons d'élevage. Cet inoculum est ensuite « calibré » par comptage à une concentration de 100 nématodes par millilitre d'eau afin de déposer un nombre de nématodes le plus reproductible possible dans chacun des pots de l'essai. Lors du calibrage, les individus sans motilité et les œufs ne sont pas pris en compte par souci d'homogénéité de l'inoculum. Un jour avant l'inoculation, les plants sont arrosés jusqu'à saturation puis sont laissés sans arrosage pendant 3 jours afin d'éviter tout lessivage d'inoculum. Chaque plantule reçoit 200 nématodes, soit 2 ml de suspension, à l'aide d'une pipette graduée en verre. En tout, 8 isolats *P. coffeae* spp ont été testés sur les trois essais parallèles (cf. tab. 4).

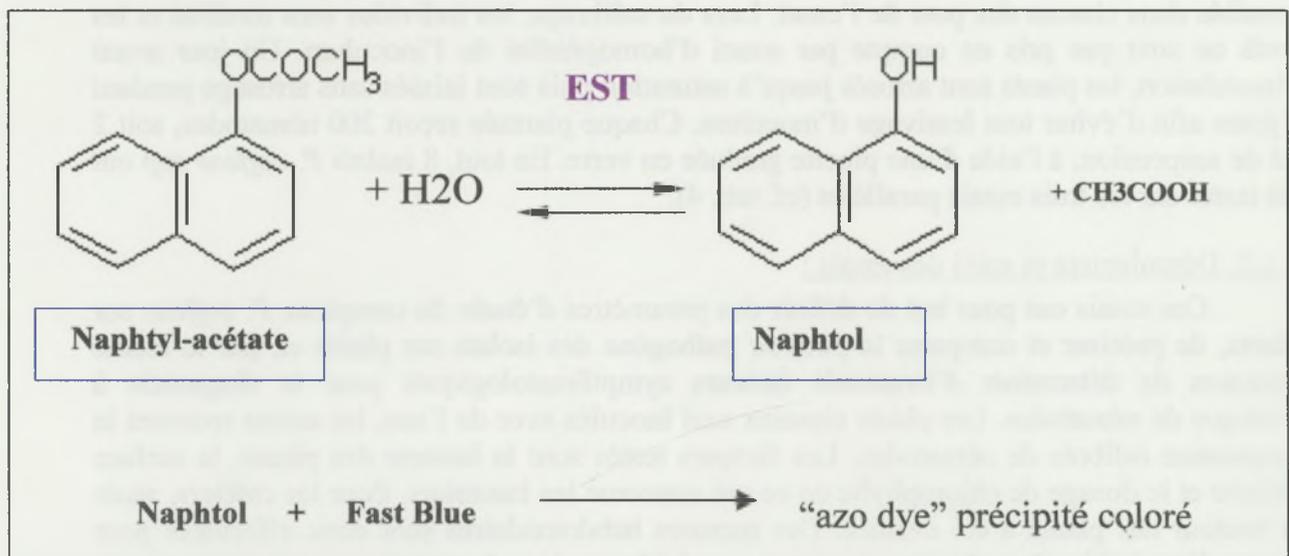
##### I. 1.2. Déroulement et suivi des essais :

Ces essais ont pour but de définir des paramètres d'étude du complexe *P. coffeae* sur plants, de préciser et comparer le pouvoir pathogène des isolats sur plants et, par la même occasion de déterminer d'éventuels facteurs symptomatologiques pour le diagnostic à l'attaque de nématodes. Les plants témoins sont inoculés avec de l'eau, les autres recevant la suspension calibrée de nématodes. Les facteurs testés sont la hauteur des plants, la surface foliaire et le dosage de chlorophylle en ce qui concerne les bananiers. Pour les caféiers, seule la hauteur des plants a été évaluée. Des mesures hebdomadaires sont donc effectuées pour suivre l'évolution des plantes et mettre en évidence les changements engendrés par la présence de divers populations de nématodes. Le dispositif, en randomisation totale, contient 8 (essais 1 et 3) à 10 répétitions (essai 2) par traitement (cf. fig. 8).

Le dosage de la chlorophylle sur les plants de bananiers a été effectué à l'aide d'un « Chlorophyll Meter » (Minolta). Cet appareil permet une lecture simple à la surface des feuilles. Le dosage s'effectue par excitation des pigments aux deux longueurs d'onde de la chlorophylle a et b que sont 645 nm et 663 nm. La mesure donne la concentration totale de chlorophylle en unités SPAD, unité arbitraire proportionnelle.



**Figure 9** : Principe de la focalisation isoélectrique



**Figure 10** : Système « azo coupling » pour la révélation des (EST)

### I. 1.3. Extraction et comptage des nématodes :

Afin d'évaluer l'agressivité des isolats, les populations de nématodes sont extraites des racines par la méthode de centrifugation-flottation (cf. annexe 3). Chaque échantillon de racine est lavé au jet à faible pression pour ne pas endommager les radicelles, broyé au mixeur et le broyat obtenu est passé sur une colonne de tamis à l'aide d'un jet à forte pression. Le matériel, collecté dans les trois derniers tamis, est soumis à une centrifugation-flottation selon la méthode de Coolen et D'Herde (1972).

Une première centrifugation est réalisée dans l'eau en présence de Kaolin, permettant une bonne fermeté du culot, pour piéger les nématodes. Le surnageant est ensuite éliminé. Le culot est remis en suspension dans une solution de sulfate de magnésium de densité 1,15 puis recentrifugé. Les nématodes passent alors dans la phase liquide et sont séparés du surnageant après un dernier passage sur un tamis de très faible maillage (5 $\mu$ m). Les nématodes sont récupérés du tamis et remis en suspension dans de l'eau. Le comptage s'effectue sur des lames dont la totalité du quadrillage correspond à un millilitre. Ainsi le nombre de nématode de l'échantillon correspond au comptage d'une lame remis à la dilution.

### I. 2. Traitement et analyse des données :

Les données collectées correspondent d'une part aux différentes variables végétatives, issues du suivi symptomatologique, et d'autre part au nombre de nématodes dans les racines. Pour l'analyse statistique des données, le nombre de nématodes est transformé en  $\log_{10}(x+10)$  afin d'homogénéiser les variances.  $\log(x+10)$  est retenu pour les nématodes car il s'agit d'un ordre de grandeur du nombre de nématodes à partir de la dilution minimale de 20 mL.

L'analyse en composante principale (ACP) étant la technique la plus simple pour effectuer une analyse descriptive de variables quantitatives de même statut (Jarry, 2001), elle a été employée dans le but de discriminer les variables végétatives les plus représentatives de l'agressivité des nématodes vis à vis de la plante hôte. Il faut plus signaler qu'une ACP ne nécessite pas de conditions de validité particulière (Falissard, 1998), ce qui permet de prendre en compte nos données brutes sans distinguer les différences entre les traitements (isolats).

Pour l'étude du pouvoir pathogène des différents isolats de *P. coffeae spp.*, les variables étant plus ou moins liées entre elles, le choix s'est tourné vers l'analyse des variables, préalablement démontrées comme corrélées à la capacité parasitaire, indépendamment les unes des autres par une simple analyse de la variance (ANOVA). En effet, toutes les variables expriment un même état physiologique de la plante. Ainsi, cette dernière analyse devrait permettre de déterminer l'agressivité des populations les unes par rapport aux autres. D'autre part, il semble intéressant de comparer les moyennes des populations de nématodes de chaque isolat pour les deux hôtes en relation avec l'hôte d'origine de l'isolat. Cette étude permettrait de mettre en évidence, s'il y a lieu, une spécificité d'hôte.

## II. Caractérisation biochimique : focalisation isoélectrique

Il est défini que les protéines possèdent une charge qui leur permet de migrer dans un champ électrique. La vitesse de migration est proportionnelle à la charge de la protéine, elle-même proportionnelle à la différence entre le pH du milieu et le pI de la protéine (point isoélectrique). A son pI, la protéine ne possède aucune charge nette, le nombre de charges positives étant égal à celui des charges négatives. Ainsi, à un pH équivalent au pI d'une protéine, celle-ci ne peut plus se déplacer dans le champ électrique.

### II. 1. Principe de la focalisation isoenzymatique

Le principe de base de la focalisation isoélectrique est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines, dans notre cas des isoenzymes, soumises à un champ électrique jusqu'à ce que le pH corresponde à leur pI (cf. fig. 9). Pour cela, un gradient de pH est créé dans le gel à l'aide des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables (amines, carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon.

Ces molécules se nomment des ampholytes. A l'anode est appliqué un acide fort et à la cathode une base forte. La technique d'électrophorèse d'isoenzymes pour l'identification inter- ou intraspécifique des nématodes est largement utilisée. Ainsi, la focalisation isoenzymatique consiste en une focalisation électrique des isoenzymes, protéines particulièrement simples à révéler et couramment utilisées en nématologie. Cette approche biochimique a pour but de caractériser le polymorphisme des isolats du complexe *P. coffeae* et de mettre en place un profil phylogénétique des isolats testés en vue de combiner un profil biochimique à un pouvoir pathogène défini.

### II. 2. Isoenzymes testées en isofocalisation

Un système isoenzymatique a été testé : il s'agit du système « estérase ». En effet, récemment il a été démontré que des isoenzymes permettaient une bonne discrimination du genre *Pratylenchus* que sont PGI (Phosphoglucose isomérase), MDH (malate déhydrogénase), PGM (phosphoglucose mutase) et naturellement EST (estérases). Lorsque la migration est terminée, le gel est révélé dans une solution de coloration spécifique au système enzymatique testé. La révélation s'effectue dans une étuve à l'obscurité et à 37°C (cf. annexe 4).

La solution de révélation pour l'estérase est basée sur le système « azo coupling » défini par Esbenshade et Triantaphyllou (1985) utilisant le Fast Blue RR comme révélateur. Il s'agit d'une réaction de colorimétrie. Le naphthyl est hydrolysé en naphthol, qui se couple immédiatement avec le Fast Blue RR pour produire un précipité coloré insoluble, nommé « azo dye », révélant le site catalytique de l'enzyme dans le gel (cf. fig.10). Cette réaction requiert une heure pour s'accomplir. Les bandes correspondant aux estérases se présentent sous forme de bandes sombres sur fond clair.

### II. 3. Analyse des gels d'isofocalisation

La matrice de similarité, obtenue par l'analyse du nombre de bandes communes entre les isolats, permet de construire un dendrogramme après analyse statistique. Plus il y a de combinaisons d'enzymes testées, plus le dendrogramme est pertinent.

## RESULTATS

L'objectif de ce stage étant de clarifier le statut pathogénique et taxinomique d'isolats de nématodes supposés apparentés à l'espèce *P. coffeae*, les tests menés au laboratoire se basent sur plusieurs niveaux d'étude. La plupart des isolats testés étant prélevés sur bananiers et caféiers, il semble important d'évaluer leur champ d'action sur ces hôtes dont ils sont des ravageurs majeurs. Des essais préliminaires *in planta* ont été réalisés afin de caractériser le pouvoir pathogène de tous les isolats. Par ailleurs, il a été recherché pour chacune des deux plantes hôtes testées (le bananier et le caféier) les facteurs végétatifs les mieux adaptés à l'étude de nématodes, ces facteurs pouvant constituer un premier diagnostic phytopathologique.

L'approche de la caractérisation biochimique a été réalisée par la technique de focalisation isoenzymatique.

Ces deux premières approches ont pour objectif d'essayer de mettre en évidence une relation entre le degré d'agressivité d'une population de nématode et son profil isoenzymatique. L'objectif final étant l'élaboration d'un diagnostic fiable et discriminant pour engager une lutte adaptée.

Dans une seconde partie, un test de criblage variétal a été effectué sur caféier, *P. coffeae* étant un ravageur majeur de *C. arabica* en Amérique Latine, en parallèle aux études de pathogénie et de recherche de résistances entreprises par les différentes équipes du CIRAD.

### I. Caractérisation du pouvoir pathogène de quelques isolats de *P. coffeae* spp. *in planta*

Le suivi des paramètres végétatifs diffère selon l'hôte testé d'autant plus que le bananier et le caféier sont des plantes botaniquement très éloignées et réagissant différemment à l'attaque de nématodes. Les bananiers présentent des symptômes de jaunissement généralisé sur les feuilles, tel un stress hydrique. Par contraste, les caféiers présentent tout d'abord des nécroses localisées qui s'étendent à toute la feuille sans présenter de chlorose. Ainsi, les plants de caféiers se dessèchent sur pied puis meurent (Anzueto, 1993). Plusieurs facteurs végétatifs ont été testés séparément pour les bananiers et pour les caféiers. Ces paramètres ont permis l'étude du pouvoir pathogène de différents isolats de *P. coffeae*. Les nématodes étudiés étant testés à la fois sur caféiers et bananiers, il est possible de mettre en évidence ou non une préférence d'hôte, l'hôte d'origine étant connu.

#### I. 1. Détermination des paramètres d'études

Rapport-gratuit.com   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRE

Dans ce cas précis, l'ACP a été l'analyse statistique retenue, cette technique permettant de faire la synthèse des informations fournies par les différentes variables explicatives (Falissard, 1998) sur bananiers et caféiers.

##### I. 1.1 Expérimentations sur bananiers. :

En ce qui concerne le bananier, les facteurs testés sont : la hauteur du pseudo-tronc (hauteur), la surface des feuilles (aire), le dosage de la chlorophylle (chlorophylle), le poids frais des parties aériennes (PA), le poids frais des racines (PR) et le nombre total de nématodes dans les racines.

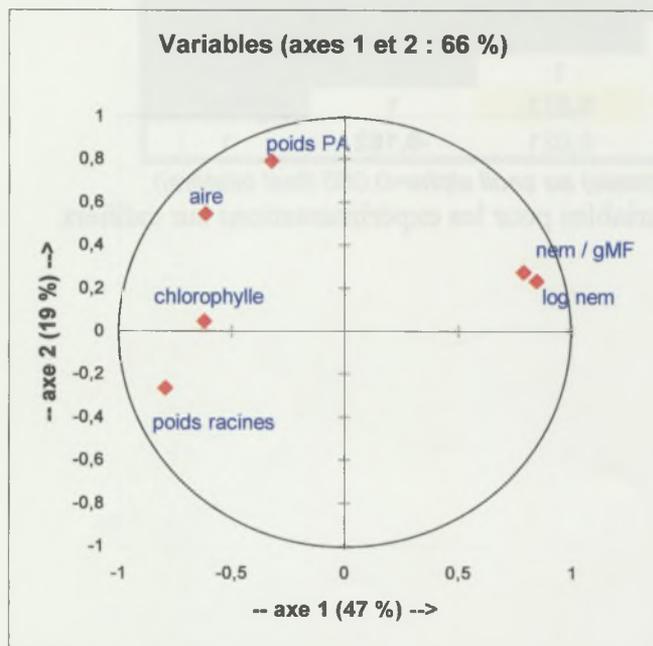
Les données des différents essais sur bananier sont regroupées dans un unique tableau. Il a été préalablement nécessaire d'ajuster les résultats en traitant les données par une opération centrée réduite à l'aide de trois populations (GLP 02, GLP 03 et COL 01) présentes dans les trois essais répartis dans le temps. Une moyenne des résultats observés de ces trois populations été calculée par essai et pour chacune des variables. Ces moyennes sont alors déduites pour l'ensemble des valeurs mesurées afin de palier aux différences des valeurs brutes entre essais. Au final, ce calcul permet d'associer les mesures pour les analyser ensemble. Le tableau général (cf. annexe 5) présente donc la totalité des résultats, où les différentes variables à étudier sont disposées en colonne et les différents objets avec leurs répétitions en ligne.

L'analyse en composante principale (ACP) permet en premier lieu de déterminer les axes les plus représentatifs pour l'analyse descriptive. Le tableau 5 présente les différents axes classés selon leurs valeurs propres.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valeur propre	2,824	1,128	0,842	0,497	0,410	0,299
% variance	<b>47,062</b>	<b>18,799</b>	14,036	8,281	6,833	4,988
% cumulé	47,062	<b>65,861</b>	79,897	88,178	95,012	100,000

**Tableau 5** : Valeurs propres des axes d'analyse

Les axes F1 et F2 représentent près de 66% d'inertie. Malgré une forte participation de l'axe F3, l'analyse des variables sur ces deux axes a été choisie. Le cercle des corrélations sur les axes F1 et F2 exposant de façon suffisamment claire la position des variables les unes par rapport aux autres (cf. fig. 11).



**Figure 11** : Cercle des corrélations entre variables

Le cercle des corrélations met en évidence que les variables descriptives du « poids des racines » et de la « concentration en chlorophylle » sont négativement corrélés au nombre de nématodes présents dans les racines (nem). En revanche, la « surface des feuilles » (aire) et plus encore le « poids des parties aériennes » (PA), n'apparaissent pas corrélés avec ce paramètre. Or, pour nos études, il est nécessaire que les variables déterminées transcrivent le plus précisément possible la capacité parasitaire des isolats testés.

Après examen des variables, il est possible de retenir que deux variables descriptives pour l'étude du pouvoir pathogène des nématodes sur bananiers : le **poids frais des racines** et le **dosage de chlorophylle**.

Parmi ces deux paramètres éligibles à la caractérisation du pouvoir pathogène des différentes populations, la variable du « poids des racines » est bien plus proche du cercle que celle du « dosage de la chlorophylle », ce qui indique une meilleure représentativité de ce

Variables	poids racines	poids PA	chlorophylle	aire	nem / gMF	log nem
poids racines	1	<b>0,159</b>	<b>0,278</b>	<b>0,281</b>	<b>-0,611</b>	<b>-0,675</b>
poids PA	<b>0,159</b>	1	0,075	<b>0,365</b>	-0,118	-0,118
chlorophylle	<b>0,278</b>	0,075	1	<b>0,401</b>	<b>-0,360</b>	<b>-0,426</b>
aire	<b>0,281</b>	<b>0,365</b>	<b>0,401</b>	1	<b>-0,287</b>	<b>-0,365</b>
nem / gMF	<b>-0,611</b>	-0,118	<b>-0,360</b>	<b>-0,287</b>	1	<b>0,604</b>
log nem	<b>-0,675</b>	-0,118	<b>-0,426</b>	<b>-0,365</b>	<b>0,604</b>	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil  $\alpha=0,050$  (test bilatéral)

**Tableau 6** : Matrice des corrélations entre variables pour les expérimentations sur bananiers

Variables	poids racines	poids PA	nem / gMF	log nem	hauteur
poids racines	1	-0,122	<b>-0,539</b>	<b>-0,605</b>	<b>0,203</b>
poids PA	-0,122	1	0,135	0,086	-0,088
nem / gMF	<b>-0,539</b>	0,135	1	<b>0,573</b>	0,021
log nem	<b>-0,605</b>	0,086	<b>0,573</b>	1	<b>-0,182</b>
hauteur	<b>0,203</b>	-0,088	0,021	<b>-0,182</b>	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil  $\alpha=0,050$  (test bilatéral)

**Tableau 8** : Matrice des corrélations entre variables pour les expérimentations sur caféiers

paramètre. Par ailleurs le paramètre poids racinaire est diamétralement opposé au nombre de nématodes. Sans surprise, la matrice des corrélations confirme ces résultats avec des coefficients de corrélation significatifs de 0.675 entre le nombre de nématodes et le poids des racines, et de 0.426 avec le dosage de la chlorophylle (cf. tab. 6).

