

T D M
TRAVAUX ET DOCUMENTS
MICROFICHES

N° 108

F2

**ÉTUDE DES RELATIONS
NUTRITIONNELLES
DE LA COCHENILLE DU MANIOC
AVEC SA PLANTE-HÔTE**

Paul-André
CALATAYUD

ORSTOM
Éditions

THESE

présentée

DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

SPECIALITE : ANALYSE ET MODELISATION DES SYSTEMES
BIOLOGIQUES

PAR

CALATAYUD Paul-André

(DEA d'analyse et modélisation des systèmes biologiques)

ETUDE DES RELATIONS NUTRITIONNELLES DE LA COCHENILLE DU
MANIOC AVEC SA PLANTE HOTE

Soutenue le 13 Mai 1993 devant la commission d'examen

30 MARS 1994

JURY

MM.

J.M. LEGAY
G. FABRES
E. THIBOUT
B. LE RÜ
P. NARDON
Y. RAHBE

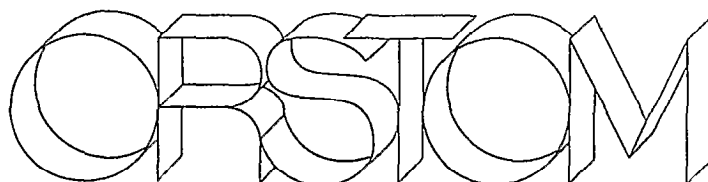
(Président)
(Rapporteur)
(Rapporteur)

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 39194 ex 1

Cpte : A

TDM 108



Editions de l'ORSTOM

L'INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

Collection :

Travaux et Documents Microédités

PARIS 1994

ISBN : 2-7099-1180-9

© ORSTOM

F 2

«La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2
« et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions
« strictement réservées à l'usage privé du copiste et non des-
« tinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les
« analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et
« d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale,
« ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses
« ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé
« que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par
« les articles 425 et suivants du Code pénal.»

*"Homme,
tu te lèveras tous les matins
pour aller guetter la naissance
d'un nouveau jour
tu regarderas l'aube, l'étoile
et tu boiras la rosée, eau pure
du commencement des mondes.*

*Peut-être surprendras-tu ainsi
l'espace d'un instant
d'une brisure
l'éclat primitif
du feu des origines."*

Emmanuel DONGALA (1941-Congo).

A mes parents

*Je vous dédie cette thèse en remerciement pour tout
l'intérêt que vous y avez porté et pour vos
encouragements permanents*

*Qu'elle soit la preuve de ma reconnaissance et de ma
profonde affection*

A ma soeur

A mon amie

A ma famille

A mes amis

En témoignage de mon attachement

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

Directeur : J.ROCHAT

Professeurs :

| | |
|-------------------|--------------------------------------------|
| S.AUDISIO | PHYSICOCHEMIE INDUSTRIELLE |
| J.C.BABOUX | TRAIT. SIGNAL ULTRASONS |
| J.BAHUAUD | MECANIQUE DES SOLIDES |
| B.BALLAND | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| G.BAYADA | CENTRE DE MATHEMATIQUES |
| C.BERGER (Melle) | PHYSIQUE INDUSTRIELLE |
| M.BETEMPS | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| C.BOISSON | VIBRATIONS ACOUSTIQUES |
| M.BOIVIN | MECANIQUE DES SOLIDES |
| H.BOTTA | GENIE CIVIL ET URBANISME (METHODES) |
| G.BOULAYE | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| J.BRAU | EQUIPEMENT DE L'HABITAT |
| M.BRUNET | MECANIQUE DES SOLIDES |
| J.C.BUREAU | THERMOCHIMIE MINERALE |
| J.P.CHANTE | COMPOSANTS DE PUISSANCE ET APPLICATIONS |
| M.CHEVRETON | ETUDE DES MATERIAUX |
| B. CHOCAT | METHODES |
| B.CLAUDEL | CHIMIE PHYSIQUE APPLIQUEE ET ENVIRONNEMENT |
| L.CRONENBERGER | CHIMIE BIOLOGIQUE |
| M.DIOT | THERMOCHIMIE MINERALE |
| A.DOUTHEAU | CHIMIE ORGANIQUE |
| B.DUPERRAY | CHIMIE BIOLOGIQUE |
| H.EMPTOZ | MOD.SYST.ET REC.DES FORMES |
| C.ESNOUF | GEMPPM* |
| L.EYRAUD | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| G.FANTOZZI | GEMPPM* |
| J.FAUCHON | CONCEPTION ET ANALYSE SYSTEMES MECA. |
| J.FAVREL | INFORMATIQUE DES SYST. DE PROD. INDUS. |
| Y.FETIVEAU | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| L.FLAMAND | MECANIQUE DES CONTACTS |
| P.FLEISCHMANN | GEMPPM* |
| A.FLORY | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| R.FOUGERES | GEMPPM* |
| L.FRECON | DEVELOP. LANGAGES INFORMAT. AVANCES |
| R.GAUTHIER | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| M.GERY | GCU (EQUIPEMENT DE L'HABITAT) |
| G.GIMENEZ | TRAITEMENT DU SIGNAL ET ULTRASONS |
| P.GOBIN | GEMPPM* |
| M.GODET | MECANIQUE DES CONTACTS |
| P.GONNARD | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| R.GOUTTE | TRAITEMENT DU SIGNAL ET ULTRASONS |
| G.GRANGE | GENIE ELECTRIQUE |
| G.GUENIN | GEMPPM* |
| G.GUILLOT | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| A.GUINET | INFORMATIQUE DES SYST.DE PROD.INDUS. |
| C.GUITTARD | DEVELOP.LANGAGES INFORMAT.AVANCES |
| J.L.GUYADER | VIBRATIONS-ACOUSTIQUE |
| R.HENRY | MECANIQUE DES STRUCTURES |
| J.JOUBERT | GENIE MECANIQUE |
| J.F.JULLIEN | BETONS ET STRUCTURES |
| A.JUTARD | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| R.KASTNER | GEOTECHNIQUE |
| H.KLEIMANN | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| J.KOULOUMDJIAN | INGENIERIE DES SYSTEMES D'INFORMATION |
| M.LAGARDE | CHIMIE BIOLOGIQUE |
| M.LALANNE | MECANIQUE DES STRUCTURES |
| A.LALLEMAND | ENERGETIQUE ET AUTOMATIQUE |
| M.LALLEMAND (Mme) | ENERGETIQUE ET AUTOMATIQUE |

| | |
|-----------------------|-------------------------------------------------|
| P.LAREAL | GENIE CIVIL ET URBANISME (GEOTECHNIQUE) |
| A.LAUGIER | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| CH.LAUGIER | PHYSIOLOGIE ET PHARMACODYNAMIE |
| P.LEJEUNE | GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES |
| C.LESUEUR | VIBRATIONS-ACOUSTIQUE |
| Y.MARTINEZ | INFORMATIQUE DES SYST. DE PROD. INDUST. |
| C.MARTY | CONCEPTION ET ANALYSE SYSTEMES MECA. |
| J. MERLIN | GEMPPM* |
| H.MAZILLE | PHYSICOCHEMIE INDUSTRIELLE |
| M.MIRAMOND | METHODES |
| N.MONGEREAU | GENIE CIVIL (GEOTECHNIQUE) |
| R.MOREL | MECANIQUE DES FLUIDES ET THERMIQUES |
| P.NARDON | BIOLOGIE |
| A.NAVARRO | CHIMIE PHYSIQUE APPLIQUEE ET ENVIRON. |
| M.OTTERBEIN | CHIMIE PHYSIQUE APPLIQUEE ET ENVIRON. |
| J.P.PASCAULT | MATERIAUX MACROMOLECULAIRES |
| J.PERA | SOLIDES ET MATERIAUX MINERAUX |
| G.PERACHON | THERMOCHIMIE MINERALE |
| M.PERDRIX | TRAITEMENT DU SIGNAL ET ULTRASONS |
| J.PEREZ | GEMPPM* |
| P.PINARD | PHYSIQUE DE LA MATIERE ET PHYSIQUE INDUSTRIELLE |
| D.PLAY | CONCEPTION ET ANALYSE SYSTEMES MECA. |
| P.PREVOT | INFORMATIQUE DES SYST. DE PROD. INDUST. |
| R.REYNAUD | ENERGETIQUE ET AUTOMATIQUE |
| J.M.REYNOUARD | BETONS ET STRUCTURES |
| M.RICHARD | ENERGETIQUE ET AUTOMATIQUE |
| E.RIEUTORD | MECANIQUE DES FLUIDES ET THERMIQUE |
| J.ROBERT-BAUDOY (Mme) | GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES |
| J.ROBIN | PHYSICOCHEMIE INDUSTRIELLE |
| D.ROUBY | GEMPPM* |
| J.F.SACADURA | MECANIQUE DES FLUIDES ET THERMIQUE |
| H.SAUTEREAU | MATERIAUX MACROMOLECULAIRES |
| S.SCAVARDA | AUTOMATIQUE INDUSTRIELLE |
| F.STOEBER | GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES |
| M.TROCCAZ | GENIE ELECTRIQUE ET FERROELECTRICITE |
| J.TUSET | SOLIDES ET MATERIAUX MINERAUX |
| R.UNTERREINER | TRAITEMENT DU SIGNAL ET ULTRASONS |
| P.VERMANDE | CHIMIE PHYSIQUE APPLIQUEE ET ENVIRON. |
| J.VERON | CHIMIE PHYSIQUE APPLIQUEE ET ENVIRON. |
| A.VINCENT | GEMPPM* |
| P.VUILLERMOZ | PHYSIQUE DE LA MATIERE |

Directeurs de recherche C.N.R.S. :

| | |
|--------------------|-------------------------------------------|
| P.CLAUDY | THERMOCHIMIE MINERALE |
| M.MURAT | GEMPPM* |
| A.NOUAILHAT | PHYSIQUE DE LA MATIERE |
| M.A.MANDRAND (Mme) | GENETIQUE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES |

Directeurs de recherche I.N.R.A. :

| | |
|-----------|----------|
| G.BONNOT | BIOLOGIE |
| S.GRENIER | BIOLOGIE |
| Y.MENEZO | BIOLOGIE |

Directeurs de recherche I.N.S.E.R.M. :

| | |
|--------------------|-------------------|
| A-F. PRIGENT (Mme) | CHIMIE BIOLOGIQUE |
| N.SARDA (Mme) | CHIMIE BIOLOGIQUE |

AVANT PROPOS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT) et à l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) qui, par leur financement, m'ont permis de mener à bien mes recherches.

Ce travail a été réalisé principalement aux laboratoires d'entomologie agricole du centre ORSTOM de Brazzaville et de biologie appliquée de l'INSA de Lyon, sous la direction du Professeur P. NARDON et avec la collaboration des Docteurs B. LE RÛ et Y. RAHBE.

Je tiens à remercier Mr P. NARDON de la confiance et des encouragements qu'il m'a témoignés tout au long de ce travail.

Je remercie vivement Mr J.M. LEGAY de m'avoir toujours accueilli cordialement malgré son temps précieux et d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je suis très reconnaissant à Mr B. LE RÛ pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, pour ses avis et ses précieuses suggestions. Il m'a souvent permis de clarifier mes propres idées. Je salue en lui sa sympathie, sa disponibilité et sa simplicité.

Je remercie vivement Mr Y. RAHBE pour l'intérêt qu'il a également porté à ce sujet, pour ses avis, ses conseils judicieux et pratiques. Sa collaboration au niveau de mes expériences n'a jamais fait défaut. Je lui exprime ici ma respectueuse admiration pour sa rigueur scientifique.

Je suis très reconnaissant à MM :

G. FABRES, Directeur de recherche à l'ORSTOM de Montpellier, qui a manifesté de l'intérêt pour mes recherches en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

E. THIBOUT, Directeur de recherche au CNRS à l'institut de biocénologie expérimentale des agrosystèmes de Tours, pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'être rapporteur de cette thèse.

Je suis également très reconnaissant au Docteur F. TJALLINGII de l'université agronomique de Wageningen, qui a manifesté de l'intérêt pour mes recherches. Sa collaboration au niveau de l'EPG m'a été d'un grand secours. Je salue en lui son accueil, sa simplicité et ses compétences.

J'exprime toute ma reconnaissance aux membres des laboratoires qui m'ont aidé et appris quelques techniques utilisées dans cette thèse, et en particulier : le laboratoire

de phytochimie du C.E.R.V.E. installé au centre ORSTOM de Brazzaville, le laboratoire de phytopathologie du centre ORSTOM de Brazzaville dirigé par le Docteur V. VERDIER, le laboratoire de microbiologie du même centre dirigé par le Docteur A. BRAUMAN et le laboratoire de zoologie et de biologie des populations de Créteil co-dirigé par le Professeur C. ROULAND.

J'exprime également toute ma gratitude au Docteur F. KHUONG-HUU du laboratoire de l'INCSN-CNRS de Gif-sur-Yvette pour l'identification des composés phénoliques.

Je suis très sensible à l'aide que m'a apporté Mme C. NARDON. Sa collaboration en microscopie optique m'a été très précieuse. La mise en forme de quelques figures et les tirages de planches photographiques sont aussi son oeuvre.

Je remercie vivement Mr B. DELOBEL pour l'aide précieuse et les conseils judicieux qu'il m'a apporté. Sa collaboration pour la purification des composés phénoliques m'a été très utile.

J'exprime ma profonde reconnaissance à MM A. KIAKOUAMA, A. AGOSSOU et A. KODJIA pour leur aide technique.

Je ne saurais oublier les aides et les conseils que j'ai reçus de : Mmes G. DUPORT, J. GUILLAUD et de MM G. BONNOT, B. RIO, S. TRECHE.

Je dois aussi une grande reconnaissance à Melle S. CROTEAU, Mme A.M. GRENIER, Mr A. HEDDI et Mr G. FEBVAY qui, de loin ou de près, ont participé à l'élaboration du manuscrit de cette thèse. Je les remercie de l'avoir lue et corrigée.

Je remercie également Mme J. JOLY et Melle C. VALLERIE d'avoir bien voulu dactylographier ce manuscrit.

Je remercie enfin tous mes collègues et le personnel des laboratoires d'entomologie agricole du centre ORSTOM de Brazzaville et de biologie appliquée de l'INSA de Lyon, qui, au cours de ces années laborieuses, m'ont prodigué leur soutien et leur sympathie, en particulier : M. TERTULIANO, O. BONATO, P. LEGALL, F. AMPE, G. BANI, G. CERDAN, D. CERDAN, S. GRENIER, L. CHAPELLE, B. DE LA CHAPELLE, B. PINTUREAU, C. OGIER, A. CLAVEL, L. NETO, N. SAUVION, P. GUERIN, B. CONSTANT, A. PARIS et I. LIADOUZE.

SOMMAIRE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| I Généralités : | 1 |
| II Présentation des travaux : | 4 |
| CHAPITRE I : MILIEU ET MATERIEL | 5 |
| I Présentation du milieu d'étude : | 5 |
| I.1 Généralités : | 5 |
| I.2 Le climat : | 5 |
| I.3 La végétation : | 6 |
| II Présentation du matériel végétal : | 6 |
| III Présentation du matériel animal : | 8 |
| CHAPITRE II : COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DE L'INSECTE | 10 |
| Introduction : | 10 |
| II Matériel et méthodes : | 11 |
| II.2 Matériel utilisé : | 11 |
| II.2 Méthodologie : | 13 |
| III Résultats et discussion : | 15 |
| III.1 Etude du trajet des stylets dans la plante : | 15 |
| III.2 Comparaison par EPG du comportement de <i>P. manihoti</i> sur plantes hôtes et sur plantes de substitution : | 20 |
| IV Conclusions : | 22 |
| CHAPITRE III : ETUDE DE CERTAINS ASPECTS DE LA NUTRITION DE <i>P.</i> <i>manihoti</i> | 24 |
| I Introduction : | 24 |
| II Matériel et méthodes : | 25 |
| II.1 Matériel utilisé : | 25 |
| II.2 Méthodologie : | 26 |
| II.2.1 Composition et teneur en nutriments primaires de la sève phloémienne : | 26 |
| II.2.1.1 Prélèvement de sève phloémienne par exsudation naturelle : | 26 |
| II.2.1.2 Dosage des nutriments primaires de la sève phloémienne de manioc : | 26 |
| II.2.2 Suivi du développement de l'insecte sur milieux artificiels : | 27 |
| II.2.3 Etude de la microflore du tube digestif et du bactériome : | 28 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.2.3.1 Microflore du tube digestif :..... | 28 |
| III.2.3.2 Microflore du bactériome :..... | 29 |
| III Résultats et discussion :..... | 30 |
| III.1 Nutriments primaires de la sève phloémienne :..... | 30 |
| III.2 Développement de l'insecte sur milieux artificiels :..... | 31 |
| III.3 Etude des bactéries digestives et des endocytobiotés de cochenille :..... | 31 |
| IV Conclusions :..... | 33 |

CHAPITRE IV : MISE EN EVIDENCE DE MECANISMES DE DEFENSE DU MANIOC CONTRE L'ATTAQUE DE LA COCHENILLE34

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I Introduction :..... | 34 |
| II Matériel et méthodes :..... | 37 |
| II.1: Matériel utilisé :..... | 37 |
| II.2 Méthodologie :..... | 38 |
| II.2.1 Méthodes de prélèvement :..... | 38 |
| II.2.2 Détection et dosage des substances secondaires étudiées :..... | 39 |
| II.2.3 Identification des flavonoïdes glycosylés :..... | 41 |
| II.2.4 Etude de la linamarase de l'insecte :..... | 42 |
| II.2.5 Test de toxicité du cyanure en milieu artificiel:..... | 44 |
| II.2.6 Caractérisation de l'état hydrique du végétal :..... | 45 |
| II.2.7 Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et l'infestation :..... | 45 |
| II.2.8 Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et la densité d'infestation :..... | 46 |
| II.2.9 Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et l'état hydrique du végétal :..... | 46 |
| II.2.10 Variation des substances secondaires étudiées en conditions naturelles selon le génotype, l'infestation et la saison :..... | 47 |
| II.2.11. Traitements statistiques :..... | 48 |
| III Résultats et discussion :..... | 49 |
| III.1 Substances secondaires présentes dans les feuilles de plantes hôtes et de substitution :..... | 49 |
| III.2 Substances secondaires présentes dans la sève phloémienne du manioc et dans le miellat :..... | 50 |
| III.3 Etude de la linamarase de l'insecte :..... | 52 |
| III.4 Test de toxicité du cyanure en milieu artificiel :..... | 53 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.5. Variation des substances secondaires étudiées selon le géotype et l'infestation : | 54 |
| III.6. Variation des substances secondaires étudiées selon le géotype et la densité d'infestation : | 56 |
| III.7. Variation des substances secondaires selon le géotype et l'état hydrique du végétal : | 56 |
| III.8. Variation des substances secondaires étudiées selon le géotype, l'infestation et la saison : | 57 |
| IV Conclusions:..... | 60 |
| CONCLUSION GENERALE..... | 62 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 66 |
| ANNEXES..... | 86 |

INTRODUCTION

I Généralités :

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae), originaire d'Amérique Latine, a été importé en Afrique au 16^{ème} siècle par les Portugais (SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983) et plus récemment en Asie (BELLOTTI et KAWANO, 1980) Il s'est rapidement intégré à l'agriculture traditionnelle africaine et constitue à présent, en zone forestière intertropicale, la culture vivrière de base de près de 200 millions d'habitants. Il est cultivé dans 35 pays africains, du Sénégal au Malawi, et occupe près de 7,5 millions d'hectares (FAO, 1985). Les tubercules et les feuilles sont utilisés dans l'alimentation humaine. Depuis le début des années 1970, une baisse moyenne de la production en tubercules d'environ 7 % est constatée en Afrique. Elle atteint près de 15 % au Congo. Cette diminution pourrait s'expliquer en partie par la présence et la diffusion rapide de maladies (bactérioses, viroses) et de ravageurs (acariens, cochenilles), d'introduction récente sur le continent africain (HERREN, 1987), telle que la cochenille farineuse *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Homoptera, Pseudococcidae) qui était jusqu'alors inconnue (MATILE-FERRERO, 1976).

P. manihoti a été signalée pour la première fois sur le continent africain en 1973 au Congo (SILVESTRE, 1973) et au Zaïre (HAHN et WILLIAMS, 1973). Elle est considérée comme l'un des plus importants ravageurs du manioc. Originaire des zones tropicales d'Amérique du Sud (Bolivie, Brésil, Paraguay) (COX et WILLIAMS, 1981), elle est actuellement présente dans 25 pays appartenant à la zone de culture du manioc en Afrique (NEUENSCHWANDER et HERREN, 1988). Ses pullulations sont à l'origine de pertes de rendement en tubercules estimées à 30 % en moyenne en Afrique intertropicale (NWANZE, 1982). Les premières études sur le modèle manioc/cochenille du manioc ont été entreprises à la fin des années 70. Elles ont d'abord porté sur la biologie et la dynamique des populations du ravageur (NWANZE, 1977, AKINLOSOTU et LEUSCHNER, 1981, FABRES, 1981, FABRES et BOUSSIENGUET, 1981, FABRES, 1982). La cochenille se reproduit par parthénogénèse thélytoque et est dotée d'un important pouvoir de multiplication. Sa pullulation intervient chaque année en fin de saison sèche/début de saison des pluies. Des précisions ont été apportées sur le rôle des facteurs climatiques qui ont une influence sur la dynamique des populations de *P. manihoti* (LE RÜ et FABRES, 1987, SCHULTHESS et coll., 1987, IZIQUEL et LE RÜ, 1989, LE RÜ et coll., 1991). De même, l'intervention de certains facteurs biotiques a été abordée. Ainsi en 1982, l'entomophytore *Neozygites fumosa* (Speare) Remaudière et Kellér (Zygomycète) a été signalée au Congo sur *P. manihoti* (LE RÜ, 1984). Dans certaines conditions d'humidité relative atmosphérique et de densité de la cochenille, ce pathogène peut être responsable de la décroissance rapide des effectifs du ravageur (LE RÜ, 1986 a, LE RÜ, 1986 b, LE RÜ et IZIQUEL, 1990).

L'entomofaune associée à la cochenille du manioc a été décrite au Congo (FABRES et MATILE-FERRERO, 1980, BASSANGAMA et coll., 1989), au Gabon (BOUSSIENGUET,

1986) et au Nigéria (IHEAGWAN, 1981, NEUENSCHWANDER et coll., 1987). Les prédateurs appartiennent à 5 ordres d'insectes : Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hemiptera et Neuroptera. La famille des Coccinellidae, avec 32 espèces recensées, représente plus de 50 % de l'ensemble des espèces prédatrices associées à *P. manihoti*, avec la prédominance des genres *Exochomus* et *Hyperaspis*. Les parasitoïdes primaires de *P. manihoti* sont tous des Hyménoptères Encyrtidae appartenant au genre *Anagyrus*.

Tous les auteurs s'accordent pour reconnaître qu'en Afrique, les entomophages indigènes exercent une faible action régulatrice sur la cochenille du manioc malgré leur importante diversité spécifique (FABRES et MATILE-FERRERO, 1980, NEUENSCHWANDER et coll., 1987). Aussi, devant les difficultés rencontrées pour la mise en oeuvre de la lutte chimique dans le contexte socio-économique africain (faibles revenus des agriculteurs, morcellement des parcelles paysannes, problèmes d'écotoxicité...), les recherches se sont orientées vers la lutte biologique. L'utilisation d'entomophages exotiques est alors apparue comme un moyen de renforcer la régulation naturelle des populations de cochenille du manioc.

Dès 1977, plusieurs espèces d'insectes entomophages de la cochenille, récoltées au sein de la biocénose sud américaine, ont été identifiées par le C.I.B.C.¹ (YASEEN et BENNETT, 1979). Ces auxiliaires, des Encyrtidae (parasitoïdes) et des Coccinellidae (prédateurs), ont été étudiés à des fins de lutte biologique, en liaison avec l'I.I.T.A.².

Les recherches les plus approfondies ont porté sur *Epidinocarsis lopezi* De Santis (Hyménoptera, Encyrtidae), un endoparasite de la cochenille du manioc qui a fait l'objet d'un premier lâcher au Nigéria dès la fin de l'année 1981. Dans le cadre du "Projet Pan-africain de Lutte Biologique" (A.B.C.P.³), des lâchers de ce parasitoïde ont été effectués en Afrique Occidentale et Centrale, et plus récemment en Afrique de l'Est. En 1990, cet Encyrtidae est signalé dans 22 pays (HERREN et NEUENSCHWANDER, 1991). L'efficacité de ce parasitoïde en tant qu'agent de lutte biologique semble cependant controversée. Alors que dans certaines conditions écologiques, comme celles de l'ouest Nigéria ou du sud Ghana, il paraît capable de réguler les populations de *P. manihoti* (NEUENSCHWANDER et coll., 1989, NEUENSCHWANDER et coll., 1990, HERREN et NEUENSCHWANDER, 1991), sa présence ne semble pas affecter significativement la dynamique des populations de la cochenille du manioc dans le sud Congo (BIASSANGAMA et coll., 1988, IZIQUEL et LE RÜ, 1989, LE RÜ et coll., 1991) ou au Sénégal (NENON, 1990). Par ailleurs, d'importants dégâts continuent à être signalés au sud-est du Nigéria par UMEH (1988⁴), en Sierra Leone par SESAY (1987⁴), au Togo par FISCHER (1987⁴) et au Malawi par NYIRENDA (1988⁴).

¹ C.I.B.C.: Commonwealth Institute of Biological Control.

² I.I.T.A.: International Institute of Tropical Agriculture.

³ A.B.C.P.: African-wide Biological Control Project.

⁴ Dans NEUENSCHWANDER *et al.*, (1990).

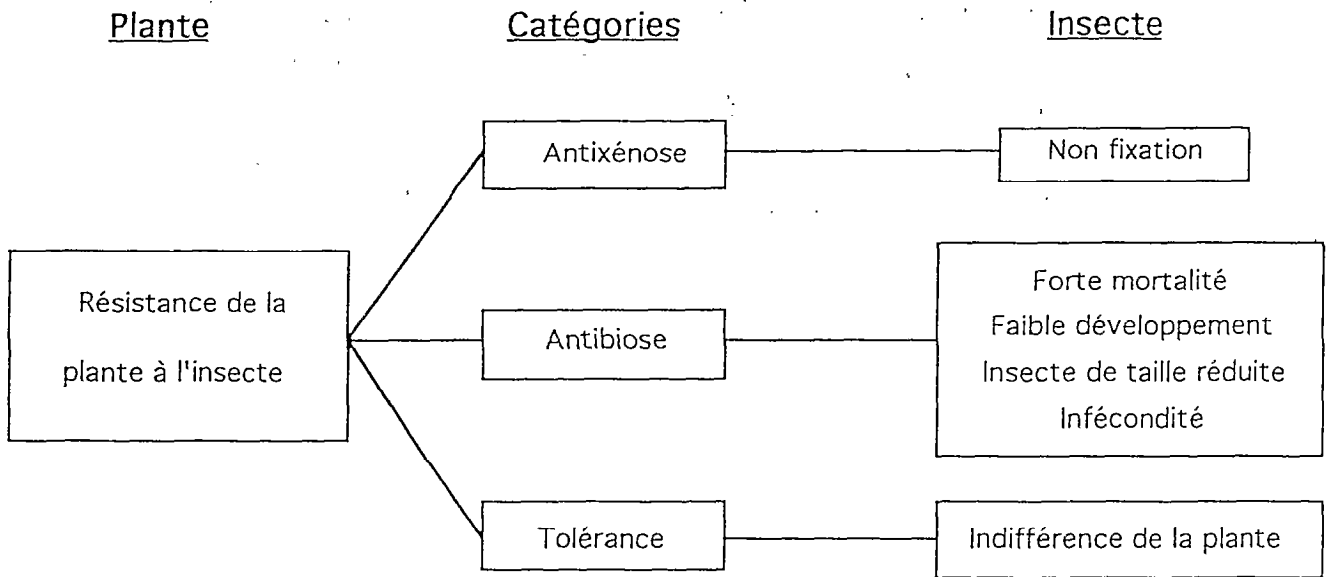


FIGURE 1 : Catégories de résistance selon PAINTER (1951).

Aucun des facteurs abiotiques (température, humidité relative, pluviométrie) et biotiques (pathogènes, parasitoïdes, prédateurs, capacité limite ⁵) étudiés jusqu'alors n'a permis d'expliquer les disparités observées dans la répartition et l'abondance du ravageur d'un biotope à un autre. La variabilité des agrosystèmes du manioc (très grande diversité des variétés de manioc et des conditions écologiques dans lesquelles ils sont cultivés) pourrait expliquer ces résultats. Les recherches se sont alors orientées vers l'étude écophysiologique des interactions entre la cochenille et sa plante hôte. Dans ce contexte, sur la base de l'important matériel végétal disponible au Congo, LE RÛ et coll. (1991) ont pratiqué un criblage en condition de plein champ, afin de déceler d'éventuels degrés de résistance susceptibles de conduire à un programme d'amélioration variétale. Ce criblage n'a pas permis d'identifier des variétés de manioc totalement résistantes en terme d'antixénose, mais a cependant mis en évidence des résistances partielles. Parmi les plantes de substitution ⁶, des résistances proches de "l'immunité" ont pu être décelées pour le poinsettia (*Euphorbia pulcherrina* Wild., Euphorbiaceae, plante parfois utilisée en Europe pour la multiplication de la cochenille ; BOUSSIENGUET, (1984)) et le talinum (*Talinum triangularae* Jack., Portulacaceae, plante adventice des parcelles de manioc sur laquelle *P. manihoti* est parfois observée ; NEUENSCHWANDER et coll., (1986)).

Par ailleurs, les différentes catégories de résistance ⁷ (figure 1) qui régissent les relations de la cochenille du manioc avec ses plantes hôtes ont été précisées (TERTULIANO et coll., 1993). L'antixénose a été appréciée à partir d'un criblage pratiqué dans trois collections (testées) du sud Congo. L'antibiose a été estimée sur la base de la détermination de la capacité intrinsèque d'accroissement (r_c) qui intègre les différentes composantes du développement de l'insecte (durée de développement et mortalité larvaire, taux de survie et fécondité journalière) et la tolérance a été appréciée sur la base de la détermination de paramètres physiologiques de la plante hôte permettant d'évaluer dans le temps l'évolution du poids sec et de la surface foliaire (HAHN et WILLIAMS, 1973, CAUSTON et VENUS, 1981, HUNT, 1982).

Dans les conditions naturelles, le manioc au Congo n'est fortement infesté par la cochenille que pendant trois mois de l'année, en fin de saison sèche et début de saison des pluies (août, septembre et octobre). De brutales variations d'effectifs sont observées lors d'importantes modifications de la physiologie de la plante (dessèchement des sommités de tiges de manioc en saison sèche, poussée de sève en fin de saison sèche/début de saison des pluies), en relation avec des variations des facteurs climatiques (température, ensoleillement, pluviométrie). Ces observations semblent indiquer que des modifications des activités photosynthétiques provoquent des modifications temporaires de la résistance de la plante, suggérant des mécanismes de résistance liés à des caractères biochimiques telles que la

⁵ La capacité limite correspond à une régulation du ravageur sous l'influence de la raréfaction de la nourriture.

⁶ On appellera plante de substitution ou plante hôte de substitution, une plante ne présentant pas d'infestation naturelle par *P. manihoti* et pouvant être assimilée à une plante non hôte-naturel.

⁷ Catégories générales de résistance, au sens de PAINTER (1951), et définies plus précisément au chapitre IV, paragraphe I.

composition et la concentration en nutriments primaires (acides aminés et sucres) ou en substances secondaires (phénols, composés cyanés, ...) des feuilles.

II Présentation des travaux :

Le travail dont il est rendu compte ici comporte trois parties.

L'orientation actuelle des recherches menées à l'ORSTOM Brazzaville sur le modèle *P. manihoti* - *M. esculenta*, visant à une meilleure compréhension des inter-relations entre la cochenille et sa plante hôte, nous conduira premièrement à préciser le comportement alimentaire de l'insecte. Cette étude aura pour but de suivre à l'aide de la microscopie optique et d'un enregistrement électrique (EPG, voir chapitre II) le trajet des stylets de l'insecte dans le végétal. Elle nous permettra notamment de connaître le compartiment nutritif de *P. manihoti* et de localiser les tissus les plus impliqués dans les mécanismes de fixation de la cochenille sur la plante.

Deuxièmement, nous étudierons certains aspects de la nutrition de l'insecte. Cette partie aura pour objectif d'apprécier les besoins en composés primaires de *P. manihoti* et d'étudier brièvement sa microflore symbiotique.

Troisièmement, nous tenterons de mettre en évidence quelques mécanismes de défense de la plante vis-à-vis de la cochenille, en précisant le rôle éventuel des composés secondaires (phénols, composés cyanés...) des feuilles de manioc et en quantifiant leurs variations en relation avec différents facteurs (génotype de la plante, densité d'infestation, état hydrique de la plante, saison).

Chaque partie comprendra une introduction mentionnant les objectifs qui lui sont propres, en les argumentant par un appui bibliographique, ainsi que l'examen des matériels, méthodes et protocoles expérimentaux qui s'y rapporteront.

Ces trois parties seront précédées d'une présentation succincte du milieu d'étude et du matériel biologique utilisé.

CHAPITRE I : MILIEU ET MATERIEL

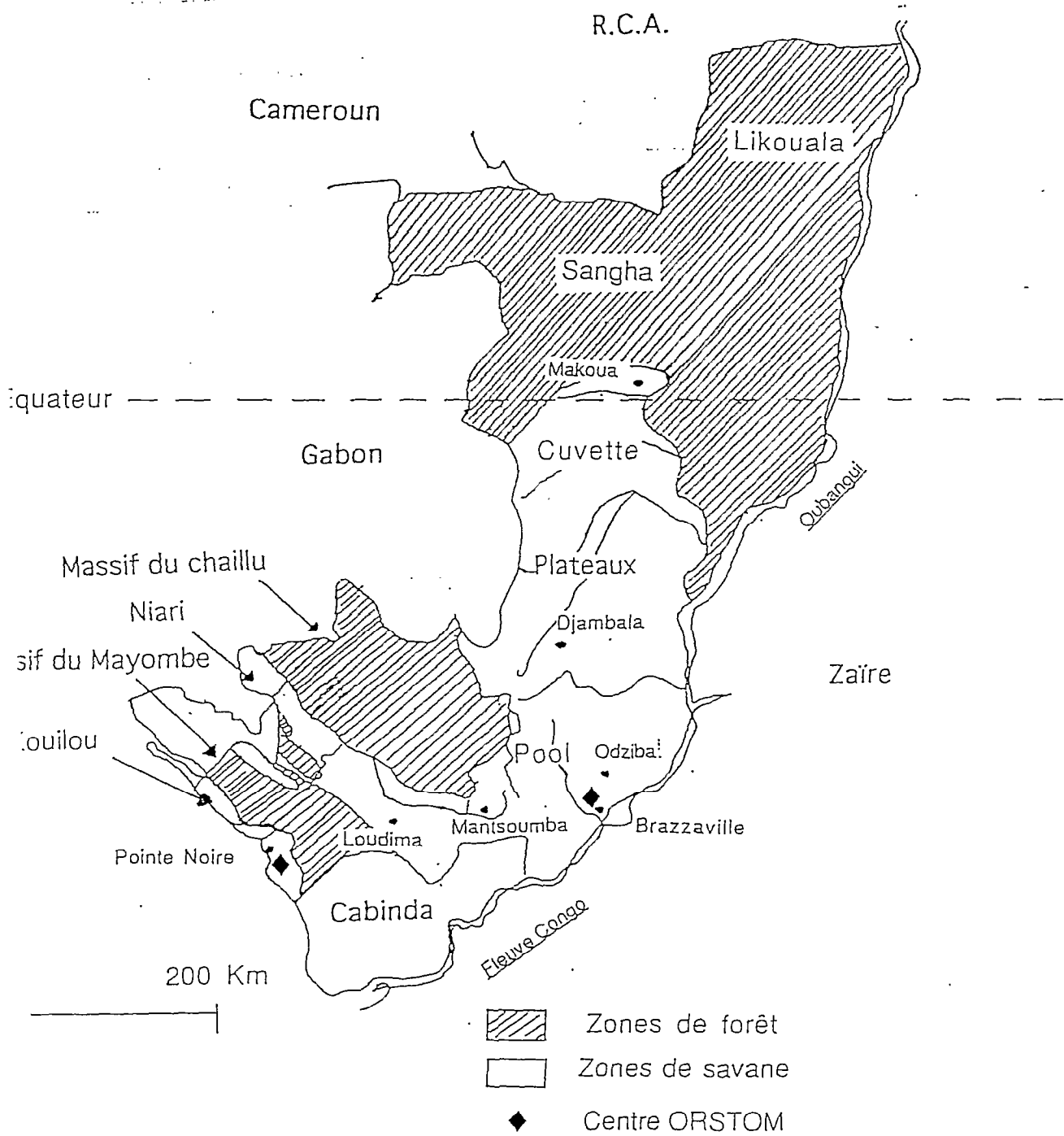


FIGURE 2: Répartition des zones de forêt et de savane en république du CONGO.

I Présentation du milieu d'étude :

I.1 Généralités :

La République du Congo, située en Afrique Centrale entre 5° de latitude sud et 5° de latitude nord, couvre une superficie de 342.000 km². Elle est limitée à l'ouest par le Gabon, au nord par le Cameroun et la République Centre Africaine (R.C.A.), et au sud-ouest par l'enclave angolaise du Cabinda (figure 2). A l'est, l'Oubangui, puis le fleuve Congo dessinent une frontière naturelle entre le Zaïre et le Congo. Le chemin de fer constitue la principale voie de communication entre Brazzaville, la capitale administrative, et Pointe-Noire, le débouché maritime sur la côte atlantique.

Deux centres ORSTOM sont situés au Congo, l'un à Brazzaville et l'autre à Pointe-Noire. Nos expérimentations ont eu lieu au centre de Brazzaville.

I.2 Le climat :

Le Congo, situé de part et d'autre de l'équateur, subit un climat équatorial nuancé par la latitude. La température moyenne annuelle est de 25 °C (extrêmes : 23-27 °C) et l'humidité relative est toujours importante (80-90 %). Ces deux facteurs climatiques ne présentent pas d'amples variations au cours de l'année. Par contre, les variations marquées du régime des pluies permettent de distinguer deux types de saisons dans la région de Brazzaville, où cette étude est réalisée (les chiffres présentés ci-après sont des moyennes sur 10 ans de 1979 à 1989) :

- la saison sèche, de juin à octobre, se caractérise par de faibles précipitations (2,1 mm en juillet), par un ciel bas et nuageux et par des températures mensuelles moyennes de 21,7 °C (juillet). Des minima de températures de 11-12 °C au lever du jour, sont parfois enregistrées en juillet (LE RÛ, 1984) ;

- la saison des pluies, d'octobre à mai, est marquée par d'abondantes précipitations (205,6 mm en avril) entrecoupées de périodes d'intense ensoleillement et par des températures moyennes mensuelles de 25,6 °C (octobre) à 26,2 °C (mars et avril).

En janvier-février, un flux d'air sec provenant de l'anticyclone sud-africain est à l'origine d'un ralentissement des précipitations, parfois évoqué localement sous le terme de "petite saison sèche". La pluviométrie moyenne annuelle à Brazzaville est de 1394 mm.

L'année 1991, pendant laquelle notre étude de terrain a été conduite, s'est caractérisée par (figure 3) :

- une grande saison sèche (gss) marquée par une pluviométrie faible voire nulle, accompagnée de températures moyennes mensuelles inférieures à 25 °C et d'humidités relatives moyennes mensuelles inférieures à 80 %.

0 10cm



FIGURE 4: Plant de manioc sain (variété M'pembe).

- une saison des pluies (gsp 1 et 2) marquée par une forte pluviométrie, accompagnée de températures moyennes mensuelles supérieures à 25 °C et d'humidités relatives moyennes mensuelles supérieures à 80 %.

En février-mars, nous avons pu noter la présence d'une "petite saison sèche" (pss) caractérisée par une plus faible pluviométrie (50 mm en février), une augmentation de la température moyenne mensuelle jusqu'à 27 °C et une sensible diminution de l'humidité relative moyenne mensuelle jusqu'à 78 % en mars.

I.3 La végétation :

La forêt dense équatoriale occupe 65 % du pays et les savanes 35 %. La couverture forestière est constituée de 2 types écologiques différents (figure 2): la forêt inondée (Basse-Sangha, Likouala) et la forêt de terre ferme (Haute Sangha, massifs du Chaillu et du Mayombe). Les savanes herbeuses et arbustives (Kouilou, Niari, Plateaux et Cuvette) sont souvent entrecoupées de bosquets forestiers ou de forêts-galeries le long des cours d'eau. La région du Pool dans laquelle nous avons travaillé est une zone de savane arbustive à *Hymenocardia acida* Tul. (Euphorbiaceae).

MATILE-FERRERO (1976) et LE RÜ (comm. pers.) ont pu remarquer que les plantations de manioc des zones de savane sont plus facilement infestées par la cochenille *P. manihoti* que celles des zones forestières.

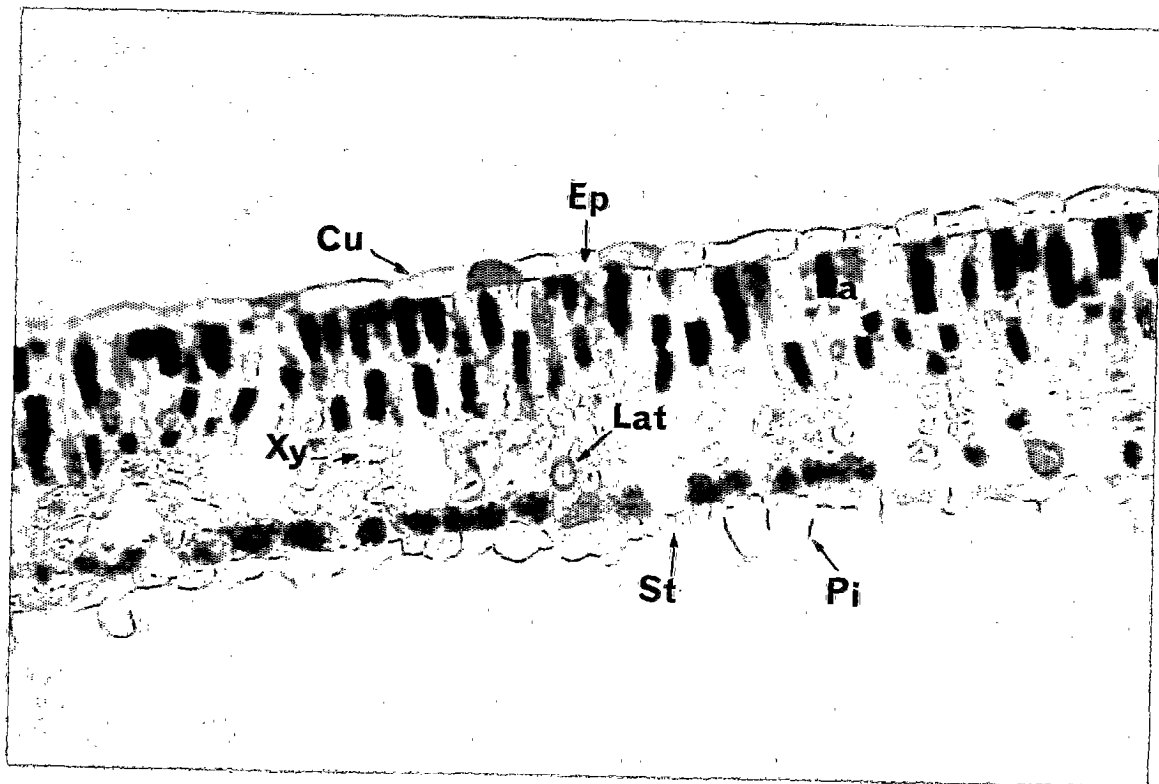
II Présentation du matériel végétal :

Le manioc est une plante tubérisée. Le genre *Manihot* (à $2n = 36$ chromosomes) est une Dicotylédone de la famille des Euphorbiacées (figure 4). Les feuilles palmées sont alternes et pédonculées (SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983).

La multiplication du manioc est couramment assurée par bouturage. La reproduction sexuée, de succès aléatoire, est uniquement utilisée pour l'obtention de nouveaux clones et l'amélioration de l'espèce (MEDARD, 1973). Dans le milieu paysan africain, le bouturage est la multiplication végétative la plus utilisée.

Quelques caractéristiques physiologiques du manioc rendent la plante adaptée à la sécheresse. En effet, en saison sèche, par manque d'eau, la plante réduit sa surface foliaire en se débarrassant des feuilles les plus vieilles. Les stomates présents à la face inférieure des feuilles se ferment, limitant également la déperdition d'eau (MEDARD, 1973, EL SHARKAWY et COCK, 1984, EL SHARKAWY et coll., 1984, COCK et coll., 1985, EL SHARKAWY et COCK, 1986).

Il est généralement admis, en physiologie végétale, que les plantes fixant le CO₂ sous forme d'acides en C₄ sont adaptées aux conditions de sécheresse. Chez le manioc, les tissus palissadiques de la couche supérieure de la feuille possèdent un mécanisme efficace de



0 200 μm

FIGURE 5 : Coupe transversale d'une feuille de manioc (variété M'pembe)
(Cu : cuticule, Ep : épiderme, Pa : parenchyme, Lat : vaisseau laticifère, Xy : xylème,
St : stomate, Pi : cellule piliforme).

recyclage du CO₂ (EL SHARKAWY et COCK, 1990). Ces auteurs rapportent que le manioc synthétise des acides en C₄ en tant que produits primaires de la photosynthèse et, a la propriété d'utiliser des taux de CO₂ très faibles, évitant ainsi une ouverture fréquente des stomates. Cependant, il ne possède pas une anatomie foliaire de type "Krantz" (caractéristique des plantes ayant un trajet photosynthétique de type C₄). EDWARD et coll. (1990) observent, quant à eux, que le manioc possède également un trajet photosynthétique de type C₃. Un compromis pourrait conclure cette controverse, qui verrait certaines espèces fixer le carbone sous forme C₃ et d'autres sous forme C₄. Il est possible que le manioc soit en voie d'évolution vers un trajet photosynthétique du type C₄, ce qui expliquerait la présence de maniocs aux caractéristiques intermédiaires entre C₃ et C₄ (EL SHARKAWY et COCK, 1990). Quelques travaux relatent les modifications de l'activité photosynthétique du manioc en conditions de stress hydrique (1980, EL SHARKAWY et COCK, 1984, EL SHARKAWY et coll., 1984, COCK et coll., 1985). Ils montrent une diminution de la photosynthèse chez les plantes soumises à un stress hydrique. En conséquence, lors de la saison sèche, le manioc peut, malgré son adaptation, présenter une diminution de son activité photosynthétique par manque d'eau. Ceci pourrait entraîner un ralentissement du métabolisme du végétal. Chez les plantes tubérifères, les composés organiques issus de la photosynthèse sont véhiculés par la sève phloémienne des feuilles vers les tubercules (sève descendante). Ces composés sont ensuite polymérisés et stockés dans ces organes souterrains. Les tubercules constituent des organes de réserve en composés organiques, et ces composés sont disponibles et utilisés par la plante en cas de besoin. Ils permettraient notamment le maintien métabolique du manioc en saison sèche.

Les Euphorbiacées se caractérisent par la présence fréquente de vaisseaux laticifères au niveau des feuilles et des tiges (figure 5). Le latex est un polymère polyisoprénique, libéré après blessure, qui est produit en plus ou moins grande quantité selon la plante. Mis à part un rôle protecteur contre l'attaque de ravageurs, qui lui a souvent été prêté mais aussi discuté (ARCHER, 1980), aucune fonction précise n'a pu lui être attribué avec rigueur. Néanmoins, PANCORO et HUGHES (1992) montrent que les vaisseaux laticifères du manioc véhiculent des enzymes hydrolytiques responsables de la cyanogénèse (voir plus loin dans le texte). Ainsi, le rôle potentiel de ce compartiment apparaît non négligeable dans la physiologie de défense de cette plante, notamment contre l'attaque de ravageurs.

