

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADA : 4-amino-N,N-diethylaniline sulfate.
- APX : Ascorbate Péroxydase.
- BI : Brunissement Interne.
- BIOS : Département des systèmes biologiques du Cirad.
- BK : variété de banane Banksii.
- Cemagref : Institut de recherche pour l'ingénierie de l'agriculture et de l'environnement.
- Cirad : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.
- EPIC : Etablissement Public à Caractère Industriel et Commercial.
- ES : Département Environnements et Sociétés du Cirad.
- F<sub>10</sub> : Mis au Froid pendant 10 jours.
- FHLOR : Département de productions fruitières et horticoles du Cirad.
- GIS : Groupement d'Intérêt Scientifique.
- Hydro : Hydroponie.
- HR : Réaction Hypersensible.
- I : Inoculé avec des nématodes.
- IRD : Institut de Recherche pour le Développement.
- LT : Variété de banane Long Tavoy.
- MeJa : Méthyl Jasmonate.
- Nem : Nématodes.

- NI : Non Inoculé avec des nématodes.
- NPF : Non Passé au Froid.
- PAL : Phénylalanine Ammino-Lyase.
- PARM : Pôle Agroalimentaire Régional de la Martinique.
- PRAM : Pôle de Recherche Agro-environnementale de la Martinique.
- Persyst : Département des performances des systèmes de production et de transformation tropicaux du Cirad.
- PGPM : Microorganisme Améliorant la Croissance des Plantes.
- PGPR : Rhizobactéries Améliorant la Croissance des Plantes.
- PF<sub>10</sub> : Passé au Froid pendant 10 jours, puis mis à température ambiante.
- PF<sub>10</sub> BI : Passé au Froid pendant 10 jours, puis mis à température ambiante ; présentant les symptômes de brunissement interne.
- PO : peroxydases (les) regroupant ici POD et APX.
- POD : Peroxydase (la).
- PPOX : PolyPhénol Oxydases.
- PR : Protéines Pathogenesis related.
- RL : Rivière Lézarde ; site d'expérimentation en champ du Cirad et parcelles de collection d'ananas sur la commune du Lamentin, Martinique.
- Stif : Stifénia.
- tBQ : 4-tert-butyl-o-benzoquinone.
- Tv<sub>10</sub> : Témoin vieillissant laissé à température ambiante pendant 10 jours.
- Tv<sub>20</sub> : Témoin vieillissant laissé à température ambiante pendant 20 jours.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma récapitulatif des réactions cellulaires et moléculaires mises en œuvre chez la plante pour se protéger contre les stress biotiques et abiotiques (Nicole *et al.*, 2008).

Figure 2 : Schéma des réactions d'oxydation des composés phénoliques par les polyphénols oxydases et les peroxydases (Pourcel *et al.*, 2006).

Figure 3 : Graphique représentant l'Expression de l'activité catalytique d'enzymes impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif ((a) POD, (b) PPOX, (c) APX) sur 2 variétés de bananiers: une sensible aux nématodes (BK) et l'autre résistante aux *Pratylenchus coffea* (LT).

Figure 4 : Graphique représentant l'Expression de l'activité catalytique des enzymes impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif : POD (a), PPOX (b) et APX (c), sur 3 variétés d'ananas (le Cayenne lisse (CL), le MD2 et le RL 53), étudiée avec six conditions de traitement : sain, méthyl jasmonate (MeJa) à 0.1 mM et 1 Mm), stifénia (stif), nématodes (nem) et hydroponie (hydro).

Figure 5 : graphique représentant l'expression de l'activité catalytique d'enzymes impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif ((a) POD, (b) PPOX, (c) APX) sur une variété d'ananas, le Cayenne lisse, étudiée avec cinq conditions de traitement (T0, TV10, TV20, F10, PF10).

Tableau récapitulatif des différentes conditions de traitement des ananas.

## **RESUME :**

La lutte contre les maladies des plantes est une préoccupation majeure de l'agriculteur. Si l'application de produits phytosanitaires constitue le seul moyen de protéger les cultures, cette stratégie s'avère polluante. Une alternative sérieuse repose sur la « stimulation des défenses naturelles » car les plantes possèdent un système immunitaire capable de réagir contre les bioagresseurs. De nombreux travaux montrent que l'activation des gènes de défense par l'utilisation préventive d'éliciteurs conduit à l'augmentation de la résistance d'un végétal génétiquement sensible aux stress biotiques ou abiotiques. Cette action peut se traduire par la stimulation d'enzymes comme les peroxydases et les polyphénols oxydases. L'importance des systèmes de résistance acquise et induite justifie des études exploratoires sur l'ananas et le bananier. Ce travail préliminaire permettra au laboratoire de cibler ses recherches pour renforcer les effets positifs de ces mécanismes au sein des systèmes agricoles.

## **Mots-clé :**

Eliciteurs / peroxydases / polyphénol oxydases / résistance systémique acquise / résistance systémique induite / stimulation des défenses naturelles / stress abiotique / stress biotique.

## **SUMMARY :**

Fighting against plant diseases is one of the farmers' greatest concern. Although plant care products are used nowadays to protect crops, they are nevertheless polluting agents. Stimulating natural defence responses is an effective alternative since the plants produce their own immune system to fight against pathogens aggressors. Numerous studies have shown that defensive genes are activated with the preventive application of elicitors and the degree of resistance of genetically susceptible plants to biotic and abiotic stresses is therefore increased. This metabolism activity can induce enzymatic stimulation such as peroxidases and polyphenol oxidases. The importance of acquired and induced resistance systems justifies this exploratory work on pineapples and banana plants. This preliminary study will help the laboratory future researches to strengthen the positive effect of these mechanisms in farming.

## **Key-words :**

disease resistance / defence mechanisms / elicitor / polyphenol oxidase / peroxidases / biotic stress / abiotic stress.

# SOMMAIRE

Remerciements .....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des figures.....	iv
<b>I - L'ENTREPRISE</b> .....	1
<b>II - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
<b>III - OBJECTIFS</b> .....	8
<b>IV - MATERIELS ET METHODES</b> .....	10
Matériel biologique.....	10
Extraction protéique.....	11
Purification par la technique de dialyse.....	13
Dosage spectrophotométrique.....	13
Electrophorèse sur Phastgel.....	15
<b>RESULTATS</b> .....	17
Racines de bananiers.....	17
Racines d'ananas.....	19
Fruit Cayenne Lisse.....	21
<b>DISCUSSION / PERSPECTIVES</b> .....	24
Racines de bananiers.....	24
Racines d'ananas.....	25
Fruit Cayenne Lisse.....	26
<b>BLIBLIOGRAPHIE</b> .....	28
<b>ANNEXES</b> .....	33

## I- L'ENTREPRISE

	<p style="text-align: center;"><b>CIRAD</b> station Petit Morne 97232 Le Lamentin Martinique Tel : 0596 42 30 00 Fax : 0596 42 30 01 Sites web : <a href="http://www.cirad.fr">www.cirad.fr</a> <a href="http://www.pram-martinique.org">www.pram-martinique.org</a></p>	
---	--	---

Créé en 1984, le Cirad est un centre de coopération internationale en recherche agronomique spécialisé dans les productions tropicales et méditerranéennes. Il a pour mission de contribuer au développement durable des pays du Sud par des recherches, des réalisations expérimentales, des actions de formation, par l'information scientifique et technique. Ses champs d'application couvrent aussi bien les sciences du vivant que les sciences sociales appliquées à l'agriculture, à la forêt, à l'élevage, à la gestion des ressources naturelles, à l'agroalimentaire, aux écosystèmes et aux sociétés.

Le Cirad est un établissement public à caractère industriel et commercial (Epic). Ce statut lui permet d'effectuer des recherches finalisées répondant aux besoins de ses nombreux partenaires. L'originalité de cette structure permet de traiter de façon transversale et intégrée les questions de recherche et de développement des systèmes agricoles et alimentaires des régions tropicales et subtropicales. Elle vise à favoriser l'émergence de réseaux d'innovations qui deviendront des relais locaux nécessaires à l'essor d'un développement autonome et durable. En effet, la totalité de ses programmes est conçue et réalisée en collaboration avec les pouvoirs publics, les institutions nationales et régionales de recherche et de développement, les groupements de producteurs, les organisations professionnelles agricoles, des organisations non gouvernementales ainsi que des entreprises privées. Les choix scientifiques sont établis à partir de six axes stratégiques prioritaires :

- la contribution à l'invention d'une agriculture écologique intensive pour nourrir la planète ;
- l'étude des conditions émergentes et des modalités de mise en valeur des bioénergies en faveur des populations du Sud ;
- l'innovation pour une alimentation accessible, diversifiée et sûre ;
- l'anticipation et la gestion des risques sanitaires infectieux liés aux animaux sauvages et domestiques ;
- l'accompagnement des politiques publiques pour la réduction des inégalités et de la pauvreté ;
- la compréhension des relations entre l'agriculture, l'environnement et entre les sociétés humaines et la nature, pour gérer durablement les espaces ruraux.

A sa création, sept départements scientifiques regroupaient l'ensemble des unités de recherche : les cultures annuelles (CIRAD-CA), les cultures pérennes (CIRAD-CP), les productions fruitières et horticoles (CIRAD-FLHOR), l'élevage et médecines vétérinaires (CIRAD-EMVT), les forêts (CIRAD-forêt), les territoires, environnement et acteurs (CIRAD-TERA) et l'amélioration des méthodes pour l'innovation scientifique (CIRAD-ADMIS). Pour mieux s'adapter aux mutations économiques, sociales et environnementales, le Cirad a, en 2007, recentré ses thématiques de recherche autour de trois départements : les systèmes biologiques (Bios), des performances des systèmes de production et de transformation tropicaux (Persyst) et les environnements et sociétés (ES).