### I. 1.2. Expérimentations sur caféiers :

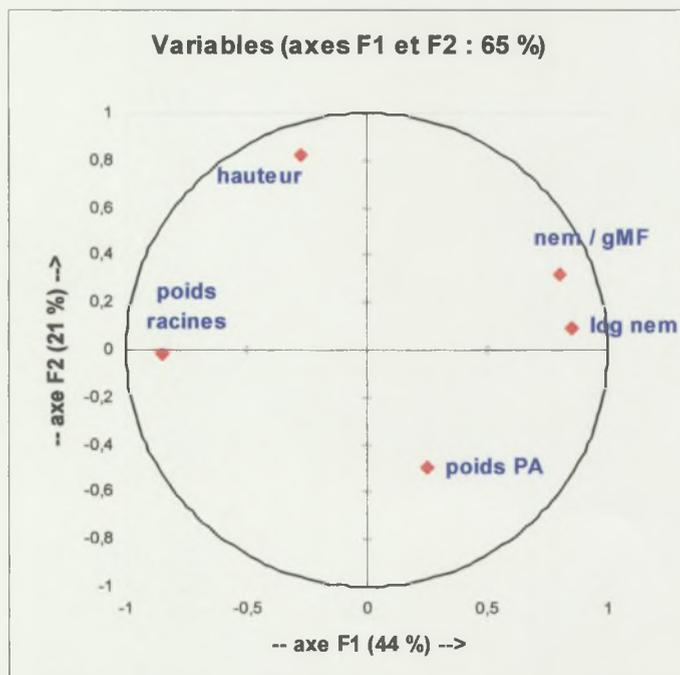
De la même façon que sur bananiers, une ACP est réalisée sur l'ensemble des variables à analyser. Les paramètres étudiés sont identiques à ceux testés précédemment sans la chlorophylle, ce paramètre n'ayant pu être mesuré sur plantule de café. Un tableau regroupe l'ensemble des données des essais (cf. annexe 6). L'ajustement des données est effectuée en déduisant la moyenne calculée sur la population COL 01, constante au sein de tous les essais.

La détermination des axes représentatifs pour l'analyse s'effectue à partir des valeurs propres des axes données par le tableau 7 (ci-dessous).

	F1	F2	F3	F4	F5
Valeur propre	2,220	1,037	0,945	0,415	0,382
% variance	<b>44,393</b>	<b>20,743</b>	18,910	8,310	7,644
% cumulé	44,393	<b>65,136</b>	84,046	92,356	100,000

**Tableau 7 :** Valeurs propres des axes d'analyse

Les valeurs indiquent la meilleure représentativité d'inertie pour la combinaison des axes F1 et F2 avec 65% d'inertie. Il ne faut pas négliger la forte participation de l'axe F3.



**Figure 12 :** Cercles des corrélations entre variables

L'axe F1 constitue encore l'axe le plus représentatif de la capacité parasitaire des isolats (cf. fig. 12). Le cercle des corrélations montre encore clairement la corrélation entre le poids frais du système racinaire et le nombre de nématodes comme sur bananiers. Les autres paramètres végétatifs, que sont la hauteur des plants et le poids des parties aériennes, ne peuvent caractériser en aucun cas le degré d'infestation des isolats, aucune corrélation ne pouvant être décelée.

Le cercle des corrélations suggère une corrélation négative entre le poids des parties aériennes et la hauteur des plants. Or, la matrice des corrélations donne un coefficient de -0.088 (cf. tab. 8). Cet artefact est due à l'inertie de l'axe F3.

Ce résultat est identique à l'étude menée sur bananier avec comme seule variable utilisable pour l'étude du pouvoir pathogène sur caféiers, le « poids frais des racines ».

## I. 2 . Caractérisation du pouvoir pathogène de plusieurs isolats de *P. coffeae* spp. :

Ainsi, afin de discriminer au mieux les populations entre elles, l'agressivité des isolats d'une part et, la capacité à provoquer des dommages d'autre part sont analysées séparément puis recoupées dans le but d'obtenir une classification globale du pouvoir pathogène des populations les unes par rapport aux autres et pour chacune des deux plantes hôtes testées.

L'agressivité se définit par la capacité reproductive et le pouvoir infectieux, c'est à dire le taux de pénétration du parasite dans l'hôte.

La capacité reproductive se caractérise par la multiplication du parasite et par conséquent se mesure par la formule suivante :  $Cr = Nf / Ni$  avec Cr la capacité reproductive, Nf nombre de nématodes extraits et Ni le nombre de nématodes inoculés. Le taux de pénétration des nématodes dans les racines est pris en compte dans le nombre de nématodes extraits des racines. Tous les essais ont été réalisés avec une inoculation plus ou moins standard de 200 nématodes. Ainsi, la capacité reproductive (Cr) est proportionnelle aux nombres de nématodes extraits au final (Nf). L'étude de l'agressivité est alors simplifiée et se limite au nombre de nématodes dans les racines. Dans le cas de l'analyse de l'agressivité des populations, il s'agit donc de comparer le nombre de nématodes des différents isolats entre eux et par rapport au témoin négatif inoculé avec de l'eau.

La prise en compte des dommages engendrés sur la plante hôte constitue par ailleurs un très bon indicateur du pouvoir pathogène au sens large des isolats de *P. coffeae* spp. testés.

### I. 2.1. Etude du pouvoir pathogène d'isolats de *P. coffeae* spp. sur bananiers :

Afin d'évaluer le pouvoir pathogène des différents isolats étudiés, la variable analysée pour l'agressivité est le nombre de nématodes extraits des racines en log (x+10), le poids frais des racines et le taux de chlorophylle traduisant la capacité à produire des dommages.

L'évaluation de l'agressivité est réalisée sur le nombre de nématodes. L'analyse de la variance et le test de Newmann-Keuls permettent la différenciation claire des isolats de *P. coffeae* par leur degré d'agressivité (cf. tab. 9).

Les isolats GLP 03 et GLP 02 se distinguent vraiment des autres isolats. Ils sont les plus agressifs sur bananiers. Deux groupes intermédiaires se distinguent : le plus agressif est formé par les populations MTQ 02, VNM 04 et IDN et le second est formé par GTM 02 et COL 01. Le dernier isolat, avant le groupe caractérisé par le témoin, est GTM 01.

Test Newman-Keuls; LOG\_NEM (centreban~1.sta)

Groupes homogènes, alpha = ,05

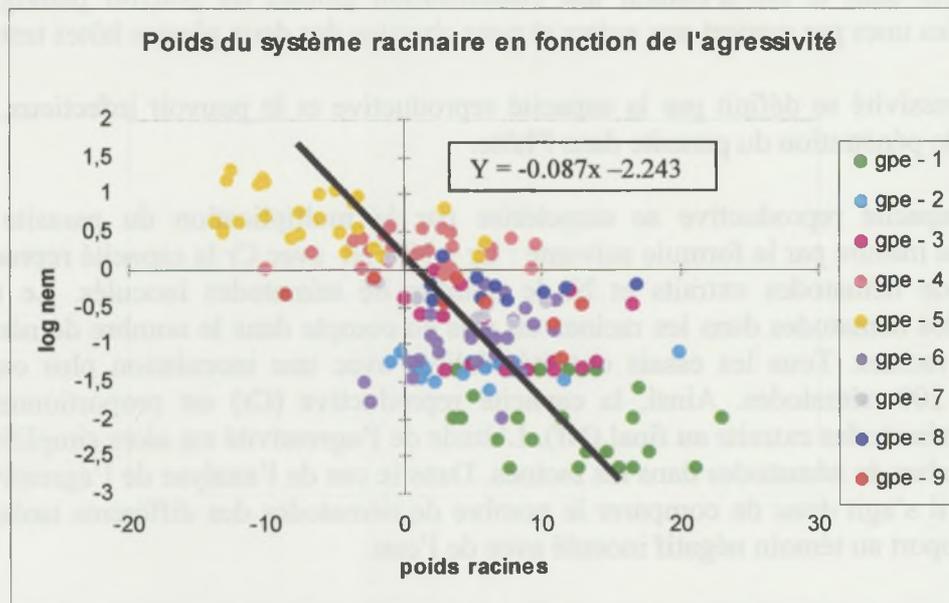
EFFET PRINC.:GPE

gpes	Moy.	regroupement				
H2O	-1,966	A				
GTM 1	-1,329		B			
COL 1	-0,990			C		
GTM 2	-0,848			C		
MTQ 2	-0,476				D	
VNM 4	-0,368				D	
IDN	-0,224				D	
GLP 2	0,272					E
GLP 3	0,715					F

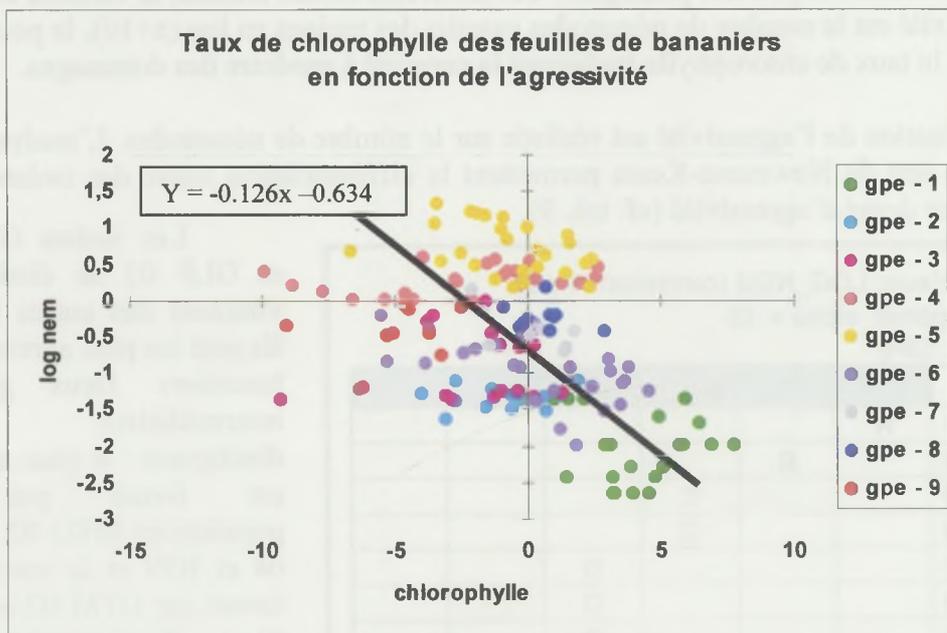
**Tableau 9 :** Test de Newmann-Keuls sur le nombre de nématodes



**Légende des figures 13, 14 et 15 :** 1-Temoin (eau) 2 GTM01 3 GTM02  
 4-GLP 02 5 GLP 03 6 COL 01  
 7 VNM 04 8 IDN 9 MTQ 02



**Figure 13:** Poids du système racinaire en fonction de l'agressivité des nématodes sur bananiers



**Figure 14 :** Taux de chlorophylle en fonction de l'agressivité des nématodes sur bananiers

De ces résultats, il est intéressant de noter que les isolats GLP 02 et GLP 03 sont les plus agressifs, ces deux types de nématodes étant prélevés sur bananiers.

La seconde variable soumise à une ANOVA et au test de Newmann-Keuls est celle du poids racinaire. L'analyse de cette variable apporte une information sur les dégâts directs engendrés par les nématodes (cf. tab. 10).

Test Newman-Keuls; POIDS\_RA (centreban~1.sta)  
Groupes homogènes, alpha = ,05  
EFFET PRINC.:GPE

	Moy.	regroupement			
GLP 3	-6,431	A			
GLP 2	1,195		B		
VNM 4	3,312		B	C	
MTQ 2	4,646		B	C	
COL 1	5,060		B	C	
GTM 1	5,083		B	C	
IDN	7,046			C	
GTM 2	7,327			C	
H2O	11,967				D

L'isolat GLP 03 engendre les plus grosses pertes de masse racinaire. De même, il est possible de remarquer que l'isolat GLP 02, bien qu'appartenant au groupe central, se rapproche légèrement de GLP 03. Ces résultats classent les isolats de façon identique que le regroupement des isolats obtenu par l'analyse de l'agressivité.

**Tableau 10 :** Test de Newmann-Keuls sur le poids racinaire

Les résultats de l'ANOVA mettent essentiellement en évidence la capacité de l'isolat GLP 03 à provoquer des dommages sur les racines de la plante. D'une manière générale, les dommages générés sont directement liés au nombre de nématodes dans les racines. Cependant, la figure 13 montre cette population légèrement en dessous de la droite de proportionnalité « nombre de nématodes-symptômes », ce qui traduit une plus faible capacité à induire des symptômes.

Le taux de chlorophylle dans les feuilles de bananiers est la conséquence indirecte d'un dysfonctionnement racinaire. Ce paramètre traduit la capacité des différents isolats à altérer la plante au niveau des parties aériennes (cf. tab. 11).

Test Newman-Keuls; CHLOROPH (centreban~1.sta)  
Groupes homogènes, alpha = ,05  
EFFET PRINC.:GPE

	Moy.	regroupement			
MTQ 2	-4,956	A			
GLP 2	-2,301		B		
GTM 2	-1,737		B	C	
GTM 1	-0,887		B	C	
GLP 3	-0,716		B	C	
VNM 4	-0,163		B	C	
COL 1	0,192		B	C	
IDN	0,587			C	
H2O	3,476				D

L'isolat le plus agressif au niveau des parties aériennes est MTQ 02, avec un nombre de nématodes relativement importante et des dégâts racinaires moyens. La population GLP 02 se distingue légèrement du groupe central, comme pour le poids des racines, ce qui traduit un agressivité généralisée de cette souche au niveau de la plante entière.

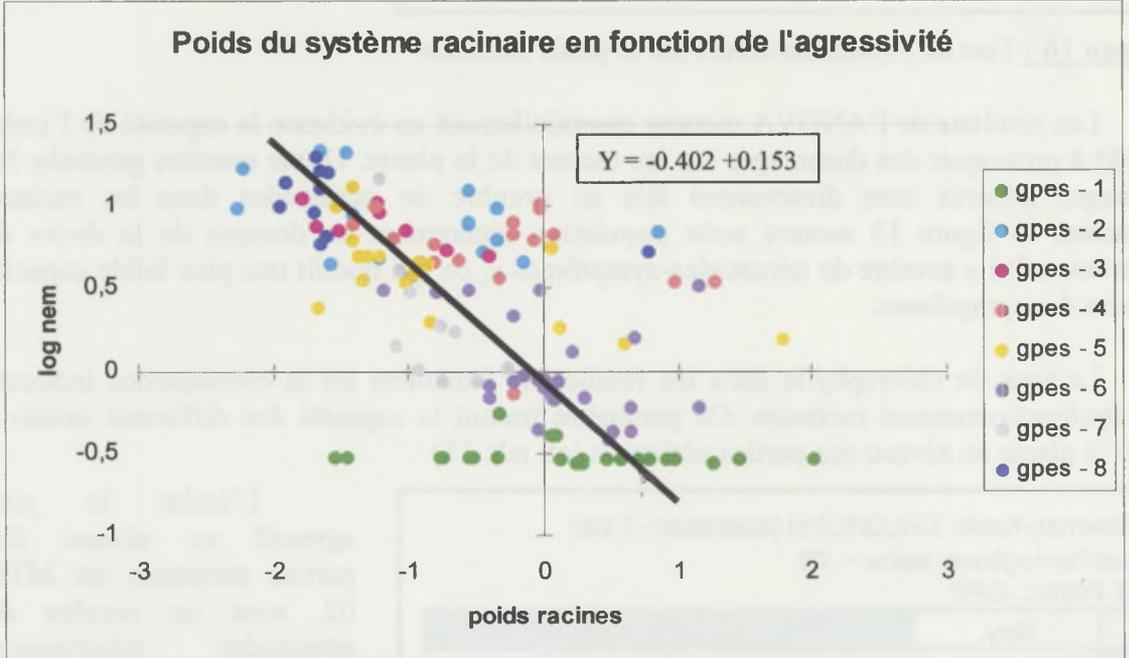
**Tableau 11 :** Test de Newmann-Keuls sur la chlorophylle

Le reste des isolats présentent un niveau faible ou intermédiaire de symptômes (cf. fig. 14). Les résultats observés démontrent une absence de relation claire entre l'état physiologique du système racinaire et celui des parties aériennes. En effet, les populations les

On voit que les données sont très dispersées et qu'il y a une forte variabilité. L'analyse de variance (ANOVA) est utilisée pour tester l'impact de l'agressivité des nématodes sur le poids du système racinaire. Les résultats de l'ANOVA sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Source	SS	df	MS	F	P
Aggressivité	1.234	1	1.234	15.67	0.0001
Erreur	6.766	28	0.242		
Total	8.000	29			

Les résultats de l'ANOVA indiquent une différence significative entre les groupes d'agressivité (F=15.67, p=0.0001). Les données sont donc regroupées en huit groupes (gpes - 1 à gpes - 8) pour l'analyse de régression.



**Figure 15:** Poids du système racinaire en fonction de l'agressivité des nématodes sur caféiers

plus agressives en terme de capacité parasitaire et de destruction des parties racinaires, ne semblent pas être celles qui induisent les plus forts symptômes de chlorose foliaire.

I. 2.2. Etude du pouvoir pathogène d'isolats de *P. coffeae* sur caféiers :

De même que sur bananiers, l'analyse de la variance et le test de Newmann-Keuls permettent de définir et classer les isolats les uns par rapport aux autres.

Les calculs sont effectués sur l'ensemble des résultats c'est à dire sur les données centrées. L'analyse du nombre de nématodes sur caféiers distingue pratiquement tous les isolats les uns des autres (cf. tab. 12).

Test Newman-Keuls; LOG\_NEM  
Groupes homogènes, alpha = ,05  
EFFET PRINC.:GPE

Catégories	Moyenne	Regroupements				
H2O	-0,519	A				
COL 1	0,002		B			
VNM 4	0,283			C		
GLP 3	0,595				D	
GLP 2	0,694				D	E
GTM 2	0,884					E F
GTM 1	0,918					F
IDN	1,027					F

Il est possible de remarquer la forte capacité parasitaire des isolats GTM 01, IDN mais aussi de GTM 02, ces trois souches étant toutes issues de caféiers. Les isolats GLP 02 et GLP 03 viennent ensuite avec des valeurs intermédiaires, la capacité parasitaire la plus faible étant celle de COL 01.

**Tableau 12 :** Test de Newmann-Keuls sur le nombre de nématodes

Il est nécessaire de souligner le haut pouvoir parasitaire des isolats GLP 02 et GLP 03 sur caféiers, ceux-ci étant prélevés de bananier (cf. fig. 15).

Pour l'analyse de la capacité des isolats à provoquer des symptômes, seul le poids du système racinaire est évalué. La mesure du poids frais des racines indique le niveau de dommages induits par les parasites dans les plants.