La présence de composés cyanés constitue une autre caractéristique biochimique du manioc (quoique non générale aux Euphorbes). Ces composés sont présents dans les feuilles, les tiges et les tubercules (COOKE, 1978, COOKE, 1979, ARGUEDAS et COOKE, 1982, ARIHANTANA et BUCKLE, 1986, EZEALA et OKORO, 1986, PANCORO et HUGHES, 1992). Le groupement -CN est lié avec le D-glucose sous forme de glucosides cyanogéniques : la linamarine et la lotaustraline (CONN, 1980)(figure 6b). La biosynthèse de ces glucosides se réalise généralement à partir des amino-acides, par l'intermédiaire d'une α -cétoxime

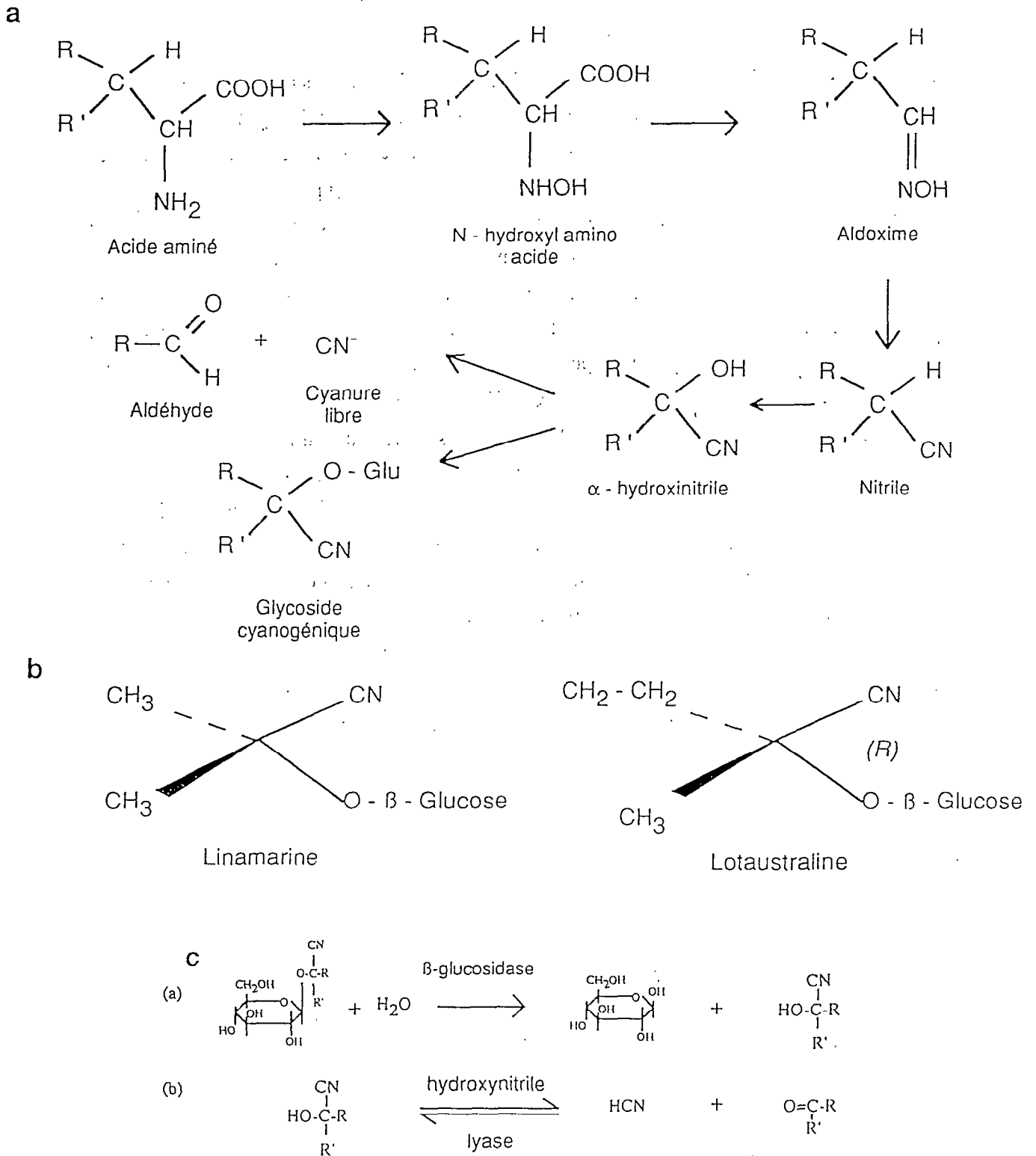


FIGURE 6 : a : Schéma général de la biosynthèse des glycosides cyanogéniques à partir des acides aminés ;
 b : Formules développées de la linamarine et de la lotaustraline ;
 c : Schéma d'hydrolyse des glycosides cyanogéniques ;
 d'après CONN (1980).

décarboxylée en aldoxime qui donne le groupement nitrile (CONN, 1973, CONN, 1979, CONN, 1980) (figure 6a). L'osidification est précédée d'une oxydation, créant un groupement hydroxyle en α . La L-valine et la L-isoleucine seraient respectivement les précurseurs de la linamarine et de la lotaustraline (figure 6b). Les glycosides cyanogéniques (composés hydrosolubles) sont synthétisés dans les feuilles et stockés dans les tubercules jusqu'à une concentration de 50,5 mg/100g de poids frais, d'après ARGUEDAS et COOKE (1982). Ces composés peuvent être hydrolysés par voie acide ou enzymatique. La voie la plus utilisée dans la plante est la voie enzymatique. Elle nécessite l'intervention de deux enzymes, une β -glucosidase et une hydroxynitrile lyase (figure 6c) permettant la libération d'acide cyanhydrique ou HCN (CONN, 1973, CONN, 1980). L'apparition d'HCN dans la plante est appelée cyanogénèse, et cette molécule toxique peut être rapidement fixée par un acide aminé (sérine ou cystéine) pour former par exemple la β -cyanoalanine, qui, par fixation d'eau, conduit à l'asparagine. Cette dernière est transformée, sous l'action d'enzymes spécifiques, en acide aspartique utilisé dans la synthèse organique (protéines, glucides, cycle de Krebs). L'HCN constitue ainsi, en plus du rôle de défense qu'on lui attribue, une source recyclée d'azote pour la plante (SEGRETAIN et BORIES, 1986).

III Présentation du matériel animal :

La cochenille farineuse du manioc *Phenacoccus manihoti* est un Homoptère appartenant à la famille des Pseudococcidae (MATILE-FERRERO, 1976). Elle est morphologiquement voisine de plusieurs espèces cosmopolites et polyphages, d'importance économique secondaire, notamment :

- Phenacoccus madeirensis* Gree., cochenille commune sur les plantes ornementales de toute l'Afrique Occidentale ;

- Phenacoccus gossypii* Towns. et Coll. et *Phenacoccus solani* Ferris, espèces communes également, se rencontrant sur de nombreuses cultures en Amérique inter-tropicale.

Phenacoccus manihoti rencontrée en Afrique et dans la zone néotropicale d'altitude du continent sud-américain (Bolivie, Paraguay, plateau du Mato-Grosso au Brésil), est un insecte oligophage inféodé au manioc. Il se reproduit par parthénogénèse thélytoque, ce mode de reproduction n'étant pas général chez les Pseudococcides. Il passe par 4 stades, que nous noterons L₁ à L₄, au cours de son développement larvaire. Au stade imago (adulte), il pond ses oeufs et les entoure de cires blanchâtres, l'ensemble étant appelé ovisac et pouvant renfermer jusqu'à 500 oeufs (figure 7).

La larve au premier stade (L₁) est de loin la plus mobile (NWANZE, 1977). Elle est responsable de la colonisation des plants de manioc au sein d'une parcelle (LE RÛ et coll., 1991), et se fixe préférentiellement sur les apex et les faces inférieures des jeunes feuilles. La colonisation des parcelles environnantes par les cochenilles est causée par le vent, mais aussi

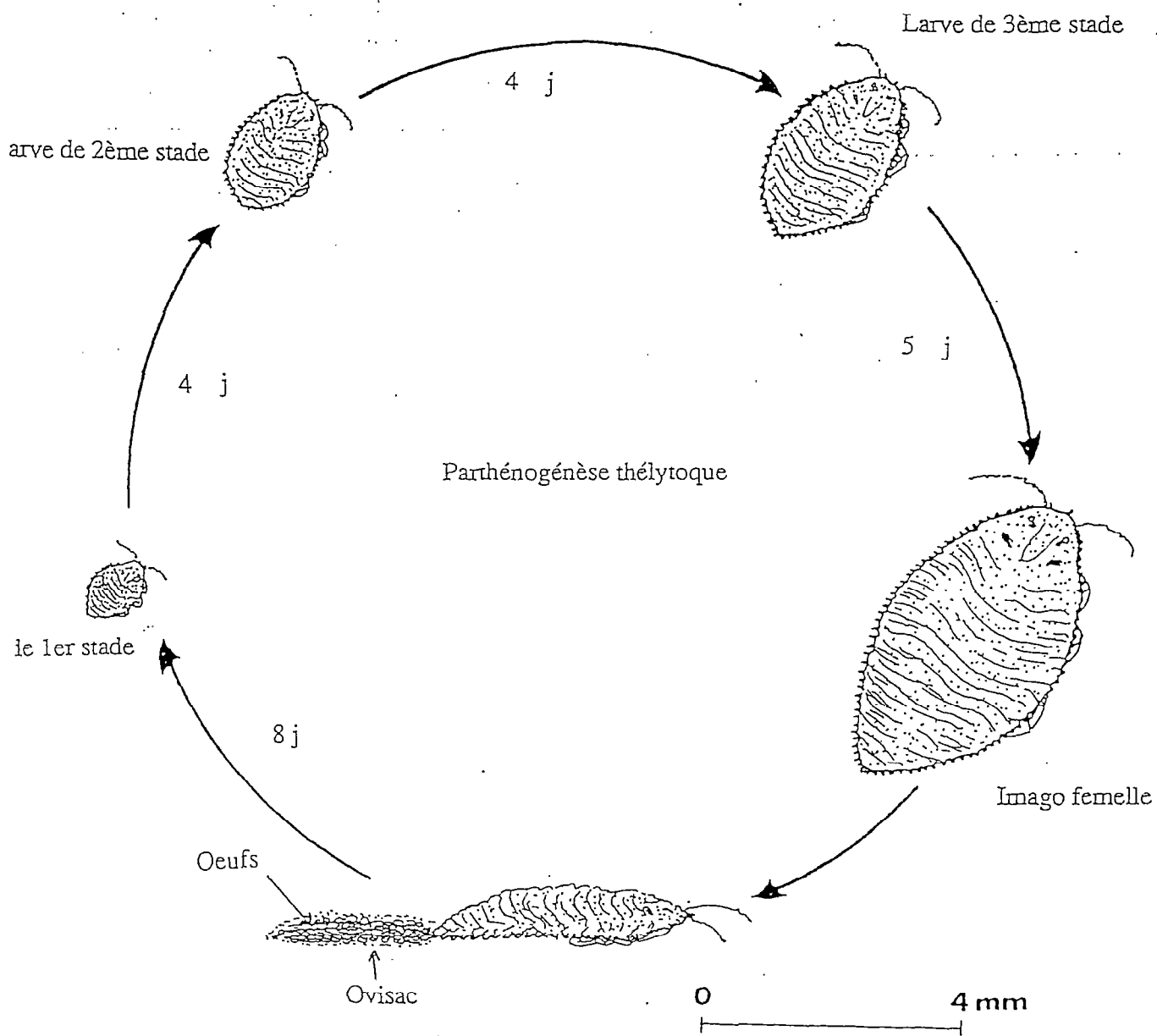


FIGURE 7: Cycle de développement de *Phenacoccus manihoti*, selon
 NWANZE (1978).
 (Durée: 22 jours, T: 25,9 °C)



FIGURE 8: Plant de manioc (variété M'pembe) infesté par *P. manihoti* .

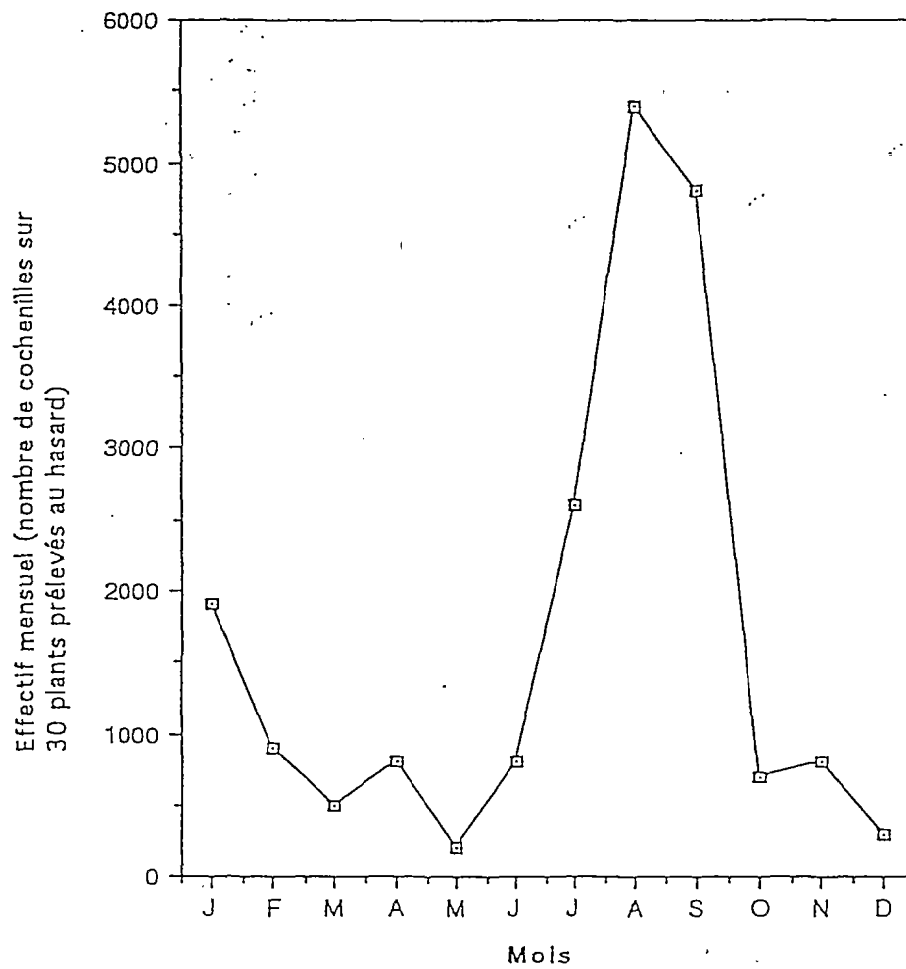


FIGURE 9: Variation de l'effectif naturel de cochenilles sur "faux caoutchouc" durant l'année 1991 dans une parcelle paysanne à Brazzaville.

par le transport de boutures infestées de manioc par l'homme (LEUSCHNER, 1977, NWANZE, 1977).

L'attaque des feuilles par la cochenille peut causer des dégâts par déformation et réduction de la surface foliaire (figure 8), ainsi que par diminution de l'activité photosynthétique. L'attaque des tiges peut provoquer un arrêt de croissance de la plante (BELLOTTI et KAWANO, 1980).

Au Congo, l'étude de la dynamique des populations de cette cochenille, entreprise dès 1979, a permis de montrer que celle-ci développe, en général, une pullulation annuelle de fin de saison sèche/début de saison des pluies. Il convient cependant de noter que cette pullulation est sujette à des variations selon les années et selon les parcelles. Elle peut être unimodale ou bimodale ; dans ce dernier cas, une deuxième pullulation est souvent observée en "petite saison sèche". Elle est généralement de saison sèche, mais peut occasionnellement survenir en saison des pluies. Quoiqu'il en soit, la pullulation des cochenilles coïncide avec de profondes modifications de la physiologie de la plante, comme le dessèchement des sommités de manioc, l'arrêt de croissance de la plante en début de saison sèche, ou la poussée de sève en début de saison des pluies (FABRES, 1981, LE RÜ et coll., 1991).

En 1991, année de notre expérimentation sur le terrain, une étude de dynamique des populations pratiquée sur "Faux caoutchouc" dans une parcelle paysanne située à Brazzaville (quartier M'pila) a permis d'observer une pullulation de saison sèche (figure 9).

CHAPITRE II : COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DE L'INSECTE

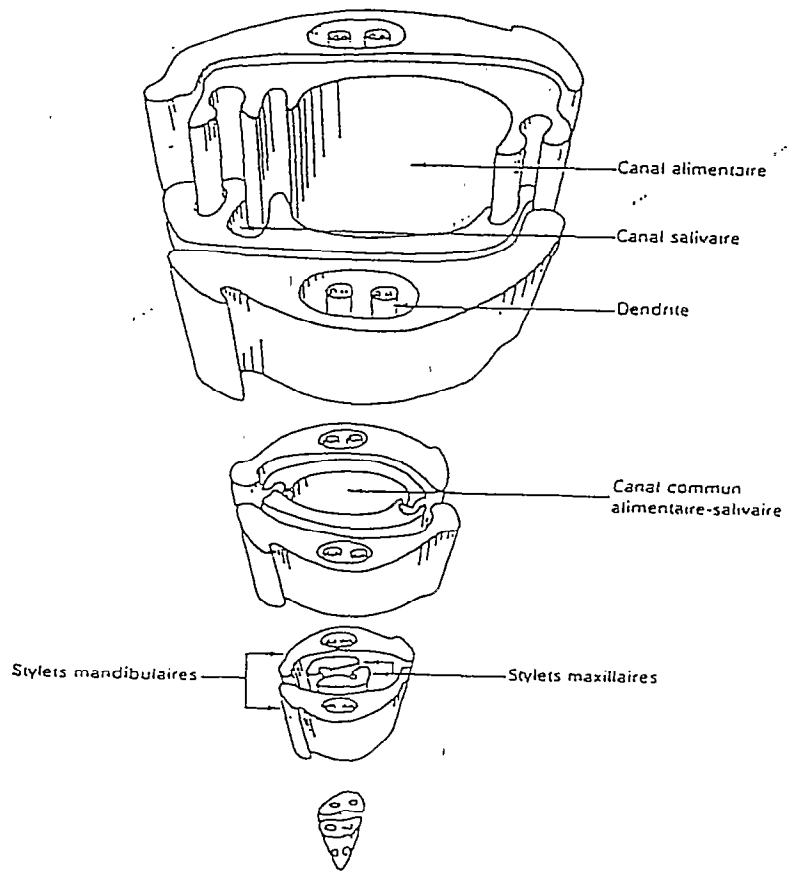


FIGURE 10 : Vue en perspective de l'extrémité des stylets d'un Aphide (LECLANT, 1981).

I Introduction :

Le comportement alimentaire des cochenilles a été décrit ou évoqué chez des Coccidae et des Pseudococcidae dans un petit nombre de cas comparativement aux Aphididae (SMITH, 1926, HERIOT, 1934, PESSON, 1944, GRASSE, 1951, ALBRIGO et BROOKS, 1977, YASUDA, 1979, CAMPBELL, 1990, MOLYNEUX et coll., 1990). Sur la base d'observations histologiques et de la production de miellat, tous ces auteurs rapportent un comportement phloémophage de l'insecte. Ce comportement a également été décrit chez des Diaspididae (SMITH, 1926, ROSEN, 1990), qui ont signalé en revanche l'existence de quelques Diaspides présentant une alimentation non phloémienne.

Rappelons que chez beaucoup d'Homoptères, le labium est inséré à la limite postéro-ventrale de la tête. Chez les Pseudococcides, les pièces buccales sont à orientation hypognathe, c'est-à-dire non continues au clypéus (comme chez les Aphides) et situées sous ce dernier (PESSON, 1944). Le labium est un tube généralement segmenté, creusé dorsalement d'une gouttière qui reçoit les stylets. Les mandibules et les mâchoires (premières maxilles) présentent chez tous les Homoptères une morphologie particulière pour former quatre stylets chitinisés (figures 10 et 13b). Par cet arrangement particulier des pièces buccales et le mode alimentaire associé, les entomologistes qualifient ces insectes de piqueurs suceurs.

La microscopie optique est l'outil le plus ancien pour décrire le trajet des stylets des Homoptères dans la plante. Il a largement été utilisé chez les Aphides (EVERT et coll., 1973, POLLARD, 1973, TJALLINGII, 1978a). POLLARD (1973) cite plus de 200 travaux utilisant la microscopie optique et rapporte que le trajet des stylets varie selon les espèces d'Aphides. Il est généralement clairement intercellulaire mais peut parfois apparaître intracellulaire ou mixte. A partir du milieu des années 1960, l'enregistrement électrique des activités de piqûre a permis de bien décrire le comportement alimentaire des Homoptères (Mc LEAN et KINSEY, 1964). Cet outil, complémentaire à la microscopie optique, consiste à suivre les variations de potentiel dans un circuit électrique au cours de la pénétration des stylets de l'insecte dans le végétal. Il a été modifié par la suite pour permettre de décrire plus en détail le trajet des stylets dans la plante et leurs interactions tissulaires (méthode en courant continu-DC, appelée EPG (TJALLINGII, 1985a)). Il a largement été utilisé pour les pucerons (TJALLINGII, 1978a, KIMMINS et TJALLINGII, 1985, TJALLINGII, 1985b, TJALLINGII, 1987, TJALLINGII, 1990b) et en particulier dans l'étude de la résistance des plantes aux Aphides et à d'autres Homoptères (KIMMINS, 1989, MONTLLOR et TJALLINGII, 1989). Il n'avait cependant jamais été employé pour étudier le comportement alimentaire des Pseudococcides ou d'une cochenille en général.

Plusieurs auteurs ont étudié l'équipement enzymatique nécessaire à l'Homoptère pour atteindre son compartiment alimentaire. Ils ont notamment suggéré l'hypothèse que la

présence d'enzymes pectinolytiques dans les sécrétions salivaires d'Aphides permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'accès au phloème. Ils s'accordent pour dire que la présence de telles enzymes dans les sécrétions est associée à un trajet plus strictement intercellulaire des stylets (Mc ALLAN et ADAMS, 1961¹ ; CAMPBELL et DREYER, (1985); MILES, 1987¹ ; MA et coll., (1990)).

Afin de vérifier dans quelle mesure *P. manihoti* était bien strictement phloémophage, comme cela a été évoqué par GUTIERREZ et coll. (1988) et par NEUENSCHWANDER et coll. (1990), notre première approche dans cette étude a été de suivre le trajet des stylets de l'insecte dans la plante. Pour ce faire, nous avons utilisé les deux outils complémentaires cités : la microscopie optique et l'électropénétrographie.

Pour compléter l'analyse détaillée du suivi électrique des stylets sur une variété témoin de manioc, nous avons également suivi, par EPG, le comportement alimentaire de l'insecte sur des plantes hôtes et sur des plantes de substitution. Cette étude nous a permis de mieux identifier les compartiments tissulaires impliqués dans les mécanismes de fixation de l'insecte sur la plante.

Nous avons par ailleurs tenté de mettre en évidence des enzymes pectinolytiques dans les sécrétions salivaires de la cochenille, qui permettraient d'élargir la gamme des interactions physiques et chimiques plante-cochenille.

II Matériel et méthodes :

II.2 Matériel utilisé :

Matériel animal :

La souche de *P. manihoti* utilisée provient de la ceinture maraîchère de Brazzaville. Pour les expérimentations, les cochenilles, maintenues sur la variété M'pembe depuis 1985, sont élevées sous serre à 21-32 °C et 70 % d'hygrométrie relative moyenne (extrêmes : 60 % - 80 %). La photophase est de 12 heures.

L'absence de travaux sur l'étude, par EPG, du trajet des stylets de cochenilles, nous conduit à utiliser également deux autres Pseudococcides à des fins comparatives:

- "Ferrisia", une cochenille polyphage qui se développe également sur manioc : *Ferrisia virgata* Cock., Hom. Pseudococcidae ;

- "Rastrococcus", cochenille des arbres fruitiers : *Rastrococcus invadens* Williams, Hom. Pseudococcidae.

Les cochenilles "Ferrisia" utilisées sont des adultes que l'on retrouve occasionnellement fixées sur des maniocs de la variété M'pembe dans les parcelles du centre ORSTOM, tandis que les cochenilles "Rastrococcus" adultes proviennent d'un élevage pratiqué sous ombrière sur manguiers (variété indéterminée).

¹ Dans BING *et al.* (1991).

TABLEAU 1 : Résultat du classement des niveaux moyens d'infestation en conditions naturelles selon LE RÜ et coll. (1991) (la plante affectée de l'indice le plus faible hébergeant naturellement le moins de cochenille) :

| Espèce | Plante | Indice |
|-------------------------------------------|-------------------|--------|
| <i>E. pulcherrina</i> | poinsettia | 0 |
| <i>T. triangularae</i> | talinum | 0 |
| | Incoza | 1 |
| <i>M. esculenta</i> | Zanaga | 2 |
| | 30M7 | 3 |
| <i>M. esculenta</i> x <i>M. glaziovii</i> | "Faux caoutchouc" | 4 |

Matériel végétal :

Nous retenons dans cette étude cinq plantes qui sont des hôtes naturels de *P. manihoti* :

- quatre variétés de manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) : M'pembe, Incoza, Zanaga et 30M7, variétés issues de la collection du centre ORSTOM de Brazzaville ;
- le "Faux caoutchouc" (hybride: *M. esculenta* x *M. glaziovii* Mull. Arg., Euphorbiaceae) provenant de la ceinture maraîchère de Brazzaville, et fortement infesté tout au long de l'année.

Notons que pour étudier le trajet des stylets de *P. manihoti* dans le végétal, nous utilisons la variété de manioc M'pembe comme plante de référence, car c'est la variété de manioc la plus communément cultivée en milieu paysan dans la région du Pool au Congo. Elle constitue par ailleurs le support de l'élevage de masse de la cochenille au laboratoire. Cette variété est aussi utilisée pour le suivi électrique du trajet des stylets de *F. virgata*.

Deux plantes de substitution de *P. manihoti* sont également retenues dans notre étude:

- le poinsettia (*Euphorbia pulcherrina* Wild, Euphorbiaceae)
- le talinum (*Talinum triangularae* Jacq, Portulacaceae).

Rappelons qu'il est possible d'élever *P. manihoti* sur poinsettia au laboratoire (BOUSSIENGUET, 1984) et d'observer des infestations occasionnelles sur talinum en conditions naturelles (NEUENSCHWANDER et coll., 1986). Dans notre étude, ces plantes constituent des hôtes occasionnels pour la cochenille et sont appelées plantes de substitution.

Notons que pour suivre le comportement de *P. manihoti* sur plantes hôtes et sur plantes de substitution, nous utilisons toutes les plantes citées précédemment à l'exception du manioc variété M'pembe, car cette plante constitue le substrat d'origine de l'insecte en élevage et aurait à ce titre un statut particulier dans les expériences, puisqu'elle ne subirait aucun changement d'hôte (risque de préconditionnement, SCHOTZKO et SMITH (1991)). LE RÜ et coll. (1991) ont apprécié les niveaux moyens d'infestation naturelle des plantes que nous utiliserons dans cette étude. Leur travail basé sur une estimation visuelle de l'infestation naturelle, a permis de classer les génotypes sur une échelle de densité (tableau 1) (0 : pas d'infestation, 1 : infestation très faible à faible (1 à 25 cochenilles par plant), 2 : infestation faible à moyenne (26 à 50) ; 3 : infestation moyenne à forte (51 à 75) et 4 : infestation forte à très forte (> 75)). Selon cette expérience, l'indice 0 est attribué aux plantes pas ou peu infestées par la cochenille (talinum et poinsettia) et l'indice 4 à la plante fortement infestée tout au long de l'année (le "Faux caoutchouc") dans des conditions naturelles.

Toutes les plantes utilisées sont cultivées à l'extérieur en pot de 30 cm de haut et de 22 cm de diamètre. Pour toutes les expérimentations que nous décrivons par la suite, nous utilisons des plants âgés de 3 mois. Le suivi électrique des stylets de *R. invadens* nous conduit à utiliser une variété indéterminée de manguier en pot (30 x 22 cm) cultivée sous ombrière.

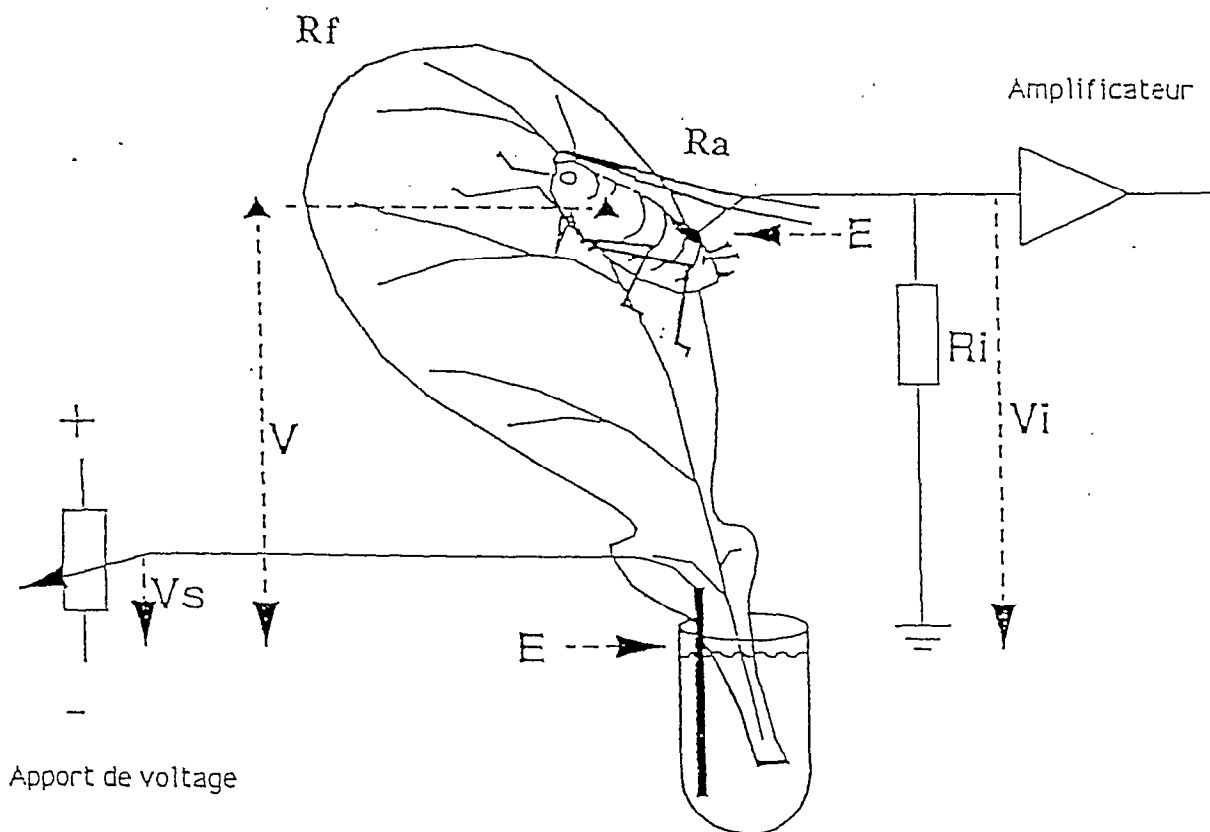


FIGURE 11 : Schéma du montage électrique du système DC de TJALLINGII (1985a).

V_s : potentiel ajustable appliqué à la plante ; V : potentiel du circuit ; E : potentiel de l'électrode ;
 V_i : potentiel du signal avant amplification ; R_a : résistance due à l'insecte ; R_i : résistance
à l'entrée de l'amplificateur ; R_f : résistance (négligeable) due à la feuille.

II.2 Méthodologie :

Microscopie optique :

Les apex de manioc, infestés de cochenilles de différents stades, sont sectionnés et plongés dans le liquide fixateur de Halmi (GABE, 1968). Cette solution est préparée avec 4,5 g de chlorure mercurique, 0,5 g de chlorure de sodium et 2,0 g d'acide trichloracétique que l'on dissout dans 80 ml d'eau. A ce volume, on ajoute 20 ml de formol et 10 ml d'une solution saturée en acide picrique. Après 24 heures de fixation, l'ensemble apex/insectes est déshydraté par des bains successifs d'alcools éthyliques (30' par bain) et d'alcool butylique I (24 h) puis imprégné de paraffine par trois bains de 30' chacun. Il est ensuite inclus dans la paraffine et, après solidification, les blocs ainsi formés sont coupés au microtome de type LKB (épaisseur de 7 μm). Les coupes obtenues sont déparaffinées par un bain de toluène pendant 5'. Elles sont ensuite réhydratées progressivement (2' par bains successifs d'alcool et d'eau). Puis, elles sont colorées pendant quelques minutes à la safranine, qui colore la gaine des stylets de l'Homoptère en rouge vif, ainsi que les parties lignifiées et subérifiées de la plante, puis au bleu de méthyle, pour colorer en bleu la cellulose (LOCQUIN et LANGERON, 1978). Après colorations, elles sont déshydratées dans deux bains successifs d'alcool butylique III et de toluène (2' par bain). Un montage au cedax entre lame et lamelle est alors réalisé pour permettre les observations sous microscope optique Leitz, de type Dialux 20.

L'électropénétrographie (EPG) :

Le montage employé est celui schématisé sur la figure 11. L'amplificateur EPG utilisé est le modèle "EPG 86" (Van de Pers Inc., The Netherlands). Lorsque les stylets de l'insecte sont insérés dans la feuille, le circuit électrique est clos. Les signaux, endogènes ou non, que l'on enregistre une fois amplifiés et qui apparaissent sous forme d'ondes sur un graphique de pénétration électrique résultent :

- des activités de pénétration des stylets qui engendrent des activités électriques ;
- de la résistance induite par l'insecte qui varie selon une source électrique exogène traversant les canaux des stylets.

Ces deux caractéristiques liées au montage constituent des informations biologiques intéressantes sur les activités de pénétration de l'Homoptère. C'est ainsi que TJALLINGII distingue actuellement au moins 8 types d'ondes, chacune étant caractéristique d'une activité de pénétration précise : contact des stylets avec l'épiderme (ondes A), salivations (ondes B et E2p), piqûre dans les cellules du parenchyme (ondes pd), ingestion passive dans le phloème (E2w), ingestion active dans le xylème (ondes G), etc... (tableau 2, figure 15).

Les cochenilles étudiées sont prélevées sur leur plante hôte. Sur chacune d'elles, un fil d'or (1-3 cm de long, 25 μm de diamètre) est collé à l'aide d'une laque d'argent à l'eau (Menk). Chaque insecte est ensuite connecté à un amplificateur et placé sur une feuille de la plante testée. L'ensemble plante (en pot) /insecte est situé dans une cage de Faraday pour filtrer les

bruits de fond extérieurs au montage parasites du réseau à 50 ou 60 Hz, et relié soit à un micro-ordinateur, soit à un enregistreur à bande passante adaptée (0-100 Hz)². La température durant l'enregistrement est de 21-32°C.

Mise en évidence d'enzymes pectinolytiques :

Nous utilisons le protocole mis au point sur *Shizaphis graminum* Rondani (Hom. Aphididae) par MA et coll. (1990), pour mettre en évidence 2 types d'enzymes présentes dans les sécrétions salivaires de puceron et hydrolysant les substances pectiques (les pectine-estérases et les polygalacturonases).

Des gels contenant 0,5 g d'agarose dans 4 ml d'eau stérile et 10 ml de solution de pectine à 0,5 % sont ajustés à différents pH (de 3,8 à 8,0) par une solution de soude. Les gels sont ensuite coulés sous hotte à flux laminaire dans des boîtes de Pétri vides stériles. Avant la solidification du gel, nous déposons sur chaque boîte coulée un film de parafilm, en évitant la formation de bulles d'air.

Cinquante à cent cochenilles aux stades L3 et L4 sont positionnées dans chacune des boîtes de Pétri préalablement préparées à différents pH. L'ensemble est laissé 24 heures sous serre à 21-32°C puis les surfaces des gels sont débarassées de leurs cochenilles par léger brossage. Après découpage du parafilm le long de la bordure des boîtes de Pétri, les gels sont imbibés de rouge de ruthénium à 0,02 % pendant 30 à 60 minutes. Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée et observés sous loupe binoculaire. En guise de contrôle, nous utilisons le même protocole, sans cochenilles mais avec deux enzymes commercialement disponibles (pectine-estérase E.C. 3-1-1-11, Sigma 9025-98-3 et polygalacturonase E.C. 3-2-1-15, Sigma 9032-75-1), ainsi qu'avec des broyats de cochenilles entières.

Comparaison par EPG du comportement de P. manihoti sur plantes hôtes et plantes de substitution :

Pour effectuer les enregistrements EPG (ou EPGgrammes), nous utilisons le même montage et le même protocole que précédemment. Pour chaque génotype testé, le début de l'enregistrement correspond au début de pénétration des stylets de l'insecte dans la plante. Le temps entre le positionnement de l'insecte sur la face supérieure de la feuille et la pénétration ou le début de l'enregistrement ou le temps 0 est variable (compris entre 10 minutes et 1 heure). Pour chaque génotype, 10 enregistrements sont effectués. L'enregistrement est poursuivi jusqu'à ce que l'insecte présente une longue piqûre dans le phloème d'une durée souvent supérieure à 4 heures. Seuls les EPGgrammes dont l'insecte accède à cette phase dans un temps inférieur à 48 heures sont considérés. Ceci explique, dans les résultats présentés ultérieurement, les nombres de répétition inférieurs à 10.

² Pour la description des signaux EPG, les signaux sont acquis et enregistrés à l'aide d'un système d'acquisition numérique PC de type KONTRON HPLC (logiciel MT450) relié au montage. Les enregistrements sont ensuite transférés dans un logiciel sur McIntosh (MacStylet, FEBVAY et coll., 1992). Pour la comparaison du comportement de *P. manihoti* sur plantes hôtes et non hôtes naturels, le montage EPG est relié à un enregistreur papier (0-75 Hz, Mini-writer, Ankersmit, GER).

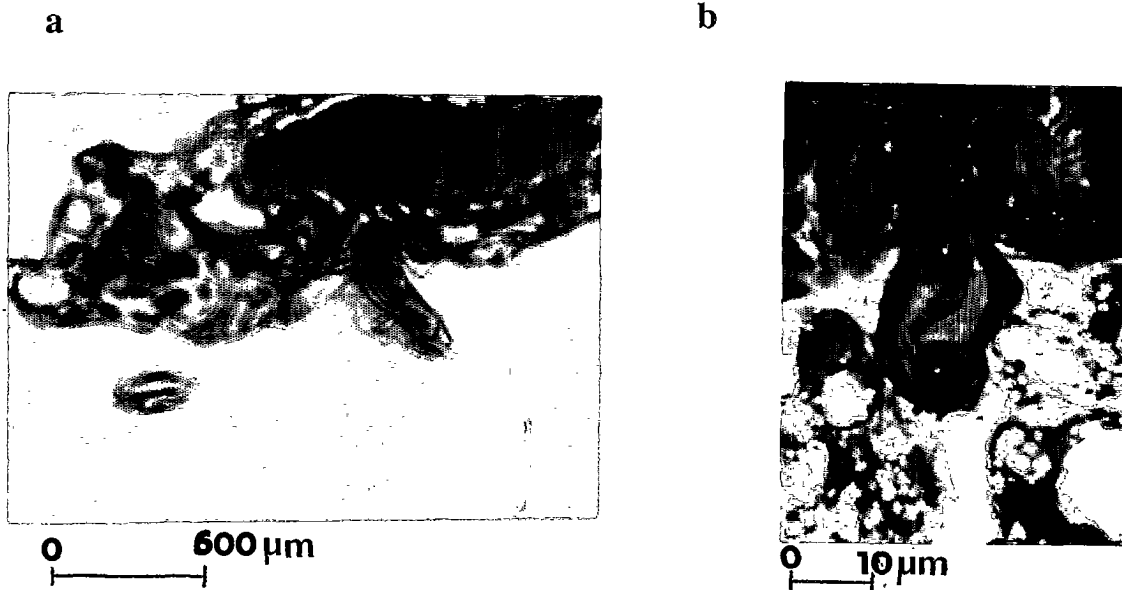


FIGURE 12 : a : Rapports généraux du labium (Lb) et des stylets (St) chez *Phenacoccus manihoti* (Cl : clipéus, Cr : crumena), b : Coupe transversale du faisceau des stylets repliés en boucle dans la crumena chez *P. manihoti*.

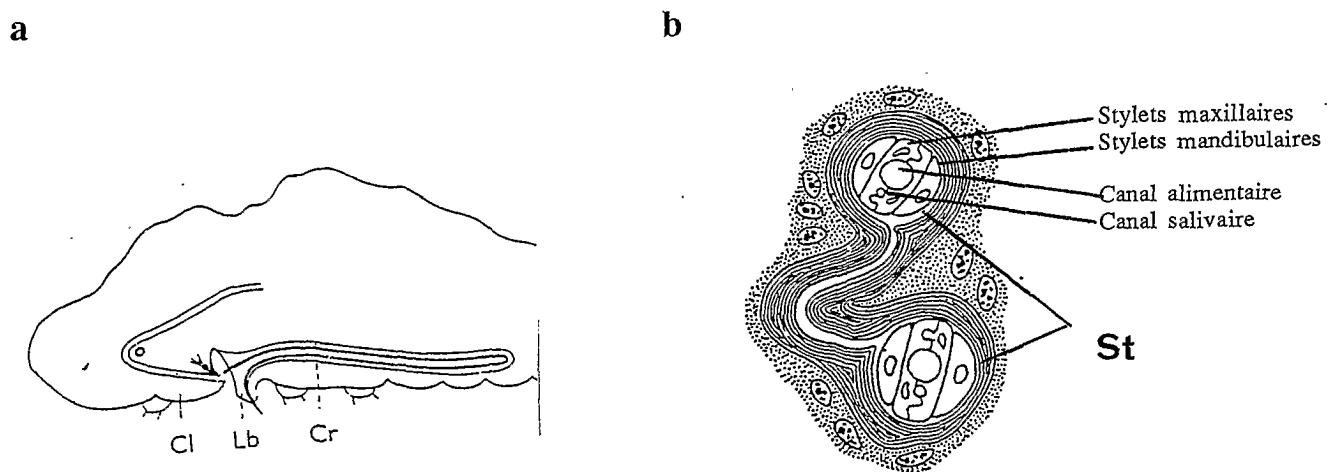
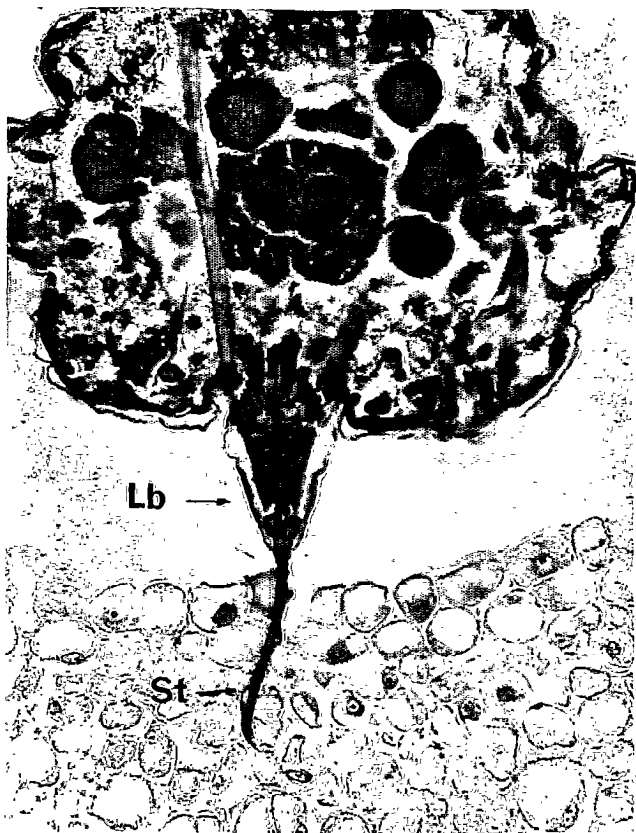
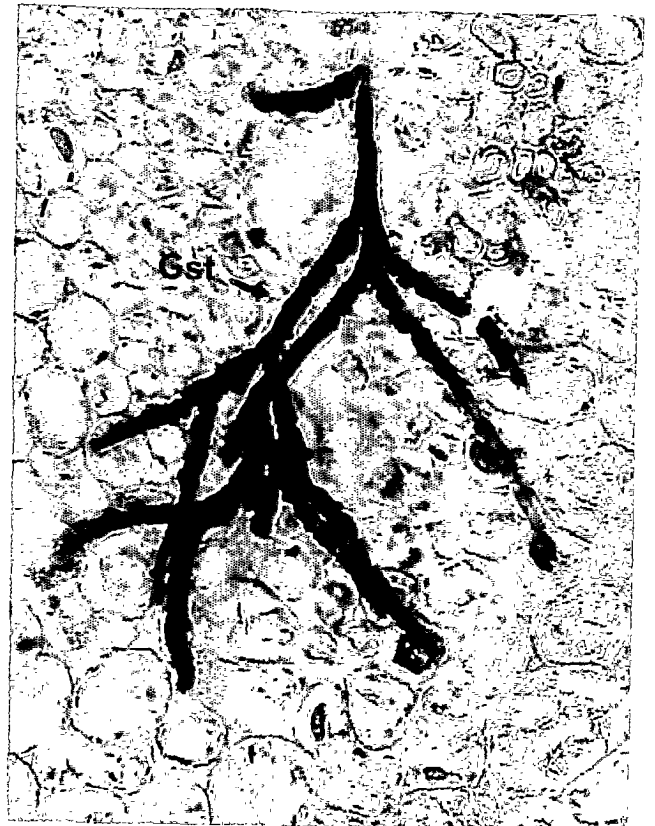


FIGURE 13 : a : Rapports généraux du labium (Lb) et des stylets (St) chez une femelle de Coccide (Cl : clipéus, Cr : crumena), b : Coupe transversale du faisceau des stylets repliés en boucle dans la crumena chez *Aulacaspis rosae* et *Pseudococcus adonidum* selon GRASSE (1951).

a



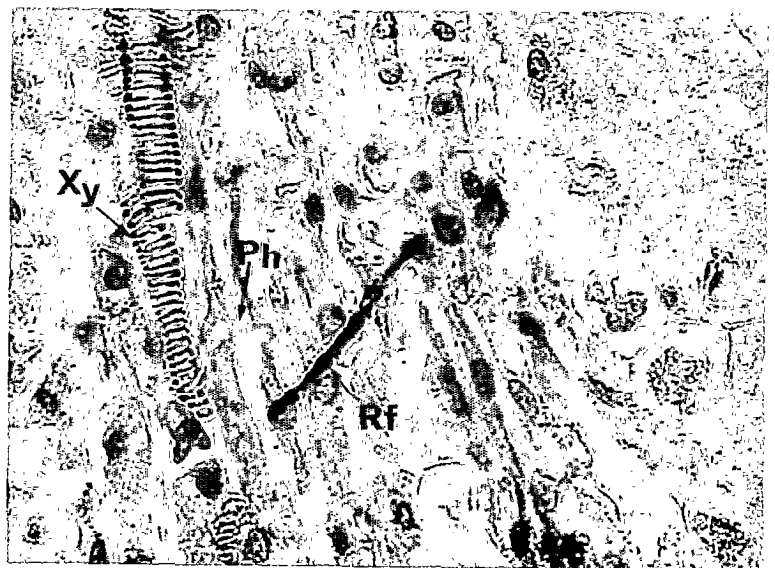
b



c



d



0 100 μm

FIGURE 14 : a : Vue transversale de la couche épidermique d'un apex de manioc et vue longitudinale du labium (Lb) et des stylets (St) de *Phenacoccus manihoti* ; b : Coupe transversale du parenchyme montrant un trajet inter et intracellulaire des stylets (Gst : gaine sétale) ; c : Coupe transversale du parenchyme montrant un trajet intercellulaire des stylets entourés de la gaine sétale ; d : Coupe longitudinale du parenchyme montrant une pénétration des stylets dans une cellule phloémienne (Ph)(Xy : xylème, Rf : renflement correspondant à l'arrêt de progression des stylets).

Les différents paramètres (voir paragraphe III.2) mesurés à partir des enregistrements obtenus pour les 6 plantes testées ne suivent pas la même distribution. Leurs valeurs brutes ne permettent généralement pas une analyse statistique paramétrique. De ce fait, nous analysons d'abord la variabilité des paramètres selon le génotype en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, approprié pour ce genre d'analyse. Pour chaque paramètre différent significativement selon le génotype, nous normalisons alors les valeurs selon la formule $\sqrt{X + 1}$. Cette normalisation permet la comparaison multiple des moyennes réalisée à la suite d'une analyse de variance et selon le test du PLSD de Fisher. Cette comparaison complémentaire au test de Kruskal-Wallis, nous permet d'apprécier quelles sont les moyennes qui ont fait apparaître une différence significative lors du test non paramétrique initial. Une simple corrélation de rangs de Spearman est ensuite effectuée pour comparer les valeurs des paramètres EPG et les indices présentés dans le tableau 1. Toutes ces analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un logiciel sur McIntosh (Statview[®]).

III Résultats et discussion :

III.1 Etude du trajet des stylets dans la plante :

Observation des coupes au microscope optique :

Les coupes longitudinales et transversales de la tête de *P. manihoti* présentées sur les figures 12a et b, montrent un rapport général du labium et des stylets similaire à celui déjà observé chez d'autres Pseudococcides (figures 13a et b) où les stylets sont repliés en boucle dans une loge ventrale du labium appelée *crumena*.

Sur les coupes de végétal (figures 14b,c et d), le trajet des stylets de *P. manihoti* est repéré par une coloration à la safranine. L'insertion des stylets dans les tissus végétaux s'accompagne du dépôt périodique de substances. Après retrait des stylets, ces substances persistent et constituent une gaine. Le trajet des stylets est visualisé grâce au caractère chromophile de la gaine. Cette gaine, dite parfois nutritive, résiduelle ou plus communément sétale, a d'abord été considérée comme le produit d'une réaction du végétal à la piqûre. Mais plusieurs travaux réalisés chez d'autres Homoptères montrent qu'elle provient surtout de l'insecte (GRASSE, 1951). Le rôle joué par la gaine sétale n'est toujours pas très clair. Selon une opinion communément admise, le guidage des stylets des Aphides jusqu'au phloème résulterait d'une combinaison éventuelle de stimuli chimiques et physiques. Divers auteurs suggèrent que les sécrétions salivaires, dont celles formant la gaine sétale, pourrait jouer un rôle important dans l'interaction plantes-Homoptères en facilitant l'atteinte et le retrait des stylets du phloème et en véhiculant des enzymes aux fonctions diverses (MILES, 1972, SRIVASTAVA, 1989, RAHBE et coll., 1993).