Le Cirad coopère avec plus de 90 pays dans le monde. Par ailleurs, il est implanté dans plus de 50 pays où les chercheurs travaillent au sein de structures nationales de recherche ou en appui à des opérations de développement. Il dispose également de centres de recherche en France et de pôles scientifiques à vocation régionale dans l'Outre-mer français. Il emploie 1800 agents dont 800 ingénieurs, des chercheurs, des techniciens, des doctorants. Le budget annuel s'élève à 203 millions d'euros dont 63% proviennent de la Subvention Pour Charges de Service Publique (SCSP) attribuée par le ministère de la recherche, 57 millions d'euros perçus à l'occasion de contrats de recherche, d'expertises, de la vente de semences, et 18 millions d'euros émanent d'autres ressources. Ces sommes sont ventilées entre les activités de recherche menées dans les unités à hauteur de 125 millions d'euros, soit 60% du budget, et le soutien à la recherche pour 79 millions d'euros.

A la Martinique, seul le département anciennement appelé CIRAD-FLHOR (productions fruitières et horticoles) est présent. Il compte un effectif de 61 agents dont 13 chercheurs et 17 agents de maîtrise. Cette structure a su renforcer et moderniser ses moyens de recherche avec la création du Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique (PRAM) en 2001. Ce Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) concentre les moyens humains et techniques du Cirad, du Cemagref, et de l'IRD sur 2500 m<sup>2</sup> de laboratoires et de bureaux à Petit Morne au Lamentin (*voir Annexe 1*). Il possède aussi une vingtaine d'hectares de terrain pour des expérimentations. Doté d'équipements scientifiques de haut niveau, cet outil de recherche a pour mission de concevoir une agriculture moderne, diversifiée, durable et reproductible, qui, tout en préservant l'environnement, assure aux exploitants un bon niveau de revenu. Il tente d'offrir des réponses au double défi de la prise en compte de l'environnement et du renouveau de l'agriculture dans un milieu insulaire tropical riche d'une biodiversité remarquable, mais marqué par de fortes contraintes. Spécialisé dans plusieurs domaines agronomiques adaptés à l'agriculture locale tels que la pédologie, la phytopathologie, la nématologie, la biochimie, et la physiologie des fruits post récolte, le PRAM tend à devenir, un véritable moteur pour le rayonnement de l'agriculture raisonnée martiniquaise

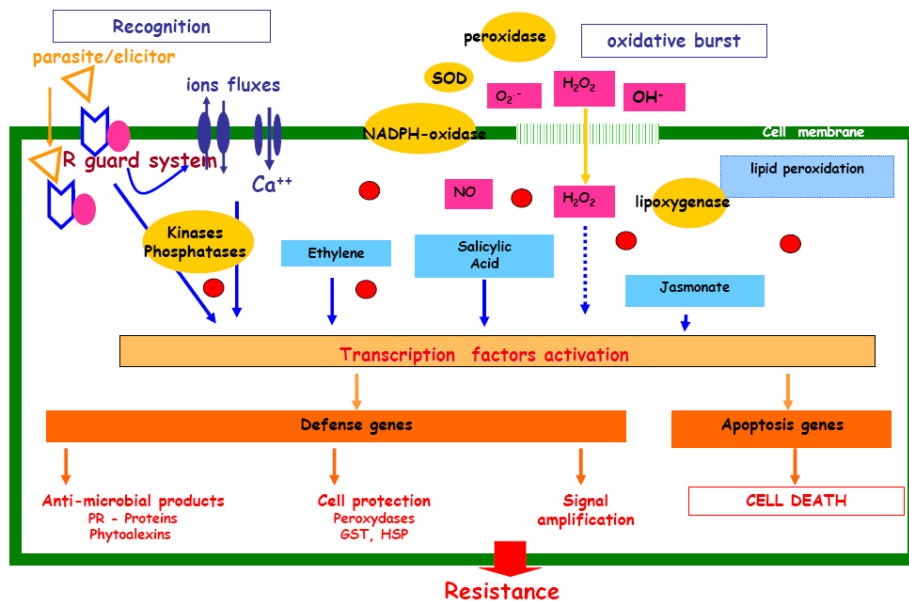
et la coopération dans la caraïbe. Trois grandes thématiques de recherche y sont développées : les innovations variétales, le fonctionnement et la conception d'agrosystèmes innovants, et la gestion intégrée des territoires.

Le laboratoire de biochimie et d'agrophysiologie (*voir Annexe 1*) au sein duquel je collabore, appartient à l'UR26 : Systèmes de culture Bananiers, Plantain et Ananas, qui s'insère dans le département PERSYST. Il cherche à mettre au point des systèmes de culture innovants intégrant l'ananas et la banane en termes de sécurité alimentaire et de respect de l'environnement. Les recherches s'articulent autour de trois axes principaux : comprendre et stimuler les mécanismes naturels de résistance/tolérance de l'ananas et de la banane aux parasites telluriques et aux autres stress environnementaux, contrôler le parasitisme tellurique par des plantes de service et mieux évaluer les risques de pollution par les pesticides, en particulier, par le chlordécone. Sous la responsabilité d'un agronome, l'équipe travaille en étroite collaboration avec les autres laboratoires du PRAM (IRD et Cemagref) et entretient des partenariats avec les professionnels de la filière ananas, les producteurs tels que l'UGPBAN (Union des producteurs de bananes de Guadeloupe et Martinique), le PARM (Pôle Agro-alimentaire Régional de la Martinique), l'UAG (Université des Antilles Guyane) et quelques industriels comme la SNYL (Yoplait).



## II- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La lutte contre les maladies des plantes est une préoccupation majeure de l'agriculteur. Dans le monde, 30 % des récoltes sont détruites au champ ou lors du stockage par des agents phytopathogènes. Actuellement, l'application de produits phytosanitaires constitue le principal moyen des professionnels pour protéger leurs cultures (Daire *et al.*, 2008). Cette stratégie certes efficace, pose des problèmes de pollution. Une alternative sérieuse repose sur la « stimulation des défenses naturelles » (SDN) car elle présente un intérêt phytosanitaire même si elle reste encore peu exploitée en champ. De nombreux travaux sur le tabac, la fraise et la vigne par exemple (Pajot *et al.*, 2007 ; Daire *et al.*, 2008) ont montré que l'activation des gènes de défense par l'application préventive d'éliciteurs conduit à l'augmentation de la résistance d'un végétal génétiquement sensible aux bioagresseurs. En effet, dans son environnement, une plante est soumise à divers stress biotiques ou abiotiques mais elle peut se protéger contre des bioagresseurs potentiels malgré un système immunitaire peu évolué (**Figure 1**). Elle est dotée de plusieurs moyens de défense : le renforcement de sa paroi, la stimulation de certaines enzymes, la production de substances antibiotiques et l'activation de plusieurs voies de signalisation (Stepanova *et al.*, 2008).



**Figure 1 : Schéma récapitulatif des réactions cellulaires et moléculaires mises en œuvre chez la plante pour se protéger contre les stress biotiques et abiotiques (Nicole *et al.*, 2008).**

- Les premières barrières physiques constitutives sont formées par la cuticule et la paroi cellulaire qui s'opposent à la plupart des phytopathogènes. Ces lignes de défense une fois franchies, la plante peut encore se protéger contre les maladies grâce à sa capacité d'émettre des substances chimiques antibiotiques préexistantes chez le végétal. La reconnaissance de l'agresseur par la plante est perçue grâce aux molécules produites ou rejetées. Ces composés appelés éliciteurs portent des messages capables de provoquer des réactions biochimiques et physiologiques contre un large spectre de maladies. Ils ne

présentent pas d'activité antimicrobienne directe mais interviennent dans l'activation des mécanismes latents de défense naturelle des plantes. Ils sont de nature endogène lorsqu'ils sont libérés de la paroi végétale sous l'action d'enzymes hydrolytiques produites par le pathogène, ou par action de stress abiotiques (UV, blessures, froid, abrasions,...) (Truong An, 2008). Lorsqu'ils proviennent de l'environnement, les éliciteurs exogènes stimulent les réponses de défense dans tous les cultivars d'une espèce donnée voire même au niveau d'une famille de plantes ; ceux-ci correspondent à des molécules sécrétées par le microorganisme ou à des composants protéiques, glycoprotéiques ou polysaccharidiques de leur surface (Kaufmann *et al.*, 1999 ; Gianinazzi *et al.*, 1991). Ainsi, tous les éliciteurs permettent d'accroître la résistance des végétaux face aux agresseurs en déclenchant la production de substances antibiotiques telles que des phytoalexines, peroxydases, ou protéines PR (Pathogenesis Related). Ces molécules possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes qui confèrent à la plante les capacités de riposter en cas d'attaque. Dans ce cas, il s'agit de résistance systémique acquise (RAS). Elle s'établit localement après reconnaissance des éliciteurs provenant du microorganisme pathogène (éliciteur exogène) ou de la plante elle-même (éliciteur endogène) puis se propage à l'ensemble de l'organisme. La réaction d'hypersensibilité (HR) est un mécanisme de résistance locale qui fait penser à la réponse inflammatoire chez l'animal. Elle est caractérisée par une nécrose pigmentée, touchant peu de cellules et se développant rapidement au niveau du point de pénétration du pathogène (Nicole, 1998). La résistance systémique se manifeste par une propagation de la réaction à la plante entière par divers signaux moléculaires, en particulier l'acide salicylique (Martinez *et al.*, 2000, 2001), l'acide jasmonique (Martinez *et al.*, 2001) et l'éthylène pour se prémunir contre les attaques extérieures. Passés quelques heures à quelques jours, ce mécanisme de défense se traduit par la synthèse de protéines ou de métabolites secondaires à action biocide ou impliqués dans le renforcement des parois des cellules végétales. Par ailleurs, plusieurs voies de signalisation comme la modification des flux ioniques, la production de formes actives d'oxygène, la production d'oxyde nitrique et la modification des protéines cellulaires par phosphorylation peuvent induire la résistance locale et systémique. Ainsi, la compréhension des mécanismes de défense des plantes face aux microorganismes pathogènes paraît cruciale pour optimiser la réponse des végétaux et améliorer le rendement des plantes cultivées tout en diminuant l'apport d'intrants (engrais ou pesticides).