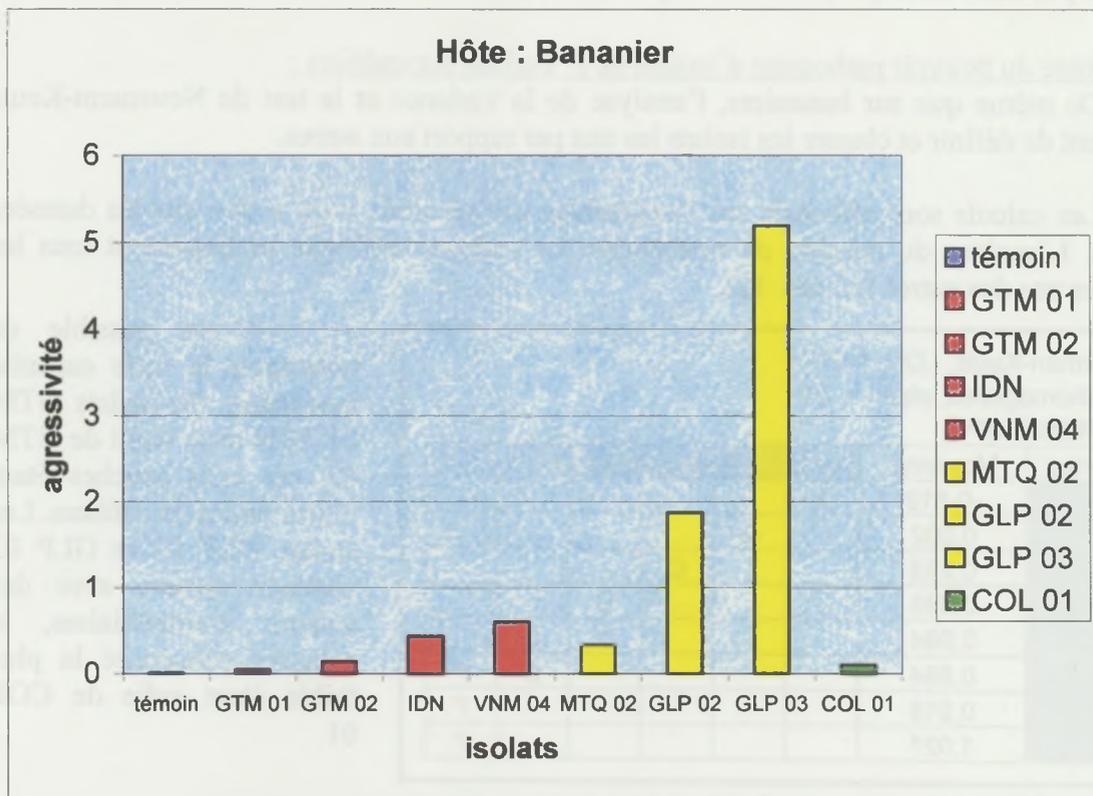
Test Newman-Keuls; PR  
Groupes homogènes, alpha = ,05  
EFFET PRINC.:GPE

Catégories	Moyenne	Regroupements		
IDN	-1,458	A		
GTM 2	-1,195	A		
GTM 1	-0,929	A	B	
VNM 4	-0,825	A	B	
GLP 3	-0,788	A	B	
GLP 2	-0,306		B	C
COL 1	0,078			C
H2O	0,158			C

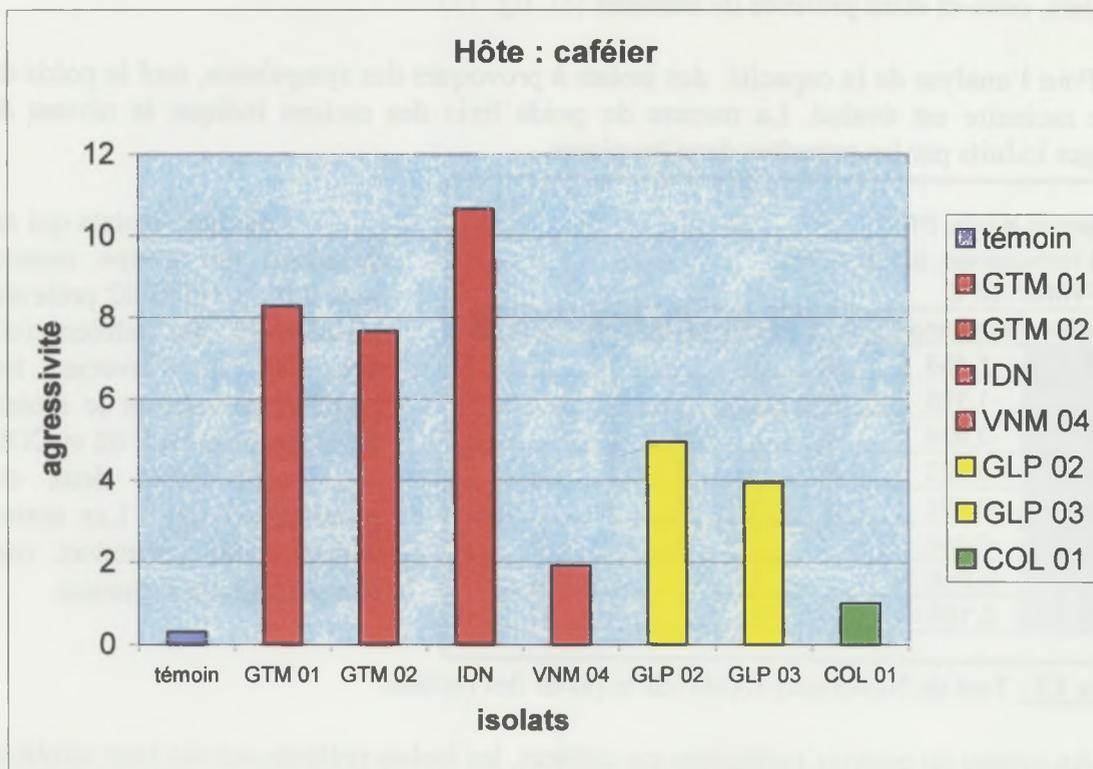
Les deux isolats qui se détachent du groupe central sont IDN et GTM 02 prélevés initialement sur caféiers (cf. tab. 13). A l'inverse, les populations causant le moins de dégâts sont GLP 02 et COL 01, issues toutes deux du genre *Musa spp.* Les autres isolats testés présentent une masse racinaire moyenne.

**Tableau 13 :** Test de Newmann-Keuls sur le poids des racines.

Au niveau du pouvoir pathogène sur caféiers, les isolats prélevés sur cet hôte semblent plus adaptés que ceux pris sur bananiers. En effet, GLP 02 et GLP 03 sont moyennement agressifs et COL 01, issu de plantain, est le plus proche du témoin avec un niveau de pouvoir pathogène négligeable. Par contraste, l'isolat GTM 02 tout comme VNM 04 possèdent peu de représentants dans les racines mais ont fortement endommagé le système racinaire.



**Figure 16a:** Capacité parasitaire des isolats sur bananier



**Figure 16b:** Capacité parasitaire des isolats sur caféiers

I. 2.3. Détermination d'une éventuelle relation entre l'hôte d'origine des isolats et leur pouvoir pathogène sur bananiers et caféiers :

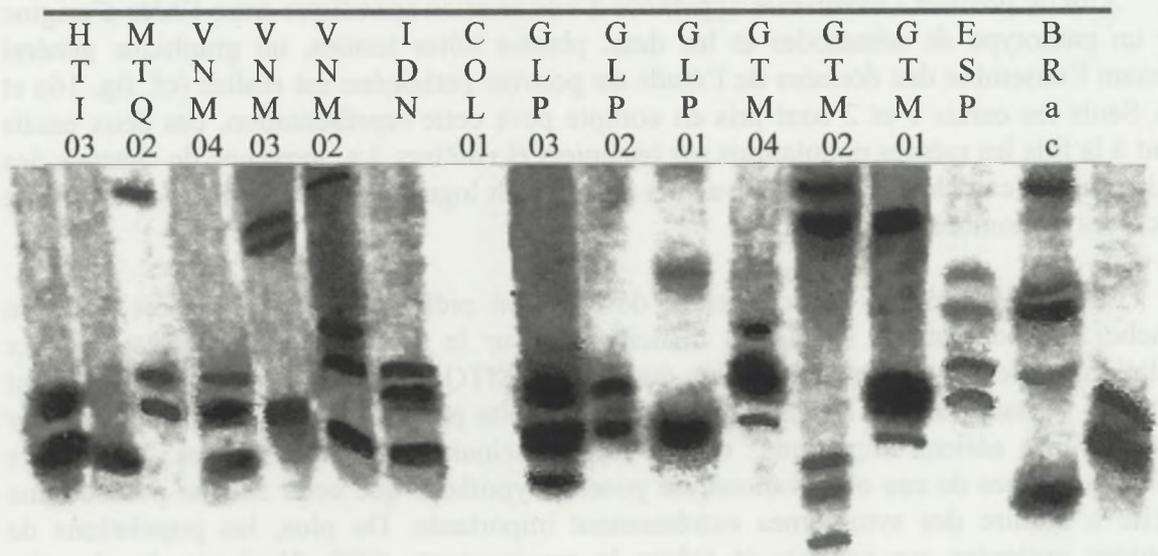
Afin de préciser l'éventuelle hypothèse d'une relation spécifique entre l'hôte d'origine pour un pathotype de nématodes et les deux plantes hôtes testées, un graphique général reprenant l'ensemble des données de l'étude du pouvoir pathogène est réalisé (cf. fig. 16a et 16b). Seuls les essais 1 et 2 sont pris en compte pour cette représentation, ces deux essais testant à la fois les mêmes populations sur bananiers et caféiers. La moyenne de chacune des populations est calculée à partir des valeurs centrées en logarithme. Ces valeurs sont ensuite recalculées en nombre de nématodes.

Les isolats prélevés sur caféier se développent préférentiellement sur cet hôte. En revanche, ces populations s'adaptent difficilement sur le bananier, comparativement aux populations prélevées sur bananier. Bien que l'isolat MTQ 02 ne présente pas un important nombre de nématodes dans les racines de bananier, cette population est la seule à engendrer des symptômes aériens importants et des dégâts racinaires non négligeables. Il est alors possible, aux vues de ces observations, de poser l'hypothèse que cette souche possède une capacité à induire des symptômes extrêmement importante. De plus, les populations de nématodes prélevées sur caféiers et même la représentante COL 01, issue de plantain, montrent un faible pouvoir pathogène sur bananier.

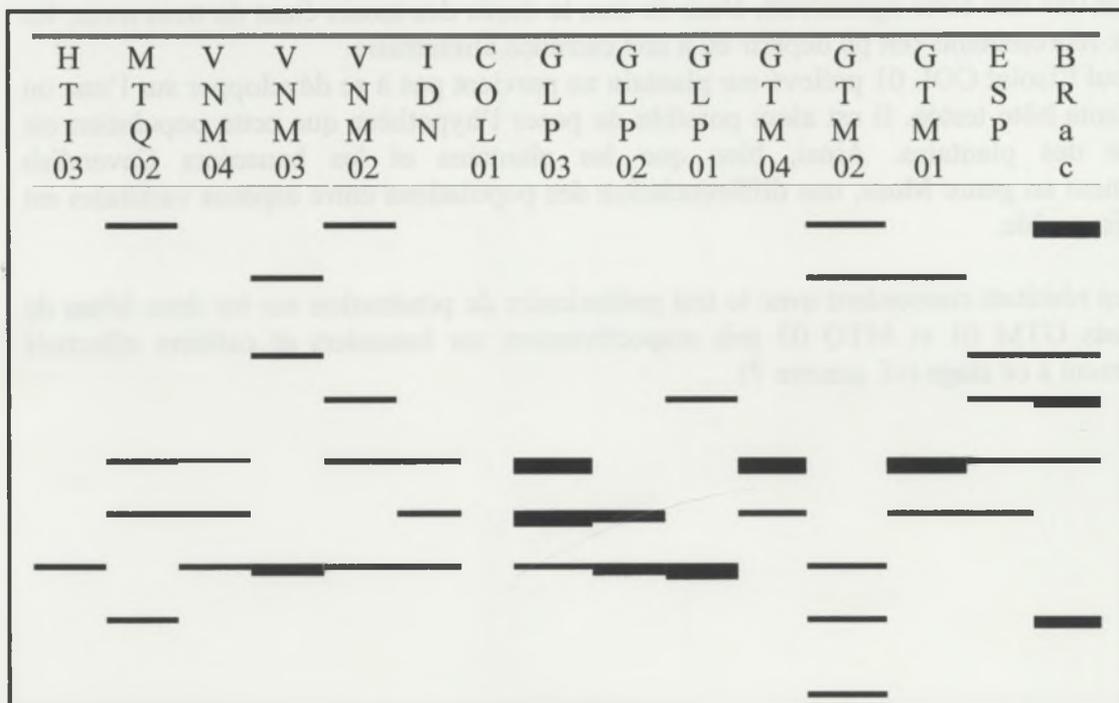
Différemment, aucune spécificité ne peut être mise en évidence en ce qui concerne les populations prises sur bananiers. En effet, l'ensemble des isolats testés affectent les caféiers avec tout de même une préférence pour les populations initialement prélevées sur l'hôte, hormis VNM 04. Ce dernier, bien qu'ayant une faible capacité parasitaire, engendre des sérieux symptômes racinaires proches de ceux de l'isolat GTM 02. Il est alors possible d'imaginer une très forte agressivité. Dans ce cas, la durée des essais étant de trois mois, les nombreux représentants ont pu dépérir du à une carence alimentaire.

Seul l'isolat COL 01 prélevé sur plantain ne parvient pas à se développer sur l'une ou l'autre plante hôte testée. Il est alors possible de poser l'hypothèse que cette population est spécifique des plantains. Ainsi, bien que les plantains et les bananiers Cavendish appartiennent au genre *Musa*, une différenciation des populations entre espèces variétales est alors envisageable.

Ces résultats concordent avec le test préliminaire de pénétration sur les deux hôtes de deux isolats GTM 01 et MTQ 03 pris respectivement sur bananiers et caféiers effectués préalablement à ce stage (cf. annexe 7).



**Figure 17:** Scan du gel d'isofocalisation révélé pour les estérases



**Figure 18:** Schématisation des bandes correspondantes observées sur le gel d'isofocalisation

## II. Caractérisation biochimique d'isolats de *P. coffeae* spp.

Afin de mettre en place un diagnostic phytopathologique fiable, il est nécessaire d'associer à un pathogène agressif un profil caractéristique déterminé. Ce profil peut être de nature moléculaire avec des marqueurs spécifiques ou encore, dans notre cas, biochimique avec la technique de focalisation isoélectrique d'isoenzymes.

Deux gels comportant 15 isolats de *P. coffeae* spp. ont été réalisés, la révélation portant sur les estérases (cf. fig. 17). Les deux gels sont identiques et fournissent donc les mêmes bandes pour chaque isolat.

Les profils isoenzymatiques correspondants obtenus sont schématisés (cf. fig. 18) pour clarifier le comptage des bandes communes (révélées et absentes) permettant de calculer un pourcentage de similarité. Ce calcul permet de dresser une matrice, indispensable à la création du dendrogramme correspondant (cf. fig. 19).

Les conclusions qui peuvent être tirées de cette partie d'étude doivent être prises avec précaution. Il ne faut pas oublier qu'une telle caractérisation se précise généralement sur au moins quatre enzymes différentes.

Toutefois, il est possible d'en extraire les grandes lignes, des études ultérieures les confirmant ou les réfutant. Tout d'abord, aucun rapprochement significatif ne peut être mis en évidence entre isolats géographiquement proches suite à cette étude. Il faut souligner par ailleurs que les populations « Brachy » et « ESP » sont des espèces de *Pratylenchus* différentes de *P. coffeae* (avec respectivement *P. brachyurus* et *P. zaei*). Cette remarque génère deux hypothèses : soit les espèces proches n'appartiennent pas à *P. coffeae*, soit l'espèce *P. coffeae* n'est pas distinguable par la technique utilisant les estérases.

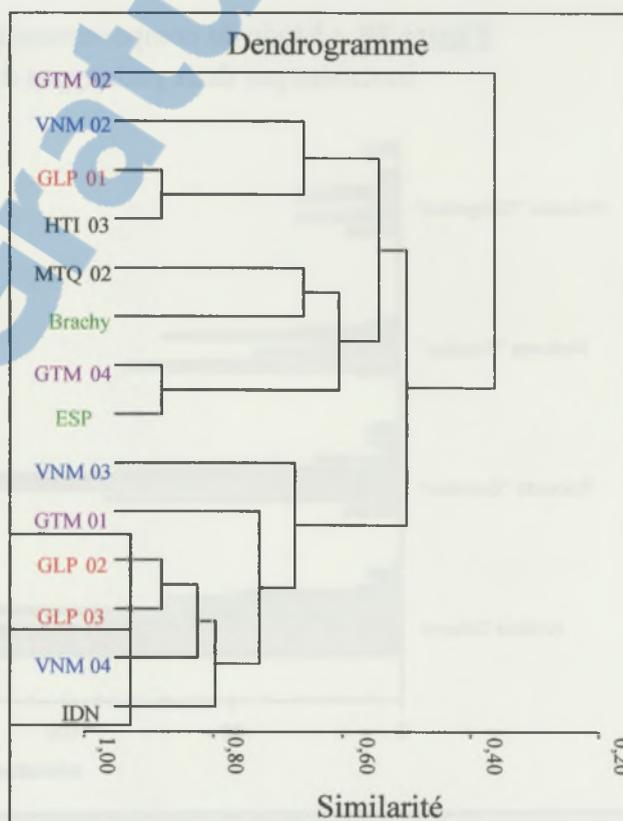
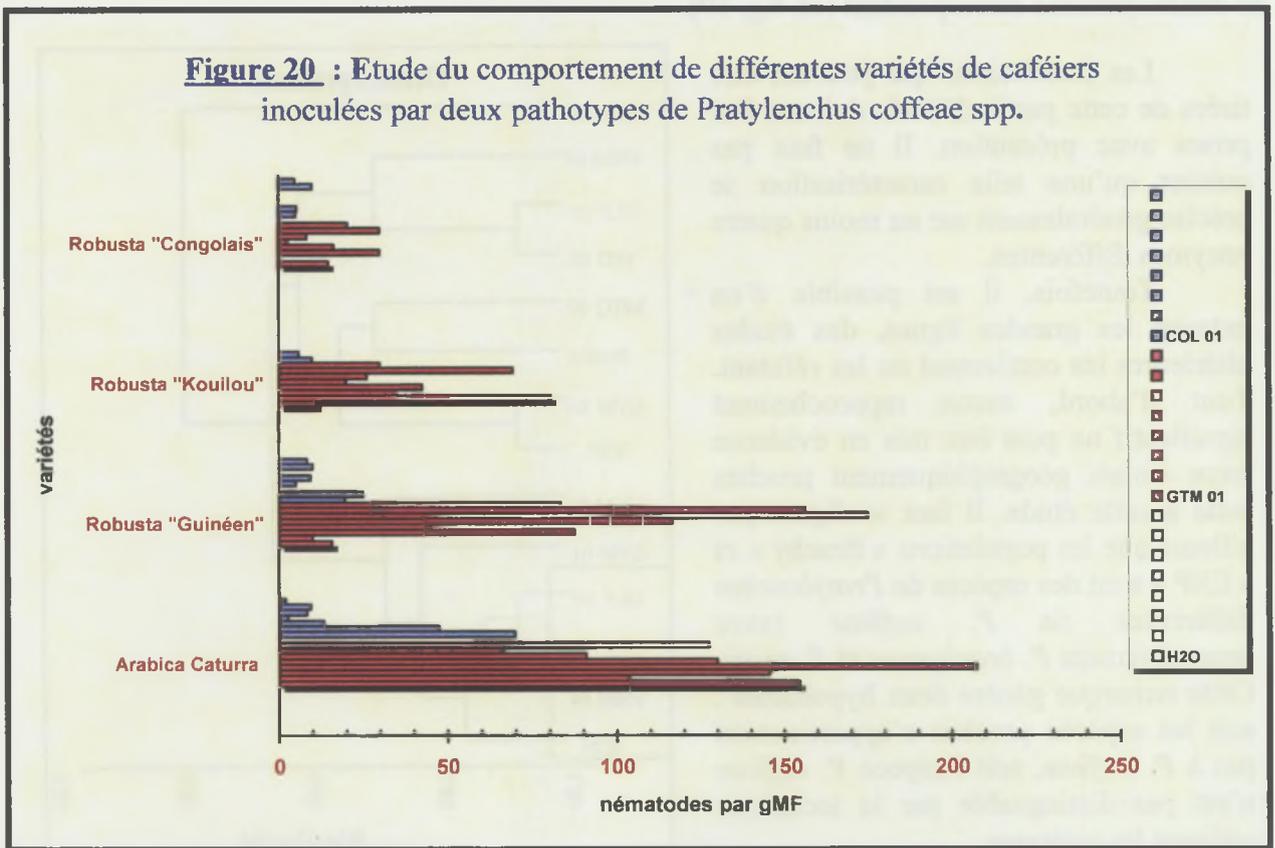


Figure 19 : Dendrogramme basée sur l'isofocalisation des estérases des isolats du complexe *P. coffeae*

Dans tous les cas, la caractérisation intraspécifique de *P. coffeae* spp. se heurte actuellement au manque d'informations et d'études sur le sujet. L'étude réalisée par Villain en 2001 tente d'élucider ce problème puisque sur trois isolats étudiés que sont GTM 01, GTM 02 et GTM 04, seul GTM 02 peut être morphologiquement associé à l'espèce *P. coffeae*. Or dans nos résultats, il s'agit de l'isolat le plus éloigné de l'ensemble des isolats testés. Ces résultats traduisent significativement le problème de caractérisation du complexe *P. coffeae*, ce qui ne veut pas dire que cet isolat ne soit pas en réalité le seul représentant de *P. coffeae* dans nos études. Aux vues des ravages planétaires que ces nématodes engendrent, il semble indispensable de s'attacher aux études de caractérisation de ces nématodes. Parallèlement, des criblages variétaux apparaissent nécessaire afin de faire face et répondre le plus rapidement aux besoins problèmes agronomiques que cette espèce de nématode engendrent.