Après avoir pénétré la couche épidermique (figure 14a), les stylets de *P. manihoti* suivent principalement un trajet intercellulaire (figures 14b et c). On observe néanmoins des trajets

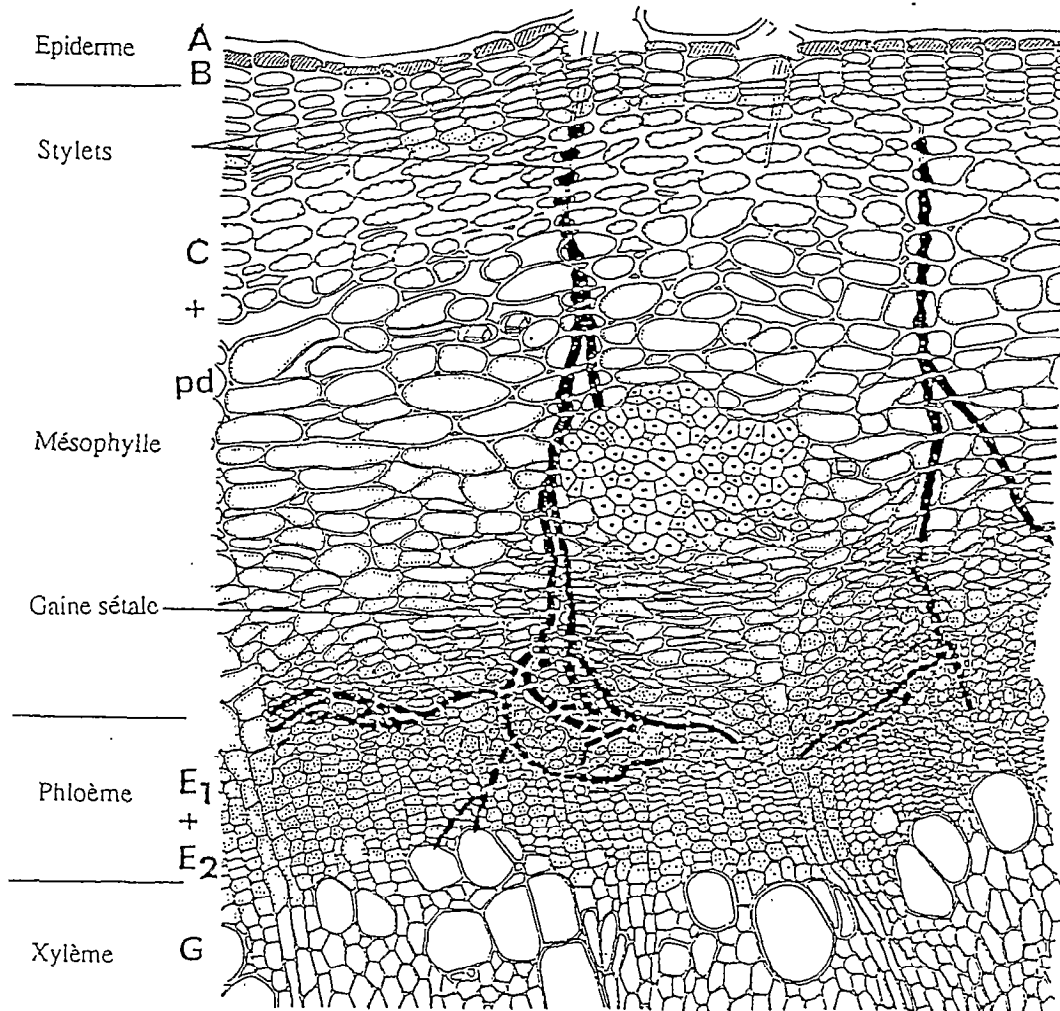


FIGURE 15 : Représentation simplifiée des corrélations entre les types d'ondes enregistrées sur un EPG et la localisation tissulaire des stylets (voir tableau 2).

TABLEAU 2 : Corrélations entre les types d'ondes enregistrées sur un EPG, la localisation tissulaire des stylets et les activités de pénétration des stylets de puceron d'après TJALLINGII (1990) :

| Désignation | Fréquence (Hertz) | Niveau électrique (2) (= localisation) | Corrélations | |
|-------------|----------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | | Tissus du végétal | Activités du puceron |
| A | 5 à 10 | e | épiderme | contact électrique des stylets |
| B | 0,2 à 0,3 | e | épiderme/mésophylle | salivation |
| C | très variable | e | tout tissu | enfoncement des stylets |
| pd | 0,02 | i | toute cellule vivante | piqûre de l'extrémité des stylets |
| E1 | 2 à 4 | i | tubes criblés - phloème | non déterminé |
| E1 | 2 à 4 | e | non déterminé | non déterminé |
| (1) E2 p | 0,5 à 4 | i | tubes criblés- phloème | salivation |
| w | 4 à 7 | i | tubes criblés - phloème | ingestion passive |
| F | 11 à 18 | e | tout tissu | travail mécanique des stylets |
| G | 4 à 6 | e | xylème | ingestion active |

(1) p= pics (peaks), w= ondes (waves)

(2): e=extracellulaire, i= intracellulaire.

apparemment intracellulaires, accompagnés de plusieurs courtes piqûres dans les cellules du mésophylle (figure 14b). Cependant, la faible résolution de la microscopie optique ne permet pas de conclure sur la réalité des trajets intracellulaires des stylets qui, d'ailleurs, est contestée. En effet, une meilleure résolution obtenue grâce à la microscopie électronique a permis de montrer que, chez certains pucerons, le trajet des stylets est essentiellement intramural-extracellulaire et plus rarement strictement intracellulaire vrai (SPILLER et coll., 1985). Seule la microscopie électronique, lourde à mettre en oeuvre, ou l'électropénétrographie, développée relativement récemment, permet de confirmer ou d'infirmer le caractère intracellulaire d'une piqûre.

Après la traversée du mésophylle, les stylets de *P. manihoti* atteignent les vaisseaux libéro-ligneux et généralement les cellules phloémiennes (figure 14d). L'arrêt de la progression des stylets et de la salivation de l'insecte est facilement visualisé par un renflement (figures 14b et d). Le cheminement complet des stylets de cochenille a été suivi sur 18 répétitions. Dans 77 % des cas, il semble se terminer dans une cellule phloémienne et dans 23 % des cas dans une cellule non phloémienne. Ce résultat illustre le caractère principalement phloémophage de *P. manihoti*. Le positionnement des stylets dans des cellules non phloémiennes pourrait représenter soit une nutrition non phloémienne, soit une étape transitoire des stylets avant l'atteinte du phloème.

Données de l'électropénétrographie (EPG) :

Les enregistrements obtenus en EPG permettent la visualisation de plusieurs type de signaux. Ceux-ci sont caractérisés par leur fréquence (s'ils montrent une périodicité), leur durée, leur niveau électrique, leur amplitude relative et leur origine électrique. Ce que l'on nomme "niveau électrique" de ces signaux peut varier par palier selon la position extra ou intracellulaire des stylets dans la plante. Ce changement brusque est interprété comme un reflet direct du potentiel transmembranaire des cellules végétales (TJALLINGII, 1985b). Il correspond à la traversée par l'extrémité des stylets d'une membrane biologique en activité. L'amplitude absolue d'un signal n'est pas constante et dépend de la conductance de l'électrode dorsale sur l'insecte et du courant appliqué entre la plante et l'insecte. C'est pour cette raison qu'est plutôt utilisée l'amplitude relative des signaux entre eux, généralement mesurée en référence à l'amplitude maximale observée sur un enregistrement (le plus souvent liée à l'onde A). L'origine électrique indique si le signal enregistré est dû à une résistance (R), une force électromotrice (emf) ou les deux (TJALLINGII, 1985a). Les ajustements externes de voltage qui n'affectent pas l'allure du signal indiquent que l'origine du signal est une force électromotrice (i.e. d'origine endogène). Au contraire, si le signal présente une réduction de son amplitude et une inversion lorsqu'on modifie le signe de la tension externe appliquée, alors son origine électrique est dite résistance (TJALLINGII, 1990a). La caractérisation des signaux a été très précisément décrite chez les pucerons et a permis d'effectuer des

TABLEAU 3 : Caractéristiques des signaux EPG obtenus sur la cochenille du manioc et corrélations avec les activités des stylets décrites chez les pucerons:

| Signaux | Caractéristiques | | | | | Corrélation avec les activités des stylets de pucerons (d'après TJALLINGII, 1990) |
|---------|---------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| | Parties éléments périodiques | Niveaux électriques (extra/intracellulaire) | Origine électrique | Fréquences (Hz) | Durées (s/h) | |
| A | | extra | nd (R?) | | var. (2-10 s) | établissement d'un contact électrique |
| C: | | extra | | | var. | activités extracellulaire des stylets et sécrétions salivaires |
| | CI | " | nd | | 2-5 s | |
| | <i>pics</i> | " | nd | 1-3 Hz | | |
| | <i>grandes ondes</i> | " | nd | 8-10 Hz | | |
| | CII | " | nd | 8-11 Hz | var. (2-5 s ou plus) | |
| | CIII | extra + 0* | nd (R?) | | var. (1-25 s) | |
| pd: | | intra | | | 17-23 s | courtes piqûres intracellulaires (5-7 s chez les pucerons) |
| | pd1 | " | | | 10-14 s | |
| | <i>pics</i> | " | emf | 1-2 Hz | | |
| | <i>grandes ondes</i> | " | | 13-15 Hz | | |
| | pd2 | " | R | 9-12 Hz | 5-14 s | |
| E: | | intra | | | | |
| | E1 | " | nd | | var. (30-75 s) | E1= piqûre des stylets dans une cellule phloémienne |
| | <i>pics</i> | " | | 1-2 Hz | | |
| | <i>grandes ondes</i> | " | | 10-12 Hz | | |
| | E2I | " | | | var. | E2= ingestion passive dans une cellule phloémienne |
| | <i>pics</i> | " | emf | 1-5 Hz | | |
| | <i>grandes ondes</i> | " | R | 8-11 Hz | | |
| | E2II | " | nd (R*) | 5-6 Hz | var. | |

*= voir le texte pour les commentaires, nd= non déterminé

corrélations convaincantes entre les types d'onde, la localisation tissulaire des stylets dans le végétal, et les activités des stylets de l'insecte (voir tableau 2 et figure 15).

Les tracés ou électropénétrogrammes obtenus chez la cochenille du manioc présentent de nombreuses analogies avec ceux obtenus et décrits chez les pucerons. De ce fait, pour décrire les signaux chez la cochenille, nous utiliserons la nomenclature définie sur le modèle puceron (tableau 3, figures 16 et 17).

Le premier signal observé en début de pénétration présente une grande amplitude, oscillant entre le niveau 0 et le plus haut niveau électrique obtenu au cours d'un enregistrement (la tension externe appliquée étant conventionnellement tenue positive). Ce signal ne dure en général que quelques secondes avant la transition vers le signal C ou un signal pd (potential drop = chute de potentiel) précoce, généralement atypique (figure 16(1)). Ce premier signal en début de pénétration peut être assimilé à un signal A classiquement observé chez les pucerons, résultant de l'établissement d'un contact électrique avec les tissus de la plante (TJALLINGII, 1990a). Le signal B observé chez les pucerons, correspondant à la première sécrétion salivaire de l'insecte, n'est pas clairement visible chez *P. manihoti*.

Le signal C (figure 16(1, 2, 3 et 4), qui apparaît comme chez les Aphides, entre deux chutes de potentiel, est composé dans ses portions stables de deux phases qui alternent à intervalle régulier de 0,1 Hz (que nous appelons respectivement C I et C II, figures 16(2, 3 et 4)). C I présente de plus grandes amplitudes électriques que C II. Dans C I, nous observons la présence de pics dont la fréquence est comprise entre 1 et 3 Hz, et des ondes (visibles aussi dans C II) dont la fréquence est comprise entre 8 et 10 Hz. Dans l'état actuel des connaissances, ces deux phases ne peuvent être interprétées précisément. Cependant, la corrélation entre le niveau électrique du signal C (extracellulaire) et le comportement de l'insecte peut être d'une part établie, et d'autre part justifiée par des observations en microscopie optique. En effet, le signal C est généralement maintenu pendant un temps considérable après le début de la pénétration des stylets dans la plante. Il doit correspondre à la fois à un trajet intercellulaire et à une sécrétion de la gaine sétale. Durant le signal C, il est possible d'observer une phase appelée C III présentant de grandes amplitudes électriques, et fréquemment visible avant une chute de potentiel. Cette phase présente certaines des caractéristiques du signal A et suggère, par la présence de pics négatifs oscillant jusqu'au niveau électrique 0, une possibilité de quasi-rupture du contact électrique entre l'insecte et la plante. Celle-ci pourrait être vraisemblablement due à une résistance électrique forte, induite par certains tissus végétaux, ou à une brève et importante constriction du canal alimentaire de l'insecte, comme celle pouvant résulter d'une composante de succion. Cette interprétation est toutefois très hypothétique et nécessiterait une confirmation expérimentale.

Durant le signal C, nous observons de courtes chutes de potentiel (pd). Comparativement aux Aphides où l'on observe plus de 55 pds par heure (KIMMINS et TJALLINGII, 1985, TJALLINGII, 1985b), la fréquence des pds est faible chez *P. manihoti* au cours d'un

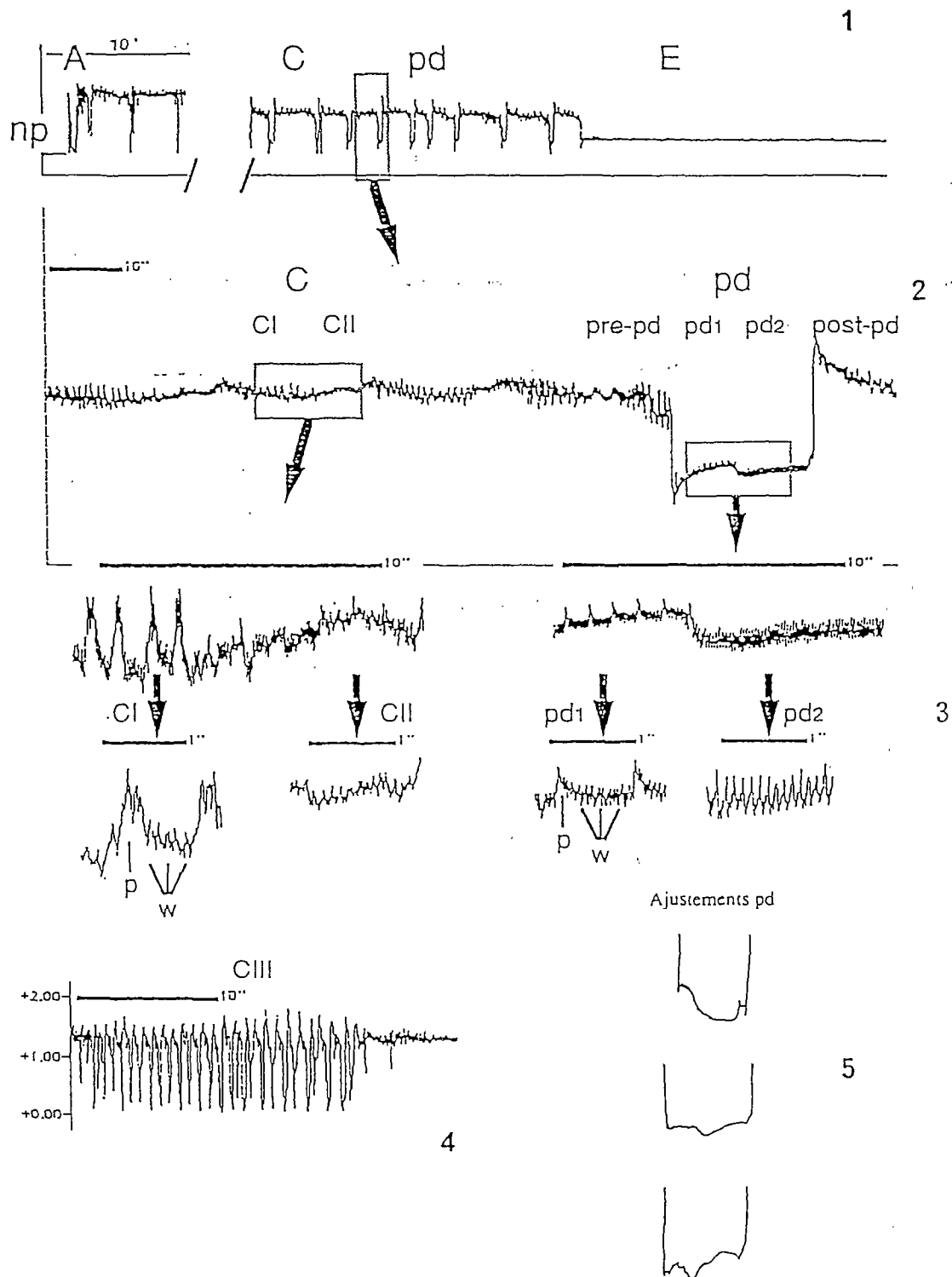
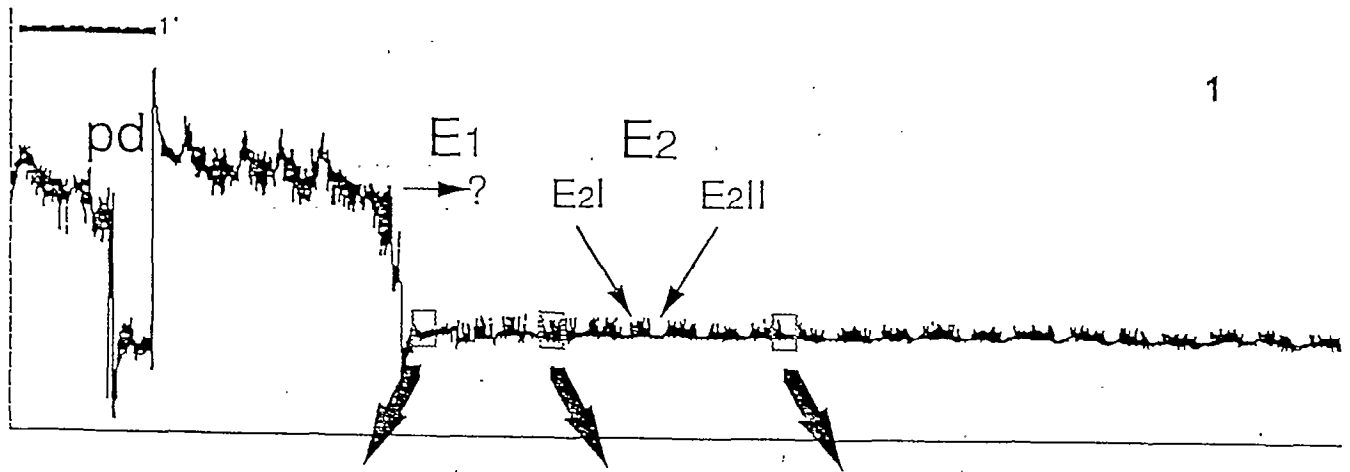
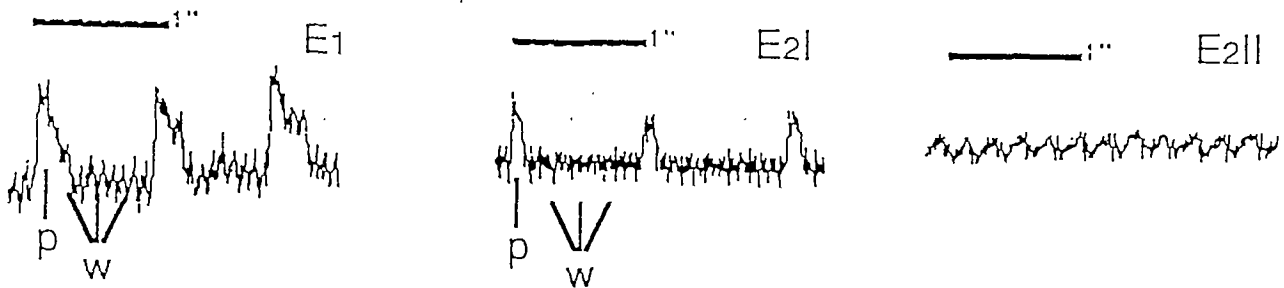


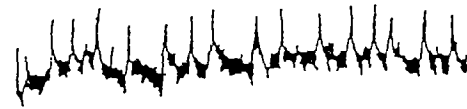
FIGURE 16 : 1 : Enregistrement EPG type obtenu chez *Phenacoccus manihoti* ; 2 : Signaux C et pd en détail ; 3 : Signaux CI, CII, pd1 et pd2 en détail ; 4 : Signal CIII en détail ; 5 : Ajustements électriques appliqués à la plante lors d'un signal pd (les parties (ici pd1) ne présentant pas une inversion correspondent à une origine électrique emf, alors que les parties (ici pd2) présentant une inversion correspondent à une origine résistance).



1



2



3

FIGURE 17 : 1 : Enregistrement EPG type obtenu chez *Phenacoccus manihoti* montrant les signaux E1 et E2 ; 2 : Signaux E1, E2I et E2II en détail ; 3 : Ajustements électriques appliqués à la plante lors d'un signal E2I (les parties (ici les pics mentionnés p) ne présentant pas une inversion correspondent à une origine électrique emf).

enregistrement (de 15 à 20 pds par heure). Néanmoins, elle est plus élevée que celle obtenue chez *Trialeurodes vaporariorum* Westw. (Hom., Aleyrodidae) où les enregistrements EPG ne montrent que 3 pds par heure (JANSSEN et coll., 1989). Cependant, les durées des pds chez *P. manihoti* indiquent un temps de contact non négligeable avec le contenu intracellulaire des cellules du mésophylle, plus important que celui enregistré chez les Aphides et même chez les Aleurodes. En effet, elle est notablement plus longue chez *P. manihoti* (20 s en moyenne ; N = 20 ; ES = 0,6³) que chez les Aphides (5 à 7 s en moyenne), ou chez les Aleurodes (14 s en moyenne). Cette observation reste valable pour les deux autres espèces de Pseudococcides (*Ferrisia virgata* sur manioc variété M'Pembe et *Rastrococcus invadens* sur Manguier) pour lesquelles les électropénétrogrammes obtenus montrent des durées moyennes des signaux pds de 15,1 s (N = 8 ; ES=0,5³) et de 19,8 s (N = 6 ; ES=1³) respectivement.

L'observation détaillée du signal pd chez *P. manihoti* fait apparaître 4 phases distinctes (figures 16(1, 2, 3 et 4)) :

- pré-pd, qui pourrait correspondre à une activité de salivation de l'insecte avant la piqûre intracellulaire ;
- pd1 présentant des pics (p) ayant une origine électromotrice (emf) dont la fréquence est comprise entre 1 et 2 Hz, ainsi que des ondes (w) d'environ 14 Hz ;
- pd2, encadrée par une légère modification du niveau de potentiel d'origine résistive, et présentant des ondes de moyenne amplitude et d'une fréquence d'environ 10-11 Hz ;
- post-pd, souvent semblable à une reprise de la phase pd1 mais à un niveau électrique extracellulaire.

Comme pour les pucerons (TJALLINGII, 1985b), la corrélation du signal pd avec le comportement de la cochenille (tableau 3) est faite à partir du niveau électrique du signal pd (niveau intracellulaire) indiquant une pénétration des stylets dans une cellule vivante.

La transition du signal C au signal E est caractérisée par une chute de potentiel maintenue souvent plus de 10 minutes (figures 16(1) et 17(2)). E est caractérisée par 2 phases nommées E1 et E2 par analogie avec la situation prévalant chez les pucerons (figure 17(1)). E1 apparaît très instable et ne dure en général pas plus de 2 minutes. Elle présente souvent des pics de forme rectangulaire dont la fréquence est comprise entre 1 et 2 Hz (figure 17(2)). Cette phase est assez semblable à ce que nous observons au cours de la première période d'un signal pd (pd1). Cependant, ces similarités doivent être étudiées plus en détail avant de suggérer une activité identique de l'insecte au cours de ces signaux. E1 laisse progressivement la place à une phase périodique plus stable appelée E2. Dans cette dernière phase, nous distinguons parfois deux sous phases, avec des pics issus d'une composante emf (dans la partie E2I, voir figures 17(2) et (3)). Leur fréquence est comprise entre 1 et 2 Hz en début de piqûre et augmente souvent jusqu'à 3 et 4 Hz au cours du temps. Nous observons également dans E2 des ondes assez irrégulières dues à une résistance ou à une composante emf (dans la partie

³ N: nombre de répétition et ES: erreur standard.

E2II, voir figures 17(1) et (2)). Les deux sous phases, appelées E2I et E2II alternent constamment en début du signal E2 (figure 17(1)), puis c'est E2I qui semble prédominer (non visible sur les figures). Les pics (correspondant à une origine électrique emf) observés au cours de ce signal voient souvent leur amplitude diminuer pour ne laisser visible que les ondes (notées w) constitutives de E2I. Ces phases ne peuvent pas être actuellement interprétées de façon précise, mais comme pour les pucerons (KIMMINS et TJALLINGII, 1985), le signal E est considéré comme une pénétration dans une cellule phloémienne avec ingestion (tableau 2). Pour la cochenille du manioc, cette interprétation se fonde sur deux observations:

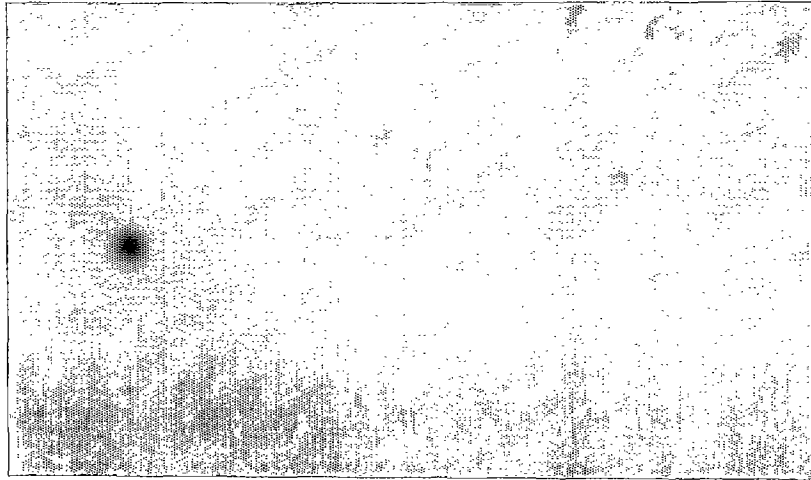
i) le niveau de potentiel électrique correspond à un niveau intracellulaire et reste maintenu au même niveau pendant tout le signal E, d'une durée souvent très longue (KIMMINS et TJALLINGII, 1985) ;

ii) une production de miellat est toujours observée durant ce signal.

Les autres signaux (F et G), décrits chez les pucerons, ne sont pas clairement observés chez la cochenille. Néanmoins, quelques électropénétrogrammes obtenus sur *P. manihoti*, montrent des signaux analogues au signal G (qui correspond, rappelons le, à une ingestion active dans le xylème). Il est également possible d'observer chez la cochenille, un signal E2II à un niveau électrique extracellulaire pouvant être assimilé au signal E(c) chez le puceron. Ces observations sont cependant trop anecdotiques pour pouvoir être vraiment significatives.

En dépit de la ressemblance globale entre les enregistrements EPG de la cochenille et du puceron, il existe des différences notables concernant la durée de piqûre dans des cellules non phloémiennes avant le signal E, cette dernière étant bien plus longue chez les cochenilles que chez les pucerons. Ceci pourrait être expliqué par une éventuelle ingestion du contenu des cellules du mésophylle, comme c'est le cas pour quelques Diaspidés (FOLDI, 1990). Chez *P. manihoti* une autre observation vient conforter cette hypothèse. La présence de pics de fréquences similaires dans les phases pd1 et E1 suggère que ces composantes emf, liées à l'activité de l'insecte, pourraient correspondre à une ingestion du contenu cellulaire de cellules non phloémiennes. Alors que CAMPBELL et DREYER (1985) suggèrent qu'avant l'atteinte du phloème, le puceron doit limiter son temps de contact avec le contenu intracellulaire du mésophylle, notre travail montre éventuellement un intérêt particulier des Pseudococcides pour ce tissu (ou en tout cas plus important que chez les Aphides). A la lumière de ces résultats, il est tentant de supposer que des facteurs liés à la composition biochimique des cellules du mésophylle puissent être impliqués dans les mécanismes de fixation de la cochenille sur la plante. Ceci a d'ailleurs même été suggéré pour les pucerons par certains auteurs, bien que cette phase de pénétration soit très réduite chez ces derniers (MONTLLOR et TJALLINGII, 1989, HARREWIJN, 1990).

a



b



0 ——— 2mm

FIGURE 18 : a : Halos concentriques rouges dans le gel d'agarose, dus à la présence de pectine-estérases dans les sécrétions salivaires de *Phenacoccus manihoti* ; b : Halos concentriques rouges dans le gel d'agarose, dus à la présence de pectine-estérases dans les broyats de cochenilles entières.

Mise en évidence d'enzymes pectinolytiques :

Quelque soit le pH du gel utilisé, l'activité pectine-estérasique est détectée dans les sécrétions salivaires de *P. manihoti* (figure 18a). Les broyats de cochenille, testés dans les mêmes conditions, révèlent aussi la présence de pectine-estérases chez la cochenille (figure 18b). Cependant, nous n'avons pas pu révéler la présence de polygalacturonases selon le même protocole.

La mise en évidence d'enzymes pectinolytiques chez *P. manihoti*, en l'occurrence une pectine-estérase, indique que la cochenille, avant l'atteinte du phloème, est capable de dégrader en partie la paroi pecto-cellulosique et donc de faciliter les mouvements de ses stylets dans un espace extracellulaire. L'importance d'enzymes pectinolytiques salivaires chez les Homoptères a souvent été évoquée. Par exemple, CAMPBELL et DREYER (1985) montrent que le degré de sensibilité du sorgho est associé à la possibilité d'hydrolyse de substances pectiques par des polysaccharases présentes dans les sécrétions salivaires de *Schizaphis graminum* Rondani (Hom. Aphididae). Ces auteurs rapportent en outre que ces insectes montrent une meilleure fixation sur feuilles excisées ou sénescences. Ceci résulterait d'un accès au phloème facilité par une dépolymérisation de la matrice polysaccharidique de la paroi cellulaire, due aux enzymes de sénescence. Cette dépolymérisation pourrait intervenir dans le processus normal de fixation de l'insecte sur la plante et le guidage des stylets jusqu'au phloème. Cependant, si nous considérons la cinétique de pénétration des stylets d'Homoptère en EPG et la cinétique enzymatique, il apparaît peu probable que les sécrétions salivaires permettent à elles seules d'expliquer le trajet intercellulaire des stylets, observé en EPG lors de la pénétration. GRASSE (1951) rapporte que la chitine des stylets est à la fois dure, souple, élastique et très ductile, qualités suffisantes pour permettre la transmission des forces physiques nécessaires à la pénétration extracellulaire. L'appoint des activités pectinolytiques pourrait par contre s'avérer utile lors du retrait partiel des stylets et pour faciliter les changements fréquents d'orientation dont témoignent les gaines salivaires hautement branchées, du type de celle présentée en figure 14b.

III.2 Comparaison par EPG du comportement de *P. manihoti* sur plantes hôtes et sur plantes de substitution :

Pour analyser le comportement de *P. manihoti* sur plantes hôtes et de substitution par électropénétrographie, il a fallu choisir les paramètres qui permettent de qualifier ou de quantifier la pénétration des stylets pour chaque enregistrement (nombre, durées unitaires ou totales des différentes phases). TJALLINGII (1990b) a cité 4 paramètres communément utilisés dans l'étude des mécanismes de fixation par EPG : nombre de piqûres, durée des piqûres, durée d'ingestion dans le phloème, temps entre le début de la piqûre dans la plante et la pénétration dans le phloème. Mais cet auteur précise que d'autres paramètres peuvent être retenus. En fait, la richesse de l'information apportée par l'analyse dépend du nombre de

TABLEAU 4 : Paramètres EPG utilisés pour étudier le comportement alimentaire de la cochenille :

| Abbréviations | Description des paramètres | Unités |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------|----------|
| t-Ei | temps jusqu'à la première piqûre dans le phloème | heures |
| n-E | nombre des piqûres dans le phloème (dernière exclue) | # |
| d-E | durée totale des piqûres dans le phloème (dernière exclue) | heures |
| ds-pd | durée de piqûre dans une cellule non phloémienne | secondes |
| ds-pd1 | durée du signal pd1 dans pd | secondes |
| ds-pd2 | durée du signal pd2 dans pd | secondes |
| d-C | durée totale du signal C | heures |
| n-np | nombre des non pénétrations | # |
| d-np | durée totale des non pénétrations | heures |
| n-pen(E) | nombre des pénétrations avec piqûre dans le phloème (dernière exclue) | # |
| n-pen(xE) | nombre des pénétrations sans piqûre dans le phloème | # |
| d-pen(E) | durée totale des pénétrations avec piqûre dans le phloème (dernière exclu) | heures |
| d-pen(xE) | durée totale des pénétrations sans piqûre dans le phloème | heures |

variables interprétées (à condition évidemment qu'elles ne soient pas trop corrélées) et de la capacité à pouvoir exploiter toute l'information fournie.

Pour chaque enregistrement obtenu, treize paramètres sont retenus (voir tableau 4). Les paramètres que nous choisissons peuvent être reliés à un comportement plus ou moins précis de l'insecte (TJALLINGII, comm. pers.) :

- n-np, d-np : variables liées à une activité extérieure ;
- d-C : variable liée au trajet intercellulaire des stylets ;
- ds-pd, ds-pd1, ds-pd2 : variables liées à une piqûre intracellulaire d'une cellule non phloémienne ;
- t-Ei, n-E, n-pen(E), d-pen(E), n-pen(xE), d-pen(xE) : variables liées à l'accès au phloème (où "pen(E)" désigne une pénétration "efficace" avec piqûre dans le phloème et "pen(xE)" une pénétration "inefficace" sans piqûre dans le phloème) ;
- d-E : variable liée à ou aux piqûres intracellulaires de cellules phloémiennes.

Rappelons que pour chaque enregistrement EPG, nous effectuons les mesures jusqu'à une pénétration dans le phloème d'une durée supérieure à 4 heures. Ainsi, les temps d'enregistrement sur lesquels les mesures sont faites sont variables d'un électropénétrogramme à un autre. C'est pour cela que nous avons aussi calculé et utilisé les paramètres d-C, n-np, d-np, n-pen(E), n-pen(xE), d-pen(E) et d-pen(xE) arbitrairement sur les dix premières heures d'enregistrement (notés param.-10).

Les moyennes des paramètres mesurés sur les électropénétrogrammes obtenus sur 4 maniocs et 2 plantes de substitution sont présentées dans le tableau 5. Notons que le temps d'accès au phloème (t-E) n'est pas calculé et peut être assimilé ici au paramètre t-Ei, défini comme le temps d'accès à la première phase suggérant une piqûre et une ingestion phloémienne (i.e. durée de la phase > 10 minutes). Le test de Kruskal-Wallis montre que seuls les paramètres ds-pd, ds-pd1, ds-pd2, n-pen(xE) et d-pen(xE) diffèrent significativement entre les plantes au seuil de 5 %. Il paraît cependant utile de noter que le nombre de répétitions disponibles est relativement faible pour ce type d'analyses (le nombre nécessaire pour des pucerons est, par exemple, estimé entre 10 et 15 répétition, selon TJALLINGII -comm. pers.-). Pour certains paramètres ayant une forte variabilité (t-Ei, d-E, n-np) cela s'avère malheureusement insuffisant pour mettre en évidence des différences à notre avis biologiquement significatives, telles que le reflète l'analyse des moyennes. En effet, une corrélation de rangs de Spearman entre chaque paramètre EPG mesuré (tableau 5) et les indices des niveaux moyens d'infestation naturelle (tableau 1) fait apparaître que la meilleure corrélation est obtenue pour le paramètre t-Ei ($\rho = -0,928$, $p = 0,038$). Ce résultat suggère que les interactions pré-phloémiennes entre les stylets et les tissus de la plante, ainsi qu'un comportement de rejet précoce dû aux délais d'atteinte du phloème semblent conditionner la fixation de l'insecte sur le végétal.

TABLEAU 5 : Moyennes des paramètres mesurés sur les électropénétragrammes de la cochenille obtenus sur les six plantes testées (moyenne \pm erreur standard (nombre de répétitions)):

| | Plantes | <i>poinsettia</i> | <i>talinum</i> | Incoza | Zanaga | 30M7 | "faux caoutchouc" | p du test ** (Kruskal-Wallis) |
|-----------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|
| | Réplications (sauf pour pd) | 4 | 6 | 6 | 3 | 4 | 6 | |
| Paramètres EPG * | | | | | | | | |
| <i>Sur tout l'enregistrement (temps var.)</i> | | | | | | | | |
| Phloème | t-Ei | 9,2 \pm 3,1 | 10,8 \pm 3,5 | 7,9 \pm 4,3 | 4,9 \pm 1,2 | 1,9 \pm 0,4 | 3,9 \pm 0,8 | 0,46 |
| | n-E | 3,0 \pm 1,1 | 1,1 \pm 0,6 | 5,5 \pm 2,2 | 4,0 \pm 1,7 | 4,0 \pm 2,8 | 2,1 \pm 0,7 | 0,45 |
| | d-E | 0,2 \pm 0,1 | 1,6 \pm 1,0 | 3,8 \pm 1,2 | 4,0 \pm 0,3 | 5,1 \pm 3,1 | 2,6 \pm 1,5 | 0,47 |
| Piqûre intracellulaire non phloémienne | ds-pd | ab 18,5 \pm 0,5 (25) | a 17,2 \pm 1,1 (15) | nd | bc 20,4 \pm 0,6 (25) | c 21,2 \pm 1,1 (12) | bc 19,1 \pm 0,5 (25) | 0,0087 |
| | ds-pd1 | b 10,0 \pm 0,3 (19) | a 8,6 \pm 0,4 (15) | nd | ab 9,4 \pm 0,3 (16) | c 11,5 \pm 0,6 (12) | b 9,8 \pm 0,3 (24) | 0,0001 |
| | ds-pd2 | a 8,1 \pm 0,5 (19) | a 8,0 \pm 0,9 (15) | nd | b 11,0 \pm 0,7 (16) | ab 9,7 \pm 1,3 (12) | a 8,2 \pm 0,4 (24) | 0,029 |
| Trajet intercellulaire des stylets | d-C | 9,9 \pm 2,7 | 11,4 \pm 3,4 | 9,7 \pm 2,4 | 4,5 \pm 0,4 | 6,0 \pm 2,9 | 6,7 \pm 1,6 | 0,52 |
| Sortie des stylets | n-np | 11,7 \pm 4,9 | 9,3 \pm 2,9 | 5,1 \pm 1,7 | 0 | 2,2 \pm 1,0 | 5,3 \pm 1,6 | 0,065 |
| | d-np | 1,3 \pm 0,4 | 1,4 \pm 0,6 | 1,7 \pm 0,8 | 0 | 0,5 \pm 0,1 | 0,4 \pm 0,2 | 0,089 |
| Piqûre phloémienne efficace | n-pen(E) | 1,5 \pm 0,3 | 0,8 \pm 0,4 | 1,8 \pm 0,7 | 1 | 0,7 \pm 0,5 | 1,0 \pm 0,2 | 0,68 |
| Piqûre phloémienne inefficace | n-pen(xE) | c 10,2 \pm 4,7 | c 9,2 \pm 2,2 | bc 3,5 \pm 1,3 | a 0 | ab 1,2 \pm 0,6 | ab 4,6 \pm 1,3 | 0,026 |
| | d-pen(E) | 3,6 \pm 0,6 | 3,3 \pm 2,0 | 11,4 \pm 2,8 | 17,5 \pm 4,3 | 11,7 \pm 6,9 | 7,0 \pm 2,2 | 0,15 |
| | d-pen(xE) | b 7,8 \pm 3,6 | b 10,9 \pm 2,5 | ab 6,3 \pm 2,4 | a 0 | a 0,8 \pm 0,6 | ab 3,0 \pm 0,7 | 0,035 |
| <i>Sur les 10 premières heures</i> | | | | | | | | |
| | d-C-10 | c 5,9 \pm 1,2 | c 5,6 \pm 0,8 | bc 3,7 \pm 0,5 | ab 2,5 \pm 0,9 | a 1,5 \pm 0,4 | bc 4,3 \pm 0,4 | 0,02 |
| | n-np-10 | c 9,0 \pm 3,7 | bc 6,0 \pm 1,8 | ab 2,5 \pm 0,8 | a 0 | a 0,2 \pm 0,2 | abc 3,8 \pm 1,4 | 0,017 |
| | d-np-10 | 1,0 \pm 0,3 | 0,9 \pm 0,4 | 0,7 \pm 0,3 | 0 | 0,2 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | 0,073 |
| | n-pen(E)-10 | 1,0 \pm 0,4 | 0 | 1,0 \pm 0,5 | 1 | 0,5 \pm 0,3 | 1,0 \pm 0,2 | 0,086 |
| | n-pen(xE)-10 | c 8,2 \pm 3,7 | bc 6,8 \pm 1,5 | a 2,1 \pm 0,8 | a 0 | a 0,2 \pm 0,2 | ab 3,5 \pm 1,2 | 0,011 |
| | d-pen(E)-10 | ab 1,4 \pm 0,8 | a 0 | ab 3,7 \pm 1,8 | c 9,7 \pm 0,3 | bc 5,0 \pm 2,9 | bc 4,8 \pm 1,1 | 0,031 |
| | d-pen(xE)-10 | bc 5,5 \pm 2,2 | c 6,5 \pm 1,4 | abc 3,9 \pm 1,6 | a 0 | a 0,1 \pm 0,1 | ab 2,4 \pm 0,7 | 0,022 |

* voir le tableau 3, pour la définition des paramètres EPG.

** pour chaque ligne dont $p < 0,05$, une comparaison de moyennes deux à deux est effectuée selon le test du PLSD de Fisher.

Les moyennes précédées d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %.

Si on compare les plantes par statut d'hôte, on s'aperçoit que sur manioc (plantes hôtes naturelles) les durées des pds sont plus longues (20-21 s) que sur poinsettia et talinum (plantes de substitution), où les durées des pds sont comprises entre 17 et 18 s. Quant à l'hybride utilisé ("Faux caoutchouc"), l'insecte y présente des durées intermédiaires entre plantes hôtes naturelles et de substitution. Cette séparation, par statut d'hôte, n'est cependant qu'imparfaitement réalisée par la comparaison multiple de moyennes, selon le test du PLSD de Fisher (tableau 5). Par contre, les paramètres $n\text{-pen}(xE)$ et $d\text{-pen}(xE)$, ont des valeurs significativement plus grandes sur plantes de substitution que sur plantes hôtes naturelles. Ces derniers paramètres, traduisant des difficultés d'accès au phloème, pourraient logiquement dépendre de facteurs physiques ou chimiques défavorables du mésophylle.

Analysés sur les dix premières heures d'enregistrement, les paramètres EPG permettent une meilleure discrimination des comportements sur les différents hôtes. Ceux relatifs à une pénétration sans piqûre dans le phloème diffèrent significativement pour un seuil de 5 % selon le statut d'hôte de la plante. Il en est de même ici pour le paramètre $d\text{-C}$. Tous ont des valeurs plus grandes sur plantes non hôtes naturels. Notons que le paramètre $d\text{-C}$ mesuré correspond en réalité aux durées totales des signaux C + pds. Ces résultats indiquent que le temps de séjour dans le mésophylle est plus important lorsque la cochenille est sur une plante de substitution. Ces observations peuvent résulter des propriétés physiques du mésophylle, différentes selon la plante, mais peuvent aussi être le reflet d'une réponse différente de l'insecte aux caractéristiques chimiques de ce tissu. Il est utile de rappeler ici que, dès (1944), PESSON montre que les stylets des femelles de Coccoïdae ne possèdent pas de terminaison nerveuse sensorielle à fonction gustative. Des travaux plus récents rapportent la même constatation chez les pucerons (TJALLINGII, 1978b, BACKUS, 1988). La fonction gustative serait réduite dans ces groupes à des récepteurs épipharyngiens, situés donc à la base des stylets dans la cavité buccale. Or, chez *P. manihoti*, bien que l'insecte soit principalement phloémophage, la durée des piqûres intracellulaires de cellules non phloémiennes en début de pénétration permet un temps de contact non négligeable de l'insecte avec des substances intracellulaires (probablement plus importante que pour les Aphides et les Aleurodes). Il est donc possible que les composés intracellulaires (et principalement vacuolaires, comme les glycosides phénoliques ou les composés cyanés spécifiques au manioc) jouent un rôle important dans la reconnaissance cochenille/manioc. Dans le chapitre IV, nous tenterons de relier le niveau foliaire en ces substances secondaires avec les paramètres EPG mesurés ici.

IV Conclusions :

Dans cette étude, l'utilisation simultanée de la microscopie optique et de l'EPG a permis de confirmer que *P. manihoti* est un insecte principalement et sans doute assez strictement phloémophage. En effet, les enregistrements EPG obtenus ont montré, sur les maniocs, qu'en

début de pénétration (moins de 48 heures d'enregistrement) 80 % de la durée totale de piqûre intracellulaire est représentées par une pénétration des stylets dans une cellule phloémienne et 20 % dans une cellule non phloémienne.

Alors que, dans la littérature, beaucoup d'auteurs tentent de relier les paramètres mesurés en EPG avec la résistance des plantes contre l'attaque de ravageurs (résistance au sens large), peu d'auteurs ont pu les relier avec la résistance étroitement impliquée dans la fixation de l'insecte, comme nous l'avons fait ici.

Les temps d'accès au phloème et les échecs de pénétration dans le phloème, dépendent du statut d'hôte de la plante. Ils sont plus importants sur plantes de substitution que sur plantes hôtes naturelles. Ces résultats suggèrent que des interactions pré-phloémiennes entre les stylets de l'insecte et les tissus du végétal puissent conditionner la fixation de *P. manihoti*. L'observation des temps de contact de l'insecte avec le contenu intracellulaire des cellules du mésophylle, sensiblement plus longs que pour les pucerons et plus important sur plantes de substitution, a permis également de suggérer que le contenu intracellulaire du mésophylle puisse être impliqué pour une bonne part dans les mécanismes de fixation de *P. manihoti* sur la plante. De plus, la révélation d'enzymes pectinolytiques salivaires indique qu'après la pénétration des stylets dans le végétal, ces enzymes participent vraisemblablement à la formation d'une gaine sétale extracellulaire. Leur existence permet d'attribuer un rôle non négligeable aux propriétés à la fois physiques et chimiques de la paroi du mésophylle dans les processus de fixation de l'insecte sur la plante.

CHAPITRE III : ETUDE DE CERTAINS ASPECTS DE
LA NUTRITION DE *P. manihoti*

I Introduction :

Les besoins nutritifs d'un insecte peuvent être appréciés en analysant son substrat nutritif, et précisés en utilisant des milieux artificiels. Chez les Homoptères, une bonne connaissance de la composition et de la teneur en nutriments primaires de la sève phloémienne permettrait de mieux comprendre la nutrition de ces insectes. Ce compartiment est malheureusement d'accès difficile. Les Aphides, qui sont les Homoptères les plus étudiés, rejettent une bonne quantité de leurs nutriments énergétiques, car une part importante de sève qu'ils ingèrent est excrétée. Ceci serait une conséquence du faible niveau en acides aminés libres et du haut niveau en saccharose, caractéristique de la sève phloémienne qu'ils ingèrent (DIXON, 1975). De nombreux travaux ont montré l'importance des taux respectifs de sucres et d'acides aminés libres, ainsi que de la balance en acides aminés libres de la sève dans la nutrition des pucerons et ceci tant par le niveau de phagostimulation que par l'équilibre nutritionnel qui en découle (SCHAEFER, 1938, AUCLAIR et coll., 1957, MALTAIS et AUCLAIR, 1957, VAN EMDEN et BASHFORD, 1969, QUIROS et coll., 1977, KUROLI, 1984, JANSSON et coll., 1987, FEBVAY et coll., 1988, RAHBE et coll., 1988). Depuis 1960, la stylectomie¹ a permis une meilleure connaissance de la composition biochimique de la sève phloémienne, donc de l'alimentation de ces insectes, et a contribué à la mise au point de nouveaux milieux artificiels holidiques, c'est-à-dire de composition chimique complètement définie. Ces milieux ont rendu possible une connaissance plus fine des besoins nutritifs de ces insectes (AUCLAIR, 1965, GOTHILF et BECK, 1966, MITTLER, 1970, DREYER et JONES, 1981a, FEBVAY et coll., 1988). L'utilisation de tels milieux s'est avérée également fort utile à l'étude expérimentale des allélochimiques végétaux présumés actifs sur le comportement alimentaire des Homoptères (DREYER et JONES, 1981b).

Un autre aspect de l'écologie nutritionnelle concerne le rôle des associations avec des microorganismes. Beaucoup d'insectes, dont la plupart des Homoptères, possèdent des symbiotes. Leur acquisition serait étroitement liée aux régimes alimentaires des insectes hôtes (BUCHNER, 1965). Cette conception est fondée sur le fait que la plupart des insectes symbiotiques vivent aux dépens de milieux mal équilibrés du point de vue nutritionnel : sang, kératine, phloème de plantes, graines de céréales. Le symbiote est alors censé contribuer à la nutrition et au rééquilibrage de la qualité nutritionnelle de l'alimentation de l'insecte (SMITH et DOUGLAS, 1987). Une élimination totale ou partielle des symbiotes, par traitement à la chaleur ou par des antibiotiques, se traduit le plus souvent par une chute remarquable de la croissance et de la fertilité de l'insecte (BROOKS, 1963, KOCH, 1967, NARDON, 1973). Ces observations, également valables pour les Homoptères phloémophages (ISHIKAWA, 1984, RAHBE et coll., 1992), indiquent que les symbiotes ont un rôle crucial dans la nutrition

¹ Elle consiste à sectionner les stylets des Homoptères phloémophages, supposés être plantés dans les tubes criblés, et à l'extrémité desquels on récupère la sève phloémienne s'écoulant sous pression.

de ces insectes, et notamment dans l'apport de substances absentes ou présentes à des teneurs insuffisantes dans la sève phloémienne (HOUK et GRIFFITHS, 1980). En fait, l'étroite association que les Homoptères ont développé avec leurs symbiotes leur a été indispensable pour exploiter ce compartiment tissulaire (TREMBLAY, 1980). Les symbiotes d'Homoptères sont des microorganismes qui peuvent être associés à ces insectes de façon extra ou intracellulaire. Dans le premier cas, on parle plutôt de microflore digestive, car les microorganismes sont situés principalement dans la lumière du tube digestif de l'insecte, comme c'est le cas chez des Cicadelles (DOUGLAS, 1988). Dans le deuxième cas, on parle d'endocytobiose (terme introduit par SCHWEMMLER (1980)) car les microorganismes sont incorporés à l'intérieur de cellules spécialisées, appelées mycétoctes quand le symbiote est une levure et bactériocytes lorsqu'il s'agit d'une bactérie (TREMBLAY, 1980). Ce dernier auteur relate la présence de bactéries symbiotiques pour plusieurs genres de Pseudococcides (*Pseudococcus* West., *Phenacoccus* Cock., *Planococcus* Fer., *Rastrococcus* Fer., *Nipaeococcus* Sull, *Dijsmicoccus* Fer., *Ferrisia* Fl., *Antonia* Sign., etc...). Cependant, à notre connaissance, aucun travail n'a décrit la présence de bactéries symbiotiques chez *P. manihoti*.