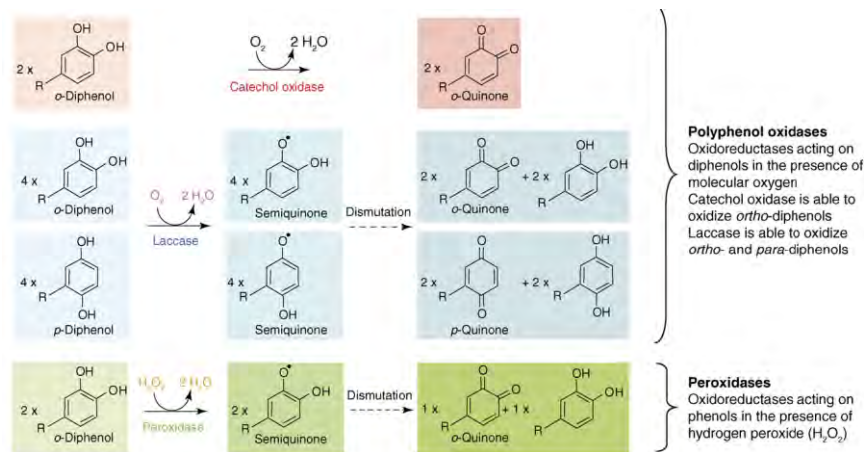
- Quelle que soit l'agression, les végétaux sont capables d'induire des mécanismes de défense. Si les **stress biotiques** causés par des virus, des organismes phytophages et autres pathogènes affectent la croissance et le rendement des plantes, les **stress abiotiques** comme la sécheresse, la salinité, la contamination aux métaux lourds et les basses températures également. Contrairement aux animaux, qui peuvent se déplacer lorsque les conditions de vie ne leur sont plus favorables, les végétaux ont développé des stratégies d'adaptation pour répondre aux changements environnementaux en contrôlant et

ajustant leurs systèmes métaboliques. Ces modifications déclenchent les mêmes mécanismes de défense que lors d'un stress biotique, les réactions moléculaires mises en œuvre étant identiques.

- Un exemple des conséquences liées au stress abiotique est le **brunissement enzymatique**. C'est une expression du « chilling injury » qui regroupe les accidents physiologiques dus à la baisse de température. Dans certains cas, il peut être recherché lorsqu'il permet d'améliorer l'aspect et le goût des produits alimentaires, comme pour le café, la datte ou le sirop d'érable. Dans le cas des fruits et légumes réfrigérés ou déshydratés, le brunissement est indésirable puisqu'il en résulte une dégradation du goût et de l'aspect (Boffmann, 2002). De plus, les fruits immatures, qui sont généralement récoltés pour l'exportation, semblent les plus sensibles. Lorsque le fruit contient une faible teneur en acidité libre et en acide ascorbique et qu'il est soumis au froid (champ et/ou conservation), puis à une augmentation de température, des tâches brunes peuvent se développer (Teisson *et al.*, 1978 ; Teisson et Combres, 1979).

Chez l'ananas (*Ananas comosus*), ce processus est appelé brunissement interne (BI) (Lacoeuille *et al.*, 1984). Il constitue un très grave inconvénient dans le transport et la conservation du fruit car il entraîne une modification de l'apparence, de la flaveur et de la qualité nutritionnelle. Toutes ces conséquences sont préjudiciables à la qualité organoleptique de l'aliment (Teisson, 1979). Ce fruit fragile suit un circuit de commercialisation type Dom-Europe : transport frigorifique par bateau pendant 13 jours à 8°C, transport routier (7 jours entre 17 et 24°C), puis présentation sur l'étal des magasins (environ 5 jours à température ambiante). Néanmoins, certaines variétés suivant ce parcours présentent une fois sur l'étal une coloration brunâtre de la chair associée au brunissement enzymatique (Zhou *et al.*, 2002 ; Stewart *et al.*, 2002). Les tâches sont localisées près du cœur et s'étendent longitudinalement et transversalement (Teisson *et al.*, 1978 ; Teisson et Combres, 1979). Les fruits atteints de BI subissent des phénomènes d'oxydation des composés phénoliques (Teisson, 1979) sans qu'apparaissent de signes extérieurs.

- La réaction de brunissement est connue pour être la manifestation du fonctionnement d'enzymes particulières : les **polyphénols oxydases (PPOX)** et les **peroxydases (POD)** (Pourcel *et al.*, 2006 ; Stewart *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2002) ). En effet, le brunissement enzymatique provoque la production de substances polyphénoliques complexes par l'intermédiaire d'oxydo-réductases qui utilisent de nombreux substrats phénoliques endogènes pour produire des quinones réactives (**Figure 2**). Ces dernières se condensent rapidement pour former les polymères bruns ou noirs visibles à l'intérieur du fruit.



**Figure 2 : Schéma des réactions d'oxydation des composés phénoliques par les polyphénols oxydases (catéchol oxydase et laccase) et les peroxydases (Pourcel *et al.*, 2006).**

Plus particulièrement, les PPOX agissent sur les diphenols en présence d'oxygène moléculaire. Elles appartiennent au groupe des oxydoréductases à deux atomes de cuivre et possèdent des spécificités de substrats différentes. Les laccases catalysent à la fois l'oxydation de *p*-diphénols et de *o*-diphénols ; tandis que les catéchol oxydases sont capables soit d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols qui sont ensuite oxydés en *o*-quinones (activité crésolasique), soit d'oxyder les *o*-diphénols en *o*-quinones par leur activité catécholase. L'activité catécholase possède le rôle prédominant dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes, la plupart des substrats étant les *o*-diphénols. En ce qui concerne les peroxydases, elles agissent sur les polyphénols en présence de peroxyde d'hydrogène (Kay *et al.*, 1967). Étudiées chez quelques plantes comme la vanille, le palmier dattier, les céréales, les cucurbitacées et les Cactées, ces enzymes se sont révélées présentes à des taux élevés (Marquez *et al.*, 2007 ; Baaziz, 2006). Par conséquent, les impacts des contraintes environnementales restent liés au contenu des différents cultivars en peroxydases et polyphénols oxydases. Le fait de soumettre certaines denrées sensibles au froid à divers stress modérés par l'application d'éliciteurs, amène les végétaux à développer une résistance aux dommages par le froid (Meir *et al.*, 1996).

Ainsi un double intérêt se dégage : mieux comprendre la nature des mécanismes de défense mis en œuvre par l'ananas ou le bananier pour évaluer leur efficacité et pouvoir les stimuler par des pratiques culturales adaptées. Aussi, cela pourrait amener à améliorer les qualités organoleptiques des fruits destinés à l'exportation. Il s'avère donc nécessaire pour le laboratoire de se pencher sur la caractérisation biochimique des enzymes liées à ces réactions de défense en réponse aux stress biotique et abiotique.

### III- OBJECTIFS

Parmi les axes de recherche du laboratoire de biochimie et d'agrophysiologie, ma contribution s'inscrit principalement dans le projet sur les innovations variétales.

L'objectif de mon travail est double :

1) caractériser l'expression des activités enzymatiques PPOX, POD et APX au sein de variétés d'ananas présentant différentes sensibilités au brunissement interne (BI).

Dans le cadre d'un programme de sélection variétale du Cirad, le laboratoire a réalisé une expérimentation sur l'induction du brunissement interne (BI) par le froid. Ce traitement est appliqué à quatre variétés d'ananas : le Cayenne lisse, variété la plus répandue et sensible au BI ; le MD<sub>2</sub>, appelé encore Hawaiian Gold, ou Honey Gold, un hybride résistant au BI développé par Del Monte ; deux hybrides de la collection du Cirad à Rivière-Lézarde (Lamentin, Martinique) (*voir Annexe 1*) issus du croisement entre le Cayenne lisse et le Perolera : le RL41 et le RL53. Il s'agit de caractériser, par des analyses biochimiques, les enzymes induisant le brunissement interne telles que les Polyphénols Oxydases (PPOX), la Peroxydase (POD) et l'Ascorbate Peroxydase (APX), selon les variétés dites « sensibles » ou « résistantes » au stress thermique. En effet, ces réactions de brunissement enzymatique sont fréquemment observées une fois sur l'étal, après le circuit de commercialisation lié à l'export (13 jours de transport frigorifique par bateau à 8°C, puis 7 jours de transport routier à 24°C et 5 jours à température ambiante sur l'étal). Elles peuvent aussi être observées au champ dans les zones intertropicales lorsque les températures s'avèrent relativement basses (8-10°C).

Dans ce contexte, un travail de thèse sur le BI a été initié au laboratoire. Il a permis d'étudier l'expression des enzymes PPOX, POD et APX pour les fruits passés à froid pendant 10 jours (F<sub>10</sub>) et les fruits passés à froid pendant 10 jours puis remis à température ambiante (PF<sub>10</sub>). Il reste à analyser les témoins non passés au froid mais vieillis pendant 10 et 20 jours (Tv<sub>10</sub>, Tv<sub>20</sub>) et confirmer que l'induction du BI par des isoenzymes spécifiques est bien la résultante de la conservation au froid puis à température ambiante.

2) Stimuler et analyser les processus de défense naturelle de l'ananas et du bananier contre les bioagresseurs.

Pour mieux comprendre les mécanismes généraux d'induction de ces enzymes lors d'une agression, le champ de l'expérimentation a été élargi à l'étude d'un stress biotique avec inoculation de nématodes sur des plants d'ananas. Les analyses sont réalisées pour les enzymes PPOX et POD sur les feuilles et les racines de trois variétés différentes (Cayenne lisse, MD<sub>2</sub>, et RL53). Par ailleurs, l'effet de deux éliciteurs (stifénia et méthyl jasmonate) a été observé. Dans le cas des bananiers, l'impact de

l'inoculation d'un nématode (*Pratylenchus coffeae*) a été comparé sur 2 variétés dont une résistante (Long Tavoy (LT) et l'autre sensible Banksii (BK)).