**Figure 20 : Etude du comportement de différentes variétés de caféiers inoculées par deux pathotypes de *Pratylenchus coffeae* spp.**



### III. Criblage variétal du genre *Coffea* aux attaques de nématodes du complexe *P. coffeae*

Parallèlement aux études concernant la caractérisation du complexe *P. coffeae*, il semblait intéressant de tester différents cultivars de caféiers dans le but d'appréhender une éventuelle résistance à ce type de parasites. En effet, de nombreux essais sont menés en parallèle sur les pathogènes courants au sein du programme de sélection « café » du CIRAD-CP, que sont les champignons, les bactéries et les virus mais pratiquement jamais sur les nématodes. Ainsi, l'essai mis en place utilise des espèces de caféiers les plus éloignés possibles phylogénétiquement afin de cerner au mieux l'ensemble du genre *Coffea*. Ce test a été réalisé d'une part, sur un cultivar *C. arabica* var. *caturra* préalablement démontré comme sensible à la plupart des nématodes et plus particulièrement au genre *Pratylenchus*, et d'autre part sur trois variétés de *C. canephora*, les plus distinctes possibles. *C. canephora* est connu pour être un matériel généralement résistant à l'ensemble des pathogènes. Les trois cultivars testés sont un *C. canephora* « Guinéen », un « Kouilou » (SG1) et un « Congolais » (SG2).

Les résultats graphiques sont d'ores et déjà éloquentes. La figure 20 met en évidence une plus forte agressivité de la population GTM 01 par rapport à la population COL 01. Cette différence s'explique toutefois par leur hôte d'origine respectif qui est le caféier pour GTM 01 et le bananier plantain pour COL 01. Ce test confirme les résultats précédemment trouvés lors de l'étude du pouvoir pathogène de diverses populations in planta (cf. résultats I.2). Aux premières vues de ces résultats, seule la population GTM 01 est prise en compte pour l'analyse plus spécifique concernant les divergences intervariétales afin d'optimiser la distinction entre les espèces de *C. canephora* testées.

La variété *Robusta* « Guinéen » est sensiblement proche du témoin sensible qu'est la variété *Caturra* (*C. arabica*). La variété *Robusta* « Congolais » présente la plus faible infestation par les nématodes, ce qui traduit une meilleure résistance à ce type de ravageur. La variété *Robusta* Kouilou présente, à première vue, un degré d'infestation moyen par rapport aux deux autres variétés de *C. canephora*. Ces premiers résultats exposent d'une manière évidente la grande diversité au sein d'une même espèce, *C. canephora*, pourtant connue pour sa robustesse et ses nombreuses résistances aux pathogènes.

Les observations de cette première approche graphique est confortée par l'analyse statistique selon le test de Newmann-Keuls (cf. tab. 14).

Catégories	Moyenne	Regroupements		
Congolais	1,131	A		
Kouilou	1,679		B	
Guinéen	1,742		B	
Caturra	2,374			C

**Tableau :** Classement en fonction du nombre de nématodes groupe.

La variété la moins parasitée « Congolais » se détache des deux autres variétés de *C. canephora*. Le témoin sensible est fortement infesté et constitue son propre

groupe.

Finalement, la variété la plus parasitée, appartenant au groupe des « Guinéens », est la variété la plus éloignée génétiquement se ségrégeant des deux autres variétés appartenant au groupe des « Congolais ». Les deux dernières variétés, Kouilou et Congolais se distinguent par leur appartenance au sous groupe SG1 et SG2 respectivement. Toutefois, ces observations *in planta* permettent de dégrossir globalement et rapidement le genre *Coffea* à l'aide de ces variétés représentatives de la totalité du genre. Cette expérimentation constitue une première approche appliquée pour la recherche de résistances aux nématodes du complexe *P. coffeae* dans le cadre de la mise en place d'une lutte durable et intégrée. Néanmoins, tous les plants de *C. canephora* présentaient un phénotype indemne de symptômes aériens, à la différence des plantules de la variété témoin sensible qui se dessèchent sur pied.

## DISCUSSION

Les études présentées dans ce mémoire confirment la diversité des populations apparentées à l'espèce *P. coffeae* et la nécessité de mieux définir les outils de caractérisation de ce complexe spécifique. L'étude du pouvoir pathogène est particulièrement importante pour distinguer les populations susceptibles de générer des dommages significatifs aux cultures considérées. Cela nécessite au préalable de déterminer des paramètres traduisant aux mieux le pouvoir pathogène des populations. Deux niveaux d'études sont à considérer : d'une part les populations de nématodes et leurs caractéristiques intrinsèques, et d'autre part, les dommages générés aux plantes par ces parasites.

Dans le cadre de cette étude, il a été indispensable de redéfinir le concept du pouvoir pathogène établi par Shaner et al. (1992) puis transposé Bos et Parlevliet (1995). Pour ces auteurs, le pouvoir pathogène résulte de deux composantes : la virulence et l'agressivité. Or, dans le cas des nématodes endoparasites migrateurs, c'est à dire que ne sont pas des agents pathogènes, il n'existe pas de virulence au sens propre, les symptômes engendrés étant la conséquence d'une simple relation trophique. L'agressivité se définit par deux composantes majeures que sont le taux de pénétration des nématodes et leur capacité à se reproduire dans la plante hôte.

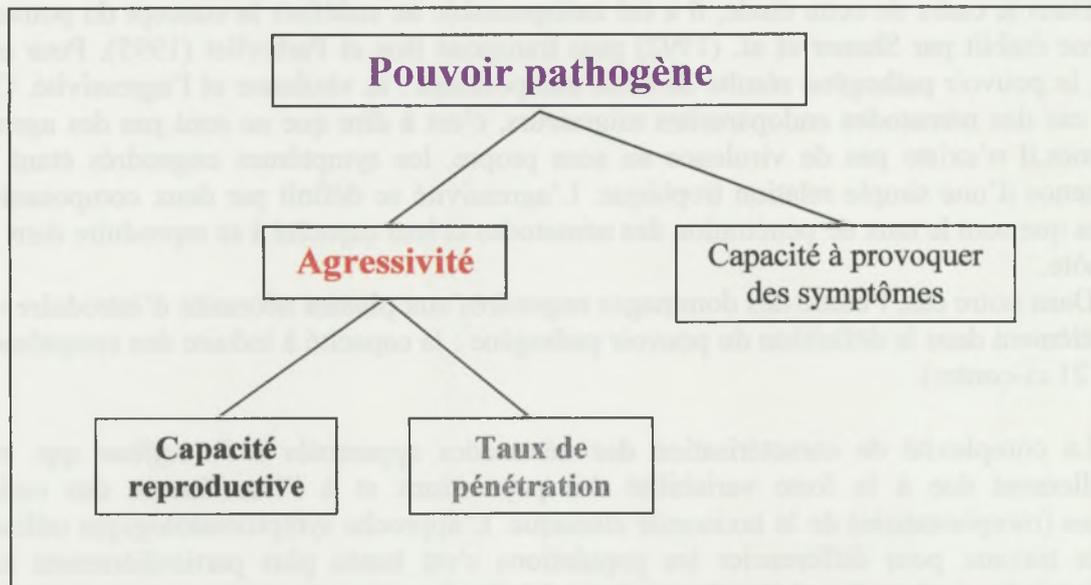
Dans notre cas, l'étude des dommages engendrés aux plantes nécessite d'introduire un nouvel élément dans la définition du pouvoir pathogène : la capacité à induire des symptômes (cf. fig. 21 ci-contre).

La complexité de caractérisation des nématodes apparentés à *P. coffeae spp.* est essentiellement due à la forte variabilité des populations et à l'insuffisance des outils classiques (morphométrie) de la taxinomie classique. L'approche symptomatologique utilisée dans ces travaux pour différencier les populations s'est basée plus particulièrement sur l'agressivité des isolats, la pénétration et la multiplication des nématodes ne pouvant être distinguées. D'autre part, le délai de trois mois défini pour nos expérimentations se base sur une période moyenne suffisante à la pénétration, la multiplication, l'établissement de la population, et par conséquent la génération de symptômes discernables. Toutefois, il est envisageable, dans le cas des isolats de MTQ 02 sur bananiers et VNM 04 sur caféiers, de poser l'hypothèse que ces nématodes, après s'être nourri sur la plante, aient migré ou plus vraisemblablement ont déperé après épuisement de leurs ressources nutritives. Afin de contourner ce problème, des études plus précoces et/ou régulières dans le temps mais par conséquent plus lourdes, sont nécessaires.

Au niveau de l'évaluation des dommages, la détermination de paramètres traduisant le plus précisément le pouvoir pathogène des nématodes semble incontournable. La mesure de la hauteur des plants, de même que le poids des parties aériennes, se montrent de faible intérêt, aucune corrélation n'ayant pu être décelée. En revanche, le meilleur paramètre, mis en évidence depuis longtemps en nématologie phytopathogène, reste le poids frais des racines. L'ACP réalisée confirme la forte corrélation existante entre la capacité parasitaire et le poids du système racinaire, transposant les dégâts racinaires. L'analyse de la variance sur cette variable expose clairement la diversité du complexe *P. coffeae* avec une distinction possible pour de nombreuses populations. Le problème est que ce paramètre ne peut assurément pas constituer un élément de diagnostic sur le terrain, celui-ci nécessitant un désenracinement et un élagage des plants au niveau du collet. Il s'agit donc d'un paramètre destructif peu maniable pour les expérimentations dans le temps et inexploitable pour un diagnostic au champ.

## DISCUSSION

Les études présentées dans ce chapitre ont permis de mieux comprendre le rôle des populations appartenant à l'espèce *P. coffeae* et le rôle de ces populations dans les cycles de contamination de ce complexe spécifique. L'étude de la diversité génétique au sein de ces populations a permis de distinguer les populations appartenant à l'espèce *P. coffeae* et les populations appartenant à d'autres espèces. Cette distinction est importante car elle permet de mieux comprendre le rôle de ces populations dans les cycles de contamination. Les résultats de cette étude ont permis de mieux comprendre le rôle de ces populations dans les cycles de contamination et de mieux comprendre le rôle de ces populations dans les cycles de contamination.



**Figure 21:** Schéma des composantes du pouvoir pathogène pour *P. coffeae* spp.

La teneur en chlorophylle se révèle être intéressante et bien corrélée avec la présence des parasites. Cependant, ce facteur n'a pu être évalué sur les caféiers, les plantules présentant un trop faible taux de pigments chlorophylliens. En outre, il est à supposer que ce paramètre ne soit pas adapté aux symptômes du caféier. En effet, le caféier présente des nécroses foliaires à la différence des chloroses observables chez le bananier. En conclusion, aucun paramètre aérien ne peut être utilisé comme descripteur du niveau symptomatologique souterrain. Or, ce sont les symptômes aériens caractéristiques qui sont intéressants pour l'établissement d'un diagnostic fiable et rapide sur le terrain. Même si le dosage de la chlorophylle pourrait éventuellement être utilisé dans le cas de diagnostics phytopathologiques sur bananiers, cette mesure doit être réalisée avec précaution par un utilisateur expérimenté, une vérification par extraction étant toutefois inévitable.

Lors de nos études sur plantes, il a été possible de mettre en évidence une différence symptomatologique entre les populations. L'exemple le plus caractéristique est la capacité de l'isolat MTQ 02 à induire des symptômes foliaires sur bananiers sans pour autant provoquer d'importants dégâts racinaires sur cet hôte. Ces observations laissent sous-entendre des dégâts ciblés au niveau du système racinaire, plus particulièrement avec une dysfonctionnement du système d'absorption ou de transport hydrique. Ces résultats impliqueraient donc une forme de virulence ? Par contraste GLP 03 présente une agressivité élevée sans induire d'importantes pertes de masse racinaire, ni engendrer de gros dommages sur la plante hôte. De telles populations n'apparaissent donc pas à l'origine des grandes pertes culturelles évoquées à l'échelle mondiale.

Les populations démontrées comme les plus agressives et surtout les plus aptes à engendrer des dommages sur la plante hôte sont à étudier plus en détail. En ce qui concerne l'approche globale sur plants, les conclusions à retenir sont qu'il existerait une certaine spécificité d'hôte concernant les isolats prélevés sur caféiers mais pas dans le cas de ceux prélevés sur bananiers. Ces résultats vont à l'encontre d'approches préliminaires effectués par Pinochet et Sarah, révélant que des populations prélevées sur bananiers étaient inaptes à se développer sur caféiers (communication personnelle). D'autre part, des travaux récemment effectués par Duncan (communication personnelle), ont montré une spécificité d'hôte pour la globalité des nématodes prélevés sur bananiers, caféiers, yam et citrus. Mais les travaux réalisés par ce dernier auteur se limitent à une unique population représentante par hôte alors que dans notre cas, il s'agit de conclusions portant sur trois populations issues de bananiers et quatre populations prélevées sur caféiers. Le fait d'augmenter le nombre de représentants testés accroît la variabilité et donc la multiplicité possible des gammes d'hôtes observées. La non spécificité d'hôte des populations issues de bananiers étudiées ici a été confirmée par l'intermédiaire de tests de pénétration des nématodes réalisés dans le cadre d'un autre stage (cf. annexe 7). Ces conclusions sont de nature à remettre en cause la pertinence du recours à des cultures intercalaires de bananiers et de caféiers parfois préconisées dans quelques pays producteurs afin de parer à certaines maladies.

La recherche d'une lutte durable et adaptée à ce type de ravageurs est actuellement primordiale. Toutefois, elle se heurte au manque de connaissances au sujet de la bio-écologie des nématodes et à la difficulté d'identification à ce type de ravageurs et particulièrement au niveau du complexe *P. coffeae*. Les différentes populations de ce complexe ne sont pas différenciables par les critères de morphométrie classique. Jusqu'à ce jour, aucune étude sérieuse n'avait été entreprise pour tenter d'éclaircir ce problème d'identification pourtant primordial. Sur caféiers, les travaux réalisés pendant ce stage constituent la continuité des études menées par Villain au cours de sa thèse. Par conséquent, des populations communes

ont été étudiées afin de préciser les résultats de cet auteur. Pour Villain, les isolats GTM 01 et GTM 04, appelés respectivement Moca et Buena Vista (du nom des localités où ils ont été prélevés), ont été classés proches des espèces types de *P. gutierrezii* ou *P. pseudocoffeae* alors que l'isolat GTM 02, nommé Chitalon, est le seul décrit comme susceptible d'appartenir à l'espèce *P. coffeae* (cf. annexe 8 ).

La caractérisation biochimique faite sur les estérases permet d'aboutir aux mêmes divisions que celles effectuées par morphométrie (Villain, 2000) et par AFLP (Hervé, 1997). Or dans notre étude sur la diversité des estérases présentée ici, l'isolat GTM 02, identifié par Villain comme la plus proche de *P. coffeae*, se révèle le plus éloigné de tous les isolats. Ce résultat, qui reste à valider par d'autres approches, est de nature à démontrer que la plupart des populations prélevées sont différentes de *P. coffeae*, ce qui invalide la plupart des publications antérieures qui mentionnent cette espèce comme dominante sur les cultures de bananiers et de caféiers.

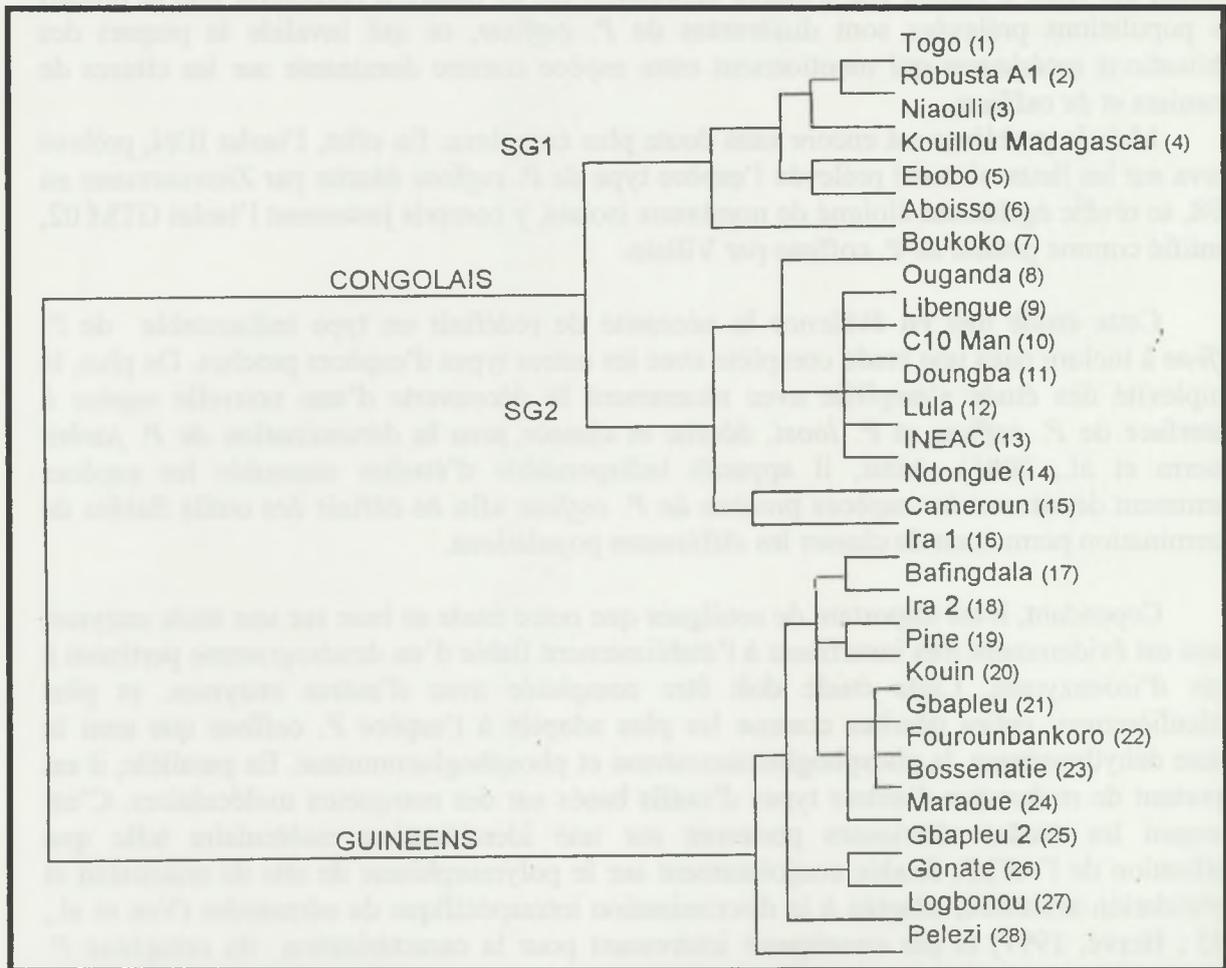
Mais le problème est encore sans doute plus complexe. En effet, l'isolat IDN, prélevé à Java sur les lieux où a été prélevée l'espèce type de *P. coffeae* décrite par Zimmermann en 1898, se révèle également éloigné de nombreux isolats, y compris justement l'isolat GTM 02, identifié comme proche de *P. coffeae* par Villain.