Dans ce chapitre, nous nous proposons dans un premier temps d'analyser le milieu alimentaire de *P. manihoti*, qui est la sève phloémienne du manioc. Notre analyse portera ici sur la composition et la teneur en nutriments primaires (sucres et acides aminés libres), les composés secondaires étant abordés plus loin. Nous suivrons ensuite le développement de la cochenille sur des milieux artificiels déjà utilisés pour des pucerons (milieu Ap0 de FEBVAY *et coll.*, (1988)) ou pour *Planococcus citri* Risso (Hom., Pseudococcidae ; milieu de GOTHILF et BECK, (1966)). Nous étudierons ensuite succinctement la microflore du tube digestif et du bactériome² de l'insecte.

Précisons au lecteur, que ce chapitre fait uniquement l'objet d'une étude descriptive. Néanmoins, Elle permet d'apporter quelques informations utiles pour le chapitre suivant et surtout pour des perspectives à envisager dans le modèle *M. esculenta* / *P. manihoti*.

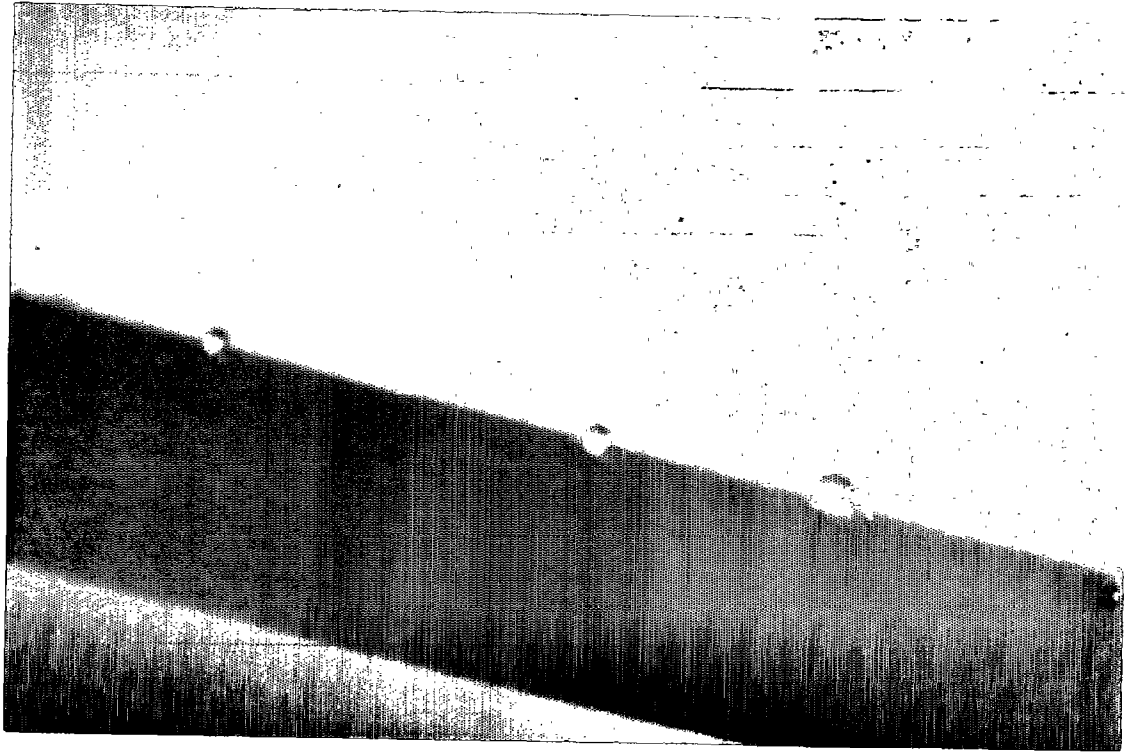
II Matériel et méthodes :

II.1 Matériel utilisé :

Matériel animal :

L'obtention de cochenilles au stade L1 est réalisée à partir de quelques ovisacs prélevés sur des adultes issus de l'élevage de masse. Les ovisacs, contenant des oeufs, sont placés dans des boîtes en plastique cristal de 5 cm de diamètre et de 3 cm de haut. Pour la mise en éclosion des oeufs, les boîtes sont mises à l'étuve à 30 °C et surveillées quotidiennement, jusqu'à l'obtention des premières cochenilles au stade L1.

² Bactériome : organe renfermant les bactériocytes.



0 1mm

FIGURE 19 : Gouttelettes d'exsudat naturel sur pétiole de manioc (variété M'pembe).

Les cochenilles, utilisées à différents stades de développement, sont issues d'un élevage de masse pratiqué au laboratoire.

Matériel végétal :

Dans cette étude, nous utilisons la variété de manioc M'pembe âgée d'environ 3 mois.

II.2 Méthodologie :

II.2.1 Composition et teneur en nutriments primaires de la sève phloémienne :

II.2.1.1 Prélèvement de sève phloémienne par exsudation naturelle.:

La méthode la plus fiable de prélèvement de la sève phloémienne est la stylectomie. Cette technique, idéale pour connaître la composition chimique de l'alimentation de l'insecte, n'est cependant pas applicable à la cochenille du manioc, car il est très difficile d'accéder au labium protégeant les stylets de ces insectes fixés sur le végétal. Par contre dans des conditions saturantes en humidité, le manioc présente la caractéristique d'exsuder naturellement au niveau de la tige et du pétiole (figure 19)(PEREIRA et SPLITTSTOESSER, 1987). Le travail de ces auteurs, fondé essentiellement sur des analyses biochimiques et des coupes histologiques, a permis de montrer que ces exsudats ne provenaient pas de glandes spécialisées telles que des nectaires mais des cellules compagnes du phloème lors de la translocation de sève au cours de la nuit. Ainsi, l'exsudation naturelle du manioc constitue pour notre modèle une méthode de récolte de sève phloémienne pas ou peu contaminée. La méthode de récolte consiste à nettoyer à l'eau distillée la surface des pétioles du manioc en fin de journée, et à placer la plante en conditions saturantes en humidité pendant la nuit. Les gouttelettes d'exsudat apparues au cours de la nuit sur les pétioles sont prélevées à l'aide de capillaires de verre préalablement étirés à la flamme. Nous prenons soin d'effectuer, d'une plante à l'autre, les prélèvements sur les mêmes étages foliaires et aux mêmes heures de la journée. Les échantillons sont ensuite lyophilisés et pesés à l'aide d'une balance Sartorius 2642 (à 0,1 mg près). La gamme des poids secs récoltés est de 3 à 15 mg de matières sèches.

II.2.1.2 Dosage des nutriments primaires de la sève phloémienne de manioc :

Dosage des glucides :

Les lyophilisats issus des prélèvements décrits ci-dessus sont repris dans 1 ml de solution d'acide sulfurique à 12 mM (pH 1,5). Ils sont ensuite filtrés pour éliminer les éventuels débris risquant de colmater la colonne. Un volume de 20 µl de surnageant est injecté dans un appareil HPLC de type Constametric 3200. La séparation des sucres se fait sur une colonne Aminex (Biorad HP X 87 H) à 30 °C. L'élution est réalisée à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 12 mM (pH 1,5), à un débit de 0,4 ml/min. La détection des sucres en sortie de

colonne est effectuée au moyen d'un réfractomètre. Le détecteur est relié à un système d'acquisition de données sur microordinateur, qui permet l'identification des pics suivant leur temps de sortie, et leur intégration. La concentration en sucres est déterminée après étalonnage de l'appareil. Celui-ci consiste à injecter des solutions de concentrations croissantes en glucides. Les composés que nous utilisons ici sont le saccharose, le glucose et le fructose. La sensibilité de la méthode est de 10 µg de sucre pour 20 µl d'injection.

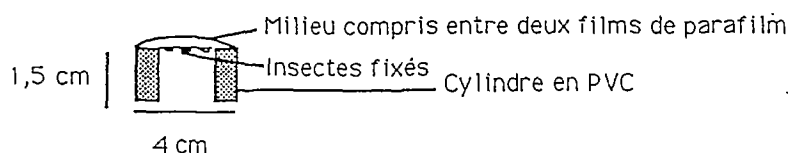
Dosage des acides aminés libres :

Les lyophilisats issus des prélèvements par exsudation naturelle sont repris par 60 µl d'eau ultra-pure. Ils sont ensuite injectés dans un auto-analyseur Beckman de type system 6300. La séparation des acides aminés libres se fait sur une colonne échangeuse de cations. L'élution est réalisée par cinq tampons successifs de Lithium de pH 2,85 à 4,80. La détection est effectuée par colorimétrie après réaction à la ninhydrine. La densité optique est lue à 570 nm. La sortie du photomètre est reliée à un système d'acquisition sur micro-ordinateur, qui permet l'identification des pics suivant leur temps de sortie et leur intégration. La concentration en acides aminés est déterminée à l'aide d'un étalon interne, l'acide glucosaminique. Le volume d'injection est de 50 µl et le seuil de sensibilité est d'environ 10 ng par acide aminé libre.

II.2.2 Suivi du développement de l'insecte sur milieux artificiels :

Les milieux artificiels que nous utilisons sont : le milieu de GOTHILF et BECK (1966) mis au point sur une Pseudococcidae (*Planococcus citri*) et le milieu Ap0 pour pucerons (mis au point à l'INRA Villeurbanne). Ils sont tous deux décrits en annexe 1 et contiennent des acides aminés libres, du saccharose, des vitamines et quelques oligo-éléments. Le milieu pour *Planococcus citri* diffère quantitativement et qualitativement du milieu Ap0. C'est pour cette raison que nous utilisons aussi Ap0, dont la conception permet de penser qu'il est à plus large spectre et non spécifique à une espèce d'Aphide (FEBVAY et coll., 1988).

Chacun des milieux est filtré stérilement (0,45 µm), puis réparti dans des ampoules stériles de 10 ml scellées à la flamme, et conservé à -20°C. Lors de son utilisation, le milieu est ensuite placé entre deux films étirés de parafilm posés sur un cylindre en PVC. L'ensemble constitue une cage d'élevage. Les insectes y sont positionnés de la façon suivante :



L'ensemble (cage et insectes) est placé sous serre à 21-32 °C et à 70 % d'humidité relative moyenne (extrêmes 60 % - 80 %). La photopériode est de 12 heures par jour.

II.2.3 Etude de la microflore du tube digestif et du bactériome :

III.2.3.1 Microflore du tube digestif :

Préparation des tubes digestifs et observation de la microflore :

Sous une loupe binoculaire, les cochenilles adultes sont placées dans un verre de montre (4 cm de diamètre) contenant 1 ml de sérum physiologique stérile. A la suite d'une légère traction simultanée des parties antérieures et postérieures de l'insecte avec des pinces fines, une fistule est provoquée. A travers celle-ci, on recueille le tube digestif qui est ensuite placé sur une lame pour subir une coloration de Gram ou au bleu de Toluidine à pH 4,5 pour observation au microscope photonique.

Caractérisation de la microflore digestive :

Cette étude concerne principalement la numération et la détermination de la morphologie et du caractère Gram de la microflore digestive, en prenant comme contrôle expérimental des liquides foliaires du manioc, que l'insecte rencontre lors de sa prise de nourriture. Notons que toutes les manipulations qui vont suivre sont effectuées dans des conditions stériles. Les cultures en milieu liquide sont effectuées dans un milieu "imitant" la sève phloémienne de manioc (milieu hypersaccharosé³, voir annexe 2). Nous pouvons penser que ce milieu est sélectif pour la microflore digestive de *P. manihoti* puisqu'il risque, par sa forte pression osmotique, de retarder la croissance de microorganismes "non phloémiens".

Préparation des inoculums et des cultures :

Les inoculums que nous utilisons proviennent d'un broyat de tubes digestifs et de cochenilles entières (pour comparaisons), ainsi que d'extraits de feuilles de manioc. Environ 100 tubes digestifs de cochenilles adultes, obtenus de la même façon que précédemment, et 100 cochenilles adultes sont broyés dans 5 ml d'une solution de sérum physiologique stérile. Afin d'éviter toute contamination, les cochenilles utilisées pour l'extraction des tubes digestifs et pour le broyat sont lavées 5 fois à l'alcool éthylique 75 °. Les liquides foliaires correspondent essentiellement à un mélange de sève phloémienne et de liquide intercellulaire. Pour l'obtention de ces prélèvements, nous utilisons la méthode de centrifugation de feuilles dépétiolées décrite en détail dans le prochain chapitre (IV, paragraphe II.2.1). Nous prenons soin d'effectuer les prélèvements sur des feuilles de manioc apparemment saines (non atteintes de bactérioses). Un volume de 80 µl de liquide foliaire est dilué dans un volume final de 2 ml de solution physiologique stérile.

³ On parle de milieu hypersaccharosé, car ce milieu contient une concentration très élevée en saccharose comparativement aux milieux classiquement utilisés pour isoler des bactéries.

Pour chaque type d'inoculum nous ensemençons un volume de 0,1 ml dans six tubes de Hungate contenant chacun 9 ml de milieu liquide (milieu hypersaccharosé). Ceux-ci sont ensuite dilués successivement de 1/100 jusqu'à 1/100.000 avec la solution hypersaccharosée.

Numération et isolement pour chaque inoculum :

Après 48 heures de culture aérobie en milieu liquide à 35 °C, la numération bactérienne est faite par estimation selon la méthode statistique du nombre le plus probable, avec trois tubes par dilution. Cette méthode consiste à déduire, par le calcul des probabilités, la proportion de tubes dans lesquels, pour chaque dilution, des bactéries se sont développées ou non. Les résultats de ce calcul peuvent s'obtenir facilement, grâce à des tables de conversion.

Pour chaque dilution, 100 µl sont ensuite repris et ensemencés sur milieux solides aérobies LPGA (trois boîtes par dilution) pour isolement. Le milieu LPGA contient 5 g d'extrait de levure, 5 g de peptone pancréatique, 10 g de glucose et 19 g d'agar dans 1000 ml d'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 7,5 à l'aide d'une solution normale de potasse. Le milieu LPGA est ensuite autoclavé à 110°C pendant 20 minutes, puis coulé sur des boîtes de Pétri vides et stériles, pour solidification.

Caractérisation :

Après 24 heures de culture en milieu solide aérobie à 35 °C, pour chaque boîte et chaque inoculum, une étude morphologique et du caractère Gram est faite sur les colonies bactériennes isolées. Ensuite, les colonies majoritaires se développant sur milieu hypersaccharosé et provenant des broyats de tubes digestifs et de cochenilles entières, font l'objet d'une étude physiologique (type de dégradation des sucres) et d'une analyse métabolique par chromatographie en phase gazeuse. Après ces études, chaque colonie est ensemencée dans 9 ml de milieu hypersaccharosé. Ce milieu est ensuite gazé sous N₂/CO₂ pour créer des conditions d'anaérobiose, puis mis en incubation à 35 °C pendant 48 heures pour suivre le développement des colonies.

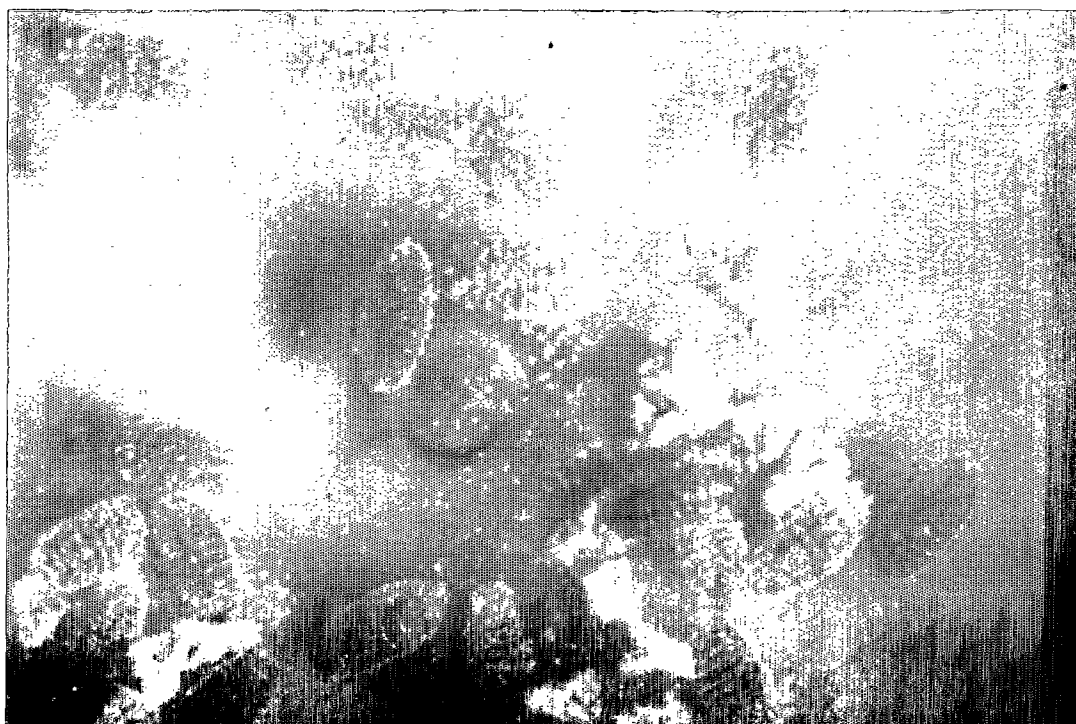
II.2.3.2 Microflore du bactériome :

Le protocole de microscopie optique utilisé pour des cochenilles adultes est le même que celui mentionné dans le chapitre précédent. Les colorants utilisés ici sont le bleu de toluidine ou le mélange rouge Ponceau / bleu de Heidenhein qui donnent une coloration bleue violette aux symbiotes.

En parallèle, sous une loupe binoculaire, les cochenilles adultes sont placées sur une lame contenant une goutte d'eau distillée. A la suite d'une légère traction simultanée des parties antérieures et postérieures de l'insecte avec des pinces fines, le bactériome, occupant environ le 1/3 du volume viscéral de l'insecte, est libéré. Celui-ci est écrasé délicatement entre lame et

TABLEAU 6 : Teneurs totales en sucres et en acides aminés libres (moyenne \pm erreur standard (répétition)) et proportions relatives de ces composés rencontrés dans la sève phloémienne :

| | Teneurs totales | Composés | Proportions relatives |
|----------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Sucres | 0,8 \pm 0,1 (4) (g/g de poids secs) | Saccharose | 85,1 |
| | | Glucose | 6,5 |
| | | Fructose | 8,4 |
| Acides aminés libres | 0,34 \pm 0,02 (3) (mg/g de poids secs) | Acide aspartique | 6,2 |
| | | Thréonine | 3,3 |
| | | Sérine | 8,2 |
| | | Asparagine | 2,8 |
| | | Acide glutamique | 10,5 |
| | | Glutamine | 36,2 |
| | | Proline | 2,4 |
| | | Glycine | 2,6 |
| | | Alanine | 8,9 |
| | | Acide alpha-aminobutyrique | 3,5 |
| | | Valine | 3,6 |
| | | Cystine | 0,7 |
| | | Méthionine | 0,05 |
| | | Cystathionine | 0,2 |
| | | Isoleucine | 0,5 |
| | | Leucine | 0,6 |
| Tyrosine | 0,4 | | |
| Phénylalanine | 0,7 | | |
| Acide gamma-aminobutyrique | 3,4 | | |
| Tryptophane | 0,05 | | |
| Lysine | 0,3 | | |
| Histidine | 3,4 | | |
| Arginine | 1,5 | | |



0 1mm

FIGURE 20 : Cochenilles aux stades L1 et L2 fixées sur milieu artificiel Ap0.

TABLEAU 7 : Nombre de cochenilles selon les différents stades obtenus sur deux milieux artificiels (pourcentage de larves obtenues / L1 fixées) à 21-32 °C :

| Milieux artificiels | L1 (fixées) | L2 (au bout de 8j) | L3 (au bout de 17j) | L4 |
|---------------------|-------------|--------------------|---------------------|----|
| Ap0 | 258 | 151 (58,5 %) | 10 (3,9 %) | 0 |
| GB | 387 | 180 (49,1 %) | 51 (13,2 %) | 0 |

L1, L2, L3 et L4 : stades larvaires successifs de la cochenilles du manioc.

lamelle afin de libérer les symbiotes des bactériocytes. Les symbiotes sont colorés au bleu de toluidine à pH 4,5 avant observation au microscope photonique.

III Résultats et discussion :

III.1 Nutriments primaires de la sève phloémienne :

Les proportions relatives des sucres et des acides aminés libres rencontrés dans les exsudats naturels de manioc sont présentées dans le tableau 6. Le saccharose apparaît comme le nutriment primaire majoritaire de la sève phloémienne de manioc, qui ne semble pas transloquer en quantités notables d'oligosaccharides, que l'on trouve parfois avec le saccharose dans certaines familles végétales. Quant aux acides aminés libres, l'acide glutamique (+ glutamine) est nettement prédominant. A un degré moindre, on trouve l'acide aspartique (+ asparagine), la sérine et l'alanine. La méthionine et le tryptophane sont quasiment absents. Comparativement à beaucoup d'espèces végétales, la composition en nutriments primaires de la sève de manioc ne présente apparemment pas de grandes différences (CALATAYUD, 1989). Notons que pour des extraits issus de prélèvements de sève par stylectomie, il est rare d'identifier du glucose et du fructose. La présence de ces derniers dans nos échantillons pourrait résulter d'une activité invertase pendant ou après l'exsudation (GROUSSOL et coll., 1986). Le GABA (acide γ amino-butérique) présent dans la sève phloémienne de manioc est souvent considéré chez les végétaux comme un acide aminé de stress. La présence de celui-ci dans nos extraits pourrait être liée à la méthode de prélèvement utilisée. En effet, différentes observations faites en laboratoire, nous ont indiqué que les gouttelettes d'exsudat apparaissent plus facilement sur des maniocs soumis à un stress (déficit hydrique, infestation).

Bien que la méthode de récolte de sève par exsudation naturelle ne permette pas une collecte de sève phloémienne aussi fiable que la stylectomie, le rapport sucres / acides aminés libres diffère généralement peu d'une méthode de prélèvement à une autre (CALATAYUD, 1989). Ce rapport est de 2353 pour nos extraits et diffère beaucoup de celui obtenu dans le même laboratoire (156) sur des échantillons issus d'une autre méthode de prélèvement (TERTULIANO et LE RÜ, 1992). Notons que PEREIRA et SPLITTSTOESSER (1987) obtiennent, pour des extraits issus d'exsudats naturels, un rapport pouvant atteindre jusqu'à 490 pour certaines variétés de manioc. Ces rapports diffèrent largement de ce ceux rencontrés dans la sève phloémienne de beaucoup d'espèces végétales qui sont généralement compris entre 1 et 15 (GIROUSSE, 1988). Si l'on admet que quantitativement nos échantillons reflètent bien la composition de la sève phloémienne (ce qui n'est bien entendu pas une certitude absolue) le manioc apparaît donc comme une plante pauvre en acides aminés libres. Il faut quand même remarquer que ce ne serait pas une situation unique, puisque par exemple c'est aussi le cas des Cucurbitacées, où cette déficience est compensée

par une forte teneur en protéines. Il est tentant de supposer que pour le manioc, une telle compensation soit faite, par exemple, par une teneur relativement élevée en glycosides cyanogéniques (composés considérés comme pouvant servir de source azotée pour le manioc). Cette caractéristique procurerait des informations intéressantes sur le métabolisme et la physiologie de *P. manihoti* et permettraient de mieux comprendre son oligophagie vis-à-vis du genre *Manihot*.

III.2 Développement de l'insecte sur milieux artificiels :

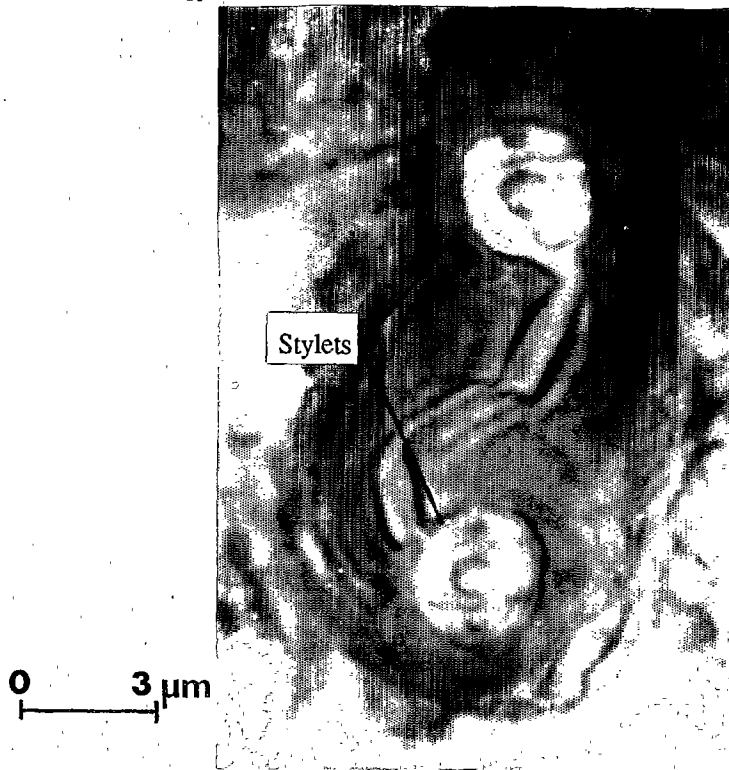
Sur milieu Ap0 pour puceron, les cochenilles sont capables de se développer jusqu'au stade L₂ mais difficilement jusqu'au stade L₃ (figure 20 et tableau 7). Les résultats sont meilleurs en utilisant le milieu GB pour l'obtention de cochenilles au stade L₃ (tableau 7). Ces deux milieux ne se sont cependant pas avérés appropriés pour permettre un développement complet de l'insecte. Comme pour le milieu utilisé par MOLYNEUX et coll. (1990) pour *Pseudococcus longispinus* Targ. (Hom., Pseudococcidae), Ap0 et GB ne permettent pas une fixation initiale complète de *P. manihoti*, où seulement 60% des larves L₁ déposées se fixent. Cette observation pourrait être aussi bien le résultat d'un dispositif expérimental inadapté que d'une composition biochimique inadéquate à la fixation de *P. manihoti*. Cependant, l'impossibilité d'accomplissement du cycle de la cochenille nous indique que la composition biochimique de ces milieux pourrait être partiellement responsable. Cette impossibilité peut être liée à l'utilisation de milieux dont les rapports sucres/acides aminés libres (2,25 pour Ap0 et 5,72 pour GB) nettement différents de celui mesuré sur les exsudats naturels du manioc dans notre cas (115). Comme pour la nutrition des pucerons, il est probable que les taux relatifs de sucres et d'acides aminés libres, ainsi que la balance en acides aminés libres jouent un rôle important dans celle de la cochenille. En effet, l'utilisation de milieux plus riches que la sève en acides aminés libres, n'a pas permis pour autant un développement complet de l'insecte. En fait, la cochenille pourrait s'être "adaptée" à ce substrat nutritif pauvre en acides aminés libres qu'est la sève phloémienne de manioc, tant par des mécanismes alimentaires (équilibre de phagostimulation) que plus strictement nutritionnels (optimisation de l'absorption et du recyclage de l'azote).

III.3 Etude des bactéries digestives et des endocytobiotés de cochenille :

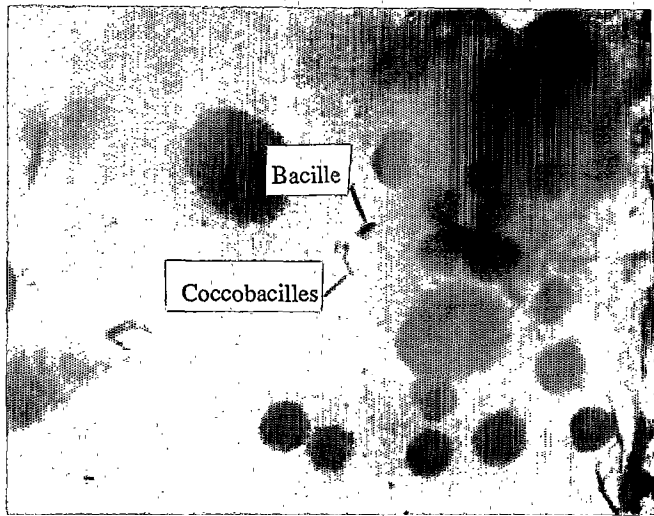
Bactéries digestives :

Les tubes digestifs isolés montrent en microcopie optique, principalement dans leur partie antérieure, la présence de bacilles longs mobiles, de coccobacilles immobiles associés sous forme de chapelets et de structures organisées en îlots contenant des cocci immobiles. Toutes ces bactéries apparaissent Gram négatives et sont de diamètre inférieur à 1 µm (figures 21b et c).

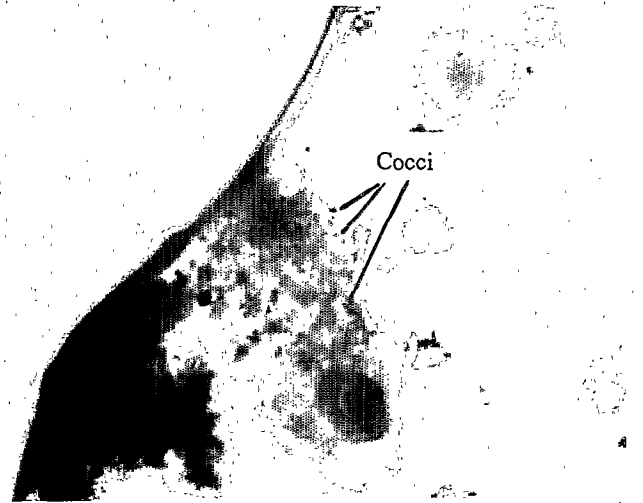
a



b



c



0 30 μm

FIGURE 21 : a : Coupe transversale de la crumena de *P. manihoti* (adulte) montrant les stylets repliés en boucle (diamètre du canal alimentaire d'environ de 1 μm) ;
 b et c : Tube digestif de cochenille adulte montrant des coccobacilles associés sous forme de chapelet, des cocci immobiles, regroupées en filot et des bacilles mobiles (peu visibles ici)(tous de diamètre inférieur à 1 μm).

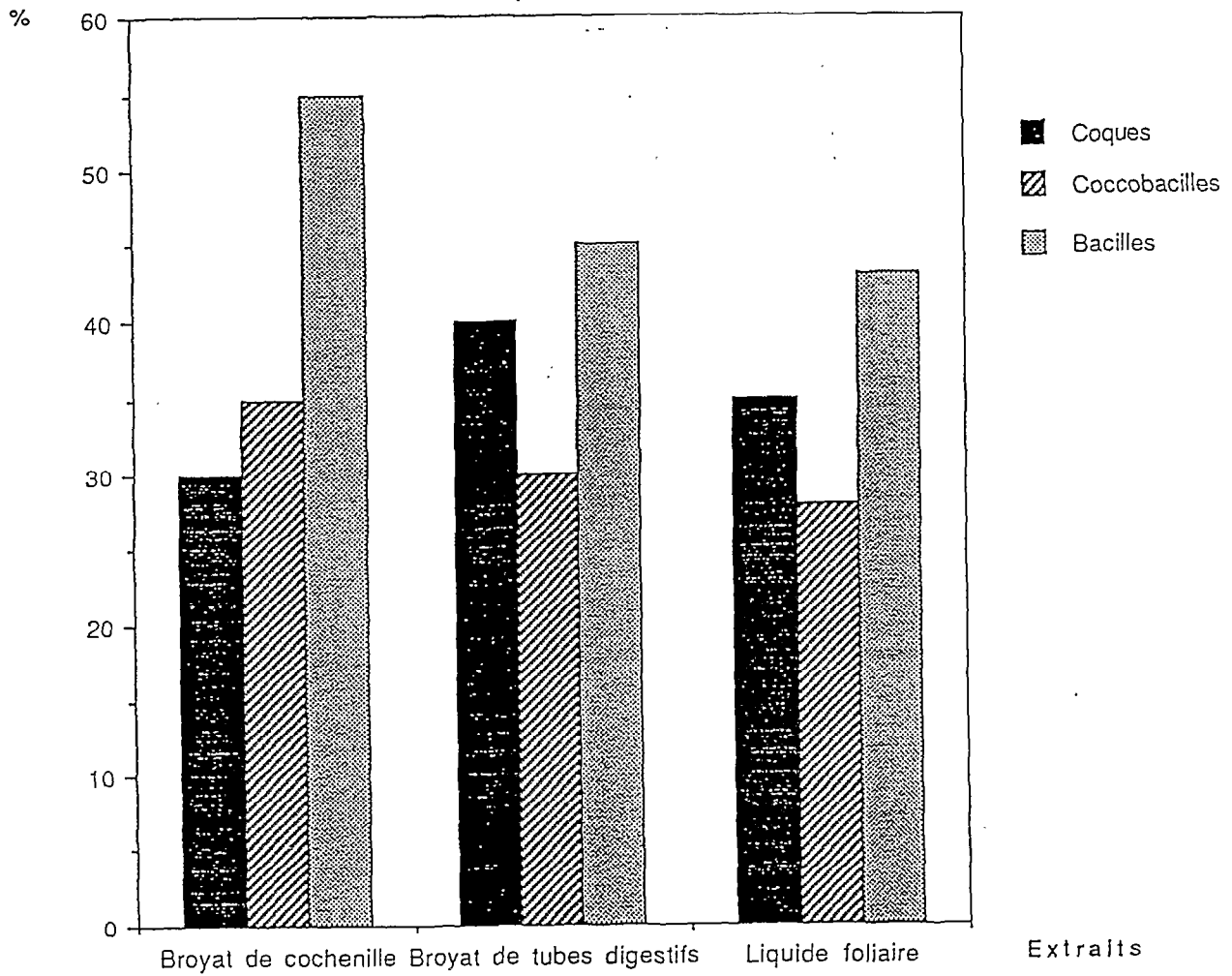


FIGURE 22 : Dispersion des différents groupes morphologiques des bactéries isolées à partir des différents extraits :

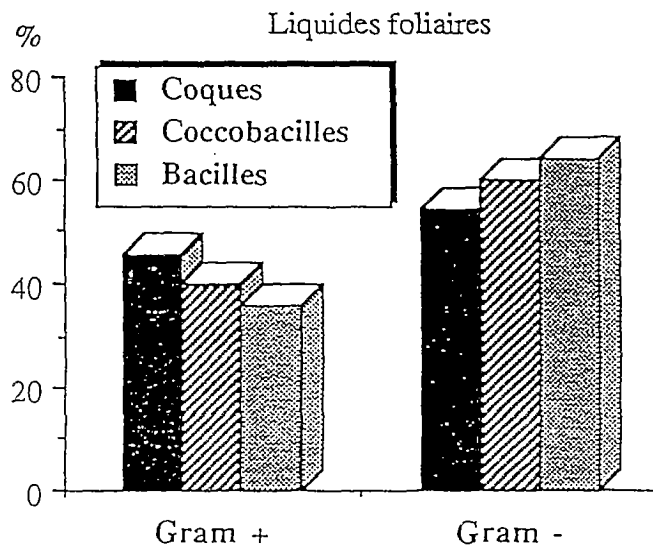
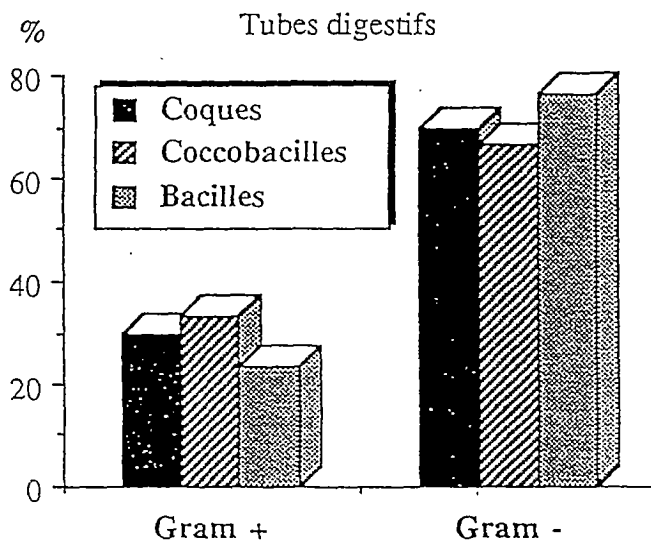
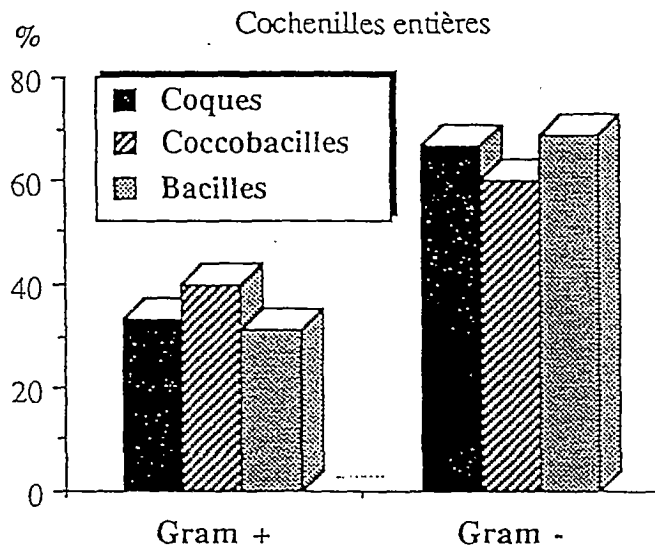


FIGURE 23 : Dispersion du caractère Gram par groupe morphologique et par type d'inoculum.

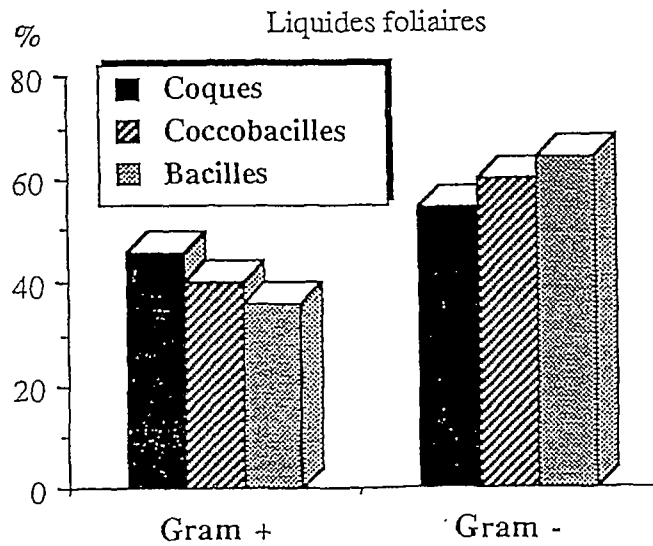
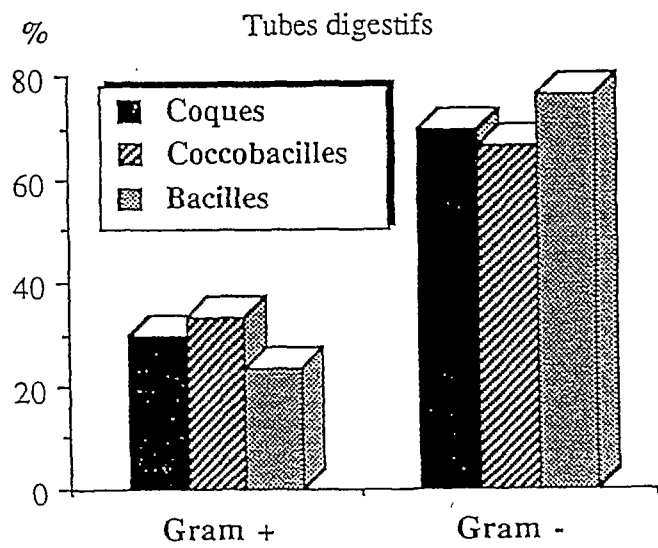
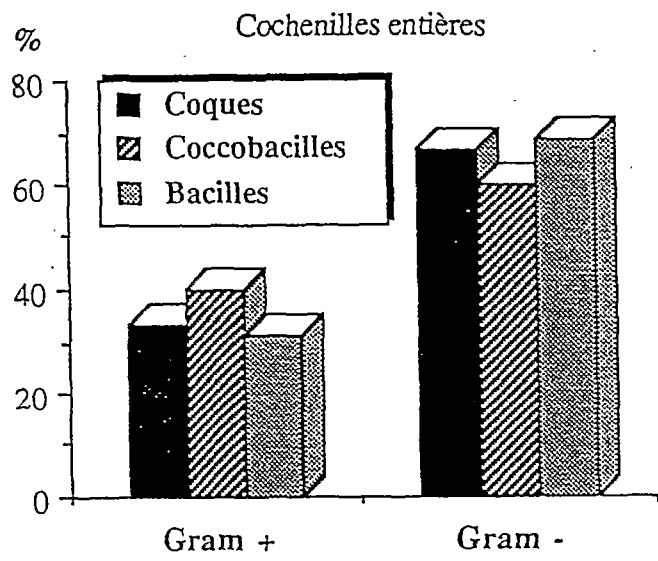


FIGURE 23 : Dispersion du caractère Gram par groupe morphologique et par type d'inoculum.

Une comparaison du diamètre du canal alimentaire des stylets de femelle adulte (d'environ 1 μm , figure 21a) et de celui des bactéries rencontrées dans le tube digestif de *P. manihoti* (inférieur à 1 μm) indique que ces bactéries peuvent provenir de contaminations simples sur la plante, suggestion faite d'ailleurs par SRIVASTAVA et ROUATT (1963) et par (GRENIER et coll., 1993) pour la microflore digestive de certains pucerons.

Pour *P. manihoti*, la caractérisation de la microflore digestive de l'insecte donne les résultats mentionnés ci-après. En milieu liquide aérobie, on dénombre sur broyat de tubes digestifs $12 \cdot 10^4$ bactéries par ml, soient 6000 bactéries par tube digestif. Une très faible concentration bactérienne, inférieure à 15 bactéries par ml, est obtenue dans les liquides foliaires.

Parmi les bactéries isolées sur milieu solide (LPGA) pour chaque type d'inoculum, il a été noté la prédominance de trois groupes morphologiques : des bactéries cocciformes, des bacilles en forme de bâtonnet et un groupe intermédiaire correspondant aux coccobacilles. L'observation de 120 colonies provenant du milieu solide a donné une distribution morphologique avec prédominance nette des bacilles sur les coques et les coccobacilles, et ceci quel que soit le type d'inoculum considéré (figure 22). En effet, dans les inoculums provenant de dilutions ultimes, la prédominance de bacilles est plus marquée, tandis que dans ceux provenant de faibles dilutions, la présence de cocciformes est plus importante. Quant aux inoculums provenant des dilutions intermédiaires un équilibre apparent est observé.

La distribution du caractère Gram montre une nette prédominance de bactéries Gram négatives quel que soit l'inoculum et le groupe morphologique considéré (figure 23).

Les caractéristiques (formes et Grams) des populations de bactéries provenant du tube digestif et des extraits foliaires apparaissent semblables. Ces résultats confortent la possibilité d'une provenance végétale des bactéries rencontrées dans le tube digestif de *P. manihoti*.

Les bactéries isolées sont dans leur majorité anaérobies facultatives et fermentatives, capables de dégrader le saccharose et le glucose en acétate et propionate. Certaines sont capables de produire, à l'issue de cette dégradation, de l'isovalérate, du valérate et de l'éthanol. Ce résultat indique, par la présence de bactéries capables de se développer rapidement dans un milieu dont la forte concentration en saccharose (composé majoritaire de la sève phloémienne) lui confère une forte pression osmotique, que les microorganismes isolés au cours de la manipulation proviennent bien d'un compartiment irrigué par la sève (tels que le tube digestif de cochenille et le phloème).

Endocytobioites :

Les résultats de la microscopie optique montrent la présence d'un bactériome d'environ 0,3 mm de long, irrigué de trachées, situé sous le tube digestif de l'insecte (figures 24a et b). Il est constitué d'éléments mucilagineux (les bactériocytes) qui hébergent les symbiotes (figures 24c et d). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus sur plusieurs Pseudococcides et

mentionnés par BUCHNER (1965) et TREMBLAY (1989). Chez *P. manihoti*, les bactéries présentes dans le bactériome apparaissent sous forme de bacilles allongés, mobiles, Gram - et de 15 à 20 μm de long. Ils sont morphologiquement identiques aux symbiotes rencontrés chez *Pseudococcus longispinus* Targ. (TREMBLAY, 1989).

Précisons que l'identification de ces symbiotes, ainsi que le rôle qu'ils pourraient jouer dans la nutrition de *P. manihoti*, et notamment dans l'assimilation ou la détoxification du cyanure (suggéré dans le chapitre IV, paragraphe III.3) font l'objet d'une de nos perspectives.

IV Conclusions :

Malgré l'impossibilité d'utiliser la stylectomie comme méthode de prélèvement de sève phloémienne pour notre modèle, la récolte par exsudation naturelle nous apporte des informations intéressantes sur la composition et la teneur en composés primaires de la sève phloémienne de manioc. *M. esculenta*, comparée à beaucoup d'espèces végétales, ne présente aucune originalité quant à la composition en nutriments primaires de sève. Néanmoins, le niveau en acides aminés libres en fait, en première analyse, une plante particulièrement pauvre en ces composés. Cette constatation permet de supposer la présence d'une source azotée différente de celle que constitue les acides aminés, à la fois pour la plante et l'insecte.

L'utilisation de milieux artificiels déjà disponibles pour d'autres Homoptères plus riches en acides aminés libres, n'a pas permis l'accomplissement du cycle de *P. manihoti*. Il semblerait que les proportions relatives en sucres et en acides aminés libres, ainsi que la balance en acides aminés libres de sève soient un des facteurs clefs dans la nutrition de l'insecte. Toutefois, ces hypothèses doivent être expérimentalement confirmées.

P. manihoti possède des bactéries digestives (cocci, bacilles et coccobacilles), provenant vraisemblablement de la plante et ne semblant pas joué un rôle primordial dans l'interaction nutritionnelle insecte / symbiote car leur nombre dans le tube digestif est relativement faible. Comme d'autres Pseudococcides, elle possède un bactériome hébergeant des bactéries symbiotiques. Bien que nos manipulations ne montrent pas le rôle joué par les endocytobiotés, leur présence dans l'insecte est intéressante et nous suggère d'étudier leur participation dans l'interaction nutritionnelle insecte / symbiote, et tout particulièrement dans l'assimilation ou la détoxification du cyanure présent dans le manioc.