Deux espèces de bananiers sont aussi incluses dans cette étude (Long Tavoy (LT) et Banksii (BK)). Par ailleurs, l'effet de deux éliciteurs (stifénia et méthyl jasmonate) est observé dans le cadre de l'expérimentation sur l'ananas.

Ce travail préliminaire a pour but d'identifier des modifications physiologiques liées aux processus de protection de la plante lorsqu'elle est soumise à un stress. Une réponse enzymatique clairement identifiée, avec l'induction d'isoenzymes spécifiques, pourrait être considérée comme un marqueur de la réponse au stress chez la plante. La finalité est de pouvoir tester puis de sélectionner les variétés résistantes aux nématodes et de les utiliser pour étudier les mécanismes de défense mis en jeu.

## IV- MATERIELS & METHODES

### *Matériel biologique*

#### a) Influence du stress thermique sur la sensibilité des fruits. (Annexe 4)



Hybride MD<sub>2</sub>



Hybride  
flhoran 53



Hybride  
flhoran 41



Cayenne lisse

Q

quatre  
variété  
s  
d'ananas  
issues

des parcelles d'expérimentation du Cirad à la Martinique sont étudiées : le Cayenne lisse, variété la plus répandue et sensible au BI ; le MD<sub>2</sub>, appelé encore Hawaiian Gold, ou Honey Gold, un hybride résistant au BI développé par Del Monte ; deux hybrides de la collection du Cirad à Rivière-Lézarde (Lamentin, Martinique) (*voir Annexe 1*) issus du croisement entre le Cayenne lisse et le Perolera : le RL41 et le RL53. Cinq conditions de traitement ont été établies pour le protocole expérimental, à raison de cinq fruits par variété et par traitement (**Tableau**). Les groupes sont constitués de manière homogène (taille, maturité). A chaque fois, les échantillons sont prélevés, préparés et conservés selon le même principe : deux lamelles de chair diamétralement opposées sont prélevées ; elles sont soit utilisées directement pour l'extraction, soit conservées à -20°C dans des sachets sous vide pour éviter la dégradation des enzymes.

	Froid (8°C)	T°C ambiante (24°C)
NPF	-	-
Tv <sub>10</sub>	-	10 j
Tv <sub>20</sub>	-	20 j
F <sub>10</sub>	10 j	-
PF <sub>10</sub>	10 j	10 j

**Tableau récapitulatif des différentes conditions de traitement des ananas.**

Les fruits non passés au froid (**NPF**) correspondent au **T<sub>0</sub>** de l'étude car utilisés immédiatement après la récolte, ils montrent l'état physiologique initial ; les fruits vieilliss (**Tv<sub>10</sub>**, **Tv<sub>20</sub>**) permettent de suivre l'évolution de l'expression des enzymes étudiées à température ambiante ; les fruits conservés au froid pendant 10 jours (**F<sub>10</sub>**) permettent d'étudier l'expression précoce des enzymes ; les fruits passés au froid puis à température ambiante pendant 10 jours (**PF<sub>10</sub>**) permettent d'analyser l'expression des mêmes enzymes en fin du processus de conservation, là où apparaissent les symptômes de BI.

## **b) Influence du stress biotique (nématodes) ou d'éliciteurs sur des variétés de sensibilités**

**différentes.** (Annexe 4)

- Sur ananas

Trois variétés d'ananas, la MD<sub>2</sub>, la Cayenne Lisse et la RL53, sont traitées suivant cinq conditions différentes, à raison de dix échantillons par variété et par traitement. Pour chacune des variétés, les plants sont cultivés :

- soit en terre stérilisée par autoclavage à 121°C pendant une heure;
- soit en milieu hydroponique enrichi avec une solution nutritive changée chaque semaine (1 g/L de mairol) ;
- soit en terre stérile mais traités au bout d'un mois avec deux éliciteurs endogènes différents une fois par semaine pendant quatre semaines : le méthyl jasmonate à 0,1 et 1 mM ou le stifénia<sup>1</sup> à 20 g/L.
- soit en milieu infesté avec des nématodes (*Criconemella Onoensis*, *Rotylenchulus reniformis*) ;

L'étude biochimique de la feuille D (feuille représentative de l'état physiologique de la plante) et des racines des plants d'ananas est prévue deux mois après le lancement de l'expérimentation. Cette durée correspond au développement du premier « flush racinaire » c'est-à-dire au terme de la première poussée de croissance racinaire.

- Sur bananiers

Deux variétés de bananiers diploïdes (AA) appartenant au genre *Musa acuminata* ont été sélectionnées. Il s'agit de la sous-espèce *Banksii* (BK) et de la variété *Long Tavoy* (LT), issues de culture in vitro. Les plants sont repiqués soit en milieu stérile (terre autoclavée à 121°C pendant 1h) pour les témoins (notés NI), soit en milieu stérile mais inoculé avec 400 individus de *Pratylenchus coffeae* (notée I). Pour chaque condition, quatre plants de chacune des espèces de bananiers sont laissés en terre durant 45 jours. Les échantillons sont ensuite préparés directement pour l'extraction ou bien conservés à -20°C dans des sachets sous vide.

### **Extraction protéique<sup>2</sup>**

#### **a) sur la pulpe d'ananas (thèse BI)**

Pour obtenir l'extrait enzymatique à partir de la chair d'ananas, 100 g de fruit frais ou décongelé sont broyés dans un blender (Waring Blendor) avec une solution d'extraction contenant 50 ml de tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (VWR, France) / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Allemagne)) ; à 0,2 M, pH 6,8, 4°C), 1 g de PVPP (PolyvinylPolypyrrolidone, 2%) (Merck, Allemagne), 0,750 g de NaCl à 1,5% (VWR, France) et 0,088 g d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich, Allemagne), jusqu'à obtenir un liquide homogène. Le NaCl

---

<sup>1</sup> Le stifénia est un produit non toxique extrait de la graine de fenugrec, légumineuse cultivée en Afrique (Essais officiels sur la vigne du Ministère de l'Agriculture pour l'obtention de l'homologation).

<sup>2</sup> Les différentes solutions sont préparées selon les indications du livre Data for Biochemical research, de Dawson *et al*, 1986.



permet d'augmenter la force ionique tandis que le PVPP et l'acide ascorbique sont utilisés comme agents protecteurs. Après une première filtration sur étamine, 20 ml du même tampon phosphate (à 0,2 M, pH 6,8) sont rajoutés pour réaliser une deuxième filtration du même type. Les deux filtrats sont alors mélangés pour être centrifugés à 4°C pendant 25 minutes à 20 000 g. Cette étape permet d'éliminer les résidus solides et d'obtenir un surnageant clair qui est ensuite saturé avec du sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck, Allemagne). La précipitation des protéines se fait en deux temps : d'abord à 30% puis à 90% de saturation en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mais toujours à 4°C. A chaque fois, les protéines flocculent pendant une nuit, ce sel montrant peu d'effet dénaturant.

#### **b) sur les feuilles : ananas et bananier** (thèse BI et mises au point)

Le protocole sur la pulpe d'ananas a été réajusté pour réaliser l'extraction protéique sur les feuilles d'ananas et de bananier.

Pour obtenir l'extrait enzymatique à partir des feuilles, 1 g de tissu lyophilisé est broyé dans un blender (Waring Blendor) avec une solution d'extraction contenant 2 ml de tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M, pH 6,8, 4°C), 0,32 g de PVPP (PolyvinylPolypyrrolidone), 0,24 g de NaCl et 0,028 g d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich, Allemagne). Le broyat est filtré et lavé avec 2 ml de tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M, pH 6,8, 4°C). Le filtrat est ensuite centrifugé à 20 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est alors récupéré pour être saturé à 30% puis 90% de sulfate d'ammonium. Une nuit à 4°C et une centrifugation à 20 000 g de 15 minutes à 4°C séparent les deux étapes de saturation.

#### **c) sur les racines : ananas et bananier** (mise au point)

Le protocole d'extraction enzymatique à partir de racines de bananier et d'ananas a été élaboré après recherche bibliographique (Wuyts *et al.*, 2006, Neves *et al.*, 2007, Damodaran *et al.*, 2009). Les protocoles d'extraction détaillés précédemment ont été utiles pour la mise au point de celui-ci.

Après récolte, les racines sont congelées à -20°C. Cette étape favorise l'éclatement des cellules et permet une meilleure lyophilisation. La dessiccation des échantillons par sublimation est réalisée à l'aide de l'appareil Alpha 1-4 LD Plus (Bioblock Scientific, France) pendant 24 heures, à -76°C. La pression descend à partir de 1 bar jusqu'à 0,001 mbar. Les échantillons (2,5g) sont ensuite broyés à l'aide d'un Ultra-turrax (modèle T25 Basic, IKA-WERKE, Allemagne) pour homogénéiser l'échantillon dans la solution d'extraction contenant 20 ml de tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M, pH 6,8, 4°C), 5% de PVPP (PolyvinylPolypyrrolidone) et 0.20% de Tween 20 (Merck, Allemagne). Le broyat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 minutes à 20 000 g. Le surnageant est récupéré pour être filtré sous vide avec du papier Whatman grade n°1 (φ 47 mm, Whatman, Angleterre). Une centrifugation de 20 000 g à 4°C pendant 20 minutes permet de clarifier le filtrat. L'extrait enzymatique est obtenu ainsi à la fois

pour les racines de bananiers et d'ananas. Les tests de dosage d'activité enzymatique montrent que l'étape de purification n'est pas nécessaire pour les échantillons issus de ce type de matériel.