Cette étude met en évidence la nécessité de redéfinir un type indiscutable de *P. coffeae* à inclure dans une étude complète avec les autres types d'espèces proches. De plus, la complexité de l'étude s'amplifie avec récemment la découverte d'une nouvelle espèce à l'interface de *P. coffeae* et *P. loosi*, décrite et classée sous la dénomination de *P. jaehni* (Inserra et al., 2001). Ainsi, il apparaît indispensable d'étudier ensemble les espèces récemment décrites et les espèces proches de *P. coffeae* afin de définir des outils fiables de détermination permettant de classer les différentes populations.

Cependant, il est important de souligner que notre étude se base sur une seule enzyme, ce qui est évidemment très insuffisant à l'établissement fiable d'un dendrogramme pertinent à partir d'isoenzymes. Cette étude doit être complétée avec d'autres enzymes, et plus particulièrement celles décrites comme les plus adaptées à l'espèce *P. coffeae* que sont la malate déshydrogénase, la phosphoglucoisomérase et phosphoglucomutase. En parallèle, il est important de rechercher d'autres types d'outils basés sur des marqueurs moléculaires. C'est pourquoi les études ultérieures porteront sur une identification moléculaire telle que l'utilisation de l'AFLP, fondée conjointement sur le polymorphisme de site de restriction et l'hybridation arbitraire, adaptée à la discrimination intraspécifique de nématodes (Vos et al., 1995 ; Hervé, 1997) et par conséquent intéressant pour la caractérisation du complexe *P. coffeae*. Il est également à prendre en considération les possibilités offertes par les techniques basées sur l'étude du polymorphisme de l'ADN ribosomal, pour le niveau interspécifique.

En attendant des avancées au niveau de l'identification des souches agressives appartenant à l'espèce *P. coffeae*, des observations sur le terrain ont permis de mettre en évidence des résistances aux nématodes dans certaines variétés de caféiers, plus précisément dans l'espèce *Coffea canephora*. De plus, une sélection ancestrale à partir de simples observations en caféiculture a développé des porte-greffes à partir de *C. canephora* var. congolais.

C'est pourquoi, un test de criblage variétal a été entrepris dans l'ensemble de cette espèce à l'aide de cultivars phylogénétiquement les plus éloignés c'est à dire appartenant aux trois « branches » caractérisant l'espèce : un cultivar du groupe Congolais, les autres du groupe Guinéen avec un représentant du sous-groupe SG1 (Kouilou) et un du sous-groupe



**Figure :22** Dendrogramme de la diversité génétique de *C. canephora* (D'après Montagnon et al, 1992)

SG2. Le test de criblage montre que la variété la plus parasitée, hormis le témoin sensible *C. arabica*, appartient au groupe des « Guinéens ». C'est donc la variété génétiquement la plus éloignée des deux autres variétés testées appartenant au groupe des « Congolais » (cf. fig. 22). Ces différences de résistance vis à vis des nématodes peuvent être d'origines variées comme la composition biochimique spécifique d'une variété, la possession d'un ou plusieurs gènes de résistance... Aux vues de ces résultats, il est néanmoins possible de corréler la distance génétique des variétés testées avec le niveau de résistance observé. Des études préliminaires sur caféiers *C. canephora* posent l'hypothèse d'un rôle de l'acide chlorogénique dans la résistance aux nématodes. Or, le groupe Congolais démontré comme le plus résistant dans notre étude (SG1 et SG2) présente un taux de caféine, d'acide chlorogénique et de trigonelline bien inférieure à celui du groupe Guinéen. Des études de confirmation plus précises sont désormais attendues dans le but de mettre en place des plantes résistantes par introgression de gènes pour l'espèce *C. canephora* ou encore d'optimiser la technique du porte-greffe en ce qui concerne l'espèce *C. arabica*.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats confirme l'importante diversité des isolats des espèces de *Pratylenchus* parasitant les bananiers et les caféiers. L'étude du pouvoir pathogène distingue des degrés d'agressivité (niveau des populations dans les racines) propres à chacun des isolats et qui se traduisent par des dommages généralement proportionnels (poids des racines). De plus, les paramètres végétatifs « poids des racines » et « taux de chlorophylle » pour les bananiers, et seulement le poids des racines pour les caféiers, ont montré pour chacun d'entre eux au moins un isolat induisant des symptômes très importants malgré des populations faibles comme le montre une des populations originaire de Martinique et une du Vietnam.

Dans le cas du bananier, les résultats observés montrent une absence de relation entre les dommages aux parties souterraines et l'état physiologique des parties aériennes. L'étude biochimique peut néanmoins permettre de définir un profil isoenzymatique spécifique à chacun des isolats par la technique de focalisation isoélectrique. Le recours à l'utilisation de plusieurs enzymes est indispensable dans les études à venir. De plus, la caractérisation des populations à l'aide de marqueurs moléculaires permettra d'élargir la gamme de marqueurs utilisables pour caractériser les espèces du complexe *P. coffeae*.

Le paramètre poids des racines reste le meilleur « évaluateur » des dommages générés à la plante par les nématodes. En tout état de cause, il est le plus précoce puisqu'il traduit les dégâts directs. Ce stage a également permis de montrer que la mesure du taux de chlorophylle est un bon marqueur des symptômes traduits aux parties aériennes. Toutefois, aucun des deux paramètres définis et utilisés pour les études en conditions contrôlées ne sont envisageables pour constituer un diagnostic phytopathologique fiable sur le terrain, la mesure du poids des racines étant un paramètre destructeur et l'évaluation de la chlorophylle traduisant tous les facteurs biotiques et abiotiques néfastes pour la plante.

Une identification précise des nématodes de ce complexe spécifique liée à une bonne connaissance de leur pouvoir pathogène permettra de développer des méthodes de lutte efficaces et durables. Parmi celles-ci, une recherche de résistance globale aux nématodes du genre *Pratylenchus* est une voie prometteuse. En effet, l'étude préliminaire de criblage variétal de *C. canephora*, exposant des résultats significatifs et exploitables, constitue un préambule à la recherche et à l'étude spécifique des facteurs de résistance aux nématodes du complexe *P. coffeae*. Ces observations laissent à penser que la résistance variétale pourrait jouer un rôle majeur dans l'avenir, des résistances étant mises en évidence dans le *C. canephora* du groupe des Congolais. L'utilisation d'un tel matériel pouvant être de deux types en caféiculture : en porte-greffe résistants (déjà utilisé) ou mieux encore comme donneur de gènes de résistance par introgression des caractères intéressants.

En conclusion, ces travaux exposent d'une manière générale la grande complexité de la caractérisation de l'espèce *P. coffeae*. Les résultats apportent une précision sur le cadre des études à effectuer à l'avenir, de nombreux travaux étant encore nécessaires pour clarifier le statut pathogénique et taxinomique des populations apparentées à *P. coffeae*.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABAWI, G.S., VAN ETTEN, H.D., MAI, W.F.** 1971. Phaseollin production induced by *Pratylenchus penetrans* in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of nematology* 3 : 301 (Abstract)
- ANDRES, M.F., PINOCHET, J., HERNANDEZ-DORREGO, A., DELIBES, A.** 2000. Detection and analysis of inter- and intraspecific diversity of *Pratylenchus spp.* Using isozyme markers. *Plant Phytopathology* 49 : 640-649.
- ANZUETO, F.** 1993 Etude de la résistance du caféier (*Coffea sp.*) à *Méloidogyne sp.* Et *Pratylenchus sp.* Thèse de doctorat. Rennes, France : ENSAR. 123 P.
- BALDRIDGE** 1998. [www.ucbiotech.org](http://www.ucbiotech.org)
- BAUJARD, P., MOUNPORT, D. MARTINY, B.** 1991 Etude au microscope électronique à balayage de quatre espèces du genre *Pratylenchus Filip'ev*, 1936 (*Nemata Pratylenchidae*). *Revue de Nématologie*, vol.13, n. 2, p. 203-210.
- BOS, L., PARLEVIET, J.E.** 1995. Concept and terminology on plant/pest relationships : Toward Consensus in Plant Pathology and Crop Protection. *Annual review of Phytopatology*, vol.33, n. 2, p. 69-102
- BURROWS, P.R.** 1990. The use of the DNA to identify plant parasitic nematodes. *Nematological Abstracts* 59 : 1-8.
- CAMPOS, V.P., SIVIPALAN, P., GNANAPRAGASAM, N.C.** 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In : M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge. *Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Walingford, Royaume Uni : C.A.B International, p. 387-430.
- CHANG, L. M.** 1969. The repellent effect of necrotic tissue on the nematode, *Pratylenchus penetrans* Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941. University of Massachusetts, M.S. Thesis.
- COOK, R. & EVANS, R.** 1987. Resistance and tolerance. P. 179-231. In Principles and practice of nematode control in crops. Brown, R.H. & Kerry, B.R. (Eds). Academic Press, London, UK.
- CORBETT, D.C.M., CLARK, S.A.** 1973. Surface features of the head in *Pratylenchus spp.* In : 2<sup>nd</sup> International Congress of Plant Pathology, Minneapolis. 393p.
- CORBETT, D.C.M., CLARK, S.A.** 1983. Surface features in the taxonomy of *Pratylenchus* species. *Revue de Nématologie*, vol 6, p.21-43.
- DUNCAN, L., COHN, E.** 1990. Nematode parasites of Citrus. In : M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge. *Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Walingford, Royaume Uni : C.A.B International, p. 321-346.
- DUNCAN, L.W., INSERRA, R.N., DUN, D.** 1998. Seasonal changes in citrus fibrous root starch concentration and body length of female of *Pratylenchus coffeae*. *Nematropica*, vol28, n.2, p.263-266.
- DROPKIN, V.H. & NELSON, P.E.** 1960. The history pathology of root knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology*, 50 p. 442-447.
- ESBENSHADE, P.R., TRIANTAPHYLLOU, A.C.** 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Méloidogyne* species. *Journal of Nematology*, vol. 17, n. 1, p.6-20.
- FERRIS, V.G., FERRIS, J.M. & FAGHIHI, J.** 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* 16 : 177-184.
- FERRIS, V.G., FERRIS, J.M. & FAGHIHI, J.** 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* 16 : 177-184.

**GIEBEL, J.** 1970. Phenolic content in rooth of some solanaceae and its influence on IAA-oxydase activity asan indicator of resitance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, 16 p.22-32

**GOWEN, S., QUENERHVE, P.** 1990. Nematodes parasites of bananas, plantain and abaca.. In : M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge. *Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Walingford, Royaume Uni : C.A.B International, p. 431-460.

**HERVE, G.** 1997. *Caractérisation biologique et moléculaire de populations de nématodes phytoparasites dans les plantations de caféiers d'Amérique Centrale*. D.E.A. Rennes, France : ENSAR.36P

**HUNG, C.L. & ROHDE, R.A.** 1973. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal nematology*, 5 p. 253-258.

**HUSSEY, R.S. & KRUSBERG, L.R.** 1971. Disc-electrophoretic patterns of enzymes and soluble proteins of *Ditylenchus dipsaci* and *D. trififormis*. *Journal of Nematology* 3 : 79-84.

**IBRAHIM, S.K., PERRY, R.N., WEBB, R.M.** 1995. Use of isoenzyme and protein phenotypes to discriminate between six *Pratylenchus* species from Great Britain. *Annals od Applied Biology*, vol 126 , p.317-327.

**INSERRA, N., DUNCAN, L.W., TROCCOLI, A., DUNN, D., MAIA DOS SANTOS, J., KAPLAN, D., VOVLAS, N.** 2001. *Pratylenchus jaehni* sp. N. from citrus in Braszil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi*. *Nematology* 3 : 653-665.

**JATALA, P., BRIDGE, J.** 1990. Nematodes parasites of root and tuber crops. : In : M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge. *Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Walingford, Royaume Uni : C.A.B International, p. 431-460..

**KAPLAN, D.T.** 1978 Characterization of soybean incompatibility to *Meloidogyne incognita* and its association to glyceollin accumulation in infected root tissue. Ph. D. Dissert., *Univ. California, Riverside*, p.115

**KAPLAN, D.T., KEEN, N.T.** 1980. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. *Revue de Nématologie* 3 : 123-134.

**LACOEUILHE, J.J., GUEROUT, R.** 1976. Action du nématode *Pratylenchus brachyurus* sur la croissance, la nutrition et les rendements de l'ananas. Influence de la localisation de la fumure. *Fruits* 33 : 147-156.

**LUC, M.** 1987. A reappraisal of Tylenchina(Nemata). 7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. *Revue de Nématologie*, vol. 10, n.2, p.203-218

**LOOF, P.A.A.** 1978. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In : W. R. NICKEL. *Manual of agricultural nematology*. New York : DEKKER, M., p. 363-421.

**MONTAGNON, C.** 2000. Optimisation des gains génétiques dans le schéma de sélection récurrente réciproque de *Coffea canephora* Pierre. Thèse de doctorat. Montpellier, France. ENSAM.

**MUSE, B.D.** 1969 Histopathology of susceptible and resitant reactions in « Wando » pea seedlings to two populations of *Ditylenchus dispaci*. *Journal Nematology*, 1 p.299 (Abstract.)

**ORUI, Y.** 1996. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda : *Pratylenchidae*) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Applied Entomology and Zoology*, vol. 31, n. 4, p.505-514

**ORUI, Y. & TAKAYUKI, M.** 1999. discrimination of several *Pratylenchus* species in Japan by PCR-RFLP analysis. *Applied Entomology and Zoology* 34 : 214-217.

**PAYAN, L.A., DICKSON, DW.** 1990. Comparison of *Pratylenchus brachyurus* based on isozyme phenotypes. *Journal of Nematology*, vol.22, n.4 p 538-545.

**PINOCHET, P., CENIS, J.L., FERNANDEZ, C., DOUCET, M., MARULL, J.** 1994. Reproductive fitness and random amplified polymorphic DNA variation among isolates of *Pratylenchus vulnus*. *Journal of Nematology*, vol. 26, n.3, p. 271-277.

PONIN, I.Y., VOINILO, V.A., GLADKAYA, R.M. & TIMOFEEV, N.N. 1977. Nematode-resistant potato varieties and ways of using them. *Pl. Breed. Abstr.*, 47 p.7545

REBOIS, R.V., MADDEN, P.A. & ELDRIDGE, B.J. 1975. Some ultra-structural changes induced in resistant and susceptible soybean roots following infection by *Rotylenchulus reniformis*. *Journal Nematology* 7 p. 122-139.

RHODE, R.A. 1972. Expression of resistance in plants to nematodes. *A review of Phytopathology* 10 : 233-252.

RICH, J.R., KEEN, N.T. & THOMASSON, I.J. 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. *Physiol.Pl. Pathol.* 10 p.105-116

SARAH, J.L. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19 : 199-216.

SARAH, J.L. 2000. In : disease of banana, abaca and ensete (D.R. Jones Ed.). CABI publishing. Wallingford, New York. 295-303.

SASSER, J.N. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In : F. Lamberti and C.E. Taylor. *Root-knot nematodes (Meloidogyne species), Systematics Biology and control*. London : Academic Press, p. 257-268.

SHANER, G., STROMBERG, E., LACY, G., BARKER, K., PIRONE, T. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology* 30 : 47-66.

SIDHU, G., WEBSTER, J.M. 1973. Genetic control of resistance in tomato. I. Identification of genes for host resistance to *Meloidogyne* to *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 19 : 546-550.

SIDHU, G.S. 1975. Gene for gene relationships in plant parasitic system. *Sc. Progr., Oxford* 62 : 467-485.

STOVER, R.H. 1972. Banana, plantain and abaca disease. Kew, U.K. Commonwealth Mycological Institute.

TRETT, M.W., PERRY, R.N. 1985. Functional and evolutionary implications of the anterior sensory anatomy of species of root-lesion nematode. *Revue de Nématologie*, vol. 8, n.4, p.341-355

TRUDGILL, D.L. 1986. Concepts of resistance, tolerance and susceptibility in relation to cyst nematodes. In : F. Lamberti and C.E. Taylor. *Cyst Nematodes*. New York/London : Plenum, p.179-189.

TRUDGILL, D.L. 1991. resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29 : 167-192.

UEHARA, T., MIZUKUBO, T., KUSHIDA, A., MOMOTA, Y. 1998. identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44 : 357-368.

VALETTE, C. 1996. *Etude de la variabilité des interactions bananiers-nématodes : Approche des facteurs de la résistance du bananier à Radopholus similis*. Thèse de Doctorat. Paris : Université de Paris 6. 120p. p.

VEECH, J.A. 1978. An apparent relationship between methoxy-substituted terpenoid aldehydes and the resistance of cotton to *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 11 p.81-87

VILLAIN, B., ANZUETO, F., HERNANDEZ, A., SARAH, J.L. 1999. Los nematodos parasitos del café. In : B. Bertrand and B. Rapidel. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San Jose, C.R. : ICCA-PROMECAFE, p.327-368

VRAIN, T.C., FORGE, T.A., DE YOUNG, R. 1997. Population dynamics of *Pratylenchus penetrans* parasiting raspberry. *Fundamental and Applied Nematology*, vol.20, n.1, p. 29-36

WAEYENBERG, L., RYSS, A., MOENS, M., PINOCHET, J., VRAIN, T.C. 2000. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. *Nematology* 2 : 135-142

ZIMMERMANN, A. 1898. *De nematoden der Koffiewortels*. Batavia (=Jakarta, Indonésia) and S'Gravenhage (the Hague, The Netherlands) : G. Kolf & Co.p. *Mededeelingen uit 's lands pantentuin* 27.

# ANNEXE 1



Figure 1.11. *Pratylenchus coffeae*. B-F : mâle ; A, G-N : femelles dont A-G, I-L : topotypes (I-N : prélevées sur caféiers dans le sud de l'Inde. D, E, H, I, M, N : extrémités postérieures : mâle entier ; G : femelle entière ; J : région de l'appareil reproducteur ; K : région de l'oesophage ; L : région de la vulve. J : vue ventrale ; autres : vues latérales (D'après Siddiqi, 1972).

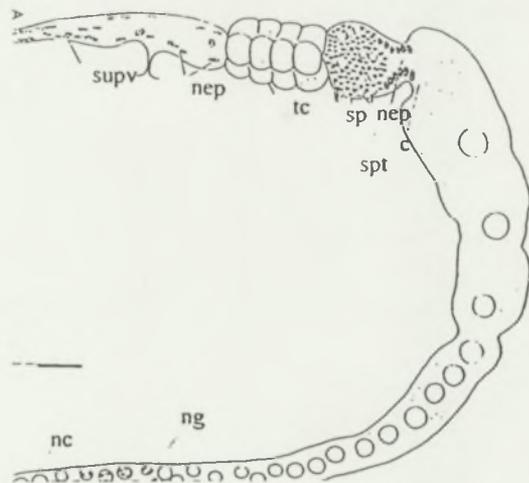


Figure 1.12. Appareil reproducteur d'une femelle adulte de *Pratylenchus coffeae*. c : constriction ; nc : noyau de "cap cell" ; ng : noyau des cellules épithéliales de la gona ; ng : noyau germinal ; sp : spermatozoïdes ; spt : spermatheca ; supv : sac utérin post vulvaire testiculaire (D'après Roman & Winkler, 1972).