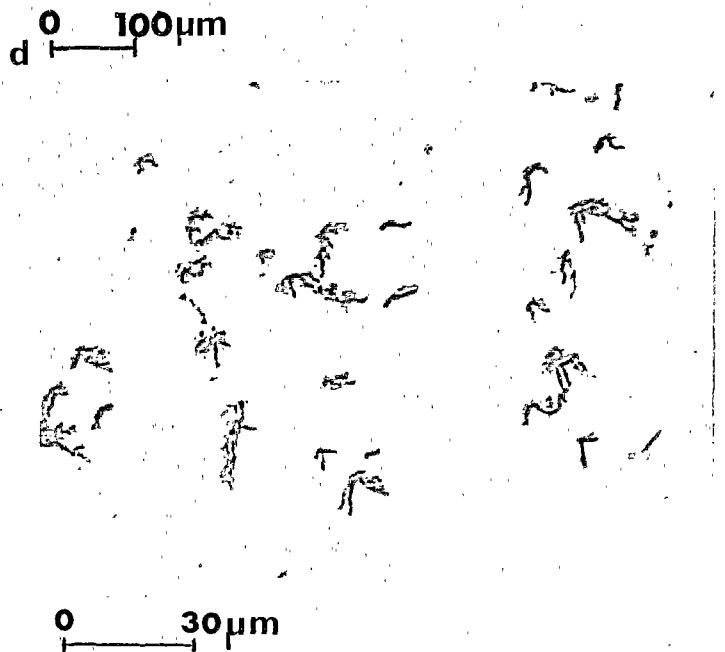
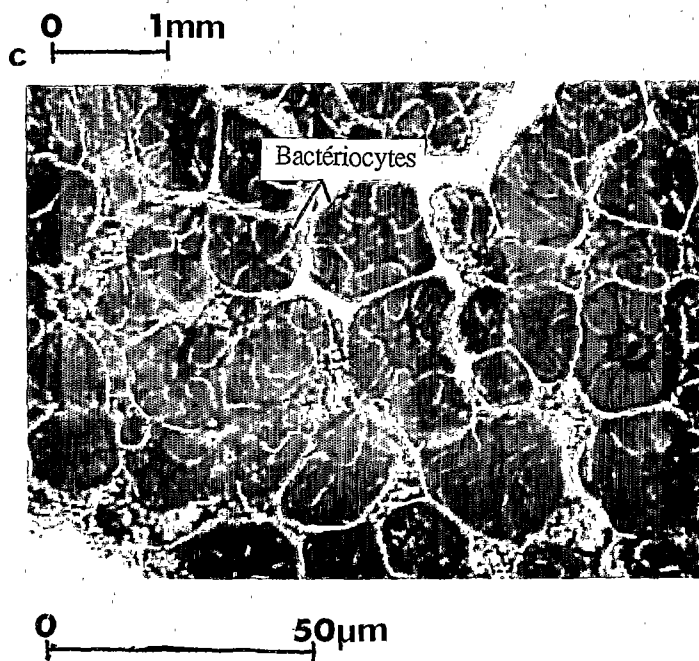
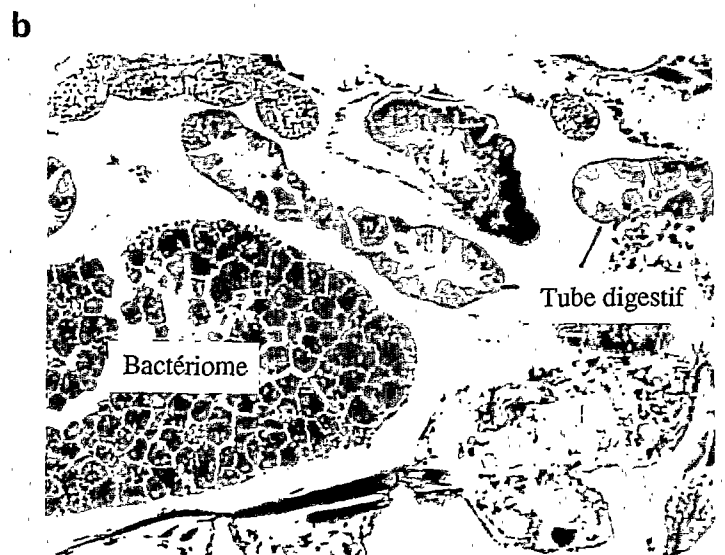
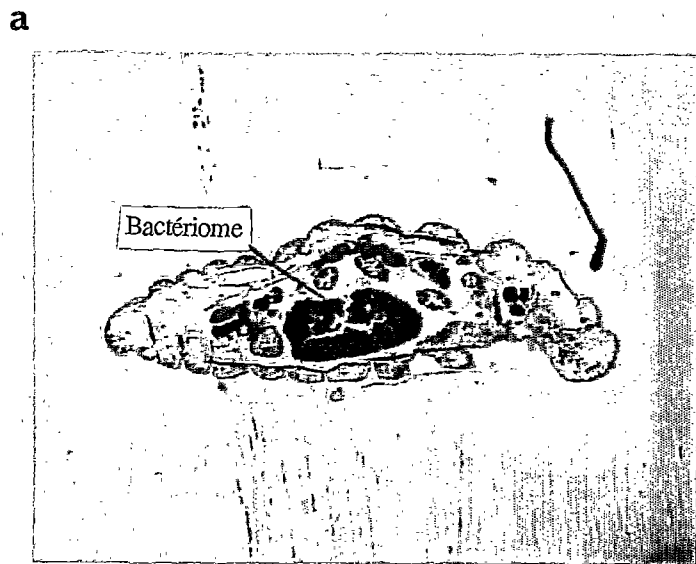


FIGURE 24 : a et b : Coupe longitudinale de *P. manihoti* (stade L4) à deux grossissements différents, montrant le bactériome sous le tube digestif ; c : Bactériome en coupe transversale montrant les bactériocytes ; d : Bactéries présentes dans les bactériocytes.

CHAPITRE IV : MISE EN EVIDENCE DE
MECANISMES DE DEFENSE DU MANIOC CONTRE
L'ATTAQUE DE LA COCHENILLE

I Introduction :

PAINTER (1951) définit la résistance des plantes aux attaques des insectes comme la capacité relative, propre à la plante, de limiter les dommages créés par l'insecte. Ce large concept de résistance masque la complexité des phénomènes physiologiques en jeu. On considère généralement sous ce terme les traits sous contrôle génétique, et donc héréditaires. La résistance est relative et peut être mesurée simplement par comparaison de plusieurs génotypes ; elle est variable et peut être modifiée par des facteurs physiques, chimiques et biologiques.

PAINTER propose trois catégories de résistance (voir la figure 1 dans l'introduction générale) :

(i) la **non-préférence**, par la suite souvent désignée par l'antixénose, ce terme étant proposé pour la première fois par KOGAN et ORTMAN (1978). Elle se caractérise par des facteurs propres à la plante et défavorables à l'*installation* du ravageur. Elle concerne les composantes comportementales de l'interaction, notamment celles prévalant lors du choix et de l'établissement sur la plante hôte ;

(ii) l'**antibiose** se caractérise par des facteurs, internes à la plante, qui *réduisent* le développement, la croissance, la reproduction ou provoquent la mortalité de l'insecte. Elle se manifeste donc généralement à plus long terme que l'antixénose, et conditionne les niveaux de populations plutôt que la colonisation initiale du végétal ;

(iii) la **tolérance** se caractérise par la capacité qu'ont certaines plantes de se développer, en présentant des *dégâts non dommageables* pour la physiologie du végétal, en dépit de niveaux de population du ravageur qui provoqueraient des dommages importants sur d'autres plantes. Elle est typiquement évaluée en termes de dégâts à la plante (ampleur des dégâts ou de leurs conséquences physiologiques ou économiques) plutôt qu'en termes d'effets sur le ravageur.

Ces trois catégories sont empiriques et ne peuvent être toujours distinguées de façon aussi claire et précise (AUCLAIR, 1988). Elles sont cependant utiles, principalement aux sélectionneurs végétaux, et conduisent à apprécier à quel moment de l'attaque du ravageur la plante développe une résistance. Si celle-ci se manifeste lors de la fixation de l'insecte sur le végétal, on se réfère plutôt à l'antixénose, alors que si celle-ci se manifeste bien après la fixation, on se réfère plutôt à l'antibiose et/ou à la tolérance.

Chez les plantes supérieures, beaucoup de stratégies (physiques, chimiques et écologiques) sont élaborées pour la défense contre l'attaque de ravageurs. La défense chimique de la plante reste cependant la stratégie la plus efficace et la plus utilisée par beaucoup d'espèces végétales (BELL, 1974). Les substances impliquées sont souvent des substances secondaires. Selon la théorie de FRAENKEL (1969) ces substances dites du métabolisme secondaire sont des composés à fonction principalement défensive qui tendent à rendre la plante répulsive ou toxique et gênent le développement des ravageurs ou des microorganismes. Le qualificatif de

"secondaire" leur est attribué parce que chaque famille de ces substances est restreinte à des groupes limités de plantes, et parce qu'elles semblent généralement ne pas intervenir dans les processus biochimiques de base communs à la plupart des végétaux. Les substances secondaires incluent des alcaloïdes, des stéroïdes, des terpénoïdes, des composés phénoliques (flavonoïdes, tannins...), des composés cyanés ou certains dérivés soufrés (glucosinolates,...), ainsi que d'autres composés organiques dont les fonctions métaboliques dans les plantes sont assez obscures (ROBINSON, 1974, BECK et REESE, 1976). Selon les cas, ces substances peuvent être présentes dans le végétal sain et sont dites constitutives, ou être induites par l'attaque de ravageurs ou de microorganismes. Le rôle de ces composés dans les interactions plantes-insectes n'est pas clair. WHITTAKER (1970) propose la terminologie fonctionnelle d'allélochimique pour certaines substances secondaires, définies dans le cas des interactions plantes-insectes comme des substances produites par la plante et qui affectent notablement le développement, la survie, le comportement ou la biologie de l'insecte. La production de phytoalexines¹, d'attractifs, de répulsifs, de phagodissuadants, d'inhibiteurs et de composés toxiques sont des exemples d'interactions allélochimiques.

Chez les Aphides, famille d'Homoptères la plus étudiée, de nombreux travaux ont pu suggérer ou démontrer l'implication de substances secondaires dans la résistance de plusieurs familles végétales. C'est notamment le cas, des acides hydroxamiques comme le DIMBOA² (ARGANDOÑA et coll., 1980, CORCUERA et coll., 1985) de la gramine (KANEHISA et coll., 1990, SALAS et CORCUERA, 1991), de divers alcaloïdes (SMITH, 1966, DREYER et coll., 1985, WINK et WITTE, 1991) et de divers acides phénoliques et flavonoïdes (TODD et coll., 1971, JORDENS-ROTTGER, 1979, DREYER et JONES, 1981b, LESZCZYNSKI et coll., 1985, JONES et KLOCKE, 1987, LUCZYNSKI et coll., 1990). Chez les Coccoidea, peu d'informations sont disponibles. Cependant, NEWBERY et coll. (1983), ont pu montrer que la résistance de plantes ligneuses à *Icerya seychellarum* Nestw (Hom. Margarodidae) était corrélée aux teneurs en alcaloïdes et en tannins polymérisés des feuilles. WARGO (1988) n'a par contre pas pu relier la résistance de *Fagus grandifolia* Ehrh. (Fagaceae) à la cochenille *Cryptococcus fagisuga* Lindinger (Hom., Coccidae) aux teneurs en phénols de l'écorce.

Dans la littérature, il y a également peu d'informations sur la localisation cellulaire et tissulaire des allélochimiques impliqués dans la défense chimique des plantes. Ce type d'information est pourtant primordial dans le cas d'insectes à comportement alimentaire tissulairement spécialisé, tel que celui des Homoptères phloémophages ou xylophages, des diptères mineurs, des thrips ou d'autres microarthropodes phytophages (acariens...). Les substances secondaires sont souvent situées dans les vacuoles (MATILE, 1984). Il est généralement admis que chez les végétaux supérieurs, la sève phloémienne, appelée aussi

¹ Phytoalexine: substance chimique dont la synthèse par la plante est induite par la présence d'organismes étrangers au végétal (généralement des microorganismes).

² DIMBOA: 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one.

sève "élaborée", véhicule principalement des substances organiques produites par la photosynthèse, alors que la sève xylémienne, appelée sève "brute", véhicule principalement des substances inorganiques issues de l'assimilation racinaire. Ainsi, la sève phloémienne peut véhiculer des composés secondaires tels que des alcaloïdes ou des composés phénoliques, probablement sous leurs formes glycosylées hydrosolubles (ZIEGLER, 1975, WINK et WITTE, 1984).

Dans le cadre de l'étude des interactions entre la cochenille du manioc et ses plantes hôtes, TERTULIANO et coll. (1993) ont pu mettre en évidence différents degrés de résistance de type antibiose. Rappelons que le taux intrinsèque d'accroissement (r_m) est un bon estimateur de la résistance par antibiose des plantes aux Aphides (STARKS et BERRY, 1976, BIRCH et WRATTEN, 1984, DIPIETRO et DEDRYVER, 1986, SUMNER et coll., 1986). Ce paramètre, défini par BIRCH (1948), intègre les différentes composantes du développement de l'insecte (durée de développement et mortalité larvaire, taux de survie et fécondité journalière). LE RÛ et PAPIEROK (1987) ont montré que la capacité intrinsèque d'accroissement r_c définie par LAUGHLIN (1965) constitue, pour la cochenille du manioc, une bonne approximation du r_m . L'analyse des valeurs prises par ce paramètre pour différentes combinaisons plantes-cochenilles du manioc (TERTULIANO et coll., 1993) a permis d'établir un classement des plantes, en terme d'antibiose, en fonction de leur résistance (les plantes les plus résistantes par antibiose ayant les r_c les plus faibles). Ces auteurs, n'ayant pas pu relier le niveau en composés primaires (sucres et acides aminés libres) avec l'antibiose, ont suggéré l'étude du rôle joué par les composés secondaires des plantes hôtes (TERTULIANO et LE RÛ, 1992).

Par ailleurs, les résultats d'EPG obtenus sur *P. manihoti* ont montré que, selon toute vraisemblance, des facteurs chimiques présents dans les compartiments extra et intracellulaires du mésophylle joueraient un rôle important dans la reconnaissance cochenille / plante. Dans ce contexte, nous nous proposons d'identifier, de doser et de localiser certaines substances secondaires (alcaloïdes, phénols et composés cyanés) présentes dans ces compartiments des plantes hôtes et des plantes de substitution. Le caractère essentiellement phloémophage de *P. manihoti* nous conduit en outre à analyser en parallèle les substances secondaires présentes dans le phloème et dans les fécès (ou miellat) de l'insecte, afin d'en apprécier une éventuelle consommation et excrétion.

Le manioc possède des glycosides cyanogéniques (linamarine et lotaustaline). L'oligophagie de *P. manihoti* vis-à-vis du genre *Manihot* suppose une adaptation de la cochenille aux composés secondaires de ses plantes hôtes, et notamment aux composés cyanés. Une telle spécialisation suggère un équipement enzymatique adapté. Ces quelques constatations nous conduisent à rechercher si une des enzymes participant à l'hydrolyse de ces glycosides, telle que la linamarase, est présente dans la cochenille. Si c'est le cas, nous nous

proposons de déterminer l'origine de cette enzyme (végétale ou animale) puis d'étudier la toxicité du cyanure libre en milieu artificiel vis-à-vis de *P. manihoti*.

Enfin, pour mettre en évidence des mécanismes de défense de type antibiose chez le manioc, nous étudierons la variation des substances secondaires phloémiennes, selon le génotype (en utilisant des plantes présentant des caractères antibiotiques différents) et selon la densité d'infestation. Rappelons que de brutales variations d'effectifs de ravageur sont observées lors d'importantes modifications de la physiologie de la plante, en relation avec la saison. Ces observations semblent résulter de modifications temporaires de la résistance du manioc à la suite notamment d'un stress hydrique durant la grande saison sèche. De telles possibilités, nous ont conduit à suivre la variation des substances secondaires phloémiennes selon l'état hydrique de la plante et selon la saison.

II Matériel et méthodes :

II.1: Matériel utilisé :

Matériel végétal :

Dans ce paragraphe, nous nous proposons de présenter uniquement l'origine du matériel végétal utilisé dans les différentes expériences, dans l'ordre choisi pour énoncer les résultats (III.1 à III.8). Les protocoles expérimentaux seront précisés plus loin (II.2.7 à II.2.10).

L'identification des substances secondaires présentes dans les feuilles porte sur les mêmes plantes hôtes et de substitution que celles utilisées lors de l'étude comportementale comparative de *P. manihoti* par EPG (chapitre II).

La comparaison des substances secondaires présentes dans la sève phloémienne et dans le miellat, est effectuée sur la variété de manioc témoin M'pembe, sur laquelle nous avons déjà décrit précisément le comportement alimentaire de *P. manihoti*.

Pour relier le niveau en substances secondaires du phloème avec le taux intrinsèque d'accroissement (r_c), huit plantes hôtes et deux plantes de substitution, présentant des caractères antibiotiques différents vis-à-vis de la cochenille du manioc, sont retenues (tableau 8) :

- sept variétés de manioc (*Manihot esculenta* Crantz Euphorbiaceae) : Incoza, Moudouma, Zanaga, 3M8, M'pembe, 30M7 et Ganfo;
- le "Faux caoutchouc" (hybride : *M. esculenta* x *M. glaziovii*) ;
- le poinsettia (*Euphorbia pulcherrina* Wild., Euphorbiaceae) ;
- le talinum (*Talinum triangularae* Jacq., Portulacaceae).

Pour l'étude de la variabilité des substances secondaires du phloème selon les autres facteurs étudiés, nous utilisons trois plantes hôtes : le "Faux caoutchouc" car c'est la plante sur laquelle nous avons suivi l'évolution de la population naturelle de cochenille durant l'année 1991 ; la variété Zanaga car elle est considérée par les sélectionneurs du programme

TABLEAU 8: Capacité intrinsèque d'accroissement (Rc) de la cochenille du manioc pour 7 variétés de manioc (Incoza, Moudouma, Zanaga, Ganfo, 3M8, M'pembe et 30M7) et "Faux caoutchouc" (d'après LE RÜ et coll., 1991) :

| Noms d'espèce | Plantes hôtes | *Rc |
|-------------------------------------------|-------------------|------------------|
| <i>M. esculenta</i> x <i>M. glaziovii</i> | "Faux-caoutchouc" | 0,141 ± 0,003 a |
| | Incoza | 0,133 ± 0,003 a |
| | Moudouma | 0,143 ± 0,002 a |
| <i>M. esculenta</i> | Zanaga | 0,155 ± 0,009 b |
| | Ganfo | 0,160 ± 0,003 b |
| | 3M8 | 0,141 ± 0,005 a |
| | M'Pembe | 0,150 ± 0,003 ab |
| | 30M7 | 0,150 ± 0,011 ab |

*Rc: capacité intrinsèque d'accroissement (moyenne ± erreur standard).

Les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un test F normal au seuil de 1 %.

nutritionnel du manioc comme l'une des plantes les plus prometteuses d'un point de vue agro-industriel, et pour des raisons d'indisponibilité de boutures de la variété témoin M'pembe, la variété 30M7 qui présente les mêmes caractéristiques antibiotiques. Rappelons que ces trois plantes présentent des caractéristiques antibiotiques significativement différentes (voir tableau 8).

Matériel animal :

Les cochenilles au stade L1 sont obtenues de la façon décrite au chapitre précédent. Les adultes proviennent d'un élevage de masse pratiqué au laboratoire sur la variété M'pembe. Pour étudier la linamarase d'origine animale, nous utilisons également des cochenilles adultes issues d'un élevage de masse, en laboratoire, sur talinum.

II.2 Méthodologie :

II.2.1 Méthodes de prélèvement :

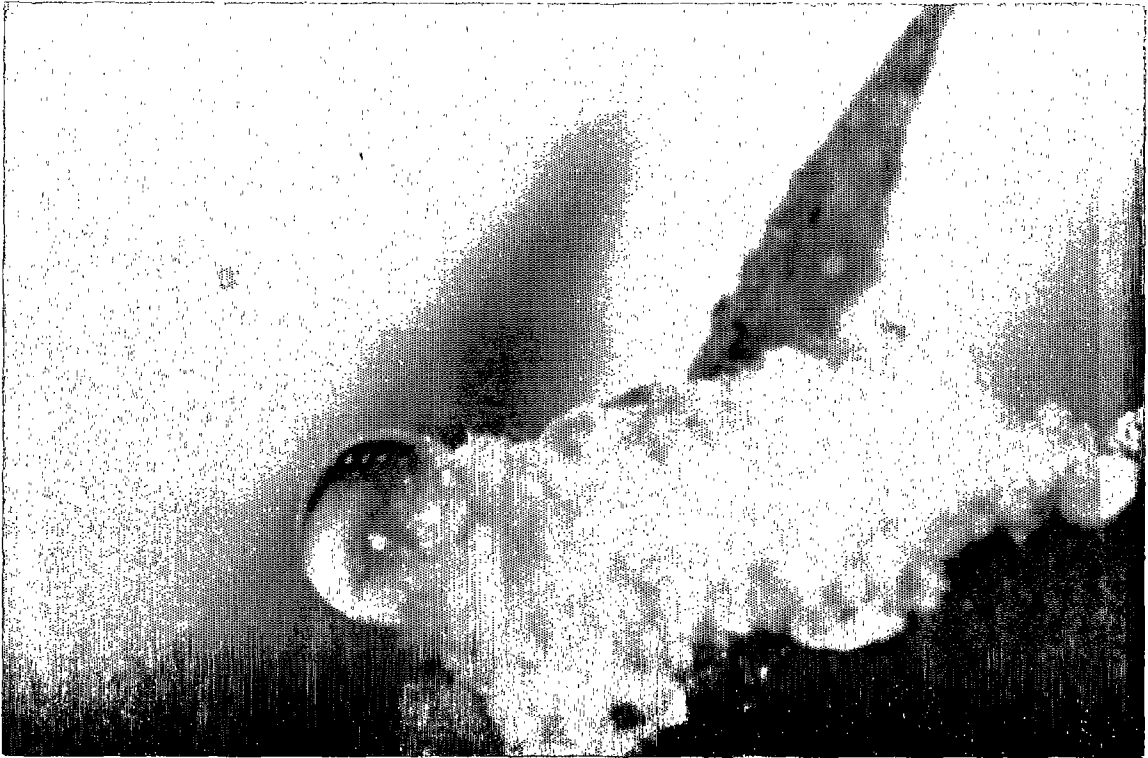
Prélèvement des liquides foliaires :

Nous utilisons la méthode de ROHRINGER et coll. (1983) modifiée par TERTULIANO et LE RÜ (1992) pour privilégier la récolte phloémienne. Cette méthode repose sur une centrifugation de feuilles dépétiolées. L'extrait recueilli contient principalement de la sève phloémienne, contaminée par du liquide extracellulaire (TERTULIANO et LE RÜ, 1992). Sur la base des théories en vigueur en physiologie des végétaux supérieurs, sur le chargement du phloème ("phloem loading") et étant donné la faible sélectivité de ce chargement phloémien (RIENS et coll., 1991), nous admettons dans nos discussions que les variations des constituants de la sève phloémienne sont perceptibles au niveau du liquide intercellulaire ainsi récolté.

Avant la centrifugation, les feuilles sont lavées à l'eau distillée puis séchées. Elles sont ensuite enveloppées dans un filtre nylon à mailles de 0,05 mm (deux feuilles minimum par filtre). L'ensemble est placé, base des feuilles dirigée vers le fond, dans un tube à centrifugation au fond duquel ont été disposées dix billes de verre de 5 mm de diamètre afin d'éviter que le liquide extrait ne soit au contact du filtre en fin de centrifugation. La centrifugation est effectuée à 10 000 tours par minute et pendant 10 minutes. Les extraits sont lyophilisés et pesés à l'aide d'une balance Sartorius 2642 (à 0,1 mg près). Ils sont ensuite stockés à -20 °C dans l'attente des dosages. La gamme des poids secs récoltés est comprise entre 10 et 50 mg.

Prélèvement de sève phloémienne :

Nous utilisons la méthode d'exsudation naturelle décrite dans le chapitre précédent (II.2.1.1). Ces échantillons seront souvent désignés par le terme d'exsudats.



0 1mm

FIGURE 25 : Gouttelette de mielat adsorbée à la surface de l'ovisac.

Prélèvement de miellat :

Il est parfois possible d'observer, sur l'élevage de masse pratiqué sous serre, des cochenilles adultes enveloppées entièrement de leur ovisac. Lorsque l'insecte éjecte les gouttelettes de miellat, celles-ci restent alors adsorbées à la surface de l'ovisac (figure 25). Il suffit de prélever ces gouttelettes, à l'aide de capillaires de verre étirés à la flamme. Cette méthode a d'ailleurs été employée par GRAY (1952) sur *Pseudococcus brevipes* Kll. (Hom., Pseudococcidae). Ce type de récolte constitue un prélèvement facile du miellat, en prenant soin de sélectionner les cochenilles la veille et de les débarrasser du miellat déjà accumulé sur l'ovisac. Après une nuit sous serre, les prélèvements sont effectués. Ils sont centrifugés pour éliminer les débris divers, puis lyophilisés et pesés à l'aide d'une balance Sartorius 2642 (à 0,1 mg près). La gamme de poids des échantillons recueillis dans ces conditions est de 3 à 15 mg de matière sèche. Les extraits sont ensuite stockés à -20°C dans l'attente des dosages.

Notons que pour comparer les teneurs en substances secondaires présentes dans la sève phloémienne et dans le miellat, nous prenons soin d'effectuer les prélèvements de sève sur les pétioles portant les cochenilles qui sont utilisées pour récolter le miellat. Tous les prélèvements sont effectués aux mêmes heures de la journée. Nous respectons également les durées d'apparition des gouttelettes de sève et de miellat (une nuit sous serre).

II.2.2 Détection et dosage des substances secondaires étudiées :

Alcaloïdes :

Pour chaque plante, 10 mg minimum des extraits secs obtenus par centrifugation de feuilles sont utilisés. Ils sont repris dans 100 µl d'eau distillée et déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince de gel de silice (Si 60). Le solvant de migration est du méthanol pur et la révélation est faite à l'aide du réactif de Dragendorff (BOUNIAS, 1983). La caféine et la quinine sont utilisées comme standards.

Cyanures liés et libres :

Pour comparer la composition en cyanures de la sève et du miellat, les extraits secs (3 à 15 mg de matière sèche) sont repris dans 2 ml d'acide phosphorique à 0,1 M. Le dosage pour évaluer la teneur en cyanures liés et libres est effectué selon la méthode de MONROY-RIVERA et coll. (1990). Sur 2 ml d'essai nous prélevons un volume de 100 µl qui serviront au dosage des cyanures libres. Celui-ci consiste, après neutralisation de l'échantillon à l'aide d'une solution de soude 1M à température ambiante, à faire réagir le cyanure avec la chloramine T et un mélange de pyridine et d'acide barbiturique. Notons que ces réactifs proviennent d'une solution commercialement disponible (Prolabo, préparation selon NAMBISAN et SUNDARESAN (1984)). Le volume de réactif utilisé est de 1 ml. La réaction

s'effectue à 2 °C pendant 30 minutes et à l'abri de la lumière. En parallèle, pour doser les cyanures liés nous prélevons un volume de 50 µl sur les 1,9 ml d'essai restant. Après hydrolyse par 1 ml d'une solution de linamarase ³ à 30 °C, pendant 15 minutes, l'acétone cyanohydrine obtenue, se dissocie irréversiblement à l'aide d'une solution de soude (0,2 M) jusqu'à un pH de l'ordre de 11 à 13. Après neutralisation par une solution d'acide chlorhydrique (0,2 N), la même réaction que pour le dosage des cyanures libres, est réalisée. Dans les deux cas, il apparaît une coloration rouge dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre à 570 nm. La détermination de la teneur en cyanure libre est faite à partir de l'équation suivante : $y = 716,976 x + 20,568$ où y correspond à la teneur de cyanure libre en ppm (ou mg/l) dans 100 µl d'essai et x à la densité optique lue. Cette équation est obtenue après dosage de solutions de cyanure de potassium (KCN) de concentrations croissantes. La sensibilité de la méthode est de 0,1 mg de cyanures libres pour un volume de 100 µl de prise d'essai. L'estimation quantitative des cyanures liés est faite par différence entre la teneur des cyanures libres issus de l'hydrolyse et celle des cyanures libres initiaux.

Pour les autres expérimentations, les analyses ont porté sur 670 échantillons au total ; pour des raisons de complexité du dosage des formes liées seuls les cyanures libres (provenant essentiellement de l'hydrolyse des formes liées lors de l'extraction du liquide foliaire) sont dosés. Les échantillons ayant été traités de façon similaire, nous pouvons admettre que les teneurs en cyanure libre de nos échantillons sont proportionnelles aux teneurs des formes liées dans le végétal. Les extraits secs (10 à 50 mg de matière sèche) sont repris dans 500 µl d'eau distillée. Un volume de 250 µl servira à doser les cyanures libres. Les 250 µl restants serviront à doser les composés phénoliques (voir plus loin dans le texte). Les cyanures libres sont dosés par colorimétrie à l'aide d'un "kit" de réactifs (Merck E., Darmstadt, Spectroquant 14800). Le principe de la méthode repose sur la formation, avec le chlore, de chlorure de cyanogène. Celui-ci réagit avec la pyridine pour former un glutacondialdéhyde, qui se condense avec l'acide diméthyl-1,3-barbiturique pour donner un colorant polyméthinique violet. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en cyanure libre et mesurée à 585 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La détermination de la teneur en cyanure libre est faite à partir de l'équation suivante : $y = 5,186x + 0,039$ où y correspond à la teneur en cyanure dans 5 ml de volume d'essai et x à la densité optique lue. Comme précédemment, cette équation est étalonnée par des solutions de KCN. La sensibilité de la méthode est de 0,1 mg de cyanure libre pour 5 ml de volume d'essai.

Composés phénoliques :

Le dosage des composés phénoliques est effectué par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Aux 250 µl d'échantillon mis de côté lors du dosage des cyanures

³ Cette solution contient 20 µg/ml de linamarase de manioc purifiée au laboratoire de microbiologie du centre ORSTOM de Brazzaville.

libres, nous ajoutons 250 μ l de méthanol pur. Avant injection dans la colonne HPLC, l'ensemble est centrifugé à 10000 tours par minute pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type Sigma 302 K, afin d'éliminer tout débris issus du prélèvement.

Un volume de 20 μ l de surnageant est injecté dans un appareil HPLC Constametric de type système 3200 ou de type KONTRON, selon les expériences décrites ultérieurement. La séparation des composés phénoliques est réalisée en phase réverse sur une colonne C18 (Prolabo S5 ODS2, 25 cm x 4,6 mm, granulométrie de 5 μ m et porosité de 80 Å). L'élution est réalisée à température ambiante, soit en élution isocratique par un mélange à 23,4 % d'acétonitrile et à 2 % d'acide acétique dans l'eau (v/v), soit par un gradient d'acétonitrile décrit en annexe 3. Le débit est de 0,8 ml/min. La détection est faite par un spectrophotomètre à 323 nm. La sortie du détecteur est reliée à un système d'acquisition de données sur micro-ordinateur, qui permet l'identification des pics suivant leur temps de sortie et leur intégration.

Les extraits sont chromatographiés individuellement et comparés à un mélange standard pour l'identification. L'estimation quantitative des composés phénoliques est faite en injectant un mélange de composés à des concentrations croissantes (permettant ainsi l'étalonnage du dosage). Ce mélange contient les acides phénoliques p-coumarique, cinnamique et ferulique, ainsi que la rutine et l'héspéridine pour les flavonoïdes glycosylés. Tous les pics détectés ne sont pas formellement identifiés. De ce fait, les acides phénoliques sont exprimés en équivalent d'acide p-coumarique, alors que les flavonoïdes glycosylés sont exprimés en équivalent de rutine. La sensibilité de la méthode est de 1,5 μ g en équivalent d'acide p-coumarique et de 3 μ g en équivalent de rutine pour 20 μ l d'injection.

II.2.3 Identification des flavonoïdes glycosylés :

Environ 10 mg d'extraits secs (obtenus par la méthode de centrifugation de feuilles de manioc, variété M'pembe) sont repris dans 1 ml d'une solution méthanolique à 50 %. La purification des composés s'effectue par HPLC avec l'appareil de type KONTRON selon le protocole décrit ci-dessus (II.2.2) et une élution par gradient d'acétonitrile (annexe 3). Un volume de 100 μ l est injecté dans une colonne C18 semi-préparative (μ Bondapak de 15 cm x 19 mm, granulométrie de 10 μ m et porosité de 125 Å). Le débit utilisé est de 7 ml/min. A la sortie du détecteur, chaque pic est collecté, les pics homologues sont regroupés puis séchés à froid au speed-vac (type SAVANT SC 100). Les pics ainsi purifiés sont ensuite envoyés à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles en vue d'une identification (par Mme Khuong Huu, ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette). L'identification des groupements aglycones s'effectue par spectrométrie de masse (SIMS et FABMS) et RMN. Après hydrolyse des flavonoïdes glycosylés en milieu acide, les sucres libérés sont réduits au borohydrure de sodium et acétylés par l'anhydride acétique. Ils sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse après avoir été séparés par chromatographie en phase gazeuse.

II.2.4 Etude de la linamarase de l'insecte :

Cette étude consiste principalement à mettre en évidence une linamarase propre à l'insecte. Pour cela, nous comparons les caractéristiques de l'enzyme (R_f^4 et pH optimum) présente dans les feuilles de manioc (variété M'pembe) et dans la cochenille. De plus, nous tentons de savoir si l'activité enzymatique de l'insecte est induite ou constitutive, nous utilisons pour cela des cochenilles élevées sur talinum, plante dépourvue de composés cyanés.

Broyage :

Les échantillons broyés sont les suivants : feuilles de manioc (variété M'pembe) et de talinum, cochenilles élevées sur M'pembe et sur talinum. Les tissus ont été broyés à 1-2 °C à l'ultraturax T25 dans un tampon de Mc Ilvain à pH 6,0 (1 mg minimum dans 2 ml de tampon). Les broyats sont ensuite centrifugés à 4 °C à 15000 π /min pendant 20 minutes (centrifugeuse Sigma 2K15). Les surnageants sont récupérés et dialysés pendant 12 heures dans des boyaux de Naturin (à membranes résistantes aux cellulases) dans un grand volume d'eau distillée (1,5 litres environ). Cette dialyse va permettre l'élimination des sucres réducteurs qui risqueraient de gêner les dosages des activités linamarasiques.

Dosage des protéines :

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de BRADFORD (1976). Cette méthode consiste à colorer les protéines en bleu par le réactif de Bradford, contenant 0,060 g de bleu de Coomassie G250, 3g d'acide perchlorique et 2,92 g de chlorure de sodium dans 100 ml d'eau distillée. On dilue 20 μ l du dialysat obtenu précédemment dans 1,5 ml de réactif. Après agitation, l'intensité de la coloration est appréciée à l'aide d'un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 595 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans les extraits : $y = 89x + 0,016$ où y correspond à la quantité de protéines (en μ g dans un volume de 1,5 ml) et x à la densité optique mesurée. La quantification est effectuée par référence à de l'albumine sérique bovine (BSA). La sensibilité de la méthode est de moins de 5 μ g de protéines (en équivalent BSA) dans un volume de 1,5 ml.

Dosage de la linamarase :

La méthode repose sur le dosage du glucose libéré par hydrolyse de la linamarine. Le milieu réactionnel comprend : 20 μ l de tampon Mc Ilvain (pH 6,0), 50 μ l d'une solution de

⁴ R_f : rapport frontal. Après la migration électrophorétique, il s'agit du rapport de la distance de migration de la protéine étudiée sur celle du front du solvant.

linamarine à 17,1 g/l et 50 µl d'essai (contenant l'enzyme). Des témoins, enzyme (sans substrat), substrat (sans enzyme) et réactif (sans enzyme ni substrat), sont effectués en parallèle. L'incubation se déroule à 37 °C pendant 30 minutes. Un volume de 3 ml d'une solution de glucose oxydase (préparée selon WERNER (1970)) est ensuite ajouté et permet le développement d'une coloration durant 25 minutes, à l'obscurité et à la température ambiante. L'intensité de cette coloration est déterminée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505 nm. La coloration est proportionnelle à la quantité de glucose libérée par l'hydrolyse : $y=119x + 4,05$ où y correspond à la quantité de glucose libérée (en µg) dans 3,12 ml et x à la densité optique mesurée. Cet étalonnage est réalisé à l'aide de solutions de glucose de concentrations croissantes. La sensibilité de la méthode est de 10 µg de glucose dans 3,12 ml. L'activité spécifique de la linamarase est exprimée en µg de glucose libéré par mg de protéines et par minute.

Electrophorèses :

Des électrophorèses sont ensuite réalisées, à partir de 20 à 200 µl de dialysats (contenant environ 2 à 50 µg de protéines) issus des broyats de feuilles de manioc ou de cochenilles entières élevées sur manioc. Des gels de polyacrylamide non dénaturants sont préparés et coulés dans des tubes en verre (0,5 x 10 cm). Les gels contiennent 5 ml d'une solution composée de 40 g d'acrylamide et 1,06 g de N-N'-méthylène-bis-acrylamide dans 100 ml d'eau distillée, 10 ml de solution de ferricyanure de potassium à 0,03 g/l et 10 ml d'une solution de persulfate d'ammonium à 4,8 g/l. Les chambres d'électrophorèse contiennent du tampon tris 0,25 M - glycine 1,92 M (pH 8,5) dilué extemporanément au 1/10 dans l'eau distillée. L'échantillon est additionné d'environ 50 µl d'une solution aqueuse de bleu de bromophénol à 0,5 %, et déposé sur le gel à l'aide d'une micropipette. La migration est effectuée à 4 °C sous 200 V. Après environ 15 minutes de migration, les gels subissent soit une coloration pour visualiser les bandes protéiques, soit un découpage (épaisseur de 2 mm) pour localiser l'activité linamarasique dans ces bandes. Pour chaque disque issu du découpage, nous effectuons une mise en évidence de l'activité linamarasique selon le protocole décrit précédemment. Quant à la coloration des protéines des gels, celle-ci est faite pendant 1 heure dans 20 ml d'une solution contenant 200 mg de bleu de Coomassie, 45 ml de méthanol, 45 ml d'eau distillée et 10 ml d'acide acétique. Les gels sont ensuite décolorés à 37 °C pendant 12 heures dans 500 ml d'une solution contenant 200 ml d'alcool méthylique, 70 ml d'acide acétique et 730 ml d'eau distillée. La valeur du Rf dépend ici du poids moléculaire et de la charge de la protéine.

Purification pour la détermination du pH optimum :

Pour déterminer le pH optimum de la linamarase de cochenille et de celle du manioc, une purification partielle est réalisée au préalable. Pour cela, 200 µl de lyophilisats issus des

broyats de cochenilles élevées sur manioc, ou de feuilles de manioc, sont déposés sur une colonne de DEAE sépharose (5 mm de diamètre, 4 cm de haut). Cette colonne est équilibrée par une solution de tampon phosphate à 5 mM, pH 7,8. A ce pH, la colonne est chargée positivement. Après le dépôt de l'échantillon, plusieurs tampons sont passés successivement (élution par palier) dans la colonne, à pH 7,8 et à des concentrations croissantes en chlorure de sodium (de 10 mM à 1600 mM). La détection des protéines se fait en sortie de colonne sous UV (à 280 nm) et l'élution s'effectue à 4 °C. Pour chaque fraction collectée nous réalisons un dosage de l'activité linamarasique éventuellement présente (selon la méthode employée précédemment). Les fractions présentant l'activité recherchée sont dialysées, puis concentrées. Après dosage des protéines, des dosages de linamarase à différents pH allant de 5,03 à 6,96 (tampons de Mc Ilvain) sont effectués pour déterminer le pH optimum de l'enzyme purifiée présente dans l'essai.

II.2.5 Test de toxicité du cyanure en milieu artificiel:

Dans cette expérimentation, nous utilisons le milieu Ap2 (= Ap0 légèrement modifié, voir annexe 1), mis au point pour des pucerons à l'U.A. INRA 227 de Villeurbanne. A ce milieu, préalablement stérilisé, on ajoute du KCN afin de préparer la gamme de concentrations suivantes : 0-25-50-100-200-400-800-1600 mg/l. Cette gamme est établie à partir des concentrations rencontrées dans les feuilles de manioc (comprises entre 200 et 700 mg/l de liquide de broyage de feuilles entières). Chaque solution ainsi préparée est ensuite placée dans une cage d'élevage de la façon présentée dans le chapitre précédent (II.2.2). Nous testons la toxicité du KCN pendant 7 jours vis-à-vis de la cochenille et du puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum* Harris, Hom. Aphididae), déposés au stade L1. Notre puceron se développant sur plante également pourvue de composé cyané, nous servira d'étude comparative de toxicité.

Le protocole de détermination des doses létales dérive de celui décrit par RAHBE et FEBVAY (1993). Trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration (10 individus par boîte pour *A. pisum*, environ 30 individus pour *P. manihoti*). Après des comptages journaliers, la mortalité cumulée au bout de 7 jours à 20 °C est utilisée pour les calculs. A partir du logiciel "Toxico " sur McIntosh (Febvay G. et Rahbe Y., 1991), les doses létales à différents niveaux de mortalité (20 %, 50 %, ...) sont évaluées avec leur intervalle de confiance. Sur la base des travaux de BLISS (1935), ce logiciel permet la transformation linéaire pondérée d'une courbe sigmoïde de mortalité (transformation des pourcentages de mortalité en probits). Il réalise le test d'adéquation à une relation linéaire (test du Chi²) et trace le graphe de la droite de régression avec son intervalle de confiance.

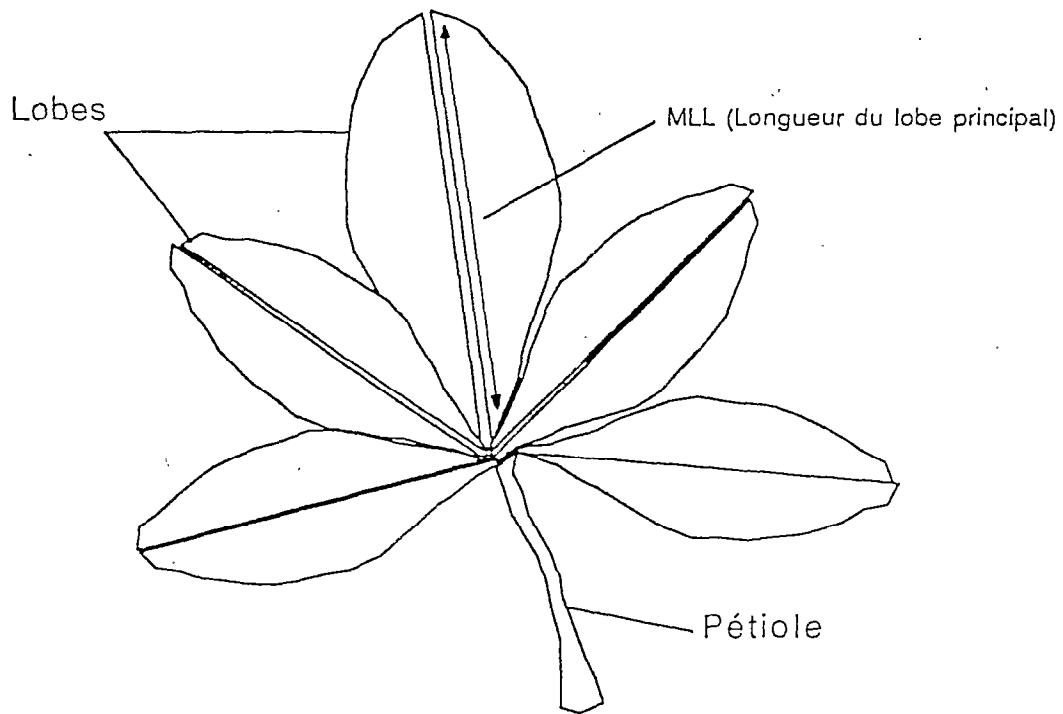


FIGURE 26 : Représentation schématique d'une feuille de manioc.

II.2.6 Caractérisation de l'état hydrique du végétal :

Deux paramètres sont retenus pour caractériser l'état hydrique du manioc, qui sont le potentiel hydrique foliaire, et la morphologie globale du plant (par l'estimation de la surface foliaire).

Mesure du potentiel hydrique foliaire :

Les mesures du potentiel hydrique foliaire sont réalisées à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instrument 650). Les feuilles utilisées sont entières et pourvues de leur pétiole. Le pétiole est ensuite sectionné perpendiculairement à son axe ; la feuille est alors enfermée dans la chambre à pression et de l'azote est envoyé dans cette dernière jusqu'à ce que la pression dans la feuille soit en équilibre avec la pression de l'enceinte. La lecture est effectuée lorsque le ménisque au niveau de la section du pétiole devient convexe. Le potentiel hydrique foliaire est alors égal à la pression lue sur le cadran de la chambre à pression. Il est exprimé en bar. Les mesures sont effectuées aux mêmes heures de la journée entre 9H00 et 10H00 a.m. et sur les mêmes étages foliaires.

Estimation de la surface foliaire :

L'estimation de la surface foliaire est basée sur un travail réalisé par HAMMER (1980). Cet auteur montre qu'une équation simple et fiable pour estimer la surface foliaire (LA) d'une feuille de manioc est la suivante : $\ln(LA) = -7,47 + 2,460 \ln(MLL)$ où LA correspond à la surface foliaire en cm^2 et MLL à la longueur du lobe principal de la feuille en mm (figure 26). Pour cette estimation, il nous suffit donc de mesurer la longueur du lobe principal de la feuille choisie. Cette méthode a l'avantage d'être rapide, de ne pas être destructive et d'être applicable sur le terrain.

II.2.7 Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et l'infestation :

Nous utilisons des plantes âgées de 3 mois, cultivées en pot (20 x 30 cm) sous ombrière (il en sera de même pour les expérimentations citées aux paragraphes II.2.8 et II.2.9). Nous nous proposons ici d'apprécier si les différences de résistance "antibiotique" exprimées par les plantes vis-à-vis de la cochenille peuvent être reliées aux teneurs des substances secondaires dans le compartiment phloémien, et cela en conditions d'infestation ou non. Pour cela, nous analysons ces composés sur plusieurs génotypes présentant des caractères antibiotiques différents (voir tableau 8). Les plantes sont infestées à raison de 200 cochenilles (stade L1) par plant, réparties sur la deuxième et la troisième feuille sous l'apex. La durée d'infestation est de deux mois. Elle est identique à celle utilisée par LE RÜ et coll. (1991) pour déterminer les r_c . Des plants témoins dans les mêmes conditions expérimentales ne subissent pas

d'infestation. Il est à noter que chaque traitement et chaque génotype font l'objet de 5 répétitions.

Au bout de 2 mois d'infestation, nous prélevons aux mêmes heures de la journée (environ 10H00 a.m.) la deuxième et la troisième feuille à partir de l'apex de chacun des plants (infestés et non infestés). Sur ces feuilles, nous prélevons les liquides foliaires selon le protocole déjà décrit. A partir des extraits secs, nous dosons le cyanure libre et les composés phénoliques comme décrit précédemment (HPLC sans gradient, appareil Constametric système 3200).

II.2.8 Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et la densité d'infestation :

Dans cette étude, nous tentons de relier le niveau en substances secondaires du phloème à la densité d'infestation sur trois génotypes (Zanaga, 30M7 et "Faux caoutchouc") présentant des caractères antibiotiques différents. Pour chaque plante étudiée, nous effectuons trois densités d'infestation : 0, 100 et 1000 cochenilles par plant. L'expérimentation est pratiquée à l'extérieur, sous ombrière. Les infestations sont faites ici sur tout le plant. Pour chaque traitement et chaque génotype, nous effectuons 5 répétitions. Au bout d'un mois d'infestation, nous prélevons toutes les feuilles du plant, aux mêmes heures de la journée. Nous prélevons ensuite les liquides foliaires selon le protocole décrit précédemment. Nous dosons le cyanure libre et les composés phénoliques à partir des extraits secs (HPLC avec gradient, appareil KONTRON).

II.2.9 Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et l'état hydrique du végétal :

Nous nous proposons de suivre le niveau en substances secondaires du phloème selon l'état hydrique de la plante, pour les trois génotypes, cités dans le paragraphe précédent, présentant des caractères antibiotiques différents. Avant l'expérimentation, nous imposons trois états hydriques pour la plante pendant deux mois :

- arrosage deux fois par semaine, mentionné 2/S (apport d'eau normal utilisé au laboratoire pour les plantes en pot) ;
- arrosage une fois par semaine mentionné 1/S (faible déficit hydrique) ;
- arrosage une fois toutes les deux semaines 1/2S (fort déficit hydrique).

Selon TURNER (1981), deux paramètres sont disponibles pour caractériser l'état hydrique d'une plante : le contenu hydrique et l'état énergétique de l'eau dans la cellule ou dans la plante. Pour le modèle manioc, des travaux du CIAT (1980) ont défini les paramètres "marqueurs" d'un déficit hydrique du végétal. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le nombre de feuilles par plant et le potentiel hydrique. Ces deux paramètres diminuent lors d'un déficit

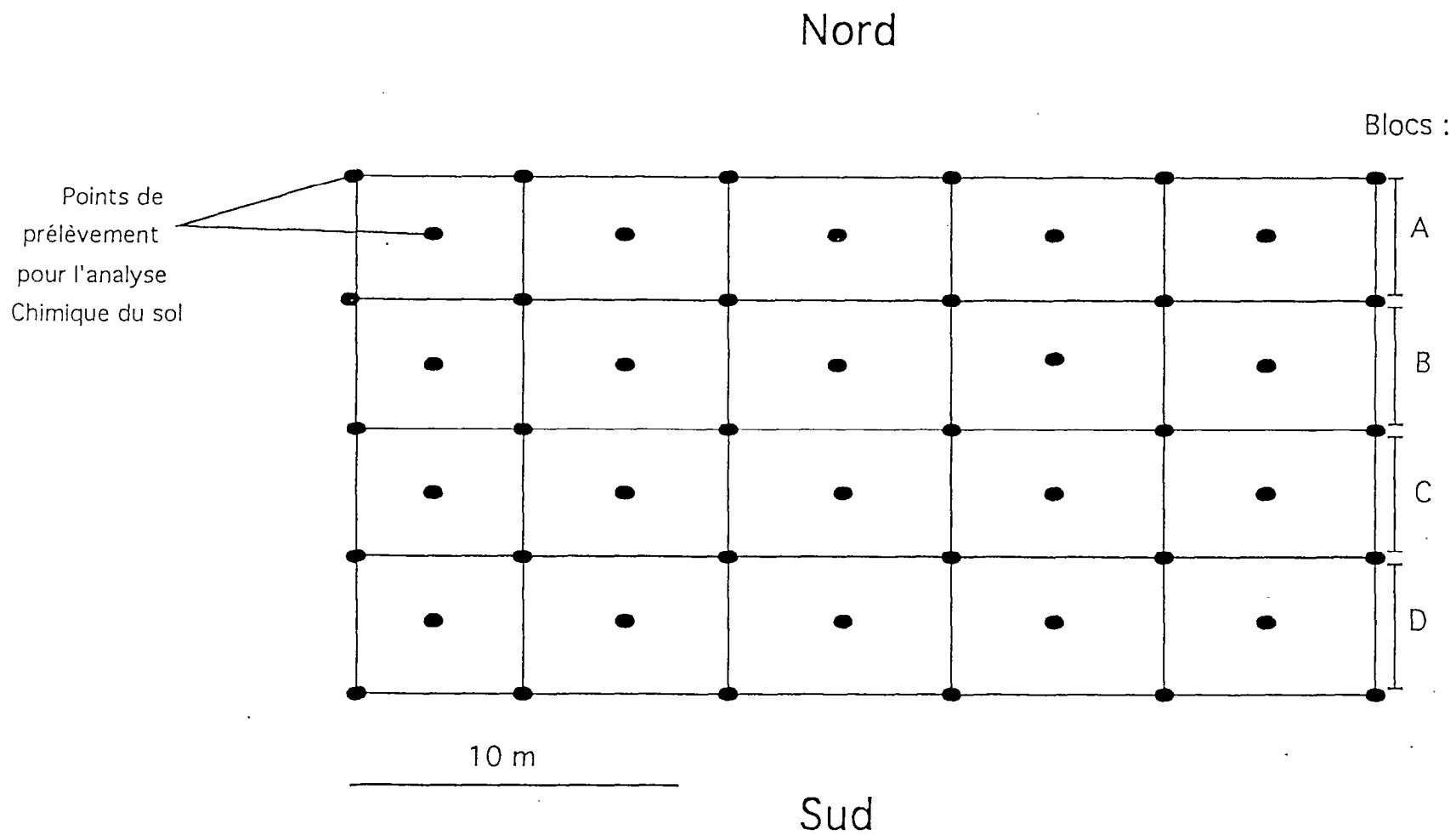


FIGURE 27 : Plan de l'essai pour l'expérimentation sur le terrain (3 géotypes, 2 niveaux d'infestation et 4 mois d'expérimentation).

hydrique de la plante. Ainsi, dans cette manipulation, nous retenons ces deux paramètres pour apprécier le déficit hydrique provoqué sur nos plantes.