### **Purification par la technique de dialyse**

Après une nuit à 4°C, les échantillons issus des extractions de fruits sont centrifugés à 20 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots récupérés sont remis en suspension avec du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M, pH 6,8) et mis à dialyser avec 10 ml de ce même tampon dans une cellule d'agitation Amicon (« stirred ultrafiltration cells », Amicon 8050, Bioblock Scientific, France). En plus de l'agitation exercée grâce à un râteau, une pression d'azote est appliquée à travers une membrane semi-perméable (membrane Biomax en polyethersulfone, 30 kDa, Millipore Corporation, USA). Cette opération permet à la fois de concentrer les solutions en macromolécules et d'éliminer la plupart des contaminants de petites masses molaires. La limite d'exclusion de la membrane est de 30 kDa. Pour obtenir un bon rendement de protéines, les échantillons sont concentrés par deux fois (*voir Annexe 2*).

### **Dosage spectrophotométrique** (*voir Annexe 2*)

#### **a) Dosage des protéines**

Le dosage protéique est réalisé par la méthode colorimétrique de Bradford (Dawson *et al.*, 1986) et le mode d'emploi donné par le fournisseur (Technical Bulletin, Sigma-Aldrich, Allemagne). Dans une micro-cuve (Plastibrand, Allemagne), 100  $\mu\text{L}$  d'extrait enzymatique dilué au  $1/10^e$  sont mélangés à 1 ml de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, Allemagne). Après 5 minutes d'attente, la mesure est réalisée à 595 nm avec un spectrophotomètre UV-visible (Cary 50 Bio, Varian, Australie) couplé à un ordinateur. La quantité de protéines retrouvée dans l'extrait est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage établie avec la sérum albumine ovine (OSA, Sigma-Aldrich, Allemagne). Compte tenu de la concentration en protéines attendue dans les extraits enzymatiques (Soler *et al.*, 1991), la gamme étalon est établie pour des concentrations comprises entre 0 et 1,4 mg/ml. Il convient au préalable de faire le zéro avec un blanc contenant le ml de réactif de Bradford et les 100  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction (tampon phosphate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 M, pH 6,8).

#### **b) Dosage de l'activité des PPOX**

Le protocole de mesure de l'activité des PPOX a été mis au point à partir de la méthode de Mayer *et al.*, 1965 et Avallone *et al.*, 2003. Il consiste en l'étude de la cinétique de cette enzyme pendant 4 minutes à 420 nm. Dans une cuve PMMA (Plastibrand, Allemagne), 200  $\mu\text{L}$  d'extrait pur sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant de 2,5 ml de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 M, pH 6,8)

et 300 µl de pyrocathécol à 50 mM (Sigma-Aldrich, Allemagne). Pour le blanc, la composition du mélange se résume à 2,8 ml de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 M, pH 6,8) et 200 µl d'échantillon pur. Le suivi de la cinétique enzymatique est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible double faisceau (Cary 100 Scan, Varian, Australie). Le blanc évoluant au cours du temps, ce spectrophotomètre permet la lecture des deux cuves simultanément afin de recalibrer la mesure en fonction de la valeur du blanc. L'activité est donnée en  $A_{420} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### **c) Dosage de l'activité des POD**

Le protocole de mesure de l'activité des POD a été inspiré de la méthode mise en place par Hammerschmidt *et al.*, 1982. Il consiste en l'étude de la cinétique de cette enzyme pendant 4 minutes à 470 nm. Dans une cuve PMMA, 200 µL d'échantillon dilué au 1/10<sup>e</sup> sont ajoutés à un mélange réactionnel composé de 2,3 ml de tampon citrate (acide citrique (Sigma-Aldrich, Allemagne) /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ((VWR, France) 0,2 M, pH 5) contenant du gaïacol à 69 mM (Sigma-Aldrich, Allemagne) et 500 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 10 mM (VWR, France). Pour le blanc, les 200 µl d'extrait sont remplacés par 200 µl d'eau. Le suivi de la cinétique enzymatique est réalisé à l'aide du spectrophotomètre à double faisceau.

### **d) Dosage de l'activité de APX**

L'activité de APX est déterminée à partir de la méthode modifiée de Schoener *et al.*, 1990. Il s'agit ici de suivre une réaction de consommation de substrat. Alors que le blanc contient 2,45 ml de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 M, pH 7), 145 µl d'acide ascorbique à 0,5 mM, 300 µL d'eau et 200 µL d'extrait enzymatique, le mélange réactionnel se compose de 2,45 ml de tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 M, pH 7), 145 µl d'acide ascorbique à 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Allemagne) et de 300 µL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,5 mM. La réaction est initiée par l'ajout de 200 µL d'extrait enzymatique pur et la réduction de l'ascorbate est mesurée à 290 nm pendant 4 minutes avec un spectrophotomètre à double faisceau. L'activité, donnée en  $A_{290} \cdot \text{min}^{-1}$ , prendra alors des valeurs négatives.

**Remarque :** Les protocoles de dosages détaillés ci-dessus concernent les analyses sur les fruits d'ananas établis après le travail de thèse sur le BI. Pour les autres matériels végétaux, les quantités ont été ajustées et les procédés modulés lors du stage car les concentrations des enzymes étudiées sont plus fortes.

## **Electrophorèse sur Phastgel (voir Annexe 2)**

### **a) Migration sur gel** (thèse BI)

Après une décongélation douce, les échantillons sont centrifugés pour être éclaircis. Les extraits enzymatiques sont ensuite dilués dans un colorant bleu (PhastGel™ Blue R, GE Healthcare, Suisse) en fonction de leur concentration protéique. La coloration permet de mettre en évidence le front de migration ; le dosage de Bradford fait au préalable permet d'uniformiser les concentrations. 40 µL

d'échantillon sont déposés sous forme d'une goutte sur chaque puits de la plaque. Ils sont ensuite récupérés à l'aide d'un peigne 8/1 approprié, appliqué dans la première position du bras de l'appareil PhastSystem (Pharmacia LKB Biotechnology, Suisse). La migration peut alors être lancée pendant 45 minutes environ sur un gel de polyacrylamide à taille de mailles variables (PhastGel™ gradient 8-25, GE Healthcare, Suisse), condition non dénaturante. La méthode de séparation est appliquée suivant les conseils que donne le fournisseur sur la fiche technique de séparation n°120 : 1500v 50 mA 7.0 W 15°C 12 vh (voir Annexe 3).

#### **b) Révélation des isoenzymes des PPOX** (thèse BI et mises au point)

Le gel est d'abord trempé quelques minutes dans une solution de préfixation composée de 200 % d'éthanol (VWR, France) et 10 % d'acide acétique (VWR, France) ajustée avec de l'eau distillée. Puis il est immergé pendant environ deux heures dans une solution de coloration légèrement chauffée contenant 33,5 ml d'un mélange de tampon Trizma maléate (0,025 M, pH 6,4, Sigma-Aldrich, Allemagne) et de chlorure de cuivre (2 mM, Merck, Allemagne) ajouté à 4 ml de pyrocatechol à 40 mM et 2,5 ml d'eau distillée.

En outre, l'article rédigé par Rescigno *et al.*, en 1997 propose une méthode de révélation sensible, plus rapide et plus spécifique que celle utilisée au laboratoire. En effet, la coloration avec le pyrocatechol révèle à la fois les polyphénols oxydases et les peroxydases. La technique présentée par les auteurs est basée sur une réaction de couplage entre le 4-tert-butyl-o-benzoquinone (tBQ) et le 4-amino-N,N-diethylaniline sulfate (ADA, Sigma-Aldrich, Allemagne) qui colore les bandes correspondant aux PPOX en bleu. Le gel est incubé dans 20 ml de tampon phosphate-potassium à 0,1 mM, pH7. L'ajout de 10 ml d'une solution à 25 mM de tBC (Sigma-Aldrich, Allemagne) diluée dans de l'acide acétique à 10 mM fait apparaître le cathécol correspondant (tBQ) en jaune. Ensuite, 5 ml d'une solution à 25 mM de ADA diluée dans de l'HCl (10 mM) permettent de visualiser les bandes protéiques en bleu.

#### **c) Révélation des isoenzymes des POD** (thèse BI et mises au point)

Le gel est lavé dans la même solution de préfixation avant d'être plongé pendant 30 minutes environ dans une solution de coloration légèrement chauffée. Le mélange est composé de 15 ml de tampon citrate (acide citrique / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 M, pH 5), 4 ml de gaïacol à 1,8 M et 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,1 M. La coloration étant éphémère, le gel est rincé dans la solution de préfixation pour prolonger la durée de révélation des bandes. Les photos sont prises immédiatement après.

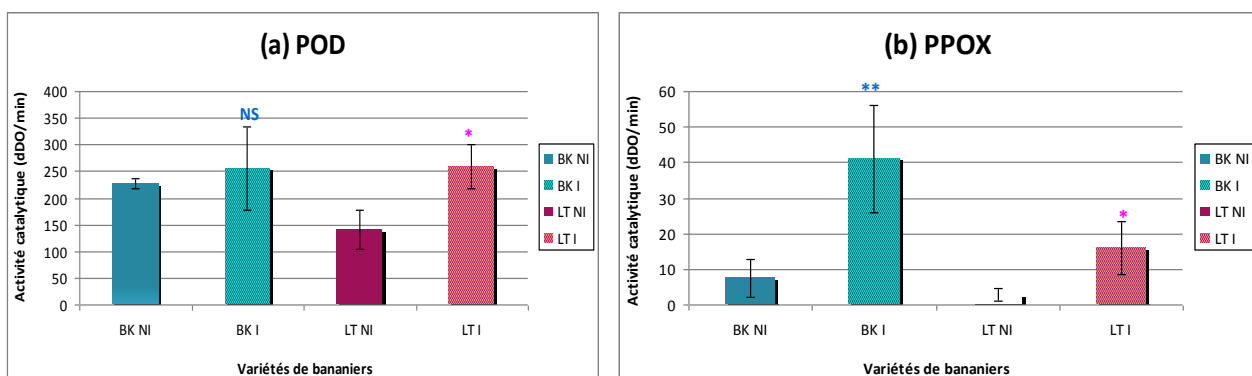
## V- RESULTATS

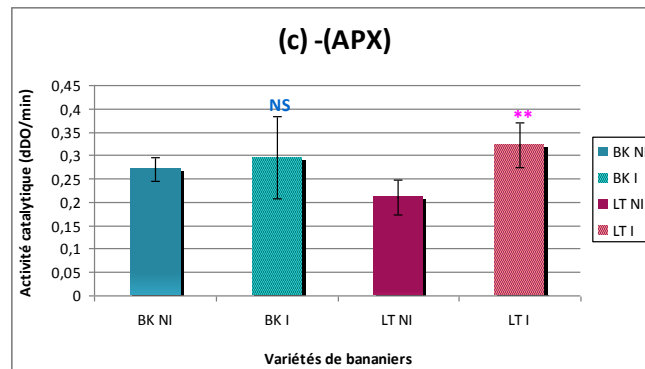
Des contretemps climatiques et techniques ont gêné l'analyse, dans le temps imparti, de toutes les expérimentations annoncées. Néanmoins, tous les protocoles détaillés précédemment ont été testés sur le matériel végétal à manipuler.