## ANNEXE 2

### L'élevage in vitro de nématodes

#### a) préparation du système d'élevage

- Faire une solution d'Agar à 1 % (3g/300ml d'eau distillée = ~80 flacons)
- Couler 1 à 2 ml de cette solution dans des flacons de verre (8 cm/4cm) avec bouchon métallique vissant
- Autoclaver (20 mn à 120 °C) l'ensemble des flacons
- Placer ces flacons dans une étuve à 27 °C en attendant d'y mettre les rondelles de carotte
- Laisser au moins une semaine et s'assurer de l'absence de contamination

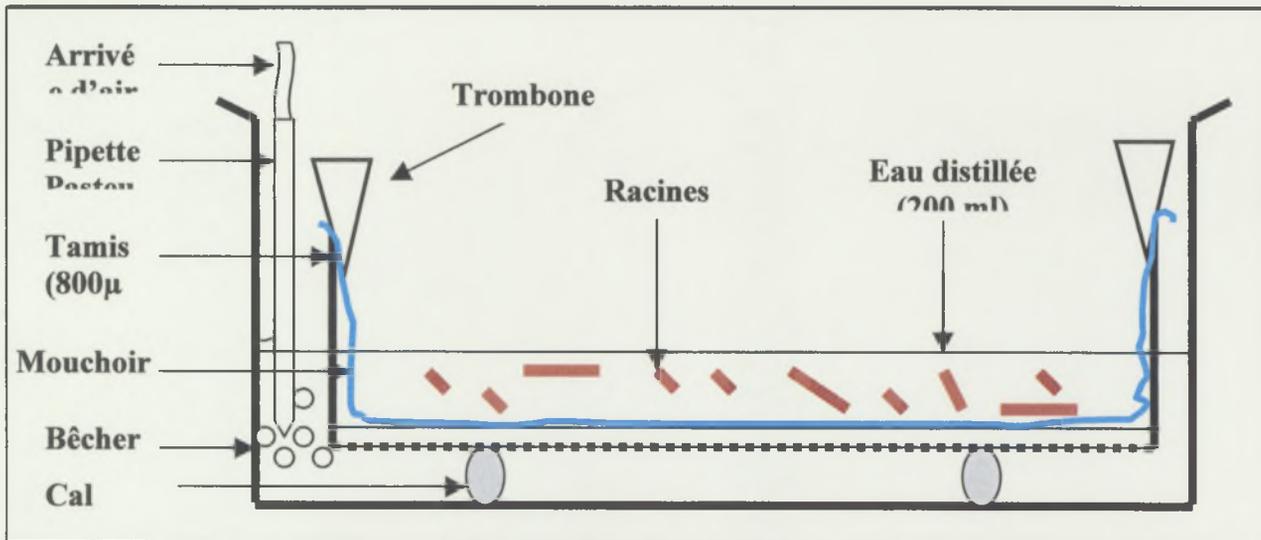


#### Sous hotte à flux laminaire

- Prendre des carottes de bonne taille, fraîches et sans lésions
- Tremper la carotte dans l'alcool à 95°C, puis la flamber
- Après avoir éliminé l'extrémité de la carotte, découper en tranches de différentes épaisseurs
- Percer chaque tranche avec un emporte-pièce d'~ 1.5 cm de diamètre
- Dans les flacons stériles, contenant une fine couche de gélose, disposer ces rondelles à 2 cm au-dessus de la gélose à l'aide d'une pince stérile
- Flambez au bec Bunsen avant fermeture et isoler le flacon par du film transparent (ou *Parafilm*)
- Placer les flacons 1 à 2 semaines à 27°C pour s'assurer de la non contamination.

## b) Mise en élevage d'une population monoxénique de nématodes endoparasites

- La mise en élevage d'une population de nématodes endoparasites migrateurs se réalise à partir d'un échantillon de racine.
- On réalise une extraction active :
  - Fixer un mouchoir sur un tamis de maille 800  $\mu\text{m}$  avec des trombones (ou utiliser un tamis de maille 80  $\mu\text{m}$  sans mouchoir)
  - Découper quelques racines en petits morceaux avec un scalpel et les placer sur le mouchoir fixé
  - Mettre de l'eau distillée (~ 400 ml) dans un bûcher plastique de 2000 ml
  - Placer le tamis contenant les racines découpées dans le bûcher
  - Apporter une aération à l'aide d'une pompe à aquarium
  - Couvrir le bûcher d'aluminium pour éviter les projections et l'évaporation.



- Après au moins 24h (jusqu'à 5 jours), verser l'eau dans des longs tubes de 200 ml
  - Laisser déposer environ 1 heure
  - Éliminer le surnageant par aspiration (laisser environ 10 ml)
  - Observer à la loupe binoculaire la quantité et la vitalité des nématodes dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre
  - Placer une goutte d'eau stérile sur une lame en verre
  - Sous une loupe binoculaire, à l'aide d'un bout de fil monté sur un petit manche (« canne à pêche ») récupérer le maximum (de 10 à 100) de nématodes un par un dans la goutte d'eau
  - Vérifier la monoxenicité des nématodes contenus dans la goutte d'eau au microscope
  - Déposer cette goutte sous hotte à flux laminaire dans un flacon sain ou sur une rondelle de carotte placée en boîte de Pétri puis sceller par trois tour de *Parafilm*.
- Noter et placer à 27 °C.

### c) Repiquage des nématodes élevés sur disques de carottes

#### Sous hotte à flux laminaire

- Au bout de 1 ou 2 mois récupérer les nématodes sur les parois des flacons (illustration) avec une pipette Pasteur avec de *l'eau stérile*
- Vider le contenu de la pipette dans un tube conique
- Centrifuger pendant 3 mn à 2500 tr/mn
- Eliminer le surnageant par aspiration et remplacer par une solution de *HgCl<sub>2</sub>* à 0.01%
- Homogénéiser et centrifuger pendant 3 mn à 2500 tr/mn
- Eliminer le surnageant par aspiration, remplacer par de *l'eau stérile*
- Homogénéiser et centrifuger pendant 3 mn à 2500 tr/mn
- Eliminer le surnageant par aspiration et remplacer par une solution de *Dihydrostreptomycine* à 0.2%
- Homogénéiser et centrifuger pendant 3 mn à 2500 tr/mn
- Eliminer le surnageant par aspiration, remplacer par de *l'eau stérile* (vérifier la vitalité des nématodes à la loupe binoculaire)
- Homogénéiser et centrifuger pendant 3 mn à 2500 tr/mn
- Réduire le volume pour avoir une suspension épaisse de nématodes
- Inoculer cette suspension en plusieurs gouttes sur les rondelles de carottes d'un ou plusieurs flacon(s) sain(s) .
- Placer à 27°C après avoir identifié le flacon (population, date, n°).



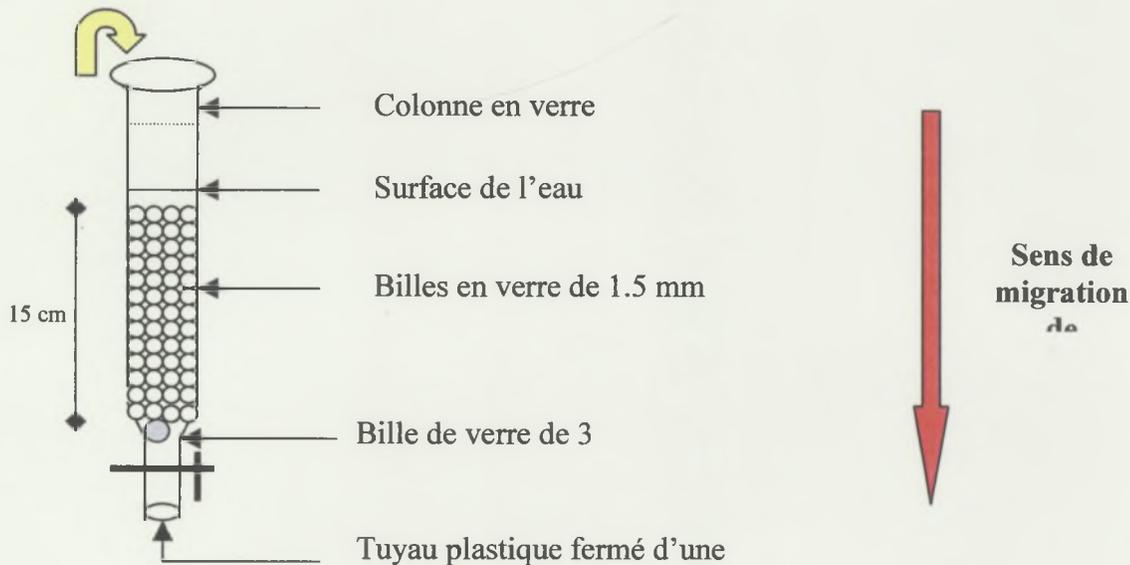
#### Référence :

Adapté par Boisseau, M., et Sarah, J.L. d'après O'Bannon, J.H., et Taylor, A.L. 1968, Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. *Phytopathologie* 58 :355, et Boncato, A.A., et Davide, R.G. 1980.

#### d) Obtention de nématodes en masse (stockage, inoculation)

Les nématodes sont récupérés sur les parois des flacons avec de l'eau stérile après 1 à 2 mois d'incubation. L'inoculum est prêt (après calibrage) pour des essais à réaliser sur plants.

Pour des études ADN ou biochimiques il est préférable de procéder de la manière suivante afin de séparer les nématodes (mobiles) des impuretés (morceau de carotte, gélose) : Déposer la suspension (  ) dans le système suivant:



- 24 heures après, récupérer quelques gouttes dans un tube gradué en desserrant la pince
- Ajuster un volume d'eau stérile et procéder au comptage à l'aide d'un microscope et d'une lame de comptage
- Laisser déposer
- Eliminer le surnageant par aspiration transvaser la suspension dans un microtube *Treff* de 1.5 ml
- Laisser déposer
- Eliminer le maximum d'eau par aspiration
- Noter le tube (population, quantité de nématode, date)
- Placer le tube à  $-80^{\circ}\text{C}$

Remarque : il est également possible d'obtenir un grand nombre de nématodes en procédant à une extraction active des nématodes présents à l'intérieur des rondelles de carottes et en purifiant la suspension avec le système (colonne de verre) décrit plus haut.

## ANNEXE 3

### Extraction des nématodes endoparasites d'un échantillon de racines

#### Matériels

- Centrifugeuse avec godets de 250 ml minimum.
- Mixer de cuisine à bol
- Vibromélangeur ø2cm.
- Batterie de tamis: 250µm, 80µm, 50µm, 32µm.
- Balance d'équilibrage.
- Planche à découper
- Grand couteau.
- Scalpel
- Passoire.
- Bêchers
- Tubes à essai gradués 50ml



#### Produits utilisés

Kaolin (argile concassé qui sert à contenir les débris végétaux et les nématodes pendant les centrifugations)

Solution de sulfate de magnésium ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), de densité ~1.15

#### Procédure

- Mettre les racines dans une passoire fine et les laver à l'eau (jet assez puissant) pour les débarrasser de la terre.
- Sur une planche, découper les racines en petits morceaux (1cm environ).
- Remettre les racines découpées dans la passoire, et relaver à l'eau courante pour éliminer toute la terre (attention de ne perdre aucune racines).
- Bien homogénéiser le lot de racines, afin d'en prélever une partie représentative.
- Identifier par une étiquette le lot de racines.
- Dans un bécher peser les racines (50 g)
- Mettre ces racines dans un mixer et ajouter 200 ml d'eau.
- Broyer les racines à la vitesse maximum (**2 fois 10 secondes**) avec un intervalle de **5 secondes** entre les 2 broyages.

- Verser ce broyat sur une batterie de tamis (de bas en haut: 32  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ .) préalablement mouillés).
- Bien rincer le mixer au-dessus des tamis pour récupérer le maximum de nématodes.
- Laver ( jet relativement puissant), sans éclabousser, le contenu du tamis 250 $\mu$ , avec un volume d'eau d'environ un 3/4 de seau, puis jeter le refus de ce tamis.
- Laver au dessus du tamis 50  $\mu\text{m}$  ( jet très faible), le contenu du tamis 80 $\mu\text{m}$ , par dessus et par dessous en l'inclinant un peu, afin de faire descendre doucement le refus vers le bas.
- Récupérer le contenu du tamis 80 $\mu\text{m}$  dans un godet à centrifuger à l'aide d'une pissette d'eau tenue à distance (jet puissant ).
- Laver et récupérer le contenu des tamis 50 $\mu\text{m}$  et 32 $\mu\text{m}$  de la même façon que le tamis 80 $\mu\text{m}$ .
- Dans le godet à centrifuger (250 ml) ajouter 2 cuillères à café de kaolin.
- Mettre en suspension à l'aide du vibromélangeur ( $\varnothing$  2cm).
- Equilibrer précisément avec de l'eau distillée les godets 2 à 2 sur la balance.
- Centrifuger à 3000 trs/minute pendant 5 minutes
- Jeter le surnageant (eau).
  
- Remplir jusqu'à ~200ml avec du *sulfate de magnésium* ( densité: 1.15 à 1.18)
- A partir de ce moment, opérer rapidement car les nématodes supportent mal la pression osmotique du sulfate de magnésium.
- Remettre le culot en suspension avec le vibromélangeur.
- Equilibrer précisément les godets avec du sulfate de magnésium 2 à 2 sur la balance
- Centrifuger à 3000 trs/minute pendant 5 minutes.
- Verser le surnageant sur un tamis de 5 $\mu\text{m}$  préalablement mouillé.
- Laver doucement (jet d'eau très faible) par dessus et par dessous ce tamis de 5 $\mu\text{m}$  légèrement incliné pour rassembler le refus.
- Récupérer le contenu du tamis dans un tube gradué de 50 ml à l'aide d'une pissette d'eau.
- Procéder au comptage.

## ANNEXE 4

### Protocole de la focalisation isoélectrique pour les estérases

#### a) Préparation des échantillons

Un volume de 15 $\mu$ de la solution d'extraction est versé dans des tubes eppendorf de 0,2mL. 5000 nématodes sont déposés dans chaque tubes. Les extrait sont conservés au congélateur(-20°C) ou à (-80°C).

A la sortie du congélateur, les tubes sont placés dans de la glace pilé pour broyer les nématodes à l'aide d'un pilon

Dans les tubes est rajouté un tampon d'extraction(pour estérase) qui aura été préparé préalablement de la manière suivante :

Pour 100mL de volume final :

concentration	produit
20%	Glycérol ou Saccharose
2%	Triton X 100
0,01%	Bleu de Bromophénol

La solution est filtrée dans des flacons stériles.

Les tubes contenant les nématodes ainsi que la solution d'extraction sont mis à centrifuger à 4°C pendant 15 minutes à 9500 tours(la centrifugeuse est préparée 15 minutes avant la manipulation à 4°C).

#### b) Préparation de l'appareil réfrigérant de la plaque

La cuve réfrigérante est remplie avec de l'eau distillée tout en prenant soin de bien immergé les résistances. Elle est programmée à 4°C 20 minutes avant son utilisation (le temps quelle soit à la température souhaité) et durant toute la manipulation.

#### c) Protocole de migration

L'appareil utilisé est le « Multiphor II »

- 1mL de pétrole(ou kerdane, kérosène) est étalé sur la plaque de marbre
- Le gel d'acrylamide est sorti de son emballage(conservation à 4°C) et il est déposé sur la plaque face rigide plastique en contact avec celle ci.
- Les mèches sont imbibées avec le tampon correspondant ; pour un gel de type Ampholine gamme pH 3,5-9,5 :

Cathode(-) en haut : 1M NaOH (2g pour 50mL H<sub>2</sub>O)

Anode(+) en bas : 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3,571g pour 50mL H<sub>2</sub>O)

- La mèche « cathode » est délicatement déposée en haut du gel et la mèche « anode » en bas du gel.
- La bande applicatrice des échantillons est placée à environ 1 cm du haut du gel.
- La plaque de verre supportant les électrodes est mise en position haute et superpose les électrodes aux mèches
- La plaque de verre est retirée.
- Les échantillons sont déposés (le surnageant (13µ) des extraits a été prélevé)
- La plaque de verre est remise en position basse et il faut vérifier que les électrodes sont en contact avec les mèches.
- Les électrodes sont branchées .
- Le couvercle est mis et le générateur est branché.
- Le générateur est réglé pour le gel ampholine pH 3,5-9,5 ; 1500Volts, 50Ma ; 30Watts ; pour 1h30 de migration.
- En fin de migration le générateur doit être stoppé avant d'ôter le couvercle.
- Les mèches de tampons sont retirées délicatement ainsi que la bande applicatrice du gel.

#### d) Coloration spécifique du système enzymatique des estérases

Pour un volume final de 200mL de solution de tampon de révélation ou tampon phosphate pH7,2

Nom	Produit	Concentration (en M)	Volume (en mL)
Solution A	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	28
Solution B	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2	72

- Le fast blue RR(120mg) ; qui est un colorant ; est ajouté à la solution du tampon de révélation. La solution obtenue est homogénéisée et filtrée.
- 80mg de naphtyl acétate (à 1%) ; qui est un colorant ; est dissous dans 10 mL d'acétone dans l'obscurité.
- Les 2 solutions obtenues sont mélangées pour obtenir la solution de révélation.  
La révélation des estérases se fait après avoir baigné dans la solution de révélation durant 1h à 37°C.
- Le gel est plongé dans une solution d'acide acétique à 7% pour la fixation des bandes.