Pour chaque génotype et chaque traitement, 5 répétitions sont choisies. Nous prélevons dans chaque cas les liquides foliaires de la deuxième et de la troisième feuille à partir de l'apex selon le protocole décrit précédemment, et nous dosons le cyanure libre et les composés phénoliques à partir d'extraits secs (HPLC sans gradient, appareil Constametric système 3200).

II.2.10 Variation des substances secondaires étudiées en conditions naturelles selon le génotype, l'infestation et la saison :

Dans cette expérimentation, nous tentons de relier le niveau en substances secondaires du phloème avec la saison (saison sèche/saison des pluies), pour des manioc infestés et non infestés présentant des caractères antibiotiques différents (toujours Zanaga, 30M7 et "Faux caoutchouc"). Cette expérimentation est réalisée sur le terrain, au centre ORSTOM de Brazzaville. Le choix du terrain est fait après examen pédologique d'une portion de terrain défrichée pour les besoins de l'étude (figure 27). Des prélèvements de sol sont effectués à deux profondeurs (0-10 et 10-20 cm de la surface). Ces échantillons sont rapportés au laboratoire de pédologie du centre ORSTOM de Brazzaville pour le dosage : du potassium, du magnésium, du calcium, du sodium, du carbone total, de l'aluminium et de la matière organique. Le pH est également mesuré. Après examen des résultats (voir au paragraphe III.8), nous partageons notre terrain en 4 blocs différents par leurs compositions chimiques (figure 27). Les blocs sont appelés A, B, C et D. Ils constituent chacun une répétition. Les boutures (3 génotypes retenus) sont disposées de façon aléatoire au sein de chaque bloc, trois mois avant le début de l'expérimentation.

Pour chaque génotype et pour chaque bloc, nous pratiquons deux densités d'infestation : 0 et 200 cochenilles réparties sur la deuxième et la troisième feuille à partir de l'apex. Avant chaque infestation, nous prenons soin de compter le nombre de feuilles et d'évaluer la surface foliaire selon le protocole décrit précédemment. Ces paramètres, qui sont faibles lors d'un déficit hydrique du manioc, nous permettront d'apprécier l'état hydrique du manioc au champ selon la saison (rapport du CIAT, (1980)).

Au bout d'un mois d'infestation, nous effectuons les prélèvements de feuilles et nous évaluons le potentiel hydrique foliaire aux mêmes heures de la journée. Les feuilles entières sont placées à -20°C dans l'attente des prélèvements du liquide foliaire. Notons que la croissance des plantes en pleine terre est différente de celle des plantes en pot. Dans cette expérimentation, nous prenons soin de vérifier que nous prélevons les feuilles situées aux mêmes étages foliaires pour les plants infestés et non infestés. Nous dosons le cyanure libre et les composés phénoliques à partir d'extraits secs (HPLC sans gradient, appareil Constametric système 3200).

Les caractéristiques climatologiques pour l'année 1991, ainsi que la dynamique des populations du ravageur au champ sur l'hybride "Faux caoutchouc", sont mentionnées au chapitre I (voir figure 9). Ces observations nous conduisent à retenir pour notre expérimentation sur le terrain 4, mois d'infestation : février (petite saison sèche), mai (grande saison des pluies), août (grande saison sèche) et novembre (retour de la grande saison des pluies).

II.2.11. Traitements statistiques :

La validité de l'analyse de variance (à un, deux ou trois facteurs) a été admise en supposant les populations normales et de même variance, et les échantillons aléatoires, simples et indépendants. Mais, si ces conditions sont suffisantes, elles ne sont pas toujours absolument nécessaires pour autant. Ayant souvent de petits échantillons, nous avons pris soin d'employer ce genre d'analyse lorsque les distributions des populations-parents sont proches des distributions normales, et lorsque ces distributions sont de formes identiques d'une population à l'autre. De plus, l'hypothèse d'égalité de variances ou d'homoscédasticité est d'importance relativement secondaire lorsque les effectifs des échantillons sont tous égaux, comme c'est le cas de la plupart de nos expériences. Dans ces conditions, l'analyse de variance est une méthode robuste, tant en ce qui concerne la normalité qu'au point de vue de l'égalité des variances. Malheureusement, il faut reconnaître qu'il est souvent difficile de contrôler la validité des hypothèses de normalité et d'égalité de variances à partir des données, généralement peu nombreuses, qui sont soumises à l'analyse de variance. Dans notre cas, la nature des variables analysées permet de se référer naturellement à l'hypothèse de normalité.

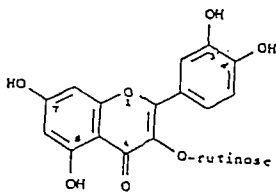
Précisons que, pour l'analyse de variance à deux ou trois facteurs, nous utilisons le principe de l'analyse des modèles croisés à effectifs égaux. Certains facteurs sont aléatoires (densité d'infestation et niveau de stress hydrique), impliquant des restrictions à l'analyse des interactions. D'autres sont fixes (génotype, saison) ou considérés comme tels (niveau d'infestation, avec et sans - i, ni-), permettant une plus grande souplesse d'interprétation vis-à-vis des interactions.

Après analyse de variance, une comparaison de moyennes deux à deux est réalisée selon le test du PLSD de Fisher pour les différences significatives observées entre les teneurs en composés secondaires et le(s) facteur(s) étudié(s) lors de l'analyse de variance. Toutes ces analyses ont été réalisées à l'aide d'un logiciel disponible sur MacIntosh (Statview ®).

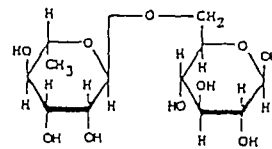
TABLEAU 9 : Teneurs totales en acides phénoliques, en flavonoïdes glycosylés et en cyanures libres des liquides foliaires pour six plantes testées (*moyennes \pm erreur standard; n=5, en mg/g de matière sèche) :

| Plantes | Cyanures libres ($p < 0,0001$) | Acides phénoliques ($p < 0,0001$) | Flavonoïdes glycosylés ($p = 0,065$) |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| <i>poinsettia</i> | 0 | $2,5 \pm 0,4$ c | $12,1 \pm 1,2$ |
| <i>talinum</i> | 0 | $2,1 \pm 0,3$ bc | $7,7 \pm 1,2$ |
| Incoza | $0,5 \pm 0,1$ a | $1,2 \pm 0,1$ ab | $10,9 \pm 1,9$ |
| Zanaga | $0,9 \pm 0,3$ b | $1,2 \pm 0,1$ ab | $7,0 \pm 1,4$ |
| 30M7 | $2,1 \pm 0,5$ c | $0,7 \pm 0,1$ a | $11,1 \pm 1,5$ |
| "Faux caoutchouc" | $0,6 \pm 0,1$ ab | $1,4 \pm 0,1$ b | $8,1 \pm 0,7$ |

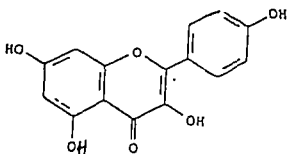
* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5% selon le test du PLSD de Fisher.



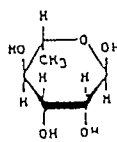
Rutine = quercétine-rutinosé



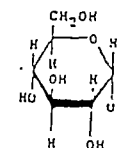
Rutinose



Kaempférol



Rhamnose



Glucose

"kaempférol-glyc 1" et "kaempférol-glyc 2"

FIGURE 28 : Formule développée de la rutine et composition des glycosides de kaempférol présents dans la sève phloémienne de manioc.

III Résultats et discussion :

III.1 Substances secondaires présentes dans les feuilles de plantes hôtes et de substitution :

La détection des alcaloïdes faite à partir des extraits secs analysés montre l'absence de ces composés dans toutes les plantes étudiées, et donc que cette famille de substances secondaires n'est pas impliquée dans les mécanismes de défense de ces végétaux à l'attaque de *P. manihoti*. Pour les autres composés détectés, les plantes de substitution se caractérisent par l'absence de cyanure libre (tableau 9). Alors que nous avons montré, dans l'analyse comportementale du chapitre II, que les compartiments inter et intracellulaire du mésophylle étaient pour une bonne part impliqués dans les mécanismes de fixation de l'insecte sur la plante, ce résultat indique que le cyanure libre pourrait jouer un rôle non négligeable dans ces mécanismes. Le niveau en cyanure libre dans nos extraits peut être pris comme indicateur du niveau des glycosides cyanogéniques dans le compartiment intracellulaire de l'épiderme (CONN, 1980). La présence exclusive de ces composés dans les feuilles de manioc et les pénétrations observées en EPG (voir chapitre II), indiquent que ces glycosides peuvent jouer un rôle phagostimulant vis-à-vis de la cochenille. Une corrélation de rangs de Spearman entre les teneurs en cyanures libres (tableau 9) et les durées des piqûres intracellulaires (ds-pd, voir tableau 5, chapitre II) s'avère significative ($p=0,975$; $p=0,05$), ce qui peut être le signe d'une ponction allélochimique participant à l'identification de l'hôte. Cela devrait cependant être confirmé sur une plus large gamme de manioc, ainsi que sur milieux artificiels, avant d'en tirer une conclusion définitive. Un tel rôle phagostimulant de glycosides cyanogéniques a déjà été montré, par exemple pour l'amygdaline dans le modèle *Lasiocampidae/Rosaceae* par KOGAN (1977). Il semble que le rôle phagostimulant des glycosides en général ne soit pas une nouveauté. En effet, cet auteur rapporte également que d'autres glycosides (non cyanogéniques), à base de groupements thiols ou autres sont phagostimulants pour beaucoup d'espèces d'insectes tels que dans les modèles : *Acrididae/Asclepiadaceae*, *Aphididae/Crucifereae*, *Epilachninae/Leguminoseae*, *Plutellidae/Crucifereae*.

Quant aux composés phénoliques, seul le niveau en acides phénoliques diffère significativement, les flavonoïdes ne marquant pas significativement les génotypes. Le niveau des acides phénoliques est plus élevé sur plantes de substitution que sur plantes hôtes (tableau 9). Comme précédemment pour les cyanures, on peut remarquer que la meilleure corrélation d'un paramètre EPG avec les teneurs en acides phénoliques a lieu pour les durées de la pénétration extracellulaire (d-C-10), avec là aussi un coefficient de corrélation des rangs de Spearman statistiquement significatif ($p=0,938$; $p=0,035$). Sur la base de ces observations, il serait tentant d'imaginer que les acides phénoliques puissent participer aux processus de fixation de l'insecte sur la plante car ces composés, contrairement aux flavonoïdes, sont généralement extracellulaires et précurseurs de nombreux polymères pariétaux tels que la lignine, la cutine, ou la subérine, ou couplés à des substances pectiques (FRY, 1983,

GOODMAN, 1986). Ils peuvent donc parfaitement interagir avec les enzymes salivaires de l'insecte, en produisant des composés à activité biologique marquée ou modifiant la structure physique des parois traversées par les stylets. Cette hypothèse est cependant bien plus délicate à tester que celle du rôle phagostimulant des glycosides cyanogéniques, car l'approche histochimique, délicate, semble seule capable de rendre compte des interactions ayant lieu in situ.

III.2 Substances secondaires présentes dans la sève phloémienne du manioc et dans le miellat :

Le dosage du cyanure dans les exsudats nous révèle l'absence de cyanure libre. Cependant, ils contiennent des cyanures liés, dont la concentration moyenne est de $1,6 \pm 0,3$ mg/g de matière sèche (n=4). Il est intéressant de signaler que la présence de glycosides cyanogéniques dans les exsudats de manioc a été également observée par FAHN (1979). Il semble que cette caractéristique ne soit pas générale à toutes les variétés de manioc, car PEREIRA et SPLISTTSTOESSER (1987) n'en révèlent pas pour celles qu'ils ont étudiées. Néanmoins, avant dosage par spectrophotométrie, ces auteurs utilisent un flacon de type Warburg pour effectuer les réactions à température ambiante et les échanges air/liquide y sont bien plus importants que dans un tube à essai. On peut redouter une dégradation de ces composés relativement thermolabiles, qui entraverait la sensibilité nécessaire à l'analyse des petits échantillons tels que les exsudats naturels.

Notons que la concentration en cyanures liés dans les exsudats est 4,7 fois plus forte que la concentration totale en acides aminés libres (= 0,34 mg/g de matière sèche). Nous admettons que ces extraits correspondent à de la sève phloémienne et qu'aucune "filtration" ne s'opère entre le compartiment phloémien et l'extérieur du végétal lors de l'exsudation. *P. manihoti* étant principalement phloémophage, ces résultats indiquent alors que la faible source d'azote sous forme d'acides aminés de la sève peut être compensée par une source azotée issue des composés cyanés présents dans le compartiment phloémien. Le rapport molaire des composés cyanés au total des acides aminés libres étant de 2,4 ; l'utilisation de l'atome d'azote cyané constituerait un appoint nutritionnel conséquent. L'assimilation du groupement -CN étant connu chez les microorganismes (SEGRETAIN et BORIES, 1986), ainsi que chez certains insectes (MEYERS et AHMAD, 1991), il est tentant d'imaginer une telle possibilité chez *P. manihoti*.

L'effet phagostimulant des glycosides cyanogéniques, qui a été suggéré dans le paragraphe précédent, peut être non seulement localisé au niveau du mésophylle mais également au niveau du phloème, puisque la sève contient ces glycosides. Il serait intéressant de tester l'effet phagostimulant de ces glycosides en milieu artificiel. En effet, dans une étude recherchant la toxicité des composés cyanés, pour un Homoptère phloémophage FISK (1980) rapporte que l'adjonction de dhurrine (glycoside cyanogénique du sorgho, provenant de la

phénylalanine) dans un milieu artificiel provoque une augmentation de production de miellat chez *Peregrinus maidis* Ashm. (Hom., Tettigometridae).

Le miellat de cochenille renferme également des cyanures liés dont la teneur moyenne est de $0,6 \pm 0,1$ mg/g (n=4) de matière sèche. La présence de cyanures liés dans les exsudats et dans le miellat confirme bien que ces composés peuvent être transportés par la sève phloémienne et consommés par *P. manihoti*. Le miellat contient également du cyanure libre, à une concentration moyenne de $0,8 \pm 0,2$ mg/g de matière sèche (n=4). Il est très vraisemblablement libéré par le métabolisme digestif à partir d'une fraction des cyanures liés consommés par l'insecte. Ceci implique la présence d'un équipement enzymatique permettant la libération du cyanure, et suppose aussi l'existence d'une voie d'évitement de l'intoxication cyanhydrique, par excrétion ou par détoxification, comme savent le faire bon nombre de microorganismes et certains insectes (SEGRETAIN et BORIES, 1986, MEYERS et AHMAD, 1991).

L'analyse des composés phénoliques d'exsudats de manioc révèle également la présence de trois flavonoïdes glycosylés, ainsi qu'une quasi absence d'acides phénoliques (voir chromatogramme obtenu en annexe 4a). L'identification chimique précise de ces composés indique qu'il s'agit de rutine et de deux isomères, dont l'aglycone est du kaempférol, auquel se lient les radicaux glucidiques glucose et rhamnose dans un ordre et une configuration indéterminée et différente de celle du rutinose (figure 28). Pour faciliter la suite de notre rédaction, nous appellerons ces deux isomères : "kaempférol-glyc 1" et "kaempférol-glyc 2". La teneur moyenne en phénols totaux des exsudats est de $19,0 \pm 2,3$ µg/g de matière sèche (n=3), celle du miellat est de $8,0 \pm 3,0$ µg/g de matière sèche (n=3). Ces résultats révèlent donc également que ces flavonoïdes glycosylés, hydrosolubles, sont transportés par la sève phloémienne et consommés par l'insecte.

La composition en phénols de l'exsudat n'est pas identique à celle du miellat. En effet, si nous comparons les chromatogrammes (annexes 4) obtenus entre ces deux types d'échantillons, nous nous apercevons que seuls le "kaempférol-glyc 1" et le "kaempférol-glyc 2" se retrouvent dans l'exsudat et dans le miellat. Par contre, la rutine (dont le temps de rétention est de 5,26' sur le chromatogramme) ne se retrouve apparemment plus dans le miellat, où apparaît un autre flavonoïde glycosylé à 5,06'. De plus, le miellat montre la présence d'un acide phénolique à 4,65' et d'un flavonoïde libre à 12,88'. Il se produirait une modification du spectre phénolique de l'aliment lors du passage intestinal chez *P. manihoti*. PENG et MILES (1991) observent la présence de catéchine dans la sève phloémienne d'une Rosaceae, mais ne retrouvent cependant pas ce composé dans le miellat de *Macrosiphum rosae* L. (Hom., Aphididae). Ces auteurs notent de plus la présence, dans l'intestin et le miellat, de composés phénoliques différents de ceux rencontrés dans l'hémolymphe. La métabolisation de phénols alimentaires par des Homoptères phloémophages semble donc un

phénomène répandu (MULLIN, 1986), bien que sa signification physiologique et écologique soit encore totalement obscure.

Chez les plantes supérieures, de récents travaux ont montré que les flavonoïdes et les glycosides sont transportés à travers le tonoplaste à l'aide d'un système de transport spécifique, similaire à celui des métabolites primaires (sucres, acides aminés) ou des ions (K^+ , Na^+ , Ca^{++}) (WINK, 1990). Il est possible que, chez les insectes, ces substances soient aussi transportées et/ou séquestrées par des protéines-porteuses membranaires de l'épithélium intestinal (WINK et WITTE, 1991).

III.3 Etude de la linamarase de l'insecte :

Les caractéristiques biochimiques des linamarases d'origine animale et végétale que nous avons étudiées sont présentées sur le tableau 10. Notons que les résultats concernant le pH optimum de la linamarase de manioc sont comparables à ceux rapportés par YEOH (1988), qui indiquent que ce pH est compris entre 6,0 et 7,1 pour beaucoup de variétés de manioc.

Le tableau 10 montre que le Rf et le pH optimum de la linamarase de cochenille sont différents de ceux de la linamarase de manioc. Contrairement aux travaux de BANI (1990), qui ont montré que l'enzyme présente chez le criquet puant (*Zonocerrus variegatus* Orthoptera, Pyrgomorphidae) se nourrissant de manioc est d'origine végétale, celle rencontrée dans *P. manihoti* semble propre à l'insecte. Cette différence paraît logique lorsqu'on compare les modes alimentaires de ces deux insectes, le criquet ingérant bien entendu tous les tissus foliaires, qui contiennent l'enzyme d'origine végétale.

Par ailleurs, l'enzyme de *P. manihoti* semble relever d'un système inductible puisque les cochenilles élevées sur talinum (plante où aucun composé cyanogénique n'a pu être décelé) ne présentent pas d'activité linamarasique.

La présence d'une linamarase (i.e. d'une β -glucosidase à activité linamarasique) propre à un insecte n'est pas un fait nouveau. FRANZL et coll. (1989) ont étudié une linamarase propre au Lépidoptère *Zygaena trifolii* Esper sur Fabaceae, présente dans l'hémolymphe de cet insecte. Pour *P. manihoti*, la localisation tissulaire de l'enzyme ne peut pas être précisée actuellement. La libération du -CN de la linamarine peut aussi bien être localisée dans le tube digestif que dans un autre compartiment tissulaire (hémolymphe, bactériome). Il peut être intéressant de mentionner que 30 des colonies bactériennes isolées dans le chapitre précédent et provenant de cochenilles entières broyées, sont cyano-résistantes jusqu'à une concentration en KCN de 700 mg/l dans le milieu hypersaccharosé et présentent également une activité linamarasique. Bien que ce résultat doive être confirmé et complété, il soulève la possibilité d'une provenance symbiotique de l'activité linamarasique décelée dans *P. manihoti*.

CONN (1980) rapporte qu'au moins 200 espèces végétales ont des glycosides cyanogéniques. On en trouve chez les Rosaceae, les Leguminoseae, les Gramineae, les

TABLEAU 10.: Caractéristiques physico-chimiques de la linamarase de manioc et de celle de la cochenille:

| Linamarase | *Activité spécifique | Rf | pH optimum |
|-------------------------------|----------------------|------|------------|
| Manioc | 1785 | 0,1 | 6,0-7,1 |
| Cochenille élevée sur manioc | 54 | 0,06 | 5,0-5,9 |
| Cochenille élevée sur talinum | 0 | - | - |

* quantité en μg de glucose libérée par mg de protéine et par minute

Les purifications relatives sont de 8,6 ng/ μg pour le manioc et de 16 ng/ μg pour la cochenille du manioc (ng de protéines purifiées par μg de protéines déposées).

Araceae, les Compositae, les Euphorbiaceae et les Passifloraceae. Cette caractéristique biochimique paraît donc répandue à un grand nombre de familles végétales. FRANZL et coll. (1989) précisent que des β -glucosidases responsables de l'hydrolyse de ces glycosides sont rencontrées chez des Coléoptères, des Hétéroptères, des Hyménoptères et des Lépidoptères. De telles observations sont révélatrices de l'importance jouée par les β -glucosidases dans l'alimentation et l'inféodation à une espèce végétale d'un bon nombre d'insectes.

III.4 Test de toxicité du cyanure en milieu artificiel :

Un problème technique perturbe l'analyse de ces résultats de toxicité. Sur le milieu artificiel témoin (Ap2), qui, comme les milieux GB et Ap0 (voir chapitre III, paragraphe III.2), reste mal adapté à l'élevage correct de *P. manihoti*, la mortalité cumulée au bout de 7 jours à 20 °C est de l'ordre de 50 à 60 %. Etant donné que le calcul des corrections de mortalité par rapport aux témoins par la procédure de ABBOTT (1925) n'est prévu que pour des mortalités comprises entre 5 et 20 %, il n'est pas possible d'utiliser directement les comparaisons des DL50 (dose létale pour 50 % de la population) des cyanures entre *A. pisum* (0 et 5 % de mortalité témoin dans la présente expérience) et *P. manihoti* (55 et 60 % de mortalité témoin dans la présente expérience). Nous avons contourné cette limitation en effectuant cette correction "a posteriori", c'est-à-dire en comparant une DL80 pour *P. manihoti* ($((60+100)/2=80)$) à une DL50 pour *A. pisum* ($((0+100)/2=50)$). La figure 29 illustre ces résultats de toxicité et on peut estimer que *A. pisum* serait 2,5 fois plus sensible au cyanure (DL50=112mg/l) que *P. manihoti* (DL80=274 mg/l). Il est intéressant de souligner que pour *A. pisum*, la dose létale vis-à-vis du cyanure semble étonnamment élevée. En masse, le cyanure se révèle moins toxique que certaines protéines, ce qui souligne un rapport de toxicité molaire beaucoup plus faible (RAHBE, comm. pers.). Ceci pourrait, peut être, s'expliquer en partie par le fait que ce puceron rencontre des glycosides cyanogéniques sur son hôte de laboratoire. La vicianine est en effet un glycoside cyanogénique présent chez les végétaux de genre *Vicia*. *A. pisum* ne serait donc pas à ce titre un puceron témoin idéal !

PESSON (1944) rapporte que les femelles de Coccoidea possèdent des caractéristiques anatomiques très particulières de l'appareil digestif, notamment en comparaison avec les Aphides. Chez les cochenilles, la polarité (filtration unilatérale de l'intestin moyen initial à l'intestin moyen terminal), nécessaire pour que la chambre filtrante soit efficace, irait de pair avec une inversion de la fonction intestinale : l'intestin moyen terminal, habituellement absorbant chez les Aphides, deviendrait excréteur chez la cochenille. En conséquence, il est possible d'envisager chez *P. manihoti* une voie d'excrétion plus efficace que chez les pucerons. Cependant, d'autres voies d'évitement de toxicité du cyanure peuvent être envisagées telle que l'assimilation ou la détoxification.

III.5. Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et l'infestation :

Il nous semble utile de faire ici une remarque sur les unités utilisées pour le dosage des substances secondaires. Elles sont exprimées en mg/g de matière sèche. En tant que telle, cette unité ne représente pas l'unité "primitive" rencontrée par l'insecte in situ, qui est la concentration dans les liquides ingérés. Cette dernière est cependant très difficile sinon impossible à évaluer rigoureusement, et d'autre part vraisemblablement très variable, par exemple lors des variations du statut hydrique de la plante (ne serait-ce qu'au cours du nyctémère). Dans ces conditions, les discussions sur les teneurs exprimées en mg/g de matière sèche peuvent être prises comme reflétant la part de la substance secondaire étudiée dans la masse globale de photosynthétats recueillis (ces derniers constituant l'essentiel du poids sec dans les échantillons que nous étudions). Cette unité reflète donc bien la situation en terme d'écologie chimique, puisqu'elle analyse la part relative investie par la plante dans la synthèse ou le transport spécifique du composé étudié.

Pour les composés phénoliques analysés (voir chromatogramme type en annexe 3), nous n'avons retenu que les pics majeurs de chaque chromatogramme. Une analyse discriminante des résultats obtenus à l'issue de cette expérimentation a permis de montrer que, pour les 3 acides phénoliques, la teneur n'augmentait pas à l'infestation pour la majorité des génotypes étudiés. Une corrélation des rangs de Spearman entre les teneurs moyennes en ces composés et les r_C n'a par ailleurs fait apparaître aucune corrélation. De plus, seuls les 3 flavonoïdes glycosylés présentés sur le chromatogramme (annexe 4) sont essentiellement détectés dans la sève phloémienne de manioc et ont à ce titre été identifiés (voir paragraphe III.2 de ce chapitre). Toutes ces raisons nous ont conduit à ne présenter dans les études qui suivent que les 3 flavonoïdes cités (rutine, "kaempférol-glyc 1" et "kaempférol-glyc 2").

Les teneurs moyennes en flavonoïdes glycosylés et en cyanure libre d'extraits de feuilles de manioc, sont présentées pour plusieurs génotypes (plants infestés et non infestés) dans le tableau 11. Les analyses de variance indiquent que seules les teneurs en rutine et en "kaempferol-glyc 2" diffèrent significativement selon les deux facteurs génotype et infestation. Si on regroupe tous les génotypes, une analyse discriminante sur les cyanures et tous les pics mesurés en HPLC permet de rechercher une fonction discriminante entre les plantes non infestées et les plantes infestées. Cette fonction, ainsi que la répartition gaussienne des deux populations, sont présentées sur les figures 30a et b. Cette analyse montre que les variables "kaempferol-glyc 2" et rutine sont les plus positivement corrélées avec le facteur infestation. Autrement dit, pour la majorité des génotypes testés, les plantes infestées ont des teneurs en ces deux composés plus élevées que les plantes non infestées. Si nous effectuons les corrélations des rangs de Spearman entre les teneurs moyennes en ces composés sur plantes infestées et les r_C , le coefficient est égal à -0,73 ($p=0,0523$) pour la

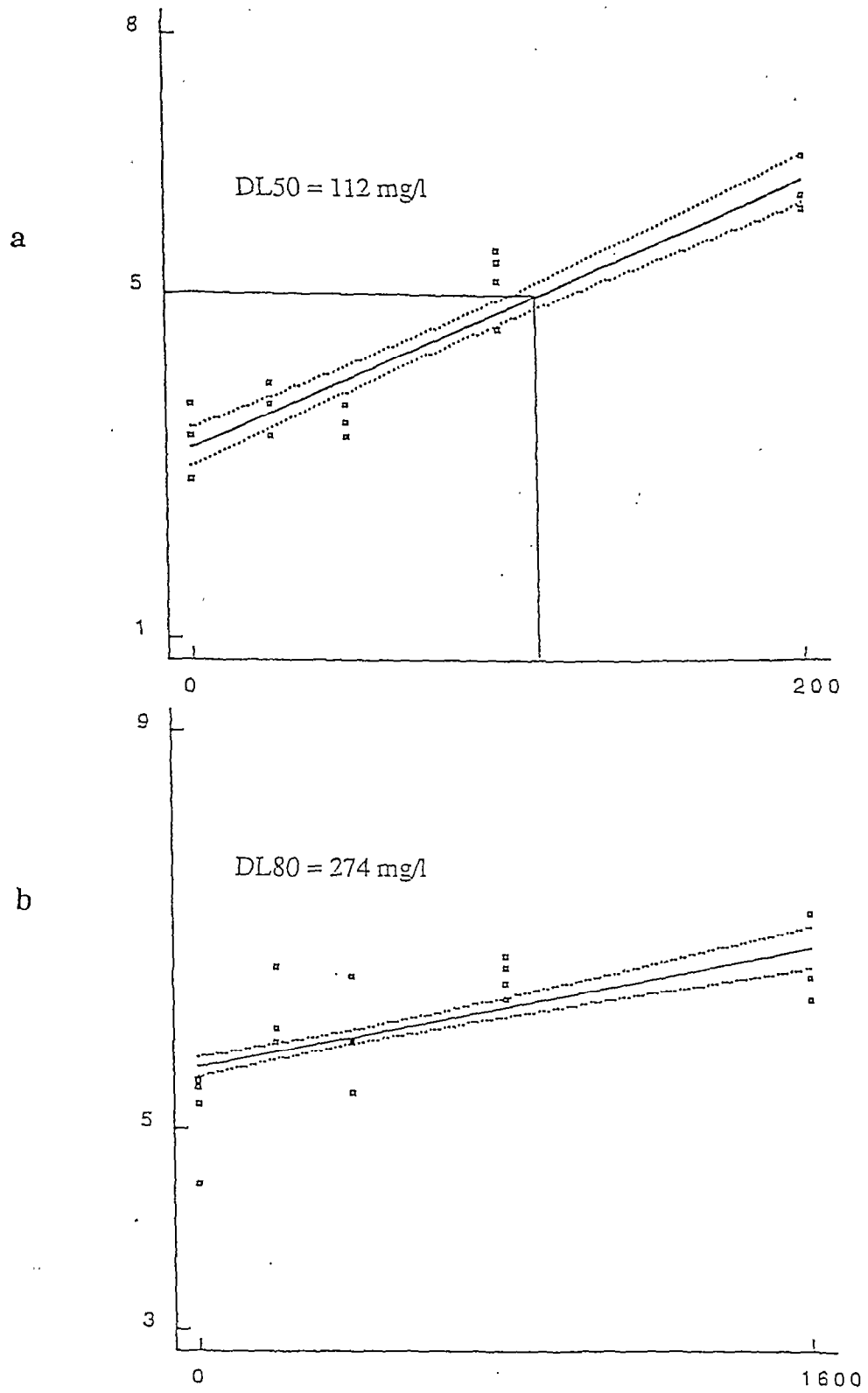
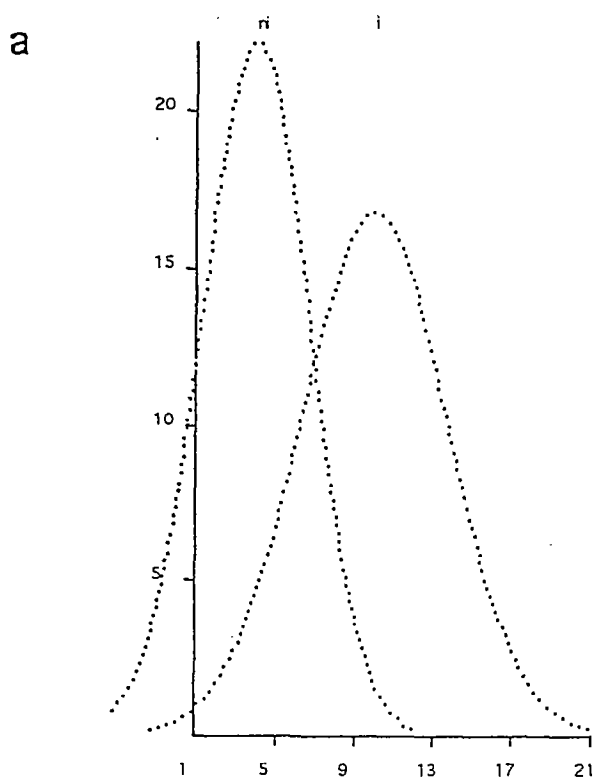


FIGURE 29 : Droites pondérées de courbes sigmoïdes de mortalité (transformation des pourcentages de mortalité en probits)(en abscisse : concentrations de KCN en mg/l, en ordonnée : probits) et estimation des doses létales à 50 % de mortalité pour *A. pisum* (en a) et pour *P. manihoti* (en b).



ni : 37 plants non infestés
 i : 39 plants infestés.

b

Coefficients de corrélation :

"kaempférol-glyc 2" : +0,948

Rutine : +0,823

"kaempférol-glyc 1" : +0,298

Pic 1 : +0,190

Pic 2 : +0,280

Pic 3 : -0,190

Cyanure libre : -0,252

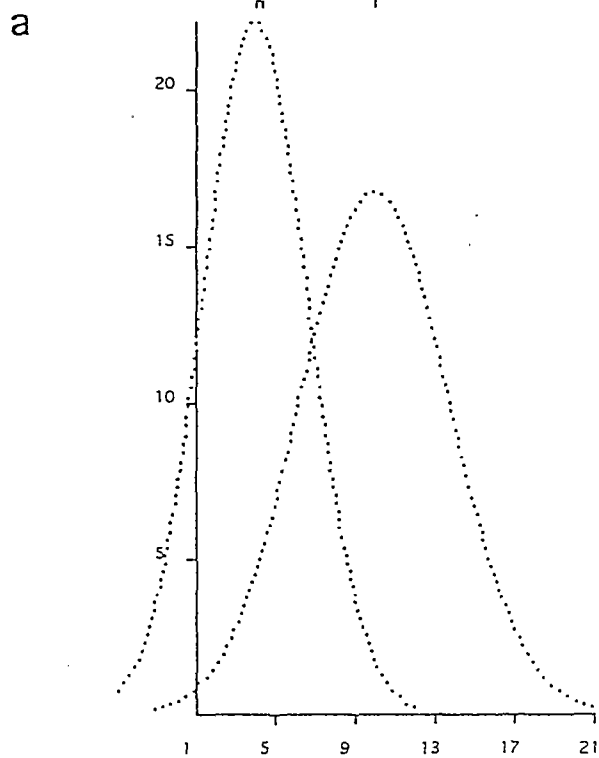
FIGURE 30 : a : Répartition en courbes gaussiennes sur deux populations (plantes non infestées et infestées) des teneurs en substances secondaires étudiées, b : Coefficients de corrélation entre la variable d'origine (substances) et la composante principale de la fonction discriminante.

TABLEAU 11 : Teneurs moyennes en substances secondaires d'extraits de feuilles de six plantes hôtes non infestées et infestées (*moyenne \pm erreur standard, n=5, en mg /g de matière sèche) et résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (génotype et infestation) :

| Plantes | F _c | Rutine | | *Kaempférol-glyc 1* | | *Kaempférol-glyc 2* | | Cyanure libre | |
|--------------------------------------------|----------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------|
| | | non infestées | infestées | non infestées | infestées | non infestées | infestées | non infestées | infestées |
| Ganfo | 0,16 | 7,8 \pm 0,9 c,u | 7,8 \pm 1,4 a,u | 1,8 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,4 | 5,1 \pm 0,6 c,u | 5,6 \pm 0,9 ab,u | 0,7 \pm 0,2 a | 1,3 \pm 0,2 |
| Zanaga | 0,155 | 1,8 \pm 0,7 ab,u | 8,1 \pm 1,4 a,v | 0,9 \pm 0,1 | 2,1 \pm 0,4 | 1,7 \pm 0,5 a,u | 6,3 \pm 1,1 b,v | 3,0 \pm 0,3 c | 1,6 \pm 0,3 |
| 30 M 7 | 0,15 | 1,9 \pm 0,9 ab,u | 8,1 \pm 1,3 a,v | 0,6 \pm 0,3 | 0,4 \pm 0,1 | 2,4 \pm 0,9 ab,u | 8,1 \pm 2,1 b,v | 3,3 \pm 0,6 c | 2,6 \pm 0,4 |
| M'pembe | 0,15 | 0,9 \pm 0,1 a,u | 6,5 \pm 0,4 a,v | 1,4 \pm 0,1 | 3,2 \pm 0,2 | 1,4 \pm 0,1 a,u | 8,6 \pm 0,5 bc,v | 1,4 \pm 0,2 b | 0,8 \pm 0,1 |
| Moudouma | 0,143 | 2,3 \pm 1,2 ab,u | 9,8 \pm 0,6 a,v | 0,5 \pm 0,3 | 3,3 \pm 0,4 | 1,3 \pm 0,6 a,u | 6,7 \pm 0,8 abc,v | 2,0 \pm 0,3 abc | 1,7 \pm 0,4 |
| 3 M 8 | 0,141 | 4,7 \pm 4,1 bc,u | 15,6 \pm 4,1 b,v | 0,4 \pm 0,1 | 0,7 \pm 0,1 | 3,1 \pm 1,9 abc,u | 10,0 \pm 2,2 c,v | 3,3 \pm 1,5 c | 1,9 \pm 0,8 |
| "Faux coulchouc" | 0,141 | 7,8 \pm 0,2 c,u | 8,9 \pm 1,1 a,u | 1,7 \pm 0,4 | 8,3 \pm 6,7 | 2,1 \pm 0,4 ab,u | 3,3 \pm 0,6 a,u | 0,7 \pm 0,1 a | 0,9 \pm 0,2 |
| Incoza | 0,133 | 4,5 \pm 1,3 bc,u | 9,1 \pm 0,1 a,v | 0,4 \pm 0,1 | 0,5 \pm 0,1 | 3,9 \pm 1,2 bc,u | 7,6 \pm 0,7 bc,v | 0,6 \pm 0,3 ab | 0,8 \pm 0,3 |
| <i>Facteurs pour l'analyse de variance</i> | | | | | | | | | |
| Génotype (A) | | 0,0039 | | 0,2047 | | 0,0225 | | 0,0001 | |
| Infestation (B) | | 0,0001 | | 0,0853 | | 0,0001 | | 0,0809 | |
| (A x B) | | 0,037 | | 0,57 | | 0,0214 | | 0,3132 | |

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

a,b... : comparaison en colonne (facteur génotype) ; u,v... : comparaison en ligne (facteur infestation).



ni : 37 plants non infestés
 i : 39 plants infestés.

b

Coefficients de corrélation :

"kaempférol-glyc 2" : +0,948

Rutine : +0,823

"kaempférol-glyc 1" : +0,298

Pic 1 : +0,190

Pic 2 : +0,280

Pic 3 : -0,190

Cyanure libre : -0,252

FIGURE 30 : a : Répartition en courbes gaussiennes sur deux populations (plantes non infestées et infestées) des teneurs en substances secondaires étudiées, b : Coefficients de corrélation entre la variable d'origine (substances) et la composante principale de la fonction discriminante.

TABLEAU 12 : Teneurs moyennes en rutine d'extraits de feuille de poinsettia et de talinum (*moyenne \pm erreur standard, n=5, en mg/g de matière sèche) :

| <i>Plantes</i> | <i>Fc</i> | Teneurs en rutine | |
|----------------|-----------|--------------------|--------------------|
| | | Non infestées | Infestées |
| poinsettia | 0,038 | 11,4 \pm 3,2 b,u | 15,6 \pm 1,5 b,u |
| talinum | 0,15 | 0,8 \pm 0,1 a,u | 1,2 \pm 0,1 a,u |

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

a,b... : comparaison en colonne (facteur génotype) ; u,v... : comparaison en ligne (facteur infestation).

rutine, à 0,02 ($p=0,9492$) pour le "kaempférol-glyc 1" et à -0,24 ($p=0,5237$) pour le "kaempférol-glyc 2". Parmi ces trois substances, seule la rutine est correctement corrélée et pourrait être impliquée dans la résistance par antibiose. Les plantes les plus résistantes n'ont cependant que des teneurs légèrement plus élevées, le plus souvent non significatives sauf pour la variété 3M8. Si nous analysons la rutine dans des extraits de feuilles de poinsettia et de talinum (tableau 12), nous nous apercevons que les teneurs moyennes sont très élevées dans les feuilles de poinsettia comparativement aux feuilles de talinum. Or, ces deux plantes sont également très différentes du point de vue antibiose, et les teneurs en rutine "marquent" bien cette antibiose. Notons que l'identification de la rutine chez ces deux plantes est basée sur la simple comparaison des temps de rétention des pics obtenus après analyse par HPLC. La variation des substances secondaires analysées dans nos extraits selon les facteurs étudiés n'a pas de raison majeure d'être très différente de celle des composés présents dans la sève phloémienne du manioc. Il est possible que la réponse défensive du manioc se traduise par une augmentation de la teneur en rutine de la sève phloémienne lors de l'infestation et que cette augmentation induite puisse être en partie responsable (ou marqueur) de l'antibiose observée.

Notons que la rutine est déjà connue comme métabolite secondaire affectant la croissance, le développement, la reproduction ou le métabolisme de certains insectes, comme des Lépidoptères, des Orthoptères ou des Homoptères (BECK et REESE, 1976). Chez les Homoptères, l'action inhibitrice de la rutine pourrait ne pas se manifester au niveau de l'insecte lui-même mais au niveau des symbiotes, comme cela a été suggéré pour *Schizaphis graminum* Rondani (Hom., Aphididae) par DREYER et JONES (1981b). Il est souvent mentionné que les monophénols sont des antibiotiques potentiels et sont impliqués dans la résistance des plantes vis-à-vis des microorganismes (LEVIN, 1971). Dans les plantes, les composés phénoliques sont stockés dans les vacuoles sous forme glycosylée. Ces formes liées, moins toxiques que les formes libres (HARBORNE, 1967 ; LESZCZYNSKI, 1985), peuvent libérer l'aglycone toxique sous l'action de glycosidases du végétal ou du parasite (HOSEL, 1981). Pour *P. manihoti*, la consommation et l'éventuelle conversion des composés phénoliques du phloème par des glycosidases digestives pourraient entraîner la libération de produits d'hydrolyse de la rutine, et éventuellement perturber le développement de l'insecte. Les pics inconnus observés dans le miellat pourraient correspondre à cette métabolisation de la rutine.

L'aglycone de la rutine est la quercétine (figure 28), qui a déjà été identifiée chez le manioc par MBAYE (1989). Cet auteur a montré que ce composé était associé aux réactions de défense du manioc vis-à-vis de *Xanthomonas campestris* pv *manihoti*. Il est donc concevable que la rutine soit hydrolysée par la cochenille du manioc et que la quercétine, dont le rôle antibactérien a été montré pour un autre modèle, puisse perturber la physiologie des symbiotes de *P. manihoti*. Cette hypothèse reste cependant à démontrer expérimentalement, et

TABLEAU 13 : Teneurs moyennes en substances secondaires selon le génotype et la densité d'infestation (*moyenne \pm erreur standard, n=5, en mg/g de matière sèche) et résultat de l'analyse de variance à deux facteurs (génotype et densité d'infestation) :

| <i>Composés</i> | | | Rutine | "Kaempférol-glyc1" | "Kaempférol-glyc2" | Cyanure libre |
|------------------------------------------|-----------------------|-------|------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| <i>Plantes</i> | Densité d'infestation | Rc | | | | |
| Zanaga | 0 | 0,155 | 1,5 \pm 0,4 a | 0,59 \pm 0,1 a | 0,5 \pm 0,1 | 1,1 \pm 0,2 a |
| | 100 | | 2,1 \pm 0,4 a | 1,1 \pm 0,4 a | 1,4 \pm 0,8 | 1,3 \pm 0,1 a |
| | 1000 | | 2,2 \pm 0,4 ab | 0,9 \pm 0,1 a | 2,0 \pm 0,5 | 0,5 \pm 0,1 a |
| 30 M 7 | 0 | 0,15 | 1,6 \pm 0,3 a | 0,6 \pm 0,1 a | 0,6 \pm 0,1 | 3,1 \pm 0,6 b |
| | 100 | | 1,5 \pm 0,3 a | 0,5 \pm 0,1 a | 1,8 \pm 0,7 | 1,5 \pm 0,6 a |
| | 1000 | | 3,3 \pm 0,6 b | 1,5 \pm 0,2 a | 1,7 \pm 0,7 | 1,2 \pm 0,7 a |
| "Faux caoutchouc" | 0 | 0,141 | 1,7 \pm 0,2 a | 1,2 \pm 0,4 a | 0,4 \pm 0,1 | 1,5 \pm 0,3 b |
| | 100 | | 13,0 \pm 1,1 c | 12,4 \pm 5,7 b | 2,1 \pm 0,8 | 3,1 \pm 1,0 b |
| | 1000 | | 30,7 \pm 8,8 d | 28,3 \pm 15,7 b | 5,6 \pm 2,4 | 2,8 \pm 0,6 b |
| <i>Facteurs de l'analyse de variance</i> | | | | | | |
| Génotype (A) | | | 0,0002 | 0,0342 | 0,2776 | 0,0229 |
| Densité (B) | | | 0,0066 | 0,241 | 0,0337 | 0,6258 |
| (A x B) | | | 0,0044 | 0,2753 | 0,3288 | 0,0773 |

* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

requiert par exemple la mise au point de milieux artificiels permettant un développement satisfaisant de *P. manihoti* sur une longue période.

En ce qui concerne les cyanures, les teneurs moyennes de la forme libre sont présentées pour plusieurs génotypes (plants infestés et non infestés) dans le tableau 11. Ce tableau montre que les teneurs ne diffèrent significativement que selon le génotype et donc que le facteur infestation ne modifie pas le niveau en cyanure libre. Par ailleurs, si nous calculons les corrélations de rangs de Spearman entre les teneurs moyennes en cyanure libre et les r_C , le coefficient de corrélation est égal à 0,22 ($p=0,5506$) pour les plantes non infestées et à 0,18 ($p=0,6191$) à l'infestation. Il apparaît donc que le cyanure n'est pas impliqué dans les mécanismes de résistance par antibiose du manioc à l'attaque de la cochenille.

III.6. Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype et la densité d'infestation :

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que la réponse défensive du manioc se manifesterait par une augmentation du niveau foliaire (plus précisément phloémien) en rutine à l'attaque de l'insecte. Nous tentons ici principalement d'apprécier cette réponse selon la densité d'infestation.

Les teneurs moyennes en rutine, "kaempferol -glyc 1", "kaempferol-glyc 2" et cyanure libre sont présentées dans le tableau 13. Une analyse de variance à deux facteurs montre que seules les teneurs en rutine diffèrent très significativement à la fois selon le génotype et la densité d'infestation. Cela confirme les résultats précédents sur une gamme d'hôte plus restreinte mais sous une gamme de stress parasitaire plus large.

Parmi les génotypes étudiés, seul le "Faux caoutchouc" présente une augmentation très importante de la teneur en rutine avec la densité d'infestation. Néanmoins, pour les variétés Zanaga et 30M7, cette augmentation apparaît sous infestation inondative. Ces résultats confirment que la réponse défensive du manioc est liée à une augmentation de la teneur en rutine dans la sève, et apportent deux informations supplémentaires : cette réponse défensive se manifeste déjà à un mois d'infestation et son ampleur dépend de la densité du ravageur.

De plus, comme pour les résultats présentés au paragraphe précédent, le niveau en cyanure libre des feuilles n'est pas altéré par l'attaque du ravageur, ceci apparaît clairement pour deux génotypes utilisés sur trois (30M7 subissant une légère baisse dans cette expérience).