Pour chacun des types de matériel végétal, trois enzymes intervenant dans le mécanisme de stress oxydatif : POD, PPOX, APX, ont été quantifiées suivant les protocoles mis au point. Pour des raisons d'incompatibilité entre la méthode d'extraction et celles des dosages protéiques disponibles au laboratoire (méthode de Bradford, méthode d'estimation des protéines de Warburg et Christian (Thorne *et al.*, 1978)), l'activité sera présentée en dDO.min<sup>-1</sup>. L'utilisation de détergent dans le procédé d'extraction et la présence des composés phénoliques interfèrent avec le dosage protéique, ce qui gêne l'exploitation des résultats. Par conséquent, l'activité catalytique de chacune des trois enzymes sera analysée en fonction des traitements et des variétés utilisées grâce à la comparaison des moyennes aidée de l'intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95</sub>). En effet, pour obtenir une analyse de variance cohérente (ANOVA à deux variables) et des tests statistiques pertinents (test de Bonferroni, de Newman-Keuls) il aurait fallu travailler sur un échantillonnage plus conséquent.

### *Racines de bananiers*

Pour chacune des conditions : Banksii non inoculé (BK NI) et inoculé (BK I), Long Tavoy non inoculé (LT NI) et inoculé (LT I), quatre plants ont été analysés (**Figure 3**).





**Figure 3 : Expression de l'activité catalytique d'enzymes impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif ((a) POD, (b) PPOX, (c) APX) sur 2 variétés de bananiers : une sensible aux nématodes (BK) et l'autre résistante aux *Pratylenchus coffea* (LT).**

*NI : Non Inoculé avec les nématodes (témoin) ; I : Inoculé avec les nématodes.*

*S : Significatif par rapport au témoin (NI), représenté par une ou plusieurs étoiles (\*) ; NS : Non Significatif.*

#### **a) POD (Figure 3a) :**

L'espèce sensible aux nématodes (BK) montre une activité catalytique plus élevée que la variété résistante (LT). Si l'on compare BK NI (moyenne =  $226.96 \pm 9.86$ ) et LT NI (moyenne =  $140.47 \pm 37.36$ ), le niveau d'expression est significativement différent à 95%. Par contre, BK I et LT I présentent visiblement le même taux d'activité.

Avec le stress provoqué par la présence de nématodes, l'induction de la POD semble augmenter chez les deux espèces. Dans le cas de la variété résistante, il existe une différence significative d'expression entre NI et I. Le taux d'activité de LT NI (moyenne =  $140.47 \pm 37.36$ ) est inférieur à celui de LT I (moyenne =  $259.19 \pm 41.85$ ).

#### **b) PPOX (Figure 3b) :**

Pour cette enzyme, les écarts sont globalement plus accentués. Même si la figure ne le montre pas de différence claire entre BK NI et LT NI, en revanche, BK I (moyenne =  $41.02 \pm 14.98$ ) comparé à LT I (moyenne =  $15.89 \pm 7.38$ ) présente une différence significative : l'activité est supérieure pour BK I.

D'autre part, l'induction du niveau d'expression de la PPOX avec le stress aux nématodes est beaucoup plus importante chez BK (moyenne =  $41.02 \pm 14.98$ ) que chez LT (moyenne =  $15.89 \pm 7.38$ ) : l'activité est deux fois plus forte pour BK par rapport à LT. Cette observation est également retrouvée intra-variétés. Le stress entraîne une augmentation trois fois plus forte chez les sensibles : entre BK NI :  $7.42 \pm 5.26$  et BK I :  $41.02 \pm 14.98$ , mais une fois plus chez les résistants : entre LT NI :  $2.79 \pm 1.74$  et LT I :  $15.89 \pm 7.38$ .

### c) APX (Figure 3c) :

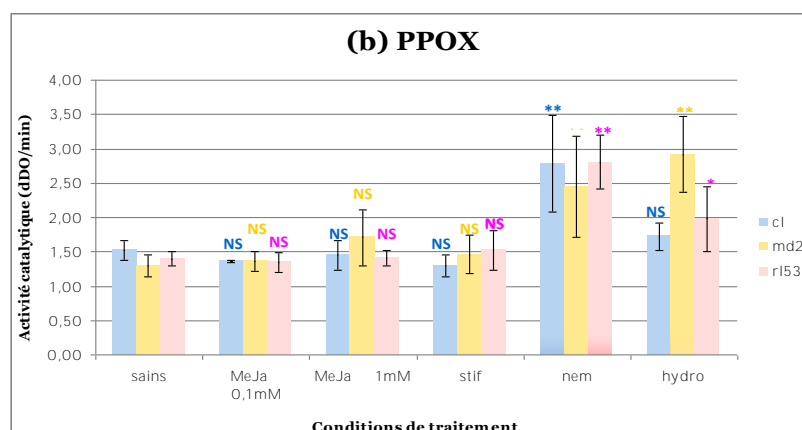
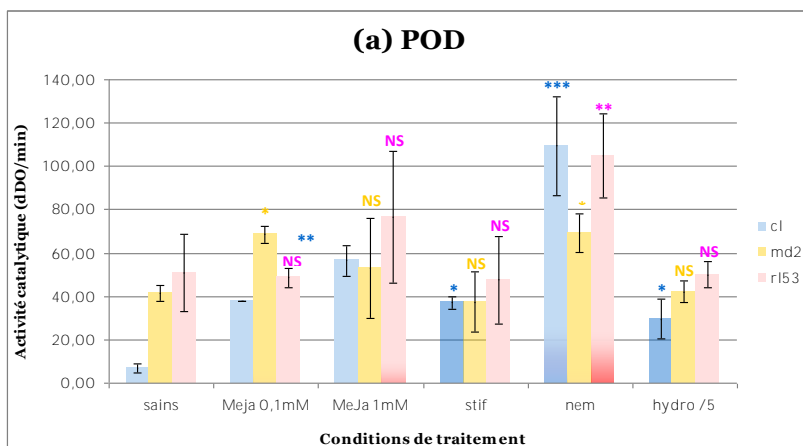
Même si l'effet est plus atténué par rapport aux autres enzymes, l'espèce BK paraît produire plus d'APX que la LT. Le niveau d'expression de BK NI (moyenne =  $0.27 \pm 0.02$ ) est significativement plus élevé que celui de LT NI (moyenne =  $0.21 \pm 0.09$ ).

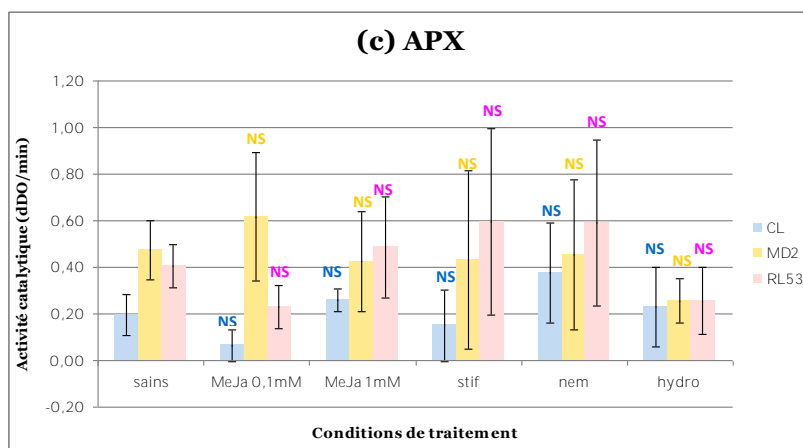
De plus, comme pour la POD, l'augmentation du taux d'activité d'APX liée au stress biotique est plus importante pour les résistants : LT NI (moyenne =  $0.21 \pm 0.04$ ) < LT I (moyenne =  $0.32 \pm 0.05$ ). Cette différence est significative chez les LT à 95%.

En somme, la variété BK paraît avoir un taux d'activité constitutive globalement supérieur à celui de l'espèce LT sur les trois enzymes étudiées. Soumis à un stress biotique avec *Pratylenchus coffeae*, les sensibles privilégient l'expression des PPOX tandis que les résistants favorisent la voie des peroxydases (POD et APX). Deux mécanismes de réponse semblent se dégager en fonction du génotype.

### Racines d'ananas

Pour chacune des conditions, un comptage des nématodes dans la gaine de terre a été effectué afin de vérifier le niveau de contamination (Annexe 5).





**Figure 4 : Expression de l'activité d'enzymes impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif : POD (a), PPOX (b) et APX (c), sur 3 variétés d'ananas (le Cayenne lisse (CL), le MD<sub>2</sub> et le RL 53), étudiée avec six conditions de traitement : sain, méthyl jasmonate (MeJa) à 0.1 mM et 1 Mm), stifénia (stif), nématodes (nem) et hydroponie (hydro).**

*S* : Significatif par rapport au témoin (NI), représenté par une ou plusieurs étoiles (\*); *NS* : Non Significatif.