## ANNEXE 5

traitements	gpe	poids racines	poids PA	chlorophylle	aire	lnem / gMF	log nem
H2O	1	11,90	-4,04	-0,29	47,91	-12,33	-1,33
H2O	1	3,90	23,96	1,51	125,89	-12,34	-1,35
H2O	1	9,90	-7,04	0,11	21,63	-12,34	-1,35
H2O	1	13,90	-3,04	-0,29	14,36	-12,34	-1,35
H2O	1	13,90	11,96	-0,39	18,85	-12,34	-1,35
H2O	1	12,90	3,96	1,01	25,31	-12,34	-1,35
H2O	1	11,90	22,96	5,91	156,64	-12,34	-1,35
H2O	1	8,90	2,96	2,11	57,49	-12,34	-1,35
H2O	1	17,74	20,48	1,47	75,84	-217,13	-2,43
H2O	1	16,55	13,68	3,17	61,41	-217,23	-2,66
H2O	1	9,21	23,02	3,87	61,12	-216,99	-2,29
H2O	1	12,55	-8,19	3,27	76,36	-217,23	-2,66
H2O	1	21,12	7,46	3,97	18,60	-217,23	-2,66
H2O	1	14,63	11,53	4,77	55,84	-217,12	-2,43
H2O	1	6,74	21,63	5,07	60,42	-216,98	-2,29
H2O	1	15,54	-0,98	4,57	56,70	-217,23	-2,66
H2O	1	7,67	17,93	3,97	100,73	-217,23	-2,66
H2O	1	13,14	23,96	3,17	36,12	-217,12	-2,43
H2O	1	4,05	-10,19	2,91	4,85	-126,43	-1,99
H2O	1	16,55	-10,59	6,91	-1,89	-126,43	-1,99
H2O	1	5,05	4,01	6,41	-18,66	-126,24	-1,69
H2O	1	8,28	1,81	7,71	45,97	-126,43	-1,99
H2O	1	23,05	-3,24	3,11	15,22	-126,43	-1,99
H2O	1	11,46	-1,73	5,81	61,73	-126,43	-1,99
H2O	1	17,05	-12,81	4,91	31,50	-126,20	-1,59
H2O	1	3,58	-7,19	5,71	14,96	-126,43	-1,99
GTM 01	2	0,90	-3,04	0,31	26,83	-12,34	-1,35
GTM 01	2	7,90	18,96	-0,99	-10,10	-12,29	-1,24
GTM 01	2	1,40	-3,54	1,31	17,88	-12,30	-1,29
GTM 01	2	19,90	9,96	1,91	-28,21	-12,23	-1,11
GTM 01	2	4,90	-7,04	-1,09	-11,87	-12,28	-1,24
GTM 01	2	6,90	-5,04	-3,99	-13,79	-12,29	-1,26
GTM 01	2	5,90	26,96	-0,59	39,27	-12,32	-1,31
GTM 01	2	7,90	1,96	-0,29	12,60	-12,34	-1,35
GTM 01	2	11,59	-9,32	-0,59	22,29	-126,06	-1,48
GTM 01	2	1,54	4,40	0,61	27,33	-125,72	-1,33
GTM 01	2	2,21	-10,61	0,71	-15,65	-126,03	-1,51
GTM 01	2	1,24	-25,36	-1,59	-42,58	-125,94	-1,46
GTM 01	2	-0,34	-10,32	-2,69	-34,29	-125,00	-1,09
GTM 01	2	-1,07	4,81	-1,39	19,90	-125,41	-1,22
GTM 01	2	6,22	10,05	-3,09	-20,08	-126,19	-1,62
GTM 01	2	4,24	17,19	-2,69	9,52	-125,87	-1,39
GTM 02	3	4,90	-3,04	1,31	119,09	-12,30	-1,27
GTM 02	3	12,90	18,96	-3,09	34,12	-12,32	-1,31
GTM 02	3	13,90	-3,54	-0,39	6,76	-12,29	-1,23
GTM 02	3	10,90	9,96	-0,99	-14,77	-12,28	-1,24
GTM 02	3	2,90	-7,04	0,21	42,13	-12,33	-1,33
GTM 02	3	7,40	-5,04	-2,89	27,56	-12,34	-1,35
GTM 02	3	10,90	26,96	-9,29	-15,55	-12,34	-1,35
GTM 02	3	8,90	1,96	-1,29	8,99	-12,33	-1,33
GTM 02	3	1,15	-9,86	0,21	35,60	-121,68	-0,60
GTM 02	3	0,05	-28,44	0,21	35,17	-118,40	-0,39
GTM 02	3	2,82	-24,19	-1,09	52,00	-121,94	-0,61
GTM 02	3	16,52	-1,74	-1,39	11,60	-121,34	-0,46
GTM 02	3	11,98	22,03	-3,79	30,33	-117,92	-0,27
GTM 02	3	4,05	6,25	-3,59	-18,55	-114,59	-0,19
GTM 02	3	2,24	-11,53	-1,59	31,17	-107,17	0,00
GTM 02	3	5,72	-5,07	-0,29	8,76	-122,47	-0,64
GLP 02	4	-3,10	-23,04	-4,29	-51,25	-7,15	0,02
GLP 02	4	0,90	-6,04	-8,89	-28,85	-4,65	0,22
GLP 02	4	-10,10	4,96	-6,59	-10,76	-5,90	0,03
GLP 02	4	3,40	8,96	-5,39	-4,83	-7,83	0,02
GLP 02	4	-1,10	-6,04	-7,69	-34,14	-5,88	0,13
GLP 02	4	2,90	25,96	-4,59	25,25	-8,63	-0,07
GLP 02	4	-3,10	-11,04	-9,89	-16,53	1,05	0,42
GLP 02	4	2,90	16,96	-4,59	13,51	-6,83	0,10
GLP 02	4	-2,49	7,53	-2,63	29,25	-30,70	0,26
GLP 02	4	1,84	-7,66	2,07	-22,87	-50,19	0,25
GLP 02	4	-1,36	-6,86	2,67	-32,41	77,73	0,47
GLP 02	4	-3,64	-8,03	-0,73	-42,86	49,06	0,40
GLP 02	4	6,26	-25,08	0,27	-27,43	-52,81	0,28
GLP 02	4	1,27	0,32	1,27	30,85	-56,29	0,23
GLP 02	4	-0,82	-11,09	2,57	55,47	-13,42	0,31
GLP 02	4	-0,96	-0,47	-3,93	-35,57	166,00	0,59
GLP 02	4	3,43	-11,38	-1,53	-33,05	76,47	0,51
GLP 02	4	-6,72	12,63	1,97	53,20	-20,91	0,24
GLP 02	4	2,73	-10,74	-1,19	-27,52	-56,98	0,56
GLP 02	4	1,32	-10,09	0,11	-12,40	-56,61	0,55
GLP 02	4	9,50	-9,10	-0,89	29,07	-89,53	0,34
GLP 02	4	9,29	18,71	-2,09	-15,65	-109,31	0,01
GLP 02	4	3,59	0,69	-2,69	-3,66	-88,79	0,30
GLP 02	4	6,25	6,81	-0,29	18,83	-97,65	0,21
GLP 02	4	7,71	18,72	-0,49	-8,74	-81,16	0,42
GLP 03	5	-13,10	-3,54	-1,99	11,46	8,32	0,49
GLP 03	5	5,40	-5,54	-0,49	-23,88	-5,97	0,18
GLP 03	5	-3,60	29,96	1,51	75,73	28,24	0,89
GLP 03	5	-13,10	7,96	2,41	83,91	12,23	0,57
GLP 03	5	-2,10	12,96	-1,19	5,38	-2,60	0,29
GLP 03	5	-10,10	-13,04	-1,59	-17,48	80,62	1,18


  
 Rapport-gta.com
   
 LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

GLP 03	5	5,90	-25,04	1,41	-4,02	-2,25	0,38
GLP 03	5	2,90	-8,04	-0,79	-25,35	18,66	0,84
GLP 03	5	-10,12	-8,86	0,37	-17,66	424,11	0,71
GLP 03	5	-6,08	0,04	-6,63	-18,71	324,01	0,68
GLP 03	5	-3,31	6,63	-3,23	-29,07	149,02	0,54
GLP 03	5	-4,23	-1,94	-0,13	-61,41	-33,67	0,23
GLP 03	5	-1,62	-5,86	2,37	-50,36	-61,09	0,19
GLP 03	5	-13,76	-2,92	-2,53	-44,33	398,65	0,65
GLP 03	5	-7,50	14,14	0,37	-50,80	126,80	0,47
GLP 03	5	-4,64	23,14	2,17	33,72	135,55	0,51
GLP 03	5	-8,10	-42,04	-0,13	-31,23	86,55	0,41
GLP 03	5	-11,95	5,88	0,67	-40,77	343,64	0,63
GLP 03	5	-12,85	7,06	-1,89	27,12	303,77	1,19
GLP 03	5	-7,51	-7,19	1,61	5,96	17,24	0,78
GLP 03	5	-10,15	-12,40	-2,09	-21,48	312,46	1,23
GLP 03	5	-12,49	-2,90	-3,39	-5,25	471,71	1,34
GLP 03	5	-6,18	16,24	0,01	26,35	109,78	1,01
GLP 03	5	-3,36	-10,41	-0,99	-4,62	77,13	0,97
GLP 03	5	-4,98	13,28	-3,49	4,99	141,82	1,08
GLP 03	5	-10,57	10,40	-0,89	-14,92	234,99	1,14
COL 01	6	0,40	-15,04	-6,39	-29,51	-12,27	-1,23
COL 01	6	4,90	-3,04	-3,89	-9,07	-11,94	-0,86
COL 01	6	1,90	4,96	-0,49	13,86	-11,95	-0,90
COL 01	6	7,40	21,96	0,21	5,25	-10,45	-0,30
COL 01	6	5,90	-1,04	-5,49	-16,53	-9,77	-0,19
COL 01	6	1,90	-2,04	-1,19	0,21	-11,39	-0,61
COL 01	6	7,90	-9,04	-1,99	-14,10	-11,65	-0,68
COL 01	6	4,90	-3,04	-0,29	51,75	-12,01	-0,92
COL 01	6	6,61	-0,71	1,57	15,33	-207,06	-0,91
COL 01	6	2,55	-4,16	3,67	-22,15	-210,29	-1,11
COL 01	6	5,27	11,64	0,97	11,06	-212,50	-1,25
COL 01	6	10,84	6,31	3,07	24,30	-204,93	-0,80
COL 01	6	9,45	0,63	-2,43	33,65	-201,85	-0,72
COL 01	6	5,88	16,59	-5,33	57,73	-205,00	-0,84
COL 01	6	8,83	-0,13	-0,33	34,79	-192,39	-0,51
COL 01	6	11,03	-4,11	-3,73	5,94	-186,15	-0,40
COL 01	6	7,55	0,69	3,77	88,89	-207,33	-0,92
COL 01	6	6,55	35,14	3,57	51,15	-211,01	-1,12
COL 01	6	2,33	2,31	3,11	-39,30	-124,54	-0,96
COL 01	6	0,55	-11,19	3,51	37,10	-125,91	-1,44
COL 01	6	1,05	-17,06	2,41	-14,74	-125,38	-1,20
COL 01	6	-2,83	-10,32	2,91	-16,75	-125,99	-1,51
COL 01	6	7,63	21,85	4,51	50,06	-125,59	-1,23
COL 01	6	-2,50	2,58	1,21	-40,42	-126,29	-1,77
COL 01	6	8,50	-0,46	0,31	49,79	-125,87	-1,37
COL 01	6	7,09	-18,91	1,81	-20,98	-126,43	-1,99
IDN	7	0,92	-3,70	0,57	68,93	-178,11	-0,38
IDN	7	7,92	17,53	1,37	39,52	-200,44	-0,69
IDN	7	-0,98	-0,07	-2,13	61,12	-74,06	0,16
IDN	7	5,67	-10,07	-1,43	-27,73	-196,51	-0,62
IDN	7	6,09	-6,72	0,07	-25,89	-188,43	-0,47
IDN	7	5,28	9,80	1,47	27,27	-197,90	-0,65
IDN	7	10,33	15,06	1,77	52,34	-187,82	-0,43
IDN	7	2,09	15,14	0,07	-32,96	-171,50	-0,31
IDN	7	-1,86	39,12	-1,73	-6,66	-146,14	-0,15
IDN	7	-2,32	-4,27	-1,63	-16,65	-142,00	-0,13
VNM 04	8	2,78	-8,28	0,67	-28,70	-74,71	0,19
VNM 04	8	11,80	-8,56	-0,03	-9,44	-173,29	-0,25
VNM 04	8	6,55	-11,07	0,97	69,49	-165,91	-0,22
VNM 04	8	1,94	6,36	0,87	3,03	-156,89	-0,19
VNM 04	8	7,55	-18,20	0,87	50,65	-184,39	-0,40
VNM 04	8	5,55	14,23	-0,33	-20,56	-180,05	-0,37
VNM 04	8	16,80	19,52	1,07	6,38	-171,38	-0,19
VNM 04	8	5,29	-14,51	-0,93	-40,71	-148,17	-0,10
VNM 04	8	10,15	20,07	-0,13	-15,72	-177,66	-0,30
VNM 04	8	2,07	48,41	2,87	100,29	-181,17	-0,41
MTQ 02	9	2,90	-5,04	-5,09	17,96	-10,90	-0,44
MTQ 02	9	11,40	-12,04	-6,19	-1,46	-12,26	-1,19
MTQ 02	9	-8,60	0,96	-9,09	9,75	-9,79	-0,33
MTQ 02	9	5,90	-17,04	-3,69	-43,19	-10,98	-0,44
MTQ 02	9	10,90	13,96	-3,29	31,44	-11,79	-0,73
MTQ 02	9	-2,10	2,96	-4,49	-33,54	-8,61	-0,11
MTQ 02	9	3,90	-14,04	-2,49	-49,91	-8,98	-0,10
MTQ 02	9	12,90	15,96	-5,29	9,96	-11,23	-0,47

## ANNEXE 6

traitements	gpes	poids racines	poids PA	nem / gMF	log nem	hauteur
H20	1	-0,35142857	0,31714286	-19,8499821	-0,52794159	0,12857143
H20	1	-1,55142857	0,01714286	-19,8499821	-0,52794159	0,32857143
H20	1	-0,35142857	0,11714286	-19,8499821	-0,52794159	0,52857143
H20	1	-1,45142857	0,11714286	-19,8499821	-0,52794159	-0,17142857
H20	1	-0,55142857	0,01714286	-19,8499821	-0,52794159	0,02857143
H20	1	-0,52142857	0,40714286	-19,8499821	-0,52794159	0,22857143
H20	1	-0,77142857	0,49714286	-19,8499821	-0,52794159	0,42857143
H20	1	-0,75142857	0,01714286	-19,8499821	-0,52794159	0,22857143
H20	1	0,921	0,181	-17,2595218	-0,54201595	0,19
H20	1	0,291	0,341	-17,2595218	-0,54201595	0,39
H20	1	0,701	-0,179	-17,2595218	-0,54201595	0,19
H20	1	2,011	0,001	-17,2595218	-0,54201595	-0,01
H20	1	0,121	-0,019	-17,2595218	-0,54201595	0,59
H20	1	0,571	-0,049	-17,2595218	-0,54201595	0,09
H20	1	0,461	-0,049	-17,2595218	-0,54201595	-0,11
H20	1	0,781	-0,379	-17,2595218	-0,54201595	0,39
H20	1	0,971	-0,179	-17,2595218	-0,54201595	-0,01
H20	1	1,451	-0,089	-17,2595218	-0,54201595	0,09
H20	1	0,26625	-0,0925	-12,194407	-0,56391297	0,325
H20	1	0,05625	0,1675	-10,7493203	-0,38782171	0,825
H20	1	0,08625	0,0075	-10,7617422	-0,38782171	0,325
H20	1	0,28625	-0,1825	-12,194407	-0,56391297	0,325
H20	1	-0,33375	-0,0525	-8,93707802	-0,26288297	0,725
H20	1	1,25625	0,1575	-12,194407	-0,56391297	0,825
H20	1	0,23625	-0,0625	-12,194407	-0,56391297	0,525
H20	1	0,28625	-0,0725	-12,194407	-0,56391297	0,825
GTM 01	2	-0,45142857	0,03714286	61,1023989	0,72733092	-0,17142857
GTM 01	2	-0,15142857	0,03714286	40,5666846	0,66239011	-0,37142857
GTM 01	2	-0,35142857	0,03714286	125,604563	0,99057235	0,12857143
GTM 01	2	-0,55142857	0,03714286	187,650018	1,10044734	-0,37142857
GTM 01	2	-0,55142857	0,01714286	110,150018	0,90342218	-0,07142857
GTM 01	2	-0,35142857	-0,48285714	71,0591088	0,79427771	-0,37142857
GTM 01	2	0,84857143	0,01714286	46,3264885	0,84312627	-0,37142857
GTM 01	2	-0,55142857	0,01714286	107,650018	0,89530429	-0,37142857
GTM 01	2	-1,40375	-0,1625	147,805593	0,95460097	-0,11
GTM 01	2	-2,26375	-0,2425	290,437172	0,98631538	-0,41
GTM 01	2	-1,65375	-0,1825	444,94845	1,34457205	-0,21
GTM 01	2	-0,97375	0,0075	41,4407096	0,58324787	-0,41
GTM 01	2	-1,57375	-0,0925	71,5942997	0,64916186	-0,51
GTM 01	2	-1,21375	0,0775	64,5179218	0,68650703	-0,51
GTM 01	2	-2,21375	0,1075	504,612316	1,23196705	-0,51
GTM 01	2	-1,45375	-0,0225	383,703029	1,32929378	-0,41
COL 01	6	-1,19142857	0,03714286	50,0029591	0,49324771	0,12857143
COL 01	6	-0,55142857	0,29714286	27,6500179	0,49324771	-0,17142857
COL 01	6	-0,05142857	0,01714286	-11,8499821	-0,05082033	0,02857143
COL 01	6	1,14857143	0,39714286	-17,1472794	-0,22691159	0,02857143
COL 01	6	0,64857143	0,01714286	-16,7249821	-0,22691159	-0,17142857
COL 01	6	0,04857143	-0,78285714	-14,0807513	-0,13000158	0,22857143
COL 01	6	-0,05142857	0,01714286	-17,8499821	-0,35185033	-0,07142857
COL 01	6	0,011	0,301	-8,29091189	-0,0648947	-0,41
COL 01	6	-0,229	-0,049	15,4037948	0,33304531	-0,31
COL 01	6	0,111	0,121	-8,67583076	-0,0648947	-0,11
COL 01	6	0,671	0,381	-1,6885875	0,19834674	-0,01
COL 01	6	-0,219	0,031	-7,25952175	-0,0648947	-0,41
COL 01	6	0,211	-0,099	-2,85622957	0,11119656	0,39
COL 01	6	0,511	-0,129	-15,4280199	-0,36592469	0,49
COL 01	6	0,651	-0,889	-15,5173615	-0,36592469	0,09
COL 01	6	0,071	0,311	-11,4371054	-0,17403917	-0,01
COL 01	6	1,161	0,001	13,509709	0,5148889	0,29
COL 01	6	-0,02375	-0,0025	18,5748238	0,49299188	0,225
COL 01	6	-0,00375	0,1075	-6,60617171	-0,10151497	-0,075
COL 01	6	-0,40375	-0,1825	-5,52774034	-0,08679172	0,025
COL 01	6	-0,15375	-0,1325	-4,80979162	-0,03243405	-0,075
COL 01	6	0,48625	0,0575	-11,1661294	-0,41778493	-0,175
COL 01	6	-0,79375	0,1675	26,1197692	0,47747972	0,025
COL 01	6	0,29625	-0,0825	-8,14035295	-0,16597296	0,025
COL 01	6	-0,40375	0,0675	-7,19440701	-0,16597296	0,025
GLP 02	4	0,971	0,191	17,2232369	0,53716529	0,89
GLP 02	4	-0,219	0,271	117,740478	0,90514208	0,79
GLP 02	4	-0,029	0,311	135,708515	0,99580314	0,29
GLP 02	4	-0,079	0,321	80,8713194	0,80040673	-0,01