III.7. Variation des substances secondaires selon le génotype et l'état hydrique du végétal :

Rappelons que les pullulations annuelles en cochenille apparaissent le plus souvent en fin de saison sèche / début de saison des pluies sur le terrain. Ces observations semblent indiquer une modification temporaire de la résistance de la plante selon la saison. Le stress hydrique occasionné par l'absence de pluie en saison sèche suggère que le facteur hydrique soit pour

TABLEAU 14 : Nombre de feuilles et potentiel hydrique foliaire sur trois géotypes de manioc et pour trois traitements hydriques (*moyenne \pm erreur standard, n=5) et résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (géotype et traitement hydrique) :

| Traitement hydrique** | Nombre de feuille | | | Potentiel hydrique (en bars) | | |
|------------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
| | 1/2S | 1/S | 2/S | 1/2S | 1/S | 2/S |
| <i>Plantes</i> | | | | | | |
| Zanaga | 6,3 \pm 1,2 ,u | 12,6 \pm 1,6 b,v | 15,3 \pm 0,6 b,v | - 6,8 \pm 1,2 ,u | - 4,5 \pm 0,5 b,v | - 4,3 \pm 0,3 a,v |
| 30M7 | 7,6 \pm 1,2 ,u | 8,6 \pm 0,8 a,u | 14,6 \pm 0,3 b,v | - 5,6 \pm 0,9 | - 5,8 \pm 0,4 a | - 4,8 \pm 0,3 a |
| "Faux caoutchouc" | 4,6 \pm 0,3,u | 7,3 \pm 0,6 a,uv | 8,3 \pm 1,2 a,v | - 4,3 \pm 0,4 ,u | - 3,4 \pm 0,1 b,uv | - 2,3 \pm 0,3 b,v |
| <i>Facteurs de l'analyse de variance</i> | | | | | | |
| Géotype (A) | | 0,0004 | | | 0,0001 | |
| Traitement hydrique (B) | | 0,0008 | | | 0,021 | |
| (A x B) | | 0,1913 | | | 0,5938 | |

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

** Nombre d'arrosages par semaine (voir matériel et méthodes).a,b... : comparaison en colonne (facteur géotype) ; u,v : comparaison en ligne (facteur traitement hydrique)

TABLEAU 15 : Teneurs moyennes en substances secondaires pour trois géotypes de manioc selon le traitement hydrique (*moyenne \pm erreur standard, n=5, en mg/g de matière sèche) et résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (géotype et traitement hydrique) :

| Plantes | Traitements hydriques | Rutine | "Kaempférol-glyc 1" | "Kaempférol-glyc 2" | Cyanure libre |
|------------------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------|
| | | | | | |
| Zanaga | 1/2S | 0,9 \pm 0,1 a | 0,4 \pm 0,1 | 2,7 \pm 0,2 | 4,8 \pm 0,7 |
| | 1/S | 0,7 \pm 0,1 a | 0,2 \pm 0,1 | 0,6 \pm 0,1 | 3,8 \pm 1,0 |
| | 2/S | 0,6 \pm 0,1 a | 0,3 \pm 0,1 | 1,4 \pm 0,2 | 3,8 \pm 0,7 |
| 30 M 7 | 1/2S | 0,9 \pm 0,2 a | 0,4 \pm 0,1 | 0,9 \pm 0,6 | 5,6 \pm 1,5 |
| | 1/S | 0,5 \pm 0,1 a | 0,2 \pm 0,1 | 2,9 \pm 0,3 | 6,6 \pm 2,6 |
| | 2/S | 1,3 \pm 0,5 a | 0,3 \pm 0,2 | 0,8 \pm 0,6 | 2,4 \pm 0,3 |
| "Faux caoutchouc" | 1/2S | 0,9 \pm 0,5 a | 0,3 \pm 0,2 | 1,8 \pm 0,6 | 1,3 \pm 0,5 |
| | 1/S | 4,4 \pm 1,8 b | 0,6 \pm 0,2 | 10,4 \pm 7,3 | 2,7 \pm 0,8 |
| | 2/S | 5,0 \pm 1,5 b | 1,1 \pm 0,5 | 2,6 \pm 1,4 | 4,1 \pm 1,9 |
| <i>Facteurs de l'analyse de variance</i> | | | | | |
| Géotype (A) | | 0,0012 | 0,0764 | 0,2655 | 0,1611 |
| Traitement hydrique (B) | | 0,138 | 0,3987 | 0,5332 | 0,6765 |
| (A xB) | | 0,0679 | 0,276 | 0,2357 | 0,1586 |

* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

TABLEAU 18 : Nombre de feuilles selon le génotype et le mois d'infestation (représentation des *moyennes du tableau d'incidence de l'analyse de variance à deux facteurs où $p < 0,0001$, $n=40$) :

| Génotypes | Zanaga | 30M7 | "Faux caoutchouc" |
|-----------|------------------|------------------|-------------------|
| Mois | ($p < 0,0001$) | ($p < 0,0001$) | ($p < 0,0001$) |
| Février | 81,2 ± 3,4 b | 35,3 ± 5,1 a | 64,6 ± 5,3 a |
| Mai | 63,9 ± 5,4 a | 137,2 ± 11,0 c | 246,3 ± 23,7 b |
| Août | 83,9 ± 6,6 b | 106,4 ± 14,4 b | 285,0 ± 39,1 bc |
| Novembre | 105,6 ± 8,3 c | 85,9 ± 8,14 b | 369,2 ± 45,0 c |

* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

TABLEAU 19 : Surface foliaire (en cm², de la 20^{ème} feuille à partir de l'apex) selon le génotype et la saison (représentation des *moyennes ± erreur standard du tableau d'incidence de l'analyse de variance à deux facteurs où $p < 0,0001$, $n=40$) :

| Génotype | Zanaga | 30M7 | "Faux caoutchouc" |
|----------|------------------|------------------|-------------------|
| Mois | ($p < 0,0001$) | ($p < 0,0001$) | ($p < 0,0001$) |
| Février | 204 ± 9,8 c | 233,0 ± 16,1 c | 404,3 ± 15,9 c |
| Mai | 111,9 ± 7,1 a | 188,0 ± 9,3 b | 174,8 ± 13,9 b |
| Août | 99,6 ± 5,4 a | 139,1 ± 11,6 a | 123,0 ± 7,3 a |
| Novembre | 141,5 ± 10,2 b | 181,2 ± 12,0 b | 141,0 ± 13,0 ab |

* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

TABLEAU 20 : Potentiel hydrique (en bars) selon le génotype, l'infestation et le mois d'infestation (représentation des *moyennes ± erreur standard du tableau d'incidence de l'analyse de variance à trois facteurs, $n=20$), résultats de l'analyse de variance à trois facteurs :

| Génotype Traitement | Zanaga | | 30 M 7 | | "Faux caoutchouc" | |
|------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | Non infestés ($p < 0,0001$) | Infestés ($p = 0,5263$) | Non infestés ($p = 0,0022$) | Infestés ($p = 0,0617$) | Non infestés ($p < 0,0001$) | Infestés ($p = 0,4354$) |
| Mois | | | | | | |
| Février | -6,2 ± 0,4 a,u | -4,7 ± 0,4 v | -4,9 ± 0,5 a,u | -5,0 ± 0,1 u | -5,2 ± 0,4 a,u | -5,9 ± 0,5 u |
| Mai | -3,9 ± 0,1 b,v | -5,1 ± 0,2 u | -3,8 ± 0,1 b,v | -5,2 ± 0,3 u | -3,5 ± 0,1 c,v | -4,8 ± 0,3 u |
| Août | -3,8 ± 0,2 b,v | -5,3 ± 0,3 u | -5,1 ± 0,2 a,u | -5,7 ± 0,3 u | -4,3 ± 0,2 b,v | -5,7 ± 0,5 u |
| Novembre | -4,6 ± 0,3 b,u | -5,4 ± 0,4 u | -4,8 ± 0,3 a,v | -6,1 ± 0,3 u | -4,6 ± 0,4 ab,u | -5,2 ± 0,5 u |
| Facteurs | p (analyse de variance) | | | | | |
| Génotype (A) | 0,3664 | (A x B) | 0,0439 | | | |
| Saison (B) | 0,0001 | (B x C) | 0,0002 | | | |
| Infestation (C) | 0,0001 | (C x A) | 0,2879 | | | |
| | | (A x B x C) | 0,0559 | | | |

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.
a,b... : comparaison en colonne (facteur saison) ; u,v... : comparaison en ligne (facteur infestation).

TABLEAU 16 : Teneurs moyennes des paramètres mesurés pour l'analyse chimique du sol selon le bloc (*moyenne \pm erreur standard, n=6) à une profondeur des prélèvements comprise entre 0 et 10 cm sous la surface :

| Paramètres | Aluminium # | Azote ## | Carbone ## | Matière organique ## | pH | Sodium # | Calcium # | Magnésium # | Potassium # |
|------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| Blocs | (p=0,0503) | (p=0,0054) | (p=0,022) | (p=0,0108) | (p=0,0148) | (p=0,7643) | (p<0,0001) | (p=0,2064) | (p=0,732) |
| A | 0,04 \pm 0,01 a | 2,06 \pm 0,35 b | 26,7 \pm 4,4 b | 4,8 \pm 0,7 b | 5,5 \pm 0,09 c | 0,06 \pm 0,03 | 2,6 \pm 0,1 c | 0,6 \pm 0,1 | 0,05 \pm 0,007 |
| B | 0,09 \pm 0,03 ab | 1,4 \pm 0,06 a | 19,9 \pm 1,2 ab | 3,4 \pm 0,2 ab | 5,4 \pm 0,08 bc | 0,04 \pm 0,01 | 1,4 \pm 0,2 bc | 0,6 \pm 0,3 | 0,04 \pm 0,007 |
| C | 0,26 \pm 0,06 b | 1,2 \pm 0,19 a | 16,9 \pm 2,4 a | 2,9 \pm 0,4 a | 5,2 \pm 0,15 b | 0,05 \pm 0,02 | 0,9 \pm 0,1 b | 0,3 \pm 0,05 | 0,04 \pm 0,004 |
| D | 0,28 \pm 0,11 b | 0,9 \pm 0,08 a | 14,7 \pm 1,6 a | 2,4 \pm 0,3 a | 5,03 \pm 0,11 a | 0,03 \pm 0,01 | 0,6 \pm 0,1 a | 0,2 \pm 0,05 | 0,04 \pm 0,006 |

* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

en meq pour 100g de sol

en g pour 100g de sol.

TABLEAU 17 : Teneurs moyennes des paramètres mesurés pour l'analyse chimique du sol selon le bloc (*moyenne \pm erreur standard, n=6) à une profondeur des prélèvements comprise entre 10 et 20 cm sous la surface :

| Paramètres | Aluminium # | Azote ## | Carbone ## | Matière organique ## | pH | Sodium # | Calcium # | Magnésium # | Potassium # |
|------------|-------------------|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| Blocs | (p=0,017) | (p=0,0005) | (p=0,0016) | (p=0,0017) | (p=0,0004) | (p=0,0772) | (p<0,0001) | (p=0,0379) | (p=0,1349) |
| A | 0,07 \pm 0,02 a | 1,38 \pm 0,17 c | 18,4 \pm 2,1 c | 3,2 \pm 0,4 c | 5,6 \pm 0,07 c | 0,03 \pm 0,04 | 2,0 \pm 0,2 c | 0,3 \pm 0,08 b | 0,04 \pm 0,005 |
| B | 0,08 \pm 0,03 a | 1,02 \pm 0,10 bc | 14,6 \pm 1,1 bc | 2,5 \pm 0,2 bc | 5,3 \pm 0,05 b | 0,03 \pm 0,09 | 1,1 \pm 0,2 b | 0,1 \pm 0,01 a | 0,03 \pm 0,004 |
| C | 0,40 \pm 0,06 b | 0,77 \pm 0,05 ab | 12,0 \pm 0,9 ab | 2,1 \pm 0,2 ab | 5,0 \pm 0,12 ab | 0,02 \pm 0,01 | 0,4 \pm 0,1 a | 0,1 \pm 0,03 a | 0,02 \pm 0,003 |
| D | 0,41 \pm 0,09 b | 0,66 \pm 0,05 a | 9,7 \pm 0,8 a | 1,7 \pm 0,1 a | 4,9 \pm 0,10 a | 0,06 \pm 0,02 | 0,4 \pm 0,1 a | 0,1 \pm 0,04 a | 0,03 \pm 0,005 |

* Pour chaque colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 %, selon le test du PLSD de Fisher.

en meq pour 100g de sol

en g pour 100g de sol.

une bonne part responsable de l'amoindrissement de la réponse défensive du manioc durant cette saison. Toutes ces raisons nous ont conduit à suivre l'influence du stress hydrique sur la synthèse en rutine du manioc.

Pour les trois génotypes utilisés dans cette expérience, le nombre moyen de feuilles et le potentiel hydrique foliaire moyen sont présentés dans le tableau 14. Les analyses de variance effectuées montrent que ces deux paramètres diffèrent significativement selon le génotype et le traitement hydrique. Quelle que soit la plante, ils diminuent avec le stress hydrique (de façon significative, sauf pour le potentiel hydrique moyen de 30M7). Ces paramètres "marqueurs" du déficit hydrique de la plante, permettent de vérifier que les traitements pratiqués font subir aux maniocs un stress hydrique significatif.

Les résultats des teneurs moyennes en flavonoïdes glycosylés et en cyanure libre sont reportés dans le tableau 15. Seules les teneurs moyennes en rutine diffèrent significativement selon le génotype, mais pas globalement selon le traitement hydrique. Une interaction à la limite de la signification apparaît cependant pour la rutine, provenant essentiellement du comportement de l'hybride "Faux caoutchouc", dont le niveau foliaire en rutine diminue fortement avec le déficit hydrique de la plante.

L'incidence d'un stress hydrique de la plante sur l'expression de ses mécanismes de défense vis-à-vis des phytophages a été montrée pour différents modèles plantes-insectes, dont des Homoptères (MATTSON et HAACK, 1987). On peut citer notamment MILES et coll. (1982), qui ont observé sur le chou que le stress hydrique facilitait le développement de *Brevicoryne brassicae* L. (Hom., Aphididae). De même, sur le modèle *Schizaphis graminum* Rondani (Hom., Aphididae) / blé, DORSCHNER et coll. (1986) ont montré que des plantes en déficit hydrique présentaient plus de dommage à l'attaque de l'insecte que celles ayant un état hydrique normal. Dans notre cas, les mesures du potentiel biotique de *P. manihoti* dans des conditions de stress hydrique n'ont pas été effectuées, mais certains génotypes présentent manifestement des interactions entre stress hydrique et réaction chimique de "défense".

III.8. Variation des substances secondaires étudiées selon le génotype, l'infestation et la saison :

Pour une expérimentation sur le terrain, il nous a paru utile d'apprécier la composition chimique du sol sur lequel l'expérimentation suivante aura lieu. Les tableaux 16 et 17 rapportent les résultats de l'analyse chimique du sol. Pour les deux niveaux de prélèvement, deux gradients opposés apparaissent clairement : celui de l'aluminium (dont les teneurs diminuent du bloc A au bloc D) et celui du calcium et des éléments organiques (dont les valeurs augmentent du bloc A au bloc D). Les teneurs en sodium, potassium et magnésium sont identiques quel que soit le bloc considéré. Les gradients en carbone, azote et matière organique sont à relier avec le fait que la portion de terrain avoisinant le bloc A correspond à une zone de forêt, alors que la portion de terrain proche du bloc D correspond à une zone de

savane. Quoiqu'il en soit tous ces prélèvements se sont avérés pauvres en éléments organiques ainsi qu'en ions (sodium, calcium, magnésium et potassium). Le gradient en aluminium souligne quant à lui que les portions proches de D sont à pH plus acide, et peuvent présenter un risque de toxicité aluminique pour les plantes cultivées de façon générale, mais ce n'est pas le cas pour le manioc (SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983). Ce sol pauvre en éléments organiques et minéraux a été pondéré par un apport de fumure N/P/K (15/15/15) avant notre expérimentation. Nous ne présenterons pas les résultats qui vont suivre selon le bloc, car les analyses statistiques ont montré qu'il n'y avait pas d'effet sol sur les substances secondaires analysées dans cette expérimentation (480 échantillons prévus au total). L'analyse de variance réalisée sur les teneurs en rutine (par exemple) selon le bloc montre que nous prenons 92 % de risque en considérant que le niveau foliaire en rutine diffère selon le type de sol ($p=0,9235$).

Les valeurs moyennes du nombre de feuilles et de la surface foliaire moyenne des feuilles de rang 20 (à partir de l'apex) sont mentionnées, pour les trois génotypes de manioc et selon la saison, dans les tableaux 18 et 19. Le mois de février correspond au démarrage végétatif du manioc dans notre expérimentation et il apparaît que la surface foliaire y est maximale pour diminuer ensuite graduellement jusqu'à la grande saison sèche (mois d'août sur les tableaux), pour les trois génotypes utilisés. En conséquence, il semblerait que les maniocs soient bien en état de déficit hydrique durant la grande saison sèche.

Les valeurs moyennes du potentiel hydrique foliaire selon le génotype, la saison et l'infestation sont mentionnées sur le tableau 20. L'effet saison n'est observé que pour les plants sains et provoque une augmentation significative (pour deux génotypes sur trois) du potentiel hydrique lors de la grande saison des pluies (mois de mai sur le tableau). Le facteur infestation est aussi net et, biologiquement, souligne que l'un des effets de l'infestation à ce niveau de densité serait d'induire un stress hydrique plus ou moins homogène tout au long de l'année, et ce quel que soit le génotype. Notons au passage, l'absence de l'effet génotype sur les paramètres hydriques. En résumé, la combinaison des deux facteurs (infestation et saison) se traduit par une quasi absence de modification du potentiel hydrique de la plante infestée durant l'année. D'un point de vue hydrique, l'infestation entraîne donc l'imposition d'un stress supplémentaire masquant les variations saisonnières bien visibles sur cultures saines.

Si nous considérons les variations de la surface foliaire et du potentiel hydrique selon la saison, le manioc est en état de déficit hydrique pendant la grande saison sèche. Cette observation est identique à celle faite par YAO et GOUE (1992).

Les teneurs moyennes des 4 substances secondaires étudiées sont analysées selon le génotype, l'infestation et la saison dans le tableau 21. Les analyses de variance à trois facteurs montrent que seul l'effet saison est toujours visible au seuil de 5 % sur ces composés. Pour les composés phénoliques et surtout les glycosides du kaempférol, on note une diminution de leurs teneurs lors de la grande saison sèche. Cette diminution est moins visible pour la rutine

TABLEAU 21 : Teneur (*moyenne \pm erreur standard, en mg/g de matière sèche, n=20) en substances secondaires analysées, selon la saison et pour trois génotypes (plants infestés et non infestés) :

Rutine

| Génotype Traitement | Zanaga | | 30M7 | | "Faux caoutchouc" | |
|-----------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés |
| <i>Mois</i> | | | | | | |
| Février | 4,9 \pm 0,5 a,u | 5,9 \pm 0,8 a,u | 4,5 \pm 0,7 a,u | 4,7 \pm 0,5 a,u | 6,5 \pm 0,7 a,u | 7,5 \pm 1,3 a,u |
| Mai | 6,4 \pm 1,6 a,u | 7,6 \pm 1,1 b,u | 15,2 \pm 6,8 c,u | 14,3 \pm 6,7 b,u | 5,4 \pm 1,0 a,u | 10,7 \pm 3,5 ab,u |
| Août | 10,4 \pm 1,4 b,v | 5,5 \pm 0,8 a,u | 7,9 \pm 1,0 b,u | 5,2 \pm 0,8 a,u | 10,9 \pm 1,1 b,u | 15,5 \pm 2,9 b,v |
| Novembre | 7,0 \pm 0,7 a,u | 9,4 \pm 1,4 c,u | 8,5 \pm 1,1 b,u | 11,9 \pm 2,1 b,u | 5,6 \pm 0,7 a,u | 13,2 \pm 2,4 b,v |
| <i>Facteurs p (analyse de variance)</i> | | | | | | |
| Génotype (A) | 0,1413 | (A x B) | 0,0082 | | | |
| Saison (B) | 0,0064 | (B x C) | 0,2713 | | | |
| Infestation (C) | 0,1298 | (C x A) | 0,0953 | | | |
| | | (A x B x C) | 0,8908 | | | |

"Kaempférol-glyc 1"

| Génotype Traitement | Zanaga | | 30M7 | | "Faux caoutchouc" | |
|-----------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|
| | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés |
| <i>Mois</i> | | | | | | |
| Février | 0,8 \pm 0,1 a | 0,9 \pm 0,2 ab | 0,6 \pm 0,1 a | 0,7 \pm 0,2 a | 0,9 \pm 0,2 ab | 1,0 \pm 0,1 a |
| Mai | 1,0 \pm 0,2 ab | 1,4 \pm 0,3 b | 3,1 \pm 1,2 b | 2,1 \pm 1,0 b | 1,1 \pm 0,3 b | 1,6 \pm 1,0 ab |
| Août | 1,2 \pm 0,1 b | 0,6 \pm 0,1 a | 0,2 \pm 0,1 a | 0,2 \pm 0,1 a | 0,7 \pm 0,1 a | 1,0 \pm 0,2 a |
| Novembre | 1,8 \pm 0,2 b | 2,5 \pm 0,2 c | 2,0 \pm 0,4 b | 1,6 \pm 0,3 b | 1,9 \pm 0,3 c | 2,2 \pm 0,6 b |
| <i>Facteurs p (analyse de variance)</i> | | | | | | |
| Génotype (A) | 0,9877 | (A x B) | 0,0111 | | | |
| Saison (B) | 0,0001 | (B x C) | 0,927 | | | |
| Infestation (C) | 0,8409 | (C x A) | 0,2666 | | | |
| | | (A x B x C) | 0,6523 | | | |

"Kaempférol-glyc 2"

| Génotype Traitement | Zanaga | | 30M7 | | "Faux caoutchouc" | |
|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés |
| <i>Mois</i> | | | | | | |
| Février | 1,4 \pm 0,1 a | 1,8 \pm 0,4 a | 1,6 \pm 0,2 a | 2,2 \pm 0,4 a | 1,1 \pm 0,2 a | 1,1 \pm 0,2 a |
| Mai | 1,9 \pm 0,4 a | 3,1 \pm 0,8 b | 9,3 \pm 5,2 b | 6,4 \pm 3,3 b | 2,9 \pm 0,8 b | 4,5 \pm 1,7 c |
| Août | 2,9 \pm 0,4 b | 1,5 \pm 0,3 a | 2,2 \pm 0,2 a | 1,8 \pm 0,3 a | 0,9 \pm 0,1 a | 1,1 \pm 0,2 a |
| Novembre | 4,1 \pm 0,5 b | 5,6 \pm 0,6 c | 5,1 \pm 0,5 b | 4,9 \pm 0,8 b | 1,9 \pm 0,3 b | 1,9 \pm 0,2 b |
| <i>Facteurs p (analyse de variance)</i> | | | | | | |
| Génotype (A) | 0,006 | (A x B) | 0,0539 | | | |
| Saison (B) | 0,0001 | (B x C) | 0,9367 | | | |
| Infestation (C) | 0,925 | (C x A) | 0,6537 | | | |
| | | (A x B x C) | 0,8206 | | | |

Cyanure libre

| Génotype Traitement | Zanaga | | 30M7 | | "Faux caoutchouc" | |
|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés | Non infestés | Infestés |
| <i>Mois</i> | | | | | | |
| Février | 0,8 \pm 0,1 a | 1,0 \pm 0,2 a | 3,1 \pm 0,7 b,u | 2,4 \pm 0,3 a,u | 1,1 \pm 0,2 ab,u | 1,2 \pm 0,2 a,u |
| Mai | 1,7 \pm 0,3 b | 2,6 \pm 0,7 b | 2,6 \pm 0,4 b,u | 2,9 \pm 0,7 a,u | 2,3 \pm 0,6 bc,u | 4,2 \pm 0,8 c,u |
| Août | 2,2 \pm 0,5 b | 1,7 \pm 0,3 b | 2,9 \pm 0,4 b,u | 3,3 \pm 0,5 a,u | 1,8 \pm 0,3 b,u | 2,3 \pm 0,4 b,u |
| Novembre | 0,8 \pm 0,2 a | 0,9 \pm 0,1 a | 1,3 \pm 0,2 a,u | 3,0 \pm 0,5 a,v | 0,9 \pm 0,1 a,u | 2,1 \pm 0,6 b,v |
| <i>Facteurs p (analyse de variance)</i> | | | | | | |
| Génotype (A) | 0,0001 | (A x B) | 0,0463 | | | |
| Saison (B) | 0,0001 | (B x C) | 0,0305 | | | |
| Infestation (C) | 0,007 | (C x A) | 0,269 | | | |
| | | (A x B x C) | 0,3877 | | | |

* Les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement pour un seuil de 5 % selon le test du PLSD de Fisher.

a,b,... : comparaison en colonne (facteur saison) ; u,v,... : comparaison en ligne (facteur infestation).

car elle dépend du génotype, alors que l'effet d'une infestation y est plus marqué que pour les autres composés phénoliques (bien que non significatif). D'un point de vue méthodologique, il faut remarquer la permanence d'une interaction saison x génotype pour tous les composés analysés (seul le "kaempférol-glyc 2" n'en est pas significativement affecté). Cela entraîne l'impossibilité théorique d'une analyse indépendante des facteurs dans le cadre du modèle linéaire. Une réponse non linéaire par une interaction génotype x saison (et donc développement de la plante) ne serait d'ailleurs pas un fait surprenant a priori. Une illustration de cette situation peut être visualisée pour la rutine. Pour l'hybride "Faux caoutchouc" (et comme déjà remarqué précédemment), on observe en toute saison une augmentation des teneurs à l'infestation, ainsi qu'un pic en saison sèche. Pour les deux autres variétés, le profil est différent avec une baisse des teneurs à l'infestation en saison sèche, alors qu'elles augmentent ou sont stables pendant les autres saisons. On peut interpréter ce phénomène comme une variabilité génotypique de la modulation saisonnière de la réponse à l'infestation. En grande saison sèche, il y a diminution ("Faux caoutchouc") ou inversion (Zanaga, 30M7) de la réponse "normale" à l'infestation, qui est d'augmenter les teneurs en rutine.

En ce qui concerne le cyanure, bien que ses teneurs diffèrent selon les trois facteurs étudiés, les interactions diverses empêchent une analyse globale du phénomène. La seule observation intéressante, par rapport à ce qui a été souligné dans notre travail, est une diminution de la teneur en cyanure libre lors du retour à la saison des pluies. Compte tenu de l'étude comportementale et des hypothèses formulées dans le paragraphe III.1, les résultats obtenus sur le terrain pourraient expliquer une modification du comportement de fixation de *P. manihoti* selon la saison et notamment lors de la phase de transition correspondant au retour de la saison des pluies. Cette période a d'ailleurs été évoquée comme étant l'une des phases clefs influençant la dynamique de population de la cochenille (LE RÛ et coll., 1991). Notons que le facteur saisonnier est en fait la résultante de plusieurs facteurs tels que le rythme nyctéméral, la lumière, le facteur trophique et le stade de développement de la plante. Dans la littérature, l'implication de la saison dans les variations des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis de ravageurs a été abondamment évoquée, mais cette étude a rarement été approfondie. Sur des modèles Homoptères, on peut citer notamment HONEK (1985) qui a montré que la "vigueur" de la céréale conditionne pour une bonne part la pullulation de deux pucerons (*Metopolophium dirhodum* Walker et *Sotobion avenae* F.). Il en est de même pour GIRMA et coll. (1990) qui ont observé que le stade de développement du blé influençait la production de nymphes par femelle chez *Diuraphis noxia* Mordvilko (Hom., Aphidiade). Néanmoins, peu de travaux ont mis en évidence l'effet de la saison sur la synthèse d'un allélochimique impliqué dans les mécanismes de résistance à des phloémophages. Citons, SALAS et CORCUERA (1991) qui ont montré que l'augmentation de la photopériode et de la température rendaient les plantes plus résistantes à l'attaque du ravageur et ont relié

cet effet à une augmentation de la teneur des feuilles d'orges en gramine (alcaloïde dérivé du tryptophane et impliqué dans la résistance de l'orge au puceron).

IV Conclusions:

L'étude du comportement alimentaire de *P. manihoti* sur différentes plantes a permis de montrer notamment que les tissus du mésophylle rencontrés par l'insecte seraient impliqués dans les mécanismes de fixation de l'insecte sur la plante. L'analyse chimique d'extraits de feuilles indique que, parmi les composés secondaires étudiés, les composés cyanés (glucosides cyanogéniques intracellulaires) et les acides phénoliques (souvent à localisation extracellulaire) pouvaient intervenir à différents niveaux dans ces mécanismes, au vu de certaines corrélations avec les paramètres comportementaux mesurés.

Par ailleurs, les glycosides cyanogéniques sont transportés par la sève phloémienne du manioc et donc consommés par l'insecte. La présence de cyanures libres dans le miellat, alors qu'ils sont absents dans la sève, suggère que les cyanures liés subissent une hydrolyse intra-intestinale par des β -glucosidases. L'existence d'une linamarase propre à l'insecte confirme cette hypothèse.

Les tests de toxicité du cyanure en milieu artificiel ont montré que le puceron *A. pisum* serait environ 2,5 fois plus sensible au cyanure que *P. manihoti*. Ces résultats indiquent que la cochenille posséderait une voie d'excrétion ou de détoxification plus efficace que les pucerons qui sont naturellement confrontés à des teneurs nulles ou bien faibles en composés cyanés.

Les flavonoïdes glycosylés que sont la rutine et deux isomères non identifiés appelés "kaempférol-glyc 1" et "kaempférol-glyc 2", seraient également transportés par la sève phloémienne et consommés par l'insecte. Une composition différente constatée entre la sève et le miellat nous indique la possibilité d'une conversion intra-intestinale des composés phénoliques ingérés par la cochenille.

L'utilisation de plusieurs génotypes de manioc a permis de montrer que, parmi les composés phénoliques majoritairement présents dans le phloème, seule la rutine avait des concentrations foliaires négativement corrélées avec le taux intrinsèque d'accroissement de la cochenille (r_C). Ceci pourrait expliquer partiellement la résistance "antibiotique" du manioc. Il semble par ailleurs qu'une des réponses défensives de la plante se traduise par une augmentation de la teneur en rutine lors de l'infestation par *P. manihoti*. Nous avons pu également montrer que la réponse défensive du manioc se manifesterait déjà au bout d'un mois d'attaque du ravageur et qu'elle était proportionnelle à la densité d'infestation. Nous avons aussi mis en évidence sa variabilité selon la saison. Elle s'amointrit en saison sèche. Cet amoindrissement pourrait être consécutif à un déficit hydrique durant cette saison. En effet, nous avons pu observer pour le "Faux caoutchouc" une diminution du niveau foliaire en

rutine lors d'un stress hydrique provoqué. Ces résultats permettraient d'expliquer en partie les observations faites sur le terrain qui montrent qu'une pullulation naturelle de cochenilles est souvent observée durant la grande saison sèche.

Dans la littérature, beaucoup de travaux se rapportent à des allélochimiques dosés dans des organes végétaux entiers (feuilles...). Pourtant, la localisation tissulaire des allélochimiques dans la plante est primordiale pour connaître les phases du comportement de l'insecte sur lesquelles ces substances agissent (fixation ou nutrition). Ces précisions sont bien sûr utiles lorsqu'on travaille sur des insectes dont le compartiment nutritif est bien différencié (cas des Homoptères phloémophages). Dans l'interaction manioc / cochenille, nous avons tenté de discerner les allélochimiques les plus impliqués dans la fixation, de ceux les plus liés à la nutrition. Il s'est avéré que les composés cyanés (glycosides cyanogéniques) ont un rôle plus probable de phagostimulant que de composé toxique vis-à-vis de l'insecte (la possibilité d'assimilation devant être sérieusement envisagée). Cette observation est intéressante pour certaines applications expérimentales et l'on pourrait par exemple proposer l'utilisation de telles substances en tant que phagostimulants dans les milieux artificiels, qui sont un outil précieux largement utilisé chez les Aphides.

Il s'est avéré que la rutine, présente également dans la sève, a un rôle plus probable dans la nutrition de *P. manihoti*. Celle-ci affecterait surtout le développement de l'insecte. Une telle hypothèse basée sur des corrélations empiriques ne permettant pas à elles seules d'attribuer un rôle direct sur la croissance de *P. manihoti*, doit être confirmé expérimentalement sur milieu artificiel.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de notre étude a été la mise en évidence de mécanismes de défense du manioc contre l'attaque de la cochenille. Avant d'aborder cet aspect particulier des interactions cochenille / manioc, il nous avait paru nécessaire de mieux connaître d'une part le comportement alimentaire et d'autre part certains éléments des besoins nutritifs de l'insecte. Nous rappellerons ici les principaux résultats acquis au cours de cette étude, mais souhaiterions exposer auparavant quelques unes des difficultés méthodologiques rencontrées dans notre travail :

- d'une part, l'étude sur plantes entières implique une durée d'obtention du matériel végétal assez longue, de l'ordre de plusieurs mois, et un entretien d'autant plus rigoureux que les maniocs, placés sous ombrière ou directement sur le terrain, sont souvent sujets à des attaques parasitaires. Il était évidemment nécessaire, dans le cadre de cette étude, de posséder des plantes en bon état phytosanitaire. Ces délais et contraintes restreignent bien évidemment les facteurs analysables (variétés, conditions agronomiques...);

- d'autre part, le travail sur le terrain dans des conditions d'interactions complexes (sol/climat/génotype/insecte) rendent les protocoles expérimentaux lourds et d'interprétation souvent délicate. Malgré ce risque, il nous avait semblé intéressant de prévoir une expérience telle que celle réalisée sur le terrain, qui reflète de façon satisfaisante une situation agronomique réelle ;

- par ailleurs, la seule méthode fiable de récolte de sève phloémienne, qui est la stylectomie, n'était pas applicable à notre modèle et il nous a fallu utiliser une technique de récolte permettant d'approcher au mieux les constituants de la sève pour en étudier la variabilité selon différents facteurs. Ici encore, il nous faut assumer le risque d'un biais systématique entre les compartiments analysés (exsudats par exemple) et la sève *in situ*.

Les principaux acquis de ce travail sont présentés dans la courte synthèse qui suit.

Comme d'autres Homoptères, *P. manihoti* est un insecte principalement phloémophage. L'utilisation d'un outil tel que l'électropénétrographie, pour la première fois utilisée sur cochenille à notre connaissance, a permis de montrer que des interactions pré-phloémiennes entre les stylets de l'insecte et les tissus de la plante, ainsi qu'un comportement de rejet précoce dû aux délais d'atteinte du phloème conditionneraient la fixation de l'insecte (CALATAYUD et coll., soumis). Une analyse des substances secondaires foliaires des plantes hôtes et des hôtes de substitution a permis de suggérer, par corrélation avec l'EPG, que les composés cyanés (glycosides cyanogéniques intracellulaires) et les acides phénoliques (souvent à localisation extracellulaire) pourraient être impliqués dans les mécanismes de fixation de l'insecte et ses interactions avec le mésophylle.

L'analyse en composés primaires de la sève phloémienne de manioc fait apparaître que ce compartiment est assez pauvre en acides aminés libres. L'utilisation de milieux artificiels déjà décrits pour des Homoptères, et plus riches en ces composés, n'a pas permis l'accomplissement du cycle de développement de *P. manihoti*. Ces résultats suggèrent que les proportions relatives en sucres et en acides aminés libres, ainsi que la balance en acides aminés libres de la sève pourrait constituer un des facteurs clefs dans la nutrition de cet insecte, mais suppose également qu'une autre source azotée soit présente dans la sève, non seulement pour les besoins de la plante mais aussi pour ceux de l'insecte. En effet, la détection de glucosides cyanogéniques à des teneurs conséquentes dans la sève comme dans le miellat, ainsi que l'existence d'une activité linamarasique (β -glucosidase) propre à l'insecte, ont permis de fonder cette hypothèse. De plus, la présence de cyanure libre dans le miellat, alors qu'il est absent dans la sève, conforte la possibilité d'une hydrolyse des cyanures liés dans le tube digestif. Par ailleurs, bien qu'aucune démonstration fine n'en ait été faite, quelques résultats préliminaires et succincts suggèrent que les symbiotes, souvent impliqués dans la complémentation nutritionnelle d'un aliment déficient ou déséquilibré, pourraient participer chez *P. manihoti* à l'assimilation du cyanure pour compenser le faible apport azoté consécutif aux basses teneurs de la sève en acides aminés libres. Une telle démonstration permettrait d'expliquer en partie l'oligophagie de *P. manihoti* et sa restriction au genre *Manihot*. Les plantes plus riches en acides aminés libres phloémiens peuvent se révéler défavorables au développement de la cochenille, soit par inadéquation de stimulation sensorielle, soit par une richesse excessive en azote mal assimilé. Cette hypothèse est appuyée par le rôle phagostimulant que joueraient les glucosides cyanogéniques intracellulaires du mésophylle dans la fixation initiale de l'insecte, mais peut être également du phloème dans l'établissement d'une ingestion soutenue.

Trois flavonoïdes glycosylés majoritaires, identifiés à la rutine et à deux composés isomères contenant du kaempférol, sont véhiculés par la sève et consommés par l'insecte. Parmi ces composés, seule la rutine semblerait être impliquée dans la résistance par antibiose du manioc. Cette mise en cause est essentiellement établie sur la base des corrélations observées d'une part entre les taux d'accroissement et les teneurs en rutine des différentes plantes hôtes, et d'autre part entre les niveaux en rutine et les différents stress imposés à la plante. En effet, des expériences en laboratoire et au champ ont permis de montrer que la réponse défensive du manioc se traduit par une augmentation de la teneur en rutine des feuilles, et vraisemblablement de la sève, lors d'une attaque du ravageur. Cette réponse varie selon la saison. Elle s'amointrit en saison sèche et est modulée par le génotype de manioc. Par ailleurs, la rutine ingérée par l'insecte ne se retrouve pas dans le miellat, qui présente d'autres composés phénoliques absents dans la sève. Ces résultats indiquent une possibilité de métabolisation des composés phénoliques phloémiens et suggèrent que les produits d'hydrolyse ou de transformation de la rutine puissent agir sur la physiologie de

l'insecte, éventuellement par l'intermédiaire de ses symbiotes. Cela n'a malheureusement pas pu être démontré expérimentalement sur les milieux artificiels, qui ne permettent pas encore d'étudier les interactions sur un cycle complet de développement.

Au chapitre des perspectives découlant directement de nos résultats, nous pouvons dégager un certain nombre de priorités. Notre travail a permis de donner un aperçu global des relations nutritionnelles de la cochenille avec sa plante-hôte et des substances rencontrées. A l'avenir, il serait nécessaire d'approfondir et de confirmer certains des différents points abordés dans ce travail, dont par exemple :

- confirmer expérimentalement le rôle des glucosides cyanogéniques dans la phagostimulation de *P. manihoti* (par des tests d'ingestion en milieu artificiel) et étudier plus en détail les étapes de la reconnaissance de l'hôte (composés cyanés vacuolaires intracellulaires) et de la consommation alimentaire (ingestion phloémienne), par exemple grâce à l'utilisation de l'EPG sur une gamme variétale bien différenciée vis-à-vis de ces composés ;

- confirmer expérimentalement l'intervention de la rutine dans le contrôle par la plante de *P. manihoti*, et étudier les mécanismes de sa toxicité éventuelle (via les symbiotes ou non ?), la possibilité de synergie glucosides cyanogéniques / rutine, ainsi que les éventuels processus de détoxication (métabolisme de la rutine dans *P. manihoti*). Ces expériences nécessiteront l'utilisation d'un milieu artificiel permettant un développement complet de l'insecte ;

- clarifier le bilan de l'azote chez *P. manihoti*, évaluer quantitativement l'assimilation du cyanure (voie de détoxication) et étudier l'équilibre des acides aminés sur un cycle annuel de développement de la plante ainsi que l'indispensabilité réelle de certains d'entre eux. Cela pourrait aboutir à l'élaboration raisonnée d'un milieu artificiel convenant à *P. manihoti* ;

- étudier le rôle des symbiotes dans les processus précédents (recyclage de l'azote cyané, amélioration du spectre aminé de la sève...). Ce point nécessitera la production maîtrisée de cochenilles aposymbiotiques ;

- déterminer plus en détail les facteurs de fixation liés à l'antixénose (intervention éventuelle du phylloplan et des phases précoces de la rencontre plante-insecte).

L'étude des mécanismes intimes de la résistance des plantes n'est pas un préalable indispensable à la mise en place de programmes de sélection variétale, notamment dans les pays en voie de développement. Cependant, la connaissance de ces mécanismes, permettrait une meilleure maîtrise du processus de création de plantes résistantes, notamment face à des variations incontrôlées du contexte agroécologique (évolution des populations de ravageurs, d'autres contraintes agronomiques ou économiques...) et d'envisager un contrôle durable de

l'effectif naturel du ravageur. La voie du contrôle génétique de la résistance conduit à l'utilisation de matériel nécessitant peu ou en tout cas moins de traitements, qui sont des facteurs limitant important en milieu rural africain par exemple, et apparaît comme une perspective souhaitable à moyen et à long terme.

L'interprétation de ces connaissances dans le contexte de la lutte intégrée devra par ailleurs prendre en compte les interactions possibles sur les autres niveaux trophiques. En effet, il pourrait fort bien y avoir un antagonisme entre lutte variétale et lutte biologique par exemple. La sélection de variétés résistantes par antibiose ne pourraient-elle pas induire des perturbations de l'intervention du parasitoïde de la cochenille ? La présence d'allélochimiques tels que la rutine dans les plantes résistantes, qui seraient ingérés par *P. manihoti*, ne gênerait-il pas le parasitisme d'*E. lopezi* ? Il conviendrait, pour répondre à ces questions, d'étudier étroitement l'interaction tritrophique variété résistante (Incoza ou 3M8 par exemple) / *P. manihoti* / *E. lopezi*.

L'interprétation de ces connaissances devra également prendre en compte les possibles interaction sur la physiologie du manioc, l'alimentation humaine ou la phytopathologie.

En conclusion, de nombreux paramètres doivent être considérés et envisagés pour la mise en place de tels programmes de recherche qui supposent la mise en oeuvre de moyens importants et la mise en place d'équipes multidisciplinaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* , 1925, Vol. 18, p. 265-267

AKINLOSOTU, T.A. and LEUSCHNER, K. Outbreak of two new cassava pests (*Mononychellus tanajoa* and *Phenacoccus manihoti*) in southwestern Nigeria. *Trop. Pest Manage.*, 1981, Vol. 27, p. 247-250

ALBRIGO, L.G. and BROOKS, R.F. Penetration of *Citrus* cuticles and cells by *Citrus* snow scale, *Unaspis citri* (Comst.). *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1977, Vol. 2, p. 463-467

ARCHER, B.L. Polyisoprene. *Secondary plant products*. Edited by E. A. Bell and B.V. Charlwood. Berlin : Springer-Verlag, 1980. Vol. 8, p. 309-327

ARGANDOÑA, V.H., LUZA, J.C., NIEMEYER, H.M. and CORCUERA, L.J. Role of hydroxamic acids in the resistance of cereals to aphids. *Phytochemistry*, 1980, Vol. 19, p. 1665-1668

ARGUEDAS, P. and COOKE, R.D. Residual cyanide concentrations during the extraction of cassava starch. *J. Food Technol.* , 1982, Vol. 17, p. 251-262

ARIHANTANA, M.B. and BUCKLE, K.A. Effect of non-enzymatic browning, starch and sugars on the total cyanide determination in cassava by an enzymatic assay. *J. Food Technol.* , 1986, Vol. 21, p. 189-197

AUCLAIR, D.H., MALTAIS, J.B. and CARTIER, J.J. Factors in resistance of peas to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) - II. Amino acids. *Can. Entomol.* , 1957, Vol. 89, p. 457-464

AUCLAIR, J.L. Feeding and nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae), on chemically defined diets of various pH and nutrient levels. *Ann. Entomol. Soc. Am.* , 1965, Vol. 58, p. 855-875

AUCLAIR, J.L. Host plant resistance. *Aphids : Their Biology, Natural enemies and Control (World Crop Pests)*. Edited by A.K. Minks and P. Harrewijn. Amsterdam : Elsevier Science Publishers B.V., 1988. Vol. C, p. 225-265

BACKUS, E.A. Sensory systems and behaviours which mediate Hemipteran plant-feeding : a taxonomic overview. *J. Insect Physiol.* , 1988, Vol. 34, p. 151-165

BANI, G. Interactions *Zonocerus variegatus* (Orthoptère, Pyrgomorphidae)-manioc au Congo : bioécologie d'un ravageur du manioc. Thèse : Sci. : Université de Rennes I, 1990. 87 p.

BECK, S.D. and REESE, J.C. Insect-plant interactions : nutrition and metabolism. *Plant apparency and chemical defense (biochemical interactions between plants and insects)*. Edited by J. Wallace and R. Mansell. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 1976. Vol. 10, p. 1-40

BELL, E.A. Biochemical bases of resistance of plants to pathogens. *Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and diseases*. Edited by F.G. Maxwells and F.A. Harris. Cambridge : University Press, 1974. p. 453-462

BELLOTTI, A. and KAWANO, K. Breeding approaches in cassava. *Breeding plants resistant to insect*. Edited by F.G. Maxwell and P.R. Jennings. 1980, p. 313-335

BIASSANGAMA, A., FABRES, G. and NENON, J.P. Parasitisme au laboratoire et au champ d'*Epidinocarsis lopezi* (Hym. Encyrtidae) auxiliaire exotique introduit au Congo pour la régulation de l'abondance de *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae). *Entomophaga*, 1988, Vol. 33, p. 453-465

BIASSANGAMA, A., LE RÜ, B., IZIQUEL, Y., KIYINDOU, A. et BIMANGOU, A.S. L'entomocénose inféodée à la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae), au Congo, cinq ans après l'introduction d'*Epidinocarsis lopezi* (Hym. Encyrtidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 1989, Vol. 25, p. 315-320

BING, J.W., NOVAK, M.G., OBRYCKI, J.J. and GUTHRIE, W.D. Stylet penetration and aphid feeding sites of *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera : Aphididae) on two growth stages of maize. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1991, Vol. 84, p. 549-554

BIRCH, L.C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *J. Anim. Ecol.*, 1948, Vol. 17, p. 15-26

BIRCH, N. and WRATTEN, S.D. Patterns of aphid resistance in the genus *Vicia*. *Ann. Appl. Biol.*, 1984, Vol. 104, p. 327-338

BLISS, C.I. The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.*, 1935, Vol. 22, p. 134-167

BOUNIAS, M. (Ed.). *L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince*. Paris : Editions Masson, 1983. 198 p.

BOUSSIENGUET, J. Bioécologie de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero et de ses ennemis naturels au Gabon. Thèse : Sci. : Faculté des Sciences Paris VI, 1984. 100 p.

BOUSSIENGUET, J. Le complexe entomophage de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom. Coccoidea, Pseudococcidae) au Gabon. I.- Inventaire faunistique et relations trophiques. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 1986, Vol. 22, p. 35-44

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Chem.*, 1976, Vol. 72, p. 248-254

BROOKS, M.A. Symbiosis and aposymbiosis in Arthropods. *Symbiotic associations, Thirteen symposium of the society for general microbiology held at the Royal Institution*. Cambridge : University press, 1963. p 200-230

BUCHNER, P. (Ed.). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York : Interscience Publishers, 1965. 909 p.

CALATAYUD, P.A. *Etude de la composition chimique de la sève phloémienne du lupin (Fabaceae) par stylectomie d'aphide (Macrosiphum albifrons): Mise au point, comparaison avec d'autres méthodes d'estimation, variabilité des teneurs en aminoacides et en saccharose*. Rapport de DEA : Université Claude Bernard Lyon I (Fr), 1989. 23 p.

CALATAYUD, P.A., RAHBE, Y., TJALLINGII, W.F., TERTULIANO, M. and LE RÜ, B. Electrically recorded feeding behaviour of cassava mealybug on host and non-host plants. *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, submitted

CAMPBELL, B.C. and DREYER, D.L. Host-plant resistance of sorghum : differential hydrolysis of sorghum pectic substances by polysaccharases of greenbug biotypes (*Schizaphis graminum*, Homoptera : Aphididae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1985, Vol. 2, p. 203-215

CAMPBELL, C.A.M. The susceptibility of cocoa to mealybug (Pseudococcidae) and other honeydew-producing Homoptera in Ghana. *Bull. Entomol. Res.* , 1990, Vol. 80, p. 137-151

CAUSTON, D.R. and VENUS, J.C. (Eds). *The biometry of plant growth*. London: Edward Arnold Ltd, 1981.

COCK, J.H., PORTO, M.C.M. and EL SHARKAWY, M.A. Water use efficiency of cassava. III. Influence of air humidity and water stress on gas exchange of field grown cassava. *Crop Sci.*, 1985, Vol. 25, p. 265-272

CONN, E.E. (Ed.) Cyanogenetic glycosides. *Toxicants Occurring Naturally in Foods*. Washington : National Academy of Sciences. 1973. p. 299-308

CONN, E.E. Biosynthesis of cyanogenic glycosides. *Naturwissenschaften* , 1979, Vol. 66, p. 28-34

CONN, E.E. Cyanogenic compounds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* , 1980, Vol. 31, p. 433-451

COOKE, R.D. An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sci. Food Agric.*, 1978, Vol. 29, p. 345-352

COOKE, R.D. Enzymatic assay for determining the cyanide content of cassava and cassava products. *Cassava Information Center - CIAT*, 1979, Vol. 3, p. 3-14

CORCUERA, L.J., QUEIROLO, C.B. and ARGANDOÑA, V.H. Effects of 2-beta-D-glucosyl-4-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one on *Schizaphis graminum* (Rondani)(Insecta, Aphidae) feeding on artificial diets. *Experientia*, 1985, Vol. 41, p. 514-516

COX, J.M. and WILLIAMS, D.J. An account of Cassava Mealybug (Hemiptera : Pseudococcidae) with a description of new species. *Bull. Entomol. Res.* , 1981, Vol. 71, p. 247-258.