#### **a) POD (Figure 4a) :**

Dans des conditions de culture saine, la variété sensible aux nématodes (CL) exprime faiblement cette enzyme (moyenne =  $6.60 \pm 2.12$ ). Lors des traitements avec les éliciteurs, le taux d'activité est clairement stimulé, que ce soit avec le MeJa (moyenne =  $56.39 \pm 6.97$ ) ou le stifénia (moyenne =  $37.02 \pm 2.73$ ). Cette réponse est néanmoins moins forte que dans le cas du stress avec les nématodes (moyenne =  $109.38 \pm 22.88$ ). L'induction maximale est obtenue avec le traitement en hydroponie (moyenne =  $147.61 \pm 46.41$ ).

Chez le MD<sub>2</sub>, espèce connue pour être résistante au brunissement mais aussi présentant une meilleure tolérance aux nématodes (Soler *et al.*, 2007), le niveau d'expression basal de la POD est supérieur à celui observé chez la CL (MD<sub>2</sub> : moyenne =  $41.49 \pm 3.70$  > CL : moyenne =  $6.60 \pm 2.12$ ). La stimulation avec le MeJa semble augmenter la production d'enzyme, en particulier à la concentration de 0.1mM (moyenne =  $68.46 \pm 4.06$ ). D'ailleurs, la réponse induite paraît équivalente à celle retrouvée lors du stress avec les nématodes (moyenne =  $69.22 \pm 8.79$ ). La culture en milieu hydroponique provoque également pour cette variété une induction maximale du taux d'activité de l'enzyme (moyenne =  $210.81 \pm 25.49$ ).

Le RL53, possédant également quelques propriétés de résistance au stress, ne montre pas de différence nette entre les conditions saine et éliciteurs. Par contre, sa réponse aux nématodes est plus forte que celle du MD<sub>2</sub> (MD<sub>2</sub> :  $69.22 \pm 8.79$  > RL53 :  $104.98 \pm 19.53$ ). En hydroponie, l'expression de la POD reste maximale tout comme pour les autres variétés présentées (moyenne =  $250.33 \pm 30.97$ ).



### **b) PPOX (Figure 4b) :**

Pour cette enzyme, aucune différence significative du taux d'activité n'est observée entre les variétés étudiées mais les nématodes et les conditions d'hydroponie entraînent une augmentation de l'activité PPOX pour toutes les variétés : Nématodes , CL (moyenne =  $2.79 \pm 0.70$ ) ; MD<sub>2</sub> (moyenne =  $2.45 \pm 0.74$ ) ; RL53 (moyenne =  $2.81 \pm 0.39$ ) ; Hydroponie, (CL (moyenne =  $1.72 \pm 0.20$ ) ; MD<sub>2</sub> (moyenne =  $2.92 \pm 0.55$ ) ; RL53 (moyenne =  $1.98 \pm 0.48$ )). La réponse observée dans ces deux conditions est du même ordre de grandeur.

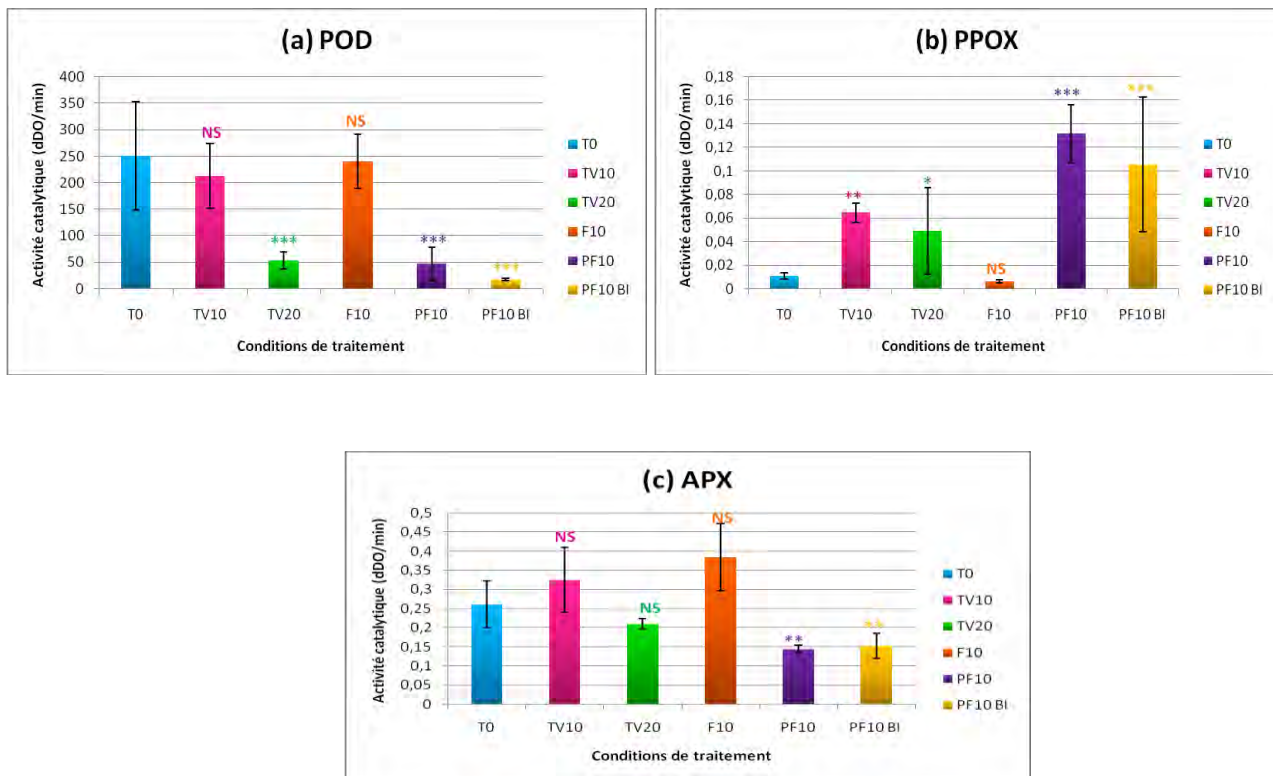
### **c) APX (Figure 4c) :**

Globalement, l'expression de cette enzyme présente une forte dispersion au sein de tous les échantillonnages car les intervalles de confiance sont très importants. Pour une variété donnée, aucune différence significative n'a pu être montrée selon les traitements. Cependant, comme pour la POD, le CL montre un taux d'expression constitutif d'APX plus faible que les espèces résistantes (CL (moyenne =  $0.20 \pm 0.09$ ) < MD<sub>2</sub> (moyenne =  $0.47 \pm 0.13$ ) et RL53 (moyenne =  $0.41 \pm 0.09$ )).

Par conséquent, si le stress aux nématodes est visible chez les trois enzymes étudiées, en particulier la POD et les PPOX, la réponse induite par l'action des éliciteurs n'est observée que pour la POD. Le MeJa semble plus efficace que le stifénia surtout pour le Cayenne Lisse et le MD<sub>2</sub>. De plus, la variété la plus tolérante, le MD<sub>2</sub>, présente un comportement sensiblement différent des autres car il paraît privilégier l'utilisation des peroxydases (POD et APX) par rapport aux PPOX contrairement aux autres variétés plus sensibles. Le RL53 se rapproche de cette tendance mais dans une moindre mesure. Cette observation confirme les résultats obtenus dans l'expérimentation sur les racines de bananiers pour l'espèce résistante LT. En outre, le traitement en hydroponie s'est révélé être très stressant pour la plante. Les répercussions sont visibles surtout au niveau de l'activité de la POD où la représentation a dû être adaptée.

### ***Fruit Cayenne Lisse***

Pour chaque condition, les trois meilleurs fruits (coloration de la chair, sans champignons, etc) sur les cinq ont été analysés. Contrairement à l'effet attendu, les fruits ayant subi le traitement PF<sub>10</sub> n'ont pas montré de brunissement interne. Une autre série de fruits traités de façon similaire mais présentant les symptômes (notée PF<sub>10</sub> BI) a été utilisée pour observer en parallèle l'induction enzymatique produite pour cette condition de conservation.



**Figure 5 : Expression de l'activité catalytique d'enzymes impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif ((a) POD, (b) PPOX, (c) APX) sur une variété d'ananas, le Cayenne lisse, étudiée avec cinq conditions de traitement (T0, TV10, TV20, F10, PF10).**

*S* : Significatif par rapport au témoin (NI), représenté par une ou plusieurs étoiles (\*); NS : Non Significatif.

#### **a) POD (Figure 5a) :**

Avec le vieillissement, l'activité enzymatique diminue de manière significative : de  $250.45 \pm 102.66$  à  $T_0$ , il passe à  $53.78 \pm 16.41$  pour  $TV_{20}$ . Entre  $T_0$  et  $F_{10}$ , le niveau d'expression de la POD reste identique. Par contre, lorsque les températures de l'itinéraire commercial sont reproduites, l'activité chute ( $PF_{10}$  : moyenne =  $47.06 \pm 31.89$  ;  $PF_{10}BI$  : moyenne =  $17.392 \pm 2.004$ ). Le taux d'expression alors atteint est semblable à celui obtenu dans la condition de vieillissement de 20 jours.

#### **b) PPOX (Figure 5b) :**

Contrairement au profil observé pour la POD, le niveau d'activité des PPOX augmente avec le vieillissement. Il existe notamment une nette différence entre  $T_0$  (moyenne =  $0.011 \pm 0.0032$ ) et  $TV_{10}$  (moyenne =  $0.064 \pm 0.008$ ). Le même constat se répète entre  $F_{10}$  (moyenne =  $0.006 \pm 0.001$ ) et  $PF_{10}$  (moyenne =  $0.131 \pm 0.025$ ) /  $PF_{10}BI$  (moyenne =  $0.106 \pm 0.057$ ). Sachant que  $T_0$  et  $F_{10}$  exprime un taux d'activité égal, le traitement induisant le BI entraîne une augmentation au moins deux fois plus grande que lors d'un traitement de vieillissement.