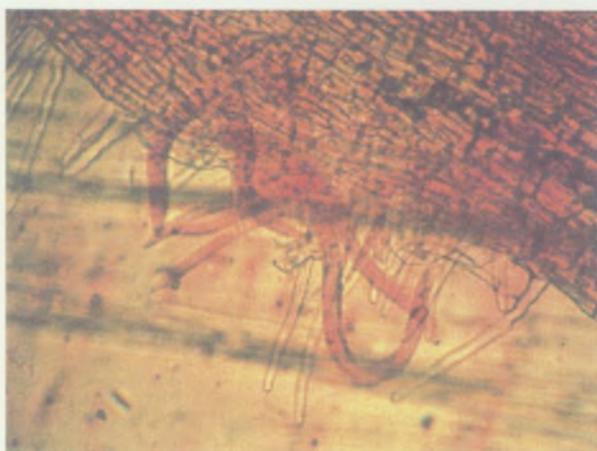
GLP 02	4	1,271	0,071	14,2591029	0,53716529	0,49
GLP 02	4	-0,219	-0,109	95,2404782	0,82905191	0,09
GLP 02	4	-0,029	-0,179	144,840935	1,02027691	0,19
GLP 02	4	-0,219	-0,269	-9,75952175	-0,14407594	0,09
GLP 02	4	0,211	-0,299	-2,85622957	0,11119656	0,59
GLP 02	4	0,071	-0,419	81,7215554	0,83212114	0,69
GLP 02	4	-1,11375	-0,4225	86,7866701	0,81022412	0,325
GLP 02	4	-0,63375	-0,1225	47,1317061	0,67746746	0,025
GLP 02	4	-0,80375	-0,0925	49,3440545	0,66653595	-0,175
GLP 02	4	-1,40375	-0,3125	127,805593	0,89848503	0,725
GLP 02	4	-1,24375	0,1775	155,706828	1,00740758	0,325
GLP 02	4	-0,32375	0,0075	28,3900086	0,5664208	0,025
GLP 02	4	-0,91375	0,0175	52,0626211	0,66653595	0,325
GLP 02	4	-0,80375	-0,5325	66,6517468	0,76852549	0,725
GLP 03	5	-1,329	0,381	111,953961	0,55489406	-0,21
GLP 03	5	-0,949	0,821	92,9766987	0,63407531	-0,01
GLP 03	5	-1,219	0,251	147,740478	0,7010221	0,49
GLP 03	5	-1,359	0,151	174,600943	0,7010221	0,79
GLP 03	5	-0,929	0,361	99,019548	0,66210403	-0,01
GLP 03	5	-0,839	-0,179	26,2187391	0,30308209	0,69
GLP 03	5	-0,959	0,011	81,9468275	0,58831782	-0,01
GLP 03	5	-1,019	0,671	74,4071449	0,53716529	-0,21
GLP 03	5	-1,659	0,261	116,66905	0,38740297	-0,01
GLP 03	5	1,781	-0,549	-6,25952175	0,19037781	0,39
GLP 03	5	0,59625	-0,5525	-1,19440701	0,16848079	0,125
GLP 03	5	0,12625	-0,2825	3,85847307	0,25999577	0,125
GLP 03	5	0,06625	-0,1825	44,0015584	0,74784089	0,425
GLP 03	5	-0,85375	0,0475	47,2827172	0,64470751	0,125
GLP 03	5	-1,30375	0,0475	71,4563866	0,70482097	0,325
GLP 03	5	-1,40375	0,0475	225,305593	1,12182877	0,525
GLP 03	5	-1,41375	0,0175	98,3583568	0,79781487	0,525
GLP 03	5	-1,52375	-0,1825	180,713394	1,00740758	-0,175
VNM 04	7	-0,989	0,171	59,9762506	0,47917335	-0,01
VNM 04	7	-1,099	-0,009	18,454764	0,15695405	-0,01
VNM 04	7	-0,499	-0,049	-5,63161477	-0,0648947	-0,31
VNM 04	7	-0,769	-0,029	20,6715127	0,2708974	0,09
VNM 04	7	-1,069	-0,069	100,131783	0,61935205	-0,01
VNM 04	7	-0,659	-0,229	14,7917603	0,2361353	-0,11
VNM 04	7	-0,269	0,011	-3,58430808	0,02225548	-0,41
VNM 04	7	-0,929	-0,119	2,12032321	0,00205209	-0,01
VNM 04	7	-0,749	0,081	-3,65407957	-0,0648947	-0,01
VNM 04	7	-1,219	0,801	492,740478	1,17398739	-0,01
IDN	8	-1,589	0,201	863,692859	1,21003249	0,09
IDN	8	-1,949	0,191	1260,51826	1,0082124	0,49
IDN	8	-1,649	0,771	991,512408	1,22513991	0,19
IDN	8	-1,649	0,371	745,898373	1,10634406	0,09
IDN	8	-1,899	-0,179	1467,11548	1,14372579	0,19
IDN	8	-1,609	-0,009	343,396216	0,81971188	-0,01
IDN	8	-1,649	-0,049	324,845741	0,76973791	0,39
IDN	8	-1,679	-0,029	1260,51826	1,30308209	0,59
IDN	8	-1,689	-0,179	567,646139	0,96313402	-0,01
IDN	8	0,781	0,701	41,0738116	0,72515577	0,29
GTM 02	3	-0,40375	0,6975	46,1389263	0,70325876	-0,375
GTM 02	3	-1,22375	0,0675	159,823942	1,02154776	-0,475
GTM 02	3	-1,78375	-0,1825	236,159502	1,05133548	-0,075
GTM 02	3	-1,21375	-0,1825	138,794939	0,96841667	0,025
GTM 02	3	-1,02375	-0,0925	94,24817	0,85659287	0,025
GTM 02	3	-0,72375	0,1075	59,447384	0,7414384	0,225
GTM 02	3	-1,67375	-0,0225	141,562818	0,87699611	0,025
GTM 02	3	-1,51375	-0,1825	120,080725	0,85106038	-0,175

## ANNEXE 7

### Etude préliminaire de la pénétration de deux isolats de *P. coffea* sur bananiers et caféiers

Les résultats observés sont des photos numériques des lames histologiques sous microscope optique. Deux types de coupe histologique ont été réalisées : une coupe longitudinale permettant de localiser les nématodes sur la totalité de la partie racinaire, et une coupe radiale mettant en évidence la localisation intra-tissulaire des nématodes dans les racines. Dans une première partie seront présentés les résultats concernant la population de Martinique (MTQ 03) issue de bananiers et dans une seconde, ceux de la population de Guatemala (GTM 01) prélevés sur caféiers.

#### a) la population de *Pratylenchus coffea* spp : MTQ 03

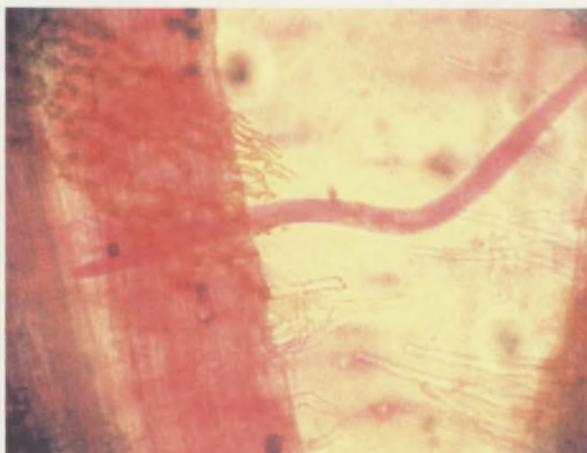


#### MTQ 03 sur bananier :

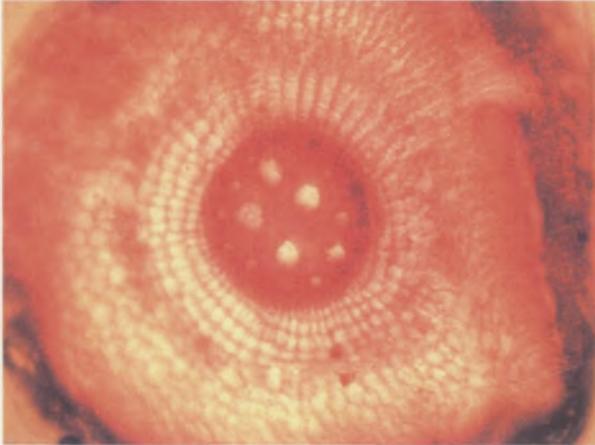
Sur cette photo nous pouvons constater que certains nématodes ont pénétré dans le parenchyme cortical (cf. Annexe 4). De plus, il a été observé un assez grand nombre de nématodes traduisant une forte pénétration à l'intérieur des tissus végétaux. Ces observations confirment que le bananier est l'hôte naturel de cette population.

#### MTQ 03 sur caféier :

Cette photo nous montre un nématode pénétrant dans le parenchyme cortical du caféier et s'arrêtant au niveau du cylindre central (cf. Annexe 4). Cette observation nous apprend que la population de nématodes peut affecter un autre hôte qu'est le caféier. D'autre part, ces résultats confirment une hypothèse que les nématodes ne peuvent pas pénétrer dans le cylindre central, l'endoderme jouant le rôle de barrière naturelle.



## b) la population de *Pratylenchus coffeae* spp : GTM 01



### GTM 01 sur bananier :

Cette photo représente une coupe radiale de racine de bananier dans laquelle aucun nématode n'a pénétré. Ces résultats sont cohérents puisque cette population de *Pratylenchus* est issue de racines de caféiers. Il est possible de poser l'hypothèse que les nématodes ne sont pas capables de se nourrir de ce type de tissu végétal.

### GTM 01 sur caféier :

Sur cette photo, nous pouvons observer un nématode qui a la tête dans l'épiderme de la racine traduisant la pénétration en cours du nématode. D'autres coupes ont révélées la présence de nématodes dans les tissus du parenchyme cortical. Les résultats observés confirment que le caféier est l'hôte de cette population.



### Conclusion :

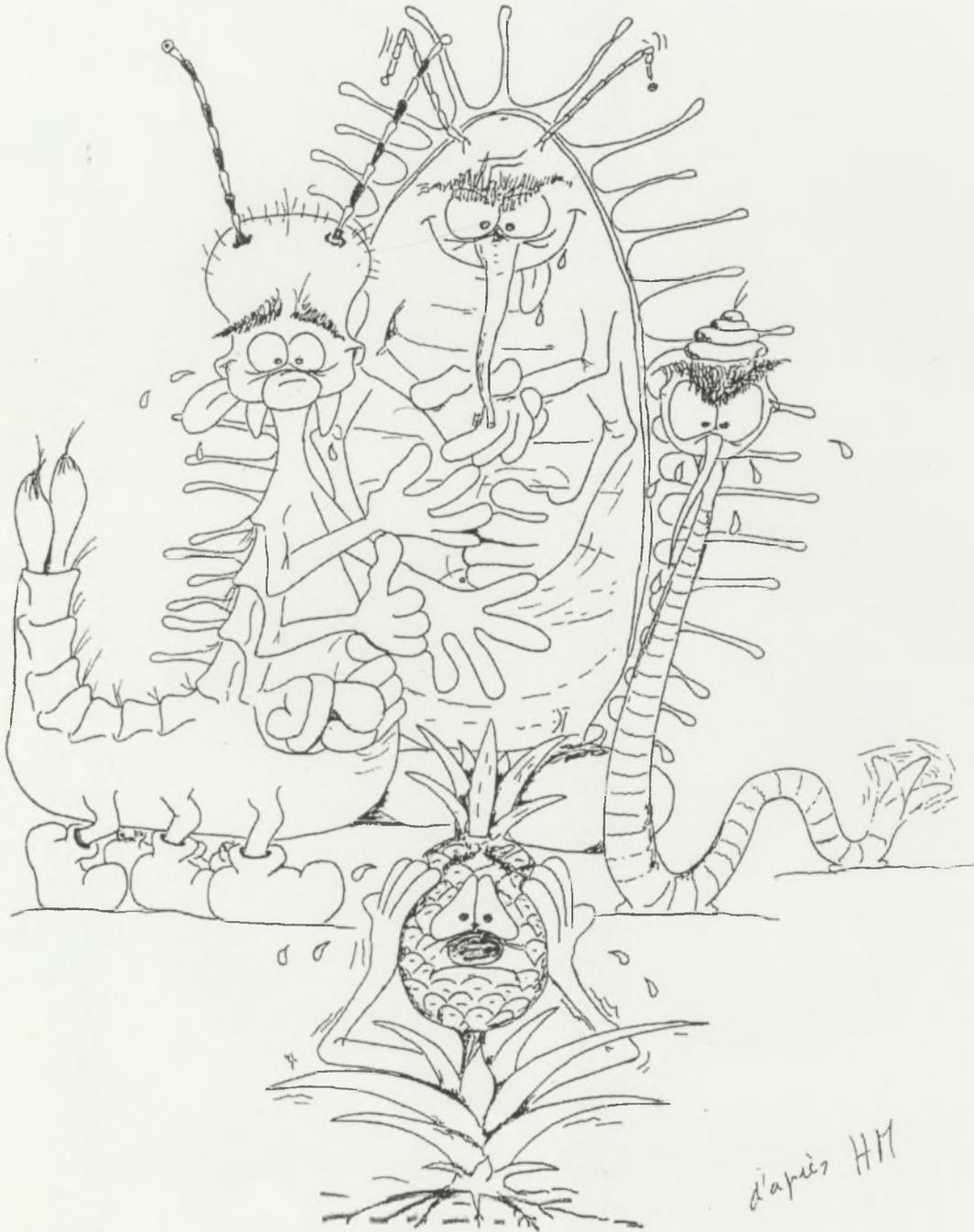
D'après ces résultats, nous avons pu observer la localisation des nématodes dans les différents tissus racinaires. Un résultat inattendu a été mis en évidence par cette coloration : la population de *Pratylenchus* MTQ 03, issue de bananiers, a pu affecter les caféiers en plus de son hôte, le bananier. Il est alors possible d'en déduire un fort pouvoir pathogène de cette population. D'autre part, nous pouvons constater que, pour la population GTM 01 sur bananier, il n'y a pas eu pénétration de nématodes : le bananier n'étant pas son hôte.

# ANNEXE 8

## ISOLATS

BUENA VISTA	MOCA	CHITALON	CHAMTACA		
<b>Observations au microscope électronique à balayage</b>					
<p><b>Groupe II</b> de Corbett &amp; Clark (1983) selon le 1<sup>er</sup> anneau céphalique des femelles. (configuration du 1<sup>er</sup> anneau céphalique des mâles différente de celle des femelles) = <i>P. gutierrezii</i> ; <i>P. pseudocoffeae</i></p> <p>Phénotype majeur des queues de femelles conoïde à extrémité distale pointue ou finement arrondie MAIS grande variabilité</p>		<p><b>Groupe I</b> de Corbett &amp; Clark (1983) selon le 1<sup>er</sup> anneau céphalique des femelles. (configuration du 1<sup>er</sup> anneau céphalique des mâles semble identique à celui des femelles) = <i>P. coffeae</i> ; <i>P. loosi</i></p> <p>Phénotype majeur des queues de femelles cylindrique à extrémité distale tronquée ou largement arrondie MAIS grande variabilité</p>			
Hervé (1996)		<b>Capacité reproductive sur rondelles de carottes <i>in vitro</i> :</b>			
faible Optimum thermique : 24-27°C		forte Optimum thermique : 27-30°C = <i>P. coffeae</i>			
<b>Analyse factorielle Discriminante sur les caractères morphométriques</b>					
G1		<p>G2</p> <p><math>D1 = D2 = D3 \neq 0</math></p> <p>D3</p>	G3		
<b>Croisements entre isolats (reproduction amphimictique obligatoire)</b>					
I1		<p>I2</p> <p>*</p> <p>?</p>	I3		
<b>Capacité parasitaire sur <i>C. arabica</i></b>					
Intermédiaire :		Forte :		Faible :	
Dynamique de pénétration intermédiaire		Dynamique de pénétration rapide		Dynamique de pénétration lente	
Capacité reproductive intermédiaire		Capacité reproductive intermédiaire		Capacité reproductive intermédiaire	

**Tableau 4.1.** Tableau synoptique résumant la diversité morphologique et biologique observée entre quatre isolats de *Pratylenchus*.



d'après HM

## RESUMÉ

La caractérisation précise des nématodes, au même titre que les divers pathogènes ou parasites des plantes, est un enjeu majeur pour le développement de stratégies de lutte efficaces et durables. Des études récentes ont montré que l'appellation *Pratylenchus coffeae*, responsables de dommages majeurs sur bananiers et caféiers de la zone néotropicale, regroupait en fait un complexe d'espèces très difficiles à distinguer par les outils classiques de la taxinomie.

Des études ont donc été entreprises sur un certain nombre d'isolats de *Pratylenchus* spp. prélevés sur ces deux cultures, afin de préciser leur pouvoir pathogène et d'essayer de définir des outils de caractérisation aussi précis que possible.

Une approche biochimique a été effectuée en mesurant la diversité des estérases par la technique d'isofocalisation. Cette étude a permis de révéler une importante diversité entre les isolats mais reste encore à ce stade, insuffisante pour élucider leur statut taxinomique.

Les études *in planta* réalisées ont permis de confirmer une forte corrélation négative entre le développement des populations de nématodes dans les racines (agressivité) et les dommages évalués par le poids des racines, aussi bien sur bananier que sur caféier. Le taux de chlorophylle dans les feuilles de bananier est également négativement corrélé au niveau de populations de nématodes observés. En revanche ce paramètre n'a pu être pris en compte pour les caféiers, les plants, trop jeunes, ne présentant pas un niveau suffisant de pigments chlorophylliens.

Les isolats étudiés montrent une gamme étendue d'agressivité et, donc, de dommages sur les plantes étudiées. De plus, les isolats prélevés sur caféiers se révèlent inaptes à se développer sur bananiers à la différence de ceux prélevés sur bananiers capables de se développer sur caféiers. Ce dernier résultat remet en cause le recours à des cultures intercalaires de bananiers et de caféiers préconisées dans certains pays. L'isolat prélevé sur bananier plantain n'a pu se développer ni sur bananier Cavendish ni sur caféier.

Tous ces résultats confirment l'importante diversité entre les divers isolats de *Pratylenchus* spp. étudiés, et donc la complexité des peuplements traditionnellement regroupés sous l'appellation *P. coffeae*. Cela renforce donc la nécessité de mettre au point des outils permettant de clarifier ce complexe spécifique et d'adapter les méthodes de lutte.

Parmi celles-ci la résistance variétale pourrait jouer un rôle majeur. Les tests préliminaires concernant le criblage de matériels de *Coffea canephora*, déjà connu pour ses nombreuses résistances, débouchent sur la mise en évidence d'une variété résistante aux nématodes du complexe *P. coffeae*. Cette variété appartient au sous groupe SG2 du groupe « congolais ». Or, suite à des observations de robustesse, ce groupe est depuis longtemps utilisé comme porte-greffe dans de nombreux pays. Peu d'études ayant lieu sur la résistance de ce matériel végétal, il semble désormais nécessaire de privilégier cette voie dans le but de trouver des moyens de lutte efficace et contrer ainsi les ravages générés par ce type de parasites.

## ABSTRACT

The specific characterization of nematodes, like all other plant pests, is a major stake to develop efficient and durable control strategies. Recent studies showed that *P. coffeae*, causing important damages on banana and coffee plants in the neotropical region, in fact regrouped a specie complex very difficult to identify by classical taxonomy tools.

Studies have been undertaken on some isolates of *Pratylenchus* spp. taken on these two crops, to precise their pathogenicity and try to define some characterization tools as accurate as possible.

A biochemical approach has been undertaken by the study of esterase diversity with the isoelectric focusing technique. This study has allowed to reveal an important diversity between isolates but still stay insufficient at this steps to clarify their taxonomic status.

Studies *in planta* confirmed an important negative correlation between the nematode population development in roots (agressivity) and the amount damage (roots weight), on banana as well as coffee plant. Chlorophyll rate in banana leaves was also negatively correlated to the nematode number. On the other hand, this parameter was not considered on coffee plant, the plantlets, too young, presenting not sufficient chlorophyllian pigments.

Isolates showed a large range of agressivity, and therefore, damage on studied plants. Moreover, the isolates taken on coffee plant were not able to develop on banana plant. In contrast, isolates taken on banana plant were able to develop on coffee plant. This result is not in agreement with the use of banana and coffee plant as intercrop on some countries. Isolates take on plantain were not able to develop neither on banana nor coffee plant.

All results confirmed the important diversity between all *Pratylenchus* isolates. These data also showed the complexity of traditional populations regrouped under the name *P. coffeae*. They supported the necessity to find accurate tools to clarify this specific complex and to adapt pest control.

Among those, the varietal resistance could play a major part. Preliminary tests on *Coffea canephora* material screening, already know for these numerous resistances, outlet on the demonstration of a variety which were resistant to the complex "*P. coffeae*". This variety belongs to the subgroup SG2 in the "Congolais" group. However, following hardiness observations on this plant, this group is since a long time used like rootstock in many countries. Few studies have been carried out on the resistance of this plant material. It now appears necessary to encourage this way to find some efficient control strategie against this parasitic complex.