DIPIETRO, J.P. et DEDRYVER, C.A. Relations entre les pucerons des céréales et leurs plantes-hôtes. I-Mise au point d'une méthodologie de résistance à *Sitobion avenae* (F.) chez différents cultivars de blé d'hiver. *Agronomie* , 1986, Vol. 6, p. 469-479

DIXON, A.F.G. Aphids and tranlocation. *Intracellular interactions and transport processes*. Edited by C.R. Stocking and U. Heber. Berlin : Springer-Verlag, 1975. p. 154-170

DORSCHNER, K.W., JOHNSON, R.C., EIKENBARY, R.D. and RYAN, J.D. Insect-plant interactions : greenbugs (Homoptera : Aphididae) disrupt acclimation of winter wheat to drought stress. *Environ. Entomol.* , 1986, Vol. 15, p. 118-121

DOUGLAS, A.E. Experimental studies on the mycetome symbiosis in the leafhopper *Euscelis incisus*. *J. Insect Physiol.* , 1988, Vol. 34, p. 1043-1053

DREYER, D.L. and JONES, K.C. Feeding deterreny of flavonoids and related phenolics towards *Schizaphis graminum* and *Myzus persicae* : aphid feeding deterrents in wheat. *Phytochemistry* , 1981, Vol. 20, p. 2489-2493

DREYER, D.L., JONES, K.C. and MOLYNEUX, R.J. Feeding deterreny of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. *J. Chem. Ecol.* , 1985, Vol. 11, p. 1045-1050

EDWARDS, G.E., SHETA, E., MOORE, B.D., DAI, Z., FRANCESCHI, V.R., CHENG, S.-H., LIN, C.-H. and KU, M.S.B. Photosynthetic characteristics of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a C3 species with chlorenchymatous bundle sheath cells. *Plant Cell Physiol.* , 1990, Vol. 31, p. 1199-1206

EL SHARKAWY, M.A. and COCK, J.H. Water use efficiency of cassava. I. Effects of air humidity and water stress stomatal conductance and gas exchange. *Crop Sci.*, 1984, Vol. 24, p. 497-502

EL SHARKAWY, M.A. and COCK, J.H. The humidity factor in stomatal control and its effect on crop productivity. *Biological Control of Photosynthesis*. Edited by R. Marcelle, H. Clijster and M. Van Parcke. Dordrecht : M. Nijhoff publishers, 1986. Vol. 4, p. 187-198

EL SHARKAWY, M.A. and COCK, J.H. Photosynthesis of cassava (*Manihot esculenta*). *Expl. Agric.* , 1990, Vol. 26, p. 325-340

EL SHARKAWY, M.A., COCK, J.H. and HELD, A.A.K. Water use efficiency of cassava. II. Differing sensitivity of stomata to air humidity in cassava and other warm-climate species. *Crop Sci.*, 1984, Vol. 24, p. 503-507

EVERT, R.F., ESCHRICH, W., EICHORN, S.E. and LIMBACH, S.T. Observations on penetration of barley leaves by aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch). *Protoplasma*, 1973, Vol. 77, p. 95-110

EZEALA, D.O. and OKORO, N. Processing techniques and hydrocyanic acid content of cassava-based human foods luffs in Nigeria. *J. Food Biochem.*, 1986, Vol. 10, p. 125-132

FABRES, G. Première quantification du phénomène de gradation des populations de *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae) en République Populaire du Congo. *Agronomie*, 1981a, Vol. 1, N° 6, p. 483-486

FABRES, G. Bioécologie de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom.: Pseudococcidae) en République Populaire du Congo. II. - Variations d'abondance et facteurs de régulation. *Agron. Trop.*, 1981b, Vol. 36, N° 4, p. 369-377

FABRES, G. et BOUSSIENGUET, J. Bioécologie de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom.: Pseudococcidae) en République Populaire du Congo. I.- Cycle évolutif et paramètres biologiques. *Agron. Trop.*, 1981, Vol. 36, N° 1, p. 82-89

FABRES, G. et MATILE-FERRERO, D. Les entomophages inféodés à la Cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom. Coccoidea Pseudococcidae) en république populaire du Congo: les composantes de l'entomocénose et leurs inter-relations. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 1980, Vol. 16, p. 509-522

FAHN, A. (Ed.). *Secretory tissue in plants*. New York: Academic press, 1979. 302 p.

FEBVAY, G., BONNIN, J., RAHBE, Y., BOURNOVILLE, R., DELROT, S. and BONNEMAIN, J.L. Resistance of different lucerne cultivars to pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: influence of phloem composition on aphid fecundity. *Entomol. Exp. Appl.*, 1988, Vol. 48, p. 127-134

FEBVAY, G., SAUVION, N. and RAHBE, Y. A macintosh program for the analysis of EPGgrams: an example application to the analysis of melon resistance to *Aphis gossypii*. *XXth Int. Congress of Entomology, Beijing, August 6-11, 1993*. in press

FISK, J. Effect of HCN, phenolic acids and related compounds in *Sorghum bicolor* on the feeding behaviour of the planthopper *Peregrinus maidis*. *Entomol. Expl. Appl.* , 1980, Vol. 27, p. 211-222

FOLDI, I. Internal anatomy. *Armored scale insects : their biology, natural enemies and control*. Edited by D. Rosen. Amsterdam : Elsevier, 1990. Vol. A. p. 65-80

FRAENKEL, G. Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. *Entomol. Exp. Appl.* , 1969, Vol. 12, p. 473-486

FRANZL, S., ACKERMANN, J. and NOHRSTEDT, A. Purification and characterization of β -glucosidase (linamarase) from the haemolymph of *Zygaena trifolii* Esper, 1973 (Insecta, Lepidoptera). *Experientia* , 1989, Vol. 45, p. 712-718

FRY, S.C. Feruloylated pectines from the primary cell wall : their structures and possible functions. *Planta* , 1983, Vol. 157, p. 111-123

GABE, M. (Ed). *Techniques histologiques*. Paris : Editions Masson, 1968. 1113 p.

GIRMA, M., WILDE, G. and REESE, J.C. Influence of temperature and plant growth stage on development, reproduction, life span, and intrinsic rate of increase of Russian wheat aphid (Homoptera : Aphididae). *Environ. Entomol.* , 1990, Vol. 19, p. 1438-1442

GIROUSSE, C. Composition en sucres et en acides aminés libres de la sève phloémienne de luzerne (*Medicago sativa* L.) : effets de facteurs écophysologiques et conséquences sur les relations luzerne / puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum* H.). Thèse : Sci. : Université de Poitiers, 1988. 170 p.

GOODMAN, R.N. (Ed.). *Cell-wall composition and metabolism*. Columbia : University of Missouri press, 1986. 500 p.

GOTHILF, S. and BECK, S.D. Rearing the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso), on defined diet. *J. Econ. Entomol.* , 1966, Vol. 59, p. 489-490

GRASSE, P.P. (Ed). *Traité de Zoologie*. Paris : Editions Masson, 1951. Vol. 10, 1948 p.

GRAY, R.A. Composition of honeydew excreted by pineapple mealybug. *Science* , 1952, Vol. 115, p. 129-133

GRENIER, A.-M., NARDON, C. and RAHBE, Y. Observations on the microorganisms occurring in the gut of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.* , 1993, In press

GROUSSOL, J., DELROT, S., CARUHEL, P. and BONNEMAIN, J.L. Design of an improved method for phloem sap collection and its use for study of phloem mobility of pesticides. *Physiol. Veg.* , 1986, Vol. 24, p. 123-133.

GUTIERREZ, A.P., NEUENSCHWANDER, P., SCHULTHESS, F., HERREN, H.R., BAUMGARTNER, J.U., WERMELINGER, B., LÖHR, B. and ELLIS, C.K. Analysis of biological control of cassava pests in Africa. II. Cassava mealybug *Phenacoccus manihoti*. *J. Appl. Ecol.* , 1988, Vol. 25, p. 921-940

HAHN, S.K. and WILLIAMS, R.J. (Eds). *Investigations on cassava in the republic of Zaïre*. Ibadan : IITA press , 1973. 12 p.

HAMMER, G.L. Estimation of cassava leaf area by a simple, non-destructive field technique. *J. Australian Inst. Agric. Sci.*, 1980, Vol. 2, p. 61-62

HARBORNE, J.B. (Ed). Function of flavonoids. *Comparative biochemistry of the flavonoids*. New York : Plenum, 1967. p. 280-303

HARREWLIJN, P. Resistance mechanisms of plant genotypes to various aphid species. *Aphid-plant genotype interactions*. Edited by R.K. Campbell and M.E. Eikenbarr. Amsterdam : Elsevier, 1990. p. 117-130

HERIOT, A.D. The renewal and replacement of the stylets of sucking insects during each stadium, and the method of penetration. *Can. J. Res.*, 1934, Vol. 11, p. 602-612

HERREN, H.R. A review of objectives and achievements. *Insect Sci. Appl.* , 1987, Vol. 8, p. 837-840

HERREN, H.R. and NEUENSCHWANDER, P. Biological control of the cassava pests in Africa. *Ann. Rev. Entomol.* , 1991, Vol. 36 , p. 257-283

HONEK, A. Temperature and plant vigour influence annual variation of abundance in cereal aphids (Homoptera, Aphididae). *J. Plant Dis. Prot.* , 1985, Vol. 92, p. 588-593

- HOSEL, W. (Ed). *Glycosylation and glycosidases*. New York : Academic press, 1981. 753 p.
- HOUK, E.J. and GRIFFITHS, G.W. Intracellular symbionts of the Homoptera. *Ann. Rev. Entomol.* , 1980, Vol. 25, p. 161-187
- HUNT, R. (Ed). *Plant growth curves*. London : Edward Arnold Ltd., 1982. 67 p.
- IHEAGWAN, E.U. Natural enemies and alternative hostplant of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae) in the southeastern Nigeria. *Rev. Zool. Afr.* , 1981, Vol. 95 , p. 433-438
- ISHIKAWA, H. Characterization of the protein species synthesized in vivo and in vitro by an aphid endosymbiont. *Insect Biochem.* , 1984, Vol. 14, p. 417-425
- IZIQUEL, Y. et LE RÜ, B. Influence de l'hyperparasitisme sur les populations d'un Hyménoptère Encyrtidae, *Epidinocarsis lopezi*, parasitoïde de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* introduit au Congo. *Entomol. Exp. Appl.* , 1989, Vol. 52, p. 239-247
- JANSSEN, J.A.M., TJALLINGII, W.I. and VAN LENTEREN, J.C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomol. Exp. Appl.* , 1989, Vol. 52, p. 69-81
- JANSSON, R.K., ELLIOTT, G.C., SMILOWITZ, Z. and COLE, R.H. Influence of cultivar maturity time and foliar nitrogen on population growth of *Myzus persicae* on potato. *Entomol. Exp. Appl.* , 1987, Vol. 42, p. 297-300
- JONES, K.C. and KLOCKE, J.A. Aphid feeding deterrence of ellagitannins, their phenolic hydrolysis products and related phenolic derivatives. *Entomol. Exp. Appl.* , 1987, Vol. 44, p. 229-234
- JORDENS-ROTTGER, D. The role phenolic substances for host-selection behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Entomol. Exp. Appl.* , 1979, Vol. 26, p. 49-54
- KANEHISA, K., TSUMUKI, H., KAWADA, K. and RUSTAMANI, M.A. Relations of gramine contents and aphid populations on barley lines. *Appl. Entomol. Zool.* , 1990, Vol. 25, p. 251-259

KIMMINS, F.M. Electrical penetration graphs from *Nilaparvata lugens* on resistant and susceptible rice varieties. *Entomol. Exp. Appl.* , 1989, Vol. 50, p. 69-79

KIMMINS, F.M. and TJALLINDGII, W.F. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. *Entomol. Exp. Appl.* , 1985, Vol. 39, p. 135-143

KOCH, A. Insects and their endosymbionts. *Symbiosis*. Edited by J.M. Henry. New York : Academic press, 1967. Vol. 2, p. 1-96

KOGAN, M. The role of chemical factors in insect/plant relationships. *Proc. XV Int. Congr. Entomol, Washington, August 19-27, 1977*. Illinois State Natural History Survey : Academic Press. 1977. p. 211-227

KOGAN, M. and ORTMAN, E.F. Antixenosis - a new term proposed to define Painter's "non-preference" modality of resistance. *Bull. Entomol. Soc. Am.* , 1978, Vol. 24, p. 175-176

KUROLI, G. Effect of composition of the host plant on the numbers of the virus vector (*Myzus persicae* Sulz.) of field crops. *Conference on integrated plant protection*. Edited by B. Darvas, P. Solyosi, L. Szalay-marso and Voros, J. Budapest : Budapest press, 1984. p. 430-441

LAUGHLIN, R. Capacity for increase: a useful population statistic. *J. Anim. Ecol.* , 1965, Vol. 34, p. 77-91

LE RÜ, B. Contribution à l'étude de l'écologie de la cochenille du manioc, *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae) en République populaire du Congo. Thèse de 3ème cycle (Fr) : Paris XI (Orsay), 1984, 118 p.

LE RÜ, B. Etude de l'évolution d'une mycose à *Neozygites fumosa* (Zygomycètes. Entomophtorales) dans une population de la cochenille du manioc, *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae). *Entomophaga* , 1986 a, Vol. 31, p. 79-89

LE RÜ, B. The role of *Neozygites fumosa* in regulation of cassava mealybug populations. *Proceedings of the 4th International Colloquium of Invertebrate Pathology, "Koningshof" Veldhoven-Netherland, August 18-22, 1986*. Amsterdam : Elsevier, 1986 b. p. 93-104

LE RÜ, B. and FABRES, G. Influence de la température et de l'hygrométrie sur la capacité d'accroissement et le profil d'abondance des populations de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae), au Congo. *Acta Oecol. / Oecol. Applic.*, 1987, Vol. 8, N° 2, p. 165-174

LE RÜ, B. and IZIQUEL, Y. Nouvelles données sur le déroulement de la mycose à *Neozygites fumosa* sur la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti*. *Entomophaga*, 1990, Vol. 35, p. 173-183.

LE RÜ, B., IZIQUEL, Y., BIASSANGAMA, A. et KIYINDOU, A. Variations d'abondance et facteurs de régulation de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae) cinq ans après l'introduction d'*Epidinocarsis lopezi* (Hym. Encyrtidae) au Congo en 1982. *Entomophaga*, 1991, Vol. 36, N° 4, p. 499-511

LE RÜ, B. and PAPIEROK, B. Taux intrinsèque d'accroissement naturel de la cochenille du manioc, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hom., Pseudococcidae). Intérêt d'une méthode simplifiée d'estimation. *Acta Oecol. / Oecol. Applic.*, 1987, Vol. 8, p. 3-14

LE RÜ, B., TERTULIANO, M. et CALATAYUD, P.A. Relation entre la cochenille du manioc (*Phenacoccus manihoti* Mat. Ferr.) et ses plantes hôtes : étude des différentes catégories de résistance biologique. *Séminaire sur la lutte biologique en Afrique, Cotonou-I.I.T.A., mars 4-9, 1991*. Sous presse

LESZCZYNSKI, B. Changes in phenol contents and metabolism in leaves of susceptible and resistant winter wheat cultivars infested by *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hom., Aphididae). *Z. Angew. Entomol.*, 1985, Vol. 100, p. 343-348

LESZCZYNSKI, B., WARCHOE, J. and NIRAZ, S. The influence of phenolic compounds on the preference of winter wheat cultivars by cereal aphids. *Insect Sci. Appl.*, 1985, Vol. 6, p. 157-158

LEUSCHNER, K. Preliminary observations on the mealybug (Hemiptera : Pseudococcidae) in Zaïre and a projected outline for subsequent work. *Proceedings of the international workshop on cassava mealybug Phenacoccus manihoti Mat-Ferr. (Pseudococcidae) INERA, M'Vuazi-Zaïre, June 26-29, 1977*. Cotonou : IITA press, 1977. p. 15-19

LEVIN, D.A. Plant phenolics : an ecological perspective. *Am. Nat.* , 1971, Vol. 105, p. 157-181

LOCQUIN, M. et LANGERON, M. (Eds). *Manuel de microscopie*. Paris : Editions Masson, 1978. 352 p.

LUCZYNSKI, A., ISMAN, M.B. and RAWORTH, D.A. Strawberry foliar phenolics and their relationship to development of the twospotted spider mite. *J. Econ. Entomol.* , 1990, Vol. 83, p. 557-563

MA, R., REESE, J.C., BLACK IV, W.C. and BRAMEL-COX, P. Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *J. Insect Physiol.* , 1990, Vol. 36, p. 507-512

MALTAIS, J.B. and AUCLAIR, J.L. Factors in resistance of peas to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris)(Homoptera: Aphididae). I. The sugar nitrogen ratio. *Can. Entomol.* , 1957, Vol. 89, p. 365-370

MATILE, P. Das toxishe kompartment der planzenzelle. *Naturwissenschaften*, 1984, Vol. 71, p. 123-141

MATILE-FERRERO, D. *Les cochenilles nuisibles au manioc en république populaire du Congo*. Rapport de mission : Muséum d'histoire naturelle (Paris, Fr), 1976. 30 p.

MATTSON, W.J. and HAACK, R.A. The role of drought in outbreaks of plant-eating insects : Drought's physiological effects on plants can predict its influence on insect populations. *Biosciences* , 1987, Vol. 37, p. 110-118

MBAYE, N. *Etude des mécanismes de défense conférant au manioc la résistance aux Xanthomonas*. Mémoire : Sci. : Université Catholique de Louvain, 1989. 120p.

Mc LEAN, D.L. and KINSEY, M.G. A technique for electronically recording of aphid feeding and salivation. *Nature* , 1964, Vol. 202, p. 1358-1359

MEDARD, R. Morphogénèse du manioc, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae-Crotonoidées): étude descriptive. *Adansonia ser. 2* , 1973, Vol. 13, p. 483-494

MEYERS, D.M. and AHMAD, S. Link between l-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity. *Phytochemistry*, 1991, Vol. 1075, p. 195-197

MILES, P.W. The saliva of Hemiptera. *Adv. Insect Physiol.*, 1972, Vol. 9, p. 183-255

MILES, P.W., ASPINALL, D. and ROSENBERG, L. Performance of the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.), on water-stressed rape plants, in relation to changes in their chemical composition. *Australia J. Zool.*, 1982, Vol. 30, p. 337-345

MITTLER, T.E. Uptake rates of plant sap and synthetic diet by the aphid *Myzus persicae*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1970, Vol. 63, p. 1701-1705

MOLYNEUX, R.J., CAMPBELL, B.C. and DREYER, D.L. Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural products. Implications for host-plant resistance to sap-sucking insects. *J. Chem. Ecol.*, 1990, Vol. 16, p. 1899-1910

MONROY-RIVERA, J.A., LEBERT, A., MARTY, C., MUCHNIK, J. and BIMBERET, J.P. Determination of cyanogenic compounds in cassava during heated air drying. *Sci. Aliments*, 1990, Vol. 10, p. 647-658

MONTLLOR, C.B. and TJALLINGII, W.F. Stylet penetration by two aphid species on susceptible and resistant lettuce. *Entomol. Exp. Appl.*, 1989, Vol. 52, p. 103-111

MULLIN, C.A. (Ed). *Adaptative divergence of chewing and sucking arthropods to plant allelochemicals*. New-York : Plenum corporation press, 1986. 175 p.

NAMBISAN, B. and SUNDARESAN, S. Effect of processing on the cyanoglucoside content of cassava. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1984, Vol. 67, p. 641-643

NARDON, P. Obtention d'une souche aposymbiotique chez le charançon *Sitophilus sasakii* Tak. : différentes méthodes et comparaison avec la souche symbiotique d'origine. *C. R. Acad. Sci.*, 1973, Vol. 277, p. 981-984

NENON, J.P. Lutte biologique en Afrique contre la cochenille du manioc : conséquences écologiques et agronomiques de l'introduction de l'Hyménoptère sud-américain *Epidinocarsis lopezi* (Hyménoptère, Encyrtidae). *Mem. Soc. Entomol. Roy. de Belgique*, 1990, Vol. 35, p. 447-456

NEUENSCHWANDER, P., HAMMOND, N.O., AJUONU, O., GADO, A., ECHENDU, N., BOKONON GANTA, A.H., ALLOMASSO, R. and OKON, I. Biological control of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* (Hom. Pseudococcidae) by *Epidinocarsis lopezi* (Hym. Encyrtidae) in West Africa, as influenced by climate and soil. *Agric. Ecosystems Environ.*, 1990, Vol. 32, p. 39-55

NEUENSCHWANDER, P., HAMMOND, W.N.O., GUTIERREZ, A.P., CUDJOE, A.R., ADJAKLOE, R., BAUMGÄRTNER, J.U. and REGEV, U. Impact assessment of the biological control of the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae), by the introduced parasitoid *Epidinocarsis lopezi* (De Santis) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bull. Entomol Res.*, 1989, Vol. 79, p. 579-594

NEUENSCHWANDER, P., HENNESEY, R.D. and HERREN, H.R. Food web of insects associated with the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae), and its introduced parasitoid, *Epidinocarsis lopezi* (De Santis) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Africa. Bull. Entomol. Res.*, 1987, Vol. 77, p. 177-189

NEUENSCHWANDER, P. and HERREN, H.R. Biological control of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* by the exotic parasitoid *Epidinocarsis lopezi* in Africa. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1988, Vol. B, p. 319-333

NEUENSCHWANDER, P., SCHULTHESS, F. and MADOJEMU, E. Experimental evaluation of the efficiency of *Epidinocarsis lopezi*, a parasitoid introduced into Africa against the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Entomol. Exp. Appl.*, 1986, Vol. 42, p. 133-138

NEWBERY, D.M.C., HILL, M.G. and WATERMAN, P.C. Host-tree susceptibility to the coccid *Icerya seychellarum* Westw. (Margarodidae : Homoptera) on albraba Atoll : the role of leaf morphology, chemistry and phenology. *Oecologia*, 1983, Vol. 60, p. 333-339

NWANZE, K.F. Biology of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* Mat-Ferr. in the Republic of Zaïre. *Proceedings of the international workshop on cassava mealybug Phenacoccus manihoti Mat-Ferr. (Pseudococcidae) INERA, M'Vuazi-Zaïre, June 26-29, 1977*. Ibadan : IITA press, 1977. p. 20-28

NWANZE, K.F. Relationships between Cassava Root Yields and Crops infestations by the mealybug, *Phenacoccus manihoti*. *Trop. Pest Manage.*, 1982, Vol. 28, p. 27-32

PAINTER, R.H. (Ed). *Insect resistance in crops plants*. Lawrence: The University press of Kansas, 1951. 520 p.

PANCORO, A. and HUGHES, M.A. In-situ localization of cyanogenic β -glucosidase (linamarase) gene expression in leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using non-isotopic riboprobes. *Plant J.*, 1992, Vol. 2, p. 821-827

PENG, Z. and MILES, P.W. Oxidases in the gut of an aphid, *Macrosiphum rosae* (L.) and their relation to dietary phenolics. *J. Insect Physiol.*, 1991, Vol. 37, p. 779-787

PEREIRA, J.F. and SPLITTSTOESSER, W.E. Exudate from cassava leaves. *Agric. Ecosystems Environ.*, 1987, Vol. 18, p. 191-194

PESSON, P. *Contribution à l'étude morphologique et fonctionnelle de la tête, de l'appareil buccal et du tube digestif des femelles de Coccides*. Monographie : CNRA / INRA Versailles (Fr), 1944. 266 p.

POLLARD, D.G. Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea) : a review. *Bull. Entomol. Res.*, 1973, Vol. 62, p. 631-714

QUIROS, C.F., STEVENS, M.A., RICK, C.M. and KOK-YOKOMI, M.L. Resistance in tomato to the pink form of the potato aphid (*Macrosiphum euphorbia* Thomas): the role of anatomy, epidermal hairs, and foliage composition. *J. Amer. Soc. hortic. Sci.*, 1977, Vol. 102, p. 166-171

RAHBE, Y., DELOBEL, B., FEBVAY, G., NARDON, C. and NARDON, P. Are aphid bacterial endosymbionts involved in the biosynthesis of aphid peculiar triglycerides ? *Endocytobiology V. Proc. 5th Int. Coll. on endocytobiology and symbiosis, Kyoto*, August 6-10, Kyoto, 1992. In press

RAHBE, Y. and FEBVAY, G. Protein toxicity to aphids: an *in vitro* test on *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.*, 1993, Vol. 67, p. 149-160

RAHBE, Y., FEBVAY, G., DELOBEL, B. and BONNOT, G. Amino acids and proteins as cues in aphid-plant interactions. *Proc. XX Intern. Congress of Entomology. Beijing (CHI), Beijing, August 11-16, 1993*, in press

RAHBE, Y., FEBVAY, G., DELOBEL, B. and BOURNOVILLE, R. *Acyrtosiphon pisum* performance in response to sugar and amino acid composition of artificial diets, and its relation to lucerne varietal resistance. *Entomol. Exp. Appl.* , 1988, Vol. 48, p. 283-292

RIENS, B., LOHAUS, G., HEINEKE, D. and HELDT, H.W. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol.* , 1991, Vol. 97, p. 227-233

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science* , 1974, Vol. 184, p. 430-435

ROHRINGER, R., EBRAHIM-NESBAT, F. and WOLF, G. Protein in intracellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *J. Exp. Bot.* , 1983, Vol. 34, p. 1589-1605

ROSEN, D. (Ed). *Armored scale insects Their biology, natural enemies and control*. Amsterdam Oxford : Elsevier press, 1990, 480 p.

SALAS, M.L. and CORCUERA, L.J. Effect of environment on gramine content in barley leaves and susceptibility to the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry* , 1991, Vol. 30, p. 3237-3240

SCHAEFER, C.W. Physiological conditions which produce wing development in the pea aphid. *J. Agr. Res.* , 1938, Vol. 57, p. 825-841

SCHOTZKO, D.J. and SMITH, C.M. Effects of preconditioning host plants on population development of russian wheat aphids (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* , 1991, Vol. 84, p. 1083-1087

SCHULTHESS, F., BAUMGARTNER, J.U. and HERREN, H.R. Factors influencing the life table statistics of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti*. *Insect Sci. Appl.* , 1987, Vol. 8, p. 851-856.

SCHWEMMLER, W. Endocytobiosis : general principles. *Biosystems* , 1980, Vol. 12, p. 111-122

SEGRETAIN, C. et BORIES, A. *Le cyanure et les glycosides cyanogénétiques du manioc: Dosages et réponses des microorganismes à ces composés*. Toulouse (Fr.) : INRA. 40 p.

SILVESTRE, P. (Ed). *Aspects agronomiques de la production du manioc à la ferme d'état de Mantsoumba (Rép. Pop. Congo)*. Paris : Editions Masson, 1973. 350 p.

SILVESTRE, P. et ARRAUDEAU, M. (Ed). *Le manioc. Techniques agricoles et productions tropicales*. Paris : Editions Masson, 1983. 262 p.

SMITH, B.D. Effect of plant alkaloid sparteine on the distribution of the aphid *Acyrtosiphon spartii* (Koch). *Nature* , 1966, Vol. 212, p. 213-214

SMITH, D.C. and DOUGLAS, A.E. The biology of symbiosis. Edited by A.J. Willis and M.A. Sleight. London: Edward Arnold, 1987. 302 p.

SMITH, K.M. A comparative study of the feeding methods of certain Hemiptera and the resulting effects upon the plant tissues with special reference to the potato plant. *Ann. Appl. Biol.* , 1926, Vol. 13, N° 1, p. 109-139

SPILLER, N.J., KIMMINS, F.M. and LLEWELLYN, M. Fine structure of aphid stylet pathways and its use in host plant resistance studies. *Entomol. Exp. Appl.* , 1985, Vol. 38, p. 293-295

SRIVASTAVA, P.N. Nutritional physiology. *Aphids : Their biology, natural enemies and control*. Edited by A.K. Minks and P. Harrewijn. Amsterdam : Elsevier science publishers, 1989. Vol. A, p. 99-115

SRIVASTAVA, P.N. and ROUATT, J.W. Bacteria from the alimentary canal of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harr.) (Homoptera, Aphididae). *J. Insect Physiol.* , 1963, Vol. 9, p. 435-438

STARKS, K.J. and BERRY, I.L. Evaluation of sorghum and small grain-resistance to greenbugs by population simulations. *Environ. Entomol.* , 1976, Vol. 5, p. 205-209

SUMNER, L.C., DORSCHNER, K.W., RYAN, J.D., EIKENBARY, R.D., JOHNSON, R.C. and Mc NEW, R.W. Reproduction of *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) on resistant and susceptible wheat genotypes during stimulated drought stress induced with polyethylene glycol. *Environ. Entomol.* , 1986, Vol. 15, p. 756-762

TERTULIANO, M., DOSSOU-GBETE, S. and LE RÜ, B. Antixenotic and antibiotic components of resistance to the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* (Hom., Pseudococcidae) in various host plants. *Insect Sci. Appl.* , 1993, In press

TERTULIANO, M. et LE RÜ, B. Interaction entre la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* et ses différentes plantes-hôtes : étude de la teneur de la sève en acides aminés et en sucre. *Entomol. Exp. Appl.* , 1992, Vol. 64, p. 1-9

TJALLINGII, W.F. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* , 1978a, Vol. 24, p. 521-530

TJALLINGII, W.F. Mechanoreceptors of the aphid labium. *Entomol. Exp. Appl.* , 1978b, Vol. 24, p. 531-537

TJALLINGII, W.F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* , 1985a, Vol. 38, p. 177-186

TJALLINGII, W.F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol. Exp. Appl.* , 1985b, Vol. 38, p. 187-193

TJALLINGII, W.F. Stylet penetration activities by aphids : new correlations with electrical graphs. *Insects-plants, 6th Int. Symp. on insect-plant relationships, 07/1986, Pau*. Edited by V. Labeyrie, G. Fabres and D. Lachaise. Dordrecht : Junk publishers, 1987. p. 301-306

TJALLINGII, W.F. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. *Aphid-plant genotype interactions*. Edited by A.K. Campbell and R.D. Einkenbarry. Amsterdam : Elsevier Science publishers, 1990a. p. 89-99

TJALLINGII, W.F. Stylet penetration parameters from aphids in relation to host-plant resistance. *Symp. Biol. Hung*, 1990b, Vol. 39, p. 411-419

TODD, G.W., GETAHUN, A. and CRESS, D.C. Resistance in barley to the greenbug, *Schizaphis graminum*. 1. Toxicity of phenolic and flavonoid compounds and related substances. *Ann. Entomol. Soc. Am.* , 1971, Vol. 64, p. 718-722

TREMBLAY, E. Coccoidea endocytobiosis. *Insect endocytobiosis : morphology, physiology, genetics, evolution*. Edited by W. Schwemmler. Boca Raton Florida : CRC press, 1989. p. 145-173

TURNER, N.C. Technics and experimental approaches for the measurements of plant water stress. *Plant Soil.* , 1981, Vol. 58, p. 339-366

VAN EMDEN, H.F. and BASHFORD, M.A. A comparison of the reproduction of *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* in relation to soluble nitrogen concentration and leaf stage (leaf position) in the Brussel sprout plant. *Entomol. Exp. Appl.* , 1969, Vol. 12, p. 351-364

WARGO, P.W. Amino nitrogen and phenolic constituents of bark of American beech, *Fagus grandifolia*, and infestation by beech scale, *Cryptococcus fagisuga*. *Eur. J. For. Path.* , 1988, Vol. 18, p. 279-290

WERNER, W., REY, H.G. and WIELINGER, R.H. Properties of a new chromogen for determination of glucose according to the GOD-POD method. *Frezenius'z anal. Chem.* , 1970, Vol. 252, p. 224-228

WHITTAKER, R.H. (Ed). The biochemical ecology of higher plants. *Chemical ecology*. Edited by E. Sondheimer and J.B. Simeone. New-York : Academic press, 1970. p. 43-70

WINK, M. (Ed). Physiology of secondary product formation in plant cell cultures. *Secondary compounds from plant tissue culture*. Edited by B. Charlwood. Oxford: Univ. press, 1990. p. 23-40

WINK, M. and WITTE, L. Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta* , 1984, Vol. 161, p. 519-524

WINK, M. and WITTE, L. Storage of quinolizidine alkaloids in *Macrosiphum albifrons* and *Aphis genista* (Homoptera, Aphididae). *Entomol. General.* , 1991, Vol. 15, p. 237-254

YAO, N.R. and GOUE, B. Water use efficiency of cassava crop as affected by soil water balance. *Agr. Forest Meteorol.* , 1992, Vol. 61, p. 187-203

YASEEN, M. and BENNETT, F.D. Investigations on the natural enemies of cassava mealybugs (*Phenacoccus* spp.) in the neotropics Trinidad. *Report for April 1978 - March 1979, Trinidad, Report Common. Inst. Biol. Control*, 1979. 11 p.

YASUDA, S. Microscopic observations on the external morphology of *Pseudaulacaspis pentagona* Targioni and on the portion of mulberry tissues inserted with the stylet. *Jap. J. Appl. Entomol. Zool.* , 1979, Vol. 23, p. 61-68

YEOH, H.-H. Variation in kinetic properties of cassava leaf β -glucosidases. *Biochem. Syst. Ecol.* , 1988, Vol. 16, p. 525-528

ZIEGLER, H. Nature of transported substances. *Encyclopedia of plant physiology*. Edited by A. Pirson and M.H. Zimmermann. Berlin : Springer Verlag, 1975. Vol. 3, p. 59-100

ANNEXES

ANNEXE 1

COMPOSITION DES MILIEUX ARTIFICIELS Ap0 et Ap2
(élaboré au Laboratoire de Biologie Appliquée - INSA LA INRA Villeurbanne)
(G. Febvay *et al.*, 1988)

COMPOSITION DU MILIEU ARTIFICIEL GB
(Milieu de S. Gothilf et S.D. Beck, 1966)

| Dans 100 ml d'eau distillée qsp | Ap0 et Ap2 (mg) | GB (mg) |
|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|
| L-amino acides | | |
| Alanine | 178,70 | 54,00 |
| Béta-alanine | 6,20 | 0,00 |
| Arginine | 244,90 | 142,40 |
| Asparagine H ₂ O | 298,50 | 239,30 |
| Acide aspartique | 88,30 | 201,10 |
| Cysteine | 29,60 | 12,30 |
| Acide glutamique | 149,40 | 203,50 |
| Glutamine | 445,60 | 302,00 |
| Glycine | 166,60 | 21,10 |
| Histidine HCl H ₂ O | 136,00 | 51,60 |
| Isoleucine (allo free) | 164,70 | 41,90 |
| Leucine | 231,60 | 41,40 |
| Lysine HCl | 351,10 | 82,70 |
| Méthionine | 72,40 | 53,20 |
| Ornithine HCl | 9,40 | 0,00 |
| Phénylalanine | 231,90 | 58,50 |
| Proline | 129,30 | 41,00 |
| Sérine | 124,30 | 55,20 |
| Thréonine (allo free) | 127,20 | 103,00 |
| Tryptophane | 42,70 | 40,90 |
| Tyrosine | 38,60 | 39,50 |
| Valine | 190,90 | 102,10 |
| GABA | 0,00 | 145,00 |
| Cystine | 0,00 | 10,50 |
| Saccharose | 20000,00 | 30000,00 |
| Vitamine | | |
| Acide p aminobenzoïque | 10,00 | 0,00 |
| Acide L-ascorbique | 100,00 | 147,80 |
| Biotine | 0,10 | 0,01 |
| D panthothénate de calcium | 5,00 | 1,50 |
| Chlorure de choline | 50,00 | 18,60 |
| Acide folique | 1,00 | 0,60 |
| i-inositol anhydre | 42,00 | 35,80 |
| Acide nicotinique | 10,00 | 7,30 |
| Pyridoxine HCl | 2,5 | 0,30 |
| Riboflavine | 0,50 | 0,30 |
| Thiamine HCl | 2,50 | 0,70 |
| Métaux | | |
| CuSO ₄ 5 H ₂ O | 0,50 | 0,50 |
| FeCl ₃ 6 H ₂ O | 4,50 | 4,50 |
| MnCl ₂ 4 H ₂ O | 0,70 | 0,70 |
| NaCl | 2,50 | 2,50 |
| ZnCl ₂ | 0,80 | 0,80 |
| K ₃ PO ₄ | 0,00 | 530,50 |
| MgCl ₂ | 0,00 | 201,70 |
| Divers | | |
| Acétate de cholestérol | 0,00 | 23,80 |
| Citrate de calcium | 10,00 | 0,00 |
| Benzoate de cholestérol | 2,50 | 0,00 |
| Mg SO ₄ 7 H ₂ O | 242,00 | 0,00 |
| KH ₂ PO ₄ | 250,00 | 0,00 |
| pH ajusté à 7,5 avec KOH | | pH ajusté à 6,9-7,0 avec KOH |

ANNEXE 2

COMPOSITION ET PREPARATION DU MILIEU HYPERSACCHAROSE

| | Poids (grammes) |
|-------------------------------------------------|-----------------|
| L-Amino Acides | |
| DL alanine | 0,74 |
| L arginine | 0,94 |
| Asparagine H ₂ O | 4,00 |
| DL aspartic acid | 2,40 |
| L acide glutamique | 1,10 |
| L glutamine | 41,00 |
| Glycine | 0,18 |
| Hystidine HCl, H ₂ O | 0,54 |
| L leucine (allo free) | 0,62 |
| DL leucine | 0,76 |
| L lysine HCl | 0,60 |
| Méthionine | 0,18 |
| L ornithine HCl | 0,10 |
| DL phénylalanine | 0,74 |
| Proline | 0,76 |
| Dl sérine | 1,66 |
| DL thréonine (allo free) | 1,22 |
| L tryptophane | 0,42 |
| DL tyrosine | 0,28 |
| L valine | 1,04 |
| Saccharose | 200,00 |
| Divers | |
| Tri-sodium citrate | 0,10 |
| Acétate de cholestérol | 0,024 |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O | 1,21 |
| KH ₂ PO ₄ | 2,50 |
| H ₂ O distillée qsq | 1000 ml |
| Métaux traces | |
| Solution d'oligo-éléments de PW | 10 ml |
| Indicateur rédox | |
| Solution résazurine à 0,1 % | 1,00 ml |
| Ajuster le pH à 7,5 avec KOH | |
| Ajouter cystéine | 0,30 |
| Autoclavage | |
| 110°C pendant 30 mn | |
| Répartition du milieu dans des tubes de Hungate | 9,0 ml/tube |
| Avant ensemencement, ajouter : | |
| Solution stérile de vitamines de PW | 0,1 ml/tube |
| Solution Na ₂ S à 2,5 % | 0,2 ml/tube |

Annexe 3

Solutions utilisées :

A : 20 ml d'acide acétique
1000 ml d'eau distillée qsp ;

B : 20 ml d'acide acétique
200 ml d'eau distillée
1000 ml d'acétonitrile qsp.

Gradient réalisé :

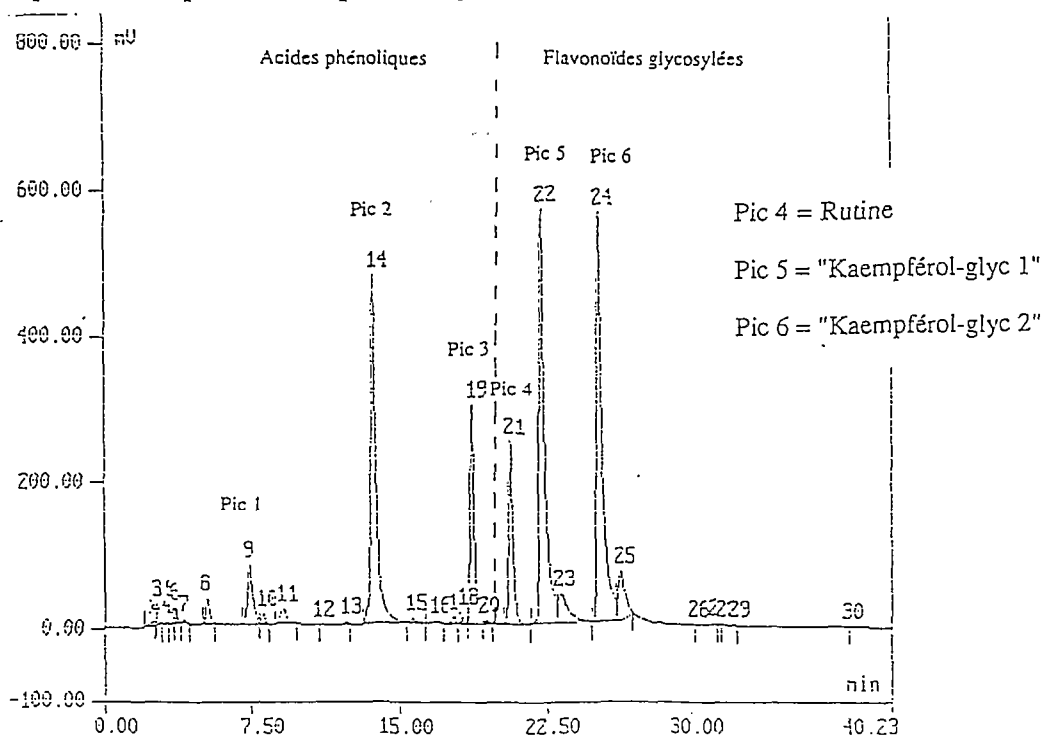
La colonne est équilibrée à 12 % de B dans un mélange A+B, avant injection.

Après injection :

de 0 à 20 minutes : 30 % de B dans un mélange A+B ;
de 21 à 35 minutes : 100 % de B ;
de 36 à 40 minutes : 12 % de B dans un mélange A+B.

Type de chromatogramme obtenu (HPLC avec gradient) :

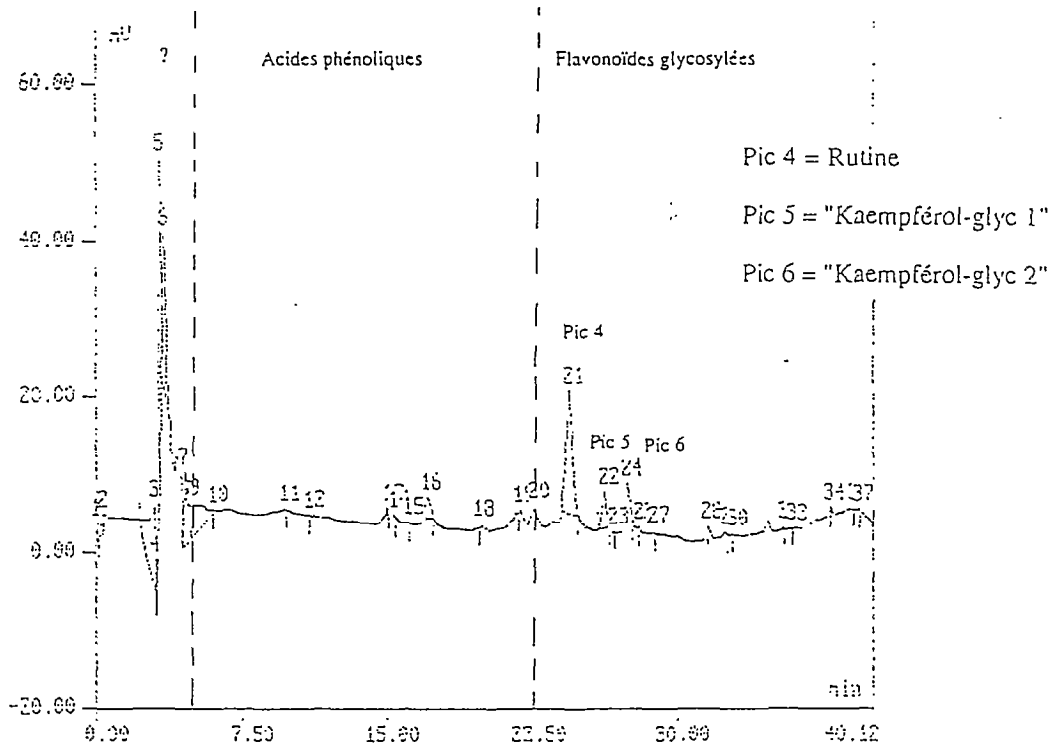
L'extrait analysé correspond à un mélange de sève phloémienne et de liquide intercellulaire, obtenu après centrifugation de feuilles. Dans notre étude, nous avons retenu uniquement les pics ou composés majoritaires mentionnés ci-dessous :



Annexe 4

Type de chromatogramme obtenu (HPLC avec gradient) :

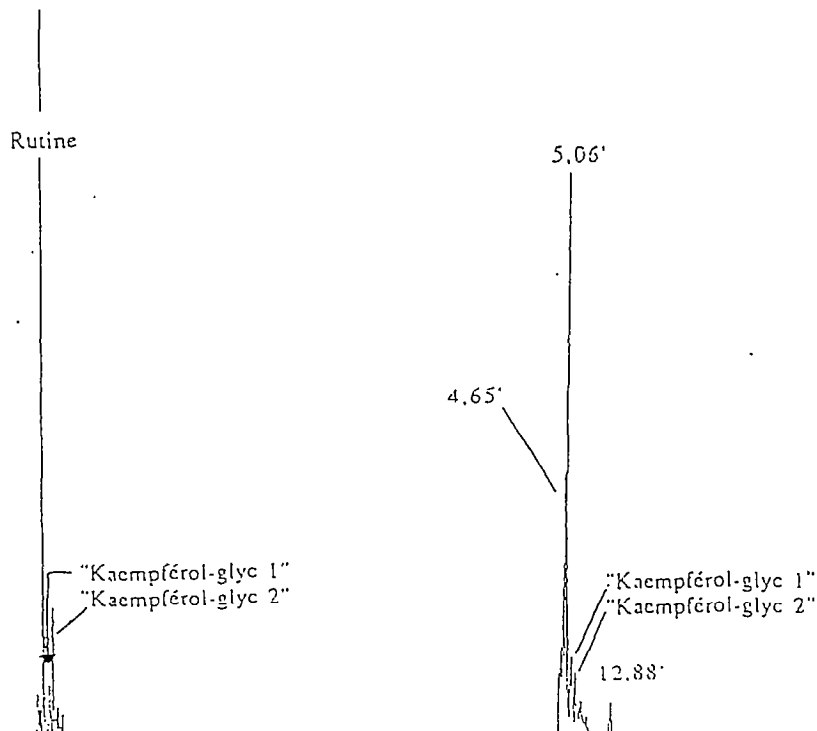
Exsudat (variété M'pembe):



Type de chromatogramme obtenu (HPLC sans gradient) :

Exsudat (variété M'pembe)

Miellat (*P. manihoti*)



FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| NOM : CALATAYUD avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant) Prénoms : Paul-andré | DATE de SOUTENANCE 13 Mai 1993 |
| TITRE : <p align="center">Étude des relations nutritionnelles de la cochenille du manioc avec sa plante hôte.</p> | |
| NATURE : Doctorat Spécialité : Analyse et modélisation des systèmes biologiques | Numéro d'ordre : 93 ISAL 0039 |
| Site B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 / et bis | CLASSE : |
| RÉSUMÉ : <p>Comme d'autres Homoptères, <i>Phenacoccus manihoti</i> est un insecte principalement phloémophage. L'utilisation, pour la première fois sur une cochenille, de l'électrographie de pénétration -EPG- a permis de révéler et de quantifier les interactions pré-phloémiennes entre les stylets de l'insecte et les tissus de la plante. Sur une gamme d'hôtes naturels (<i>Manihot</i>) et de substitution (<i>Talinum</i>, <i>Poinsettia</i>), un comportement de rejet précoce, dû aux délais et obstacles à atteindre le phloème, a été mis en évidence. Une analyse de certaines substances secondaires des liquides foliaires des hôtes a permis de préciser que les composés cyanés et les acides phénoliques du mésophylle seraient plus particulièrement impliqués dans les mécanismes de fixation de <i>P. manihoti</i> sur la plante. Les flavonoïdes ne semblent pas intervenir dans cette phase précoce.</p> <p>Nous avons ensuite précisé le rôle des composés allélochimiques dans la relation d'antibiose du manioc sur la cochenille. Il s'est avéré que les glucosides cyanogéniques, transportés par la sève phloémienne, ont plus probablement un rôle phagostimulant que toxique, alors que la rutine, flavonoïde glycosylé également transloqué, pourrait affecter le développement de <i>P. manihoti</i>.</p> <p>Des expérimentations au champ et au laboratoire ont permis de déceler une réponse défensive du manioc contre l'attaque de la cochenille, se traduisant par une augmentation de la teneur en rutine lors de l'infestation, notamment chez les génotypes les moins favorables à <i>P. manihoti</i>. Cette réponse est variable et dépend notamment du facteur saisonnier : elle s'amoindrit en saison sèche, à la fin de laquelle sont souvent observées sur le terrain les pullulations de la cochenille.</p> | |
| MOTS-CLÉS <i>Phenacoccus manihoti</i> , <i>Manihot esculenta</i> , Electrographie-pénétration, Composé allélochimique, Antibiose, Antixénose, Glycoside cyanogénique, Rutine | |
| Laboratoire (s) de recherches : Laboratoire d'entomologie agricole du centre ORSTOM de Brazzaville (Congo) Laboratoire de biologie appliquée de l'INSA de Lyon (France) | |
| Auteur de thèse: P. NARDON | |
| Membres du jury : Composition du jury : NARDON, G. FABRES, E. THIBOUT, J.M. LEGAY, B. LE RÛ, Y. RAHBE | (Empty space for jury members) |

As do other Homopterous insects, *Phenacoccus manihoti* feeds mainly on phloem sap. The use of electrical penetration graphs (EPG), for the first time on a mealybug, shows that pre-phloem interactions between the insect stylets and the plant tissues are an important step for host-plant acceptance. Precocious plant rejection due to delays in phloem finding may result in global "antixenosis". A chemical analysis of some secondary plant compounds in leaves of host plants and substitute plants revealed that cyanide compounds and phenolic acids, as opposed to flavonoids, were mainly correlated with host recognition by *P. manihoti*.

We tried to specify the action of allelochemical compounds present in the phloem sap. The cyanogenic glucosides (linamarin and lotaustralin in cassava) seem to play a phagostimulatory (vs toxic) function,

while rutin is likely to induce some inhibiting role in the development of the insect.

Field and laboratory experiments showed the occurrence of a putative defensive response of cassava against mealybug, which displayed significant increases in rutin levels with infestation, especially with the less favourable genotypes. This induced response clearly depended mainly on seasonal factor. It decreased in the dry season, at the end of which most population increases could be observed in field conditions.

KEY WORDS

Phenacoccus manihoti, *Manihot esculenta*, EPG, allelochemicals, antibiosis, antixenosis, cyanogenic glucoside, rutin, insect-plant resistance, linamarase, symbiosis, nutrition.