**c) APX (Figure 5c) :**

Aucune différence tangible n'est observée chez les fruits vieillis par rapport au témoin. Il en est de même entre T<sub>0</sub> et F<sub>10</sub>. Par contre, le taux d'activité diminue de façon nette entre T<sub>0</sub> (moyenne = 0.261 ± 0.605) et PF<sub>10</sub> (moyenne = 0.144 ± 0.010) / PF<sub>10</sub> BI (moyenne = 0.152 ± 0.033) et entre F<sub>10</sub> (moyenne = 0.384 ± 0.087) et PF<sub>10</sub> (moyenne = 0.144 ± 0.010) / PF<sub>10</sub> BI (moyenne = 0.152 ± 0.033).

En conclusion, en cours de conservation au froid (F<sub>10</sub>) il n'ya pas d'expression significative l'activité catalytique basale des trois enzymes étudiées.

De façon générale, les peroxydases POD et APX (PO) semblent suivre le même schéma : plus le temps de vieillissement est long, plus leur activité baisse. Par ailleurs, les conditions de conservation durant l'itinéraire commercial Antilles–Europe induisent une diminution de l'expression enzymatique qu'il y ait des symptômes de brunissement ou non. A l'inverse, les PPOX augmentent avec le temps de vieillissement et lors des conditions PF<sub>10</sub> / PF<sub>10</sub> BI.

## VI- DISCUSSION / PERSPECTIVES

La mesure de l'activité catalytique des trois enzymes : POD, PPOX et APX associée au dosage de la concentration protéique pour chaque échantillon permet d'obtenir l'activité spécifique de chacune d'entre elles. La méthode de Bradford, couramment utilisée, s'est avérée peu intéressante au final car la présence de détergent et de composés phénoliques dans la solution d'extraction provoque des interférences. Les tentatives de remplacer le Tween 20 par d'autres composés similaires comme le Triton X100 se sont révélées d'autant plus infructueuses qu'elles faisaient apparaître d'autres incompatibilités au niveau de la mesure des cinétiques, notamment celle des PPOX. L'autre alternative a été d'opter pour la méthode d'estimation des protéines de Warburg et Christian (Thorne *et al.*, 1978) proposée par l'ouvrage Data for Biochemical Research de Dawson *et al.* (1986). La concentration en protéines est établie en mg/ml à partir de la formule  $1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$ . Là encore les calculs d'activité spécifiques ont été plus hétérogènes que les données d'activité brutes. Les graphiques ont donc été présentés et interprétés à partir de l'activité catalytique en fonction du traitement et de l'espèce. Il aurait été judicieux d'exprimer les valeurs en Katal, unité du système international (SI), c'est-à-dire en  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}/\text{g}$  frais, à partir de la loi de Beer-Lambert ( $dDO = \epsilon \times l_{\text{cm}} \times dC_{\text{mol/L}}$ ). Le point critique se situe au niveau de la détermination du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) du produit de chacune des réactions enzymatiques étudiées. Si pour la réaction avec l'APX, la constante de l'acide ascorbique est facile à trouver ( $\epsilon = 10\ 000$ ), pour les autres en revanche c'est plus délicat.

Toutefois, le travail préliminaire réalisé a permis de dégager quelques modifications physiologiques.

### **Racines de bananiers**

Tout d'abord, dans le cas de l'expérimentation sur les bananiers (*Musa acuminata*), l'induction des peroxydases et des PPOX en présence de *Pratylenchus coffeae* quelle que soit la variété (sensible ou résistante) a confirmé les résultats obtenus par Damodaran *et al.* (2009) sur des hybrides de *Musa acuminata* inoculés avec *Fusarium oxysporum f.sp cubense*. Néanmoins, cette augmentation apparaît moins importante chez les espèces sensibles lorsqu'il s'agit des peroxydases (Chen & Chang, 1980 ; Mohanty *et al.*, 1986). En revanche, aucune différence significative n'a pu être établie entre les sensibles et les résistants pour les PPOX (Giebel *et al.*, 1982) alors que pour les PO, la réponse de BK semble supérieure à celle de LT. Les travaux de Damodaran *et al.* (2009) et Mateille (1994) ont montré le contraire en particulier pour les peroxydases : les variétés résistantes ont des taux d'activité plus forts que les sensibles. Cependant, l'échantillonnage utilisé pour la manipulation est trop petit pour être concluant. Il serait intéressant de pouvoir reconduire l'expérience sur un plus grand nombre d'échantillons et d'y ajouter une condition où la résistance systémique induite pourrait être analysée. Quelques travaux ont déjà mis en évidence ce mécanisme chez le bananier par l'action de

Microorganismes Améliorant la Croissance des Plantes (PGPM), de rhizobactéries (PGPR), de champignons endophytes ou de micorhizes (Sikora *et al.*, 2008 ; Elsen, 2008).

### **Racines d'ananas**

A l'inverse des racines de bananiers, l'expérimentation sur les racines d'ananas indique de façon plus claire l'augmentation de l'expression des PO chez les espèces résistantes MD<sub>2</sub> et RL53 par rapport au CL. Alors que le RL53 est plus sensible que le MD<sub>2</sub>, aucune différence d'expression significative n'est observée. Ceci peut être lié à l'utilisation d'un matériel végétal plus ancien, les plants ayant été récoltés avant les autres variétés et conservés plus longtemps avant la mise en terre. Un constat important est la réaction des plants en milieu hydroponique. Ce traitement a été réalisé dans le but d'obtenir des racines saines en écartant un artéfact qui serait lié à la présence de terre. En réalité, les racines se trouvent plus stressées encore qu'en présence de nématodes, ce qui se traduit par une production exacerbée de POD. Il est vrai que les racines ont été immergées pendant deux mois avec un renouvellement du milieu une fois par semaine alors que l'ananas n'est pas une plante aquatique.

Par ailleurs, les essais de stimulation des défenses naturelles de la plante avec le MeJa et le stifénia ont été peu concluants. Les effets sont visibles uniquement chez les peroxydases, et surtout pour la POD où le MeJa semble intervenir dans l'induction de l'activité de cette enzyme. L'échantillonnage est sans nul doute encore trop faible pour être déterminant mais laisse envisager l'application d'éliciteurs pour la mise en place d'une résistance systémique acquise. Chinnasri et Sipes ont montré en 2005 que l'utilisation de l'acibenzolar-s-méthyl sur les jeunes plants d'ananas entraîne la mise en place de ce mécanisme par la production de protéines PR1. L'acide salicylique pourrait être également testé comme éliciteur car il constitue l'autre médiateur important de la réponse des plantes aux bioagresseurs, sachant qu'il implique un mode d'action différent (Koo & Howe, 2009 ; Loake & Grant, 2007 ; Pickett *et al.*, 2007 ; Beckers et Spoel, 2005). De plus, il manque une condition cruciale pour l'interprétation de cette manipulation où le traitement avec le MeJa en terre stérile serait suivi de l'inoculation de nématodes. La réalisation n'a pas été possible pendant le stage, néanmoins elle permettrait de vérifier l'induction du processus de résistance systémique acquise (Vallad et Goodman, 2003). En outre, l'analyse des échantillons à des temps différents serait utile pour déterminer la stabilité des réponses enzymatiques associées et entrevoir à posteriori une application aux champs.

### **Fruit Cayenne Lisse**

Dans le contexte du travail de thèse déjà effectué au laboratoire, les conditions de vieillissement ont permis de confirmer l'utilisation de T<sub>0</sub> comme témoin négatif, ce qui correspond aux fruits non passés au froid analysés tout de suite après la récolte. En effet, les fruits montrent des variations des

activités des enzymes étudiées. L'expérimentation sur les fruits de CL a révélé un mécanisme de couplage inverse PO / PPOX. Alors que le niveau d'expression de la POD diminue avec le temps (Tv) et le brunissement interne, les PPOX augmentent. Il serait nécessaire de comparer ces résultats avec ceux d'autres variétés de sensibilités différentes (MD<sub>2</sub>, RL53 et RL41). Aussi, l'induction du BI même s'il ne provoque pas de symptômes, entraîne une modification de l'activité catalytique de ces enzymes.

D'autre part, en liaison avec les manipulations précédentes (racines de bananiers et d'ananas), l'utilisation d'éliciteurs en prévention de ce stress abiotique serait intéressante à mettre en place pour permettre l'amélioration de la qualité des fruits destinés à l'exportation. Nilprapruk a montré en 2008 que l'application de MeJa sur les fruits d'ananas réduit l'impact du BI lié au stress de température.

En conclusion, la compréhension de l'impact des stress biotique et abiotique par les systèmes de résistances acquise et induite chez l'ananas et le bananier est loin d'être simple. Comme ici, la plupart des études ont été effectuées sur des systèmes simples combinant deux variétés de plantes à sensibilités différentes à une espèce de nématodes. Or, les mécanismes de défenses des plantes dépendent aussi de la nature de l'espèce infestante. Les interactions qui existent entre la plante et le nématode sont donc multiples, ce qui laisse entrevoir la complexité des processus physiologiques mis en jeu. Les résultats présentés sont issus des expérimentations mises en place pour les fruits et les racines et portent sur quelques unes des enzymes intervenant dans les réactions de défense des végétaux (POD, PPOX et APX). D'autres comme la catalase, la superoxyde dismutase et la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) méritent d'y être incluses car les agressions biologiques conduisent à une production forte et rapide des espèces réactives de l'oxygène. Le dosage de la PAL, qui a été exploré au cours du stage, demeure souvent associé à ceux des PO et des PPOX dans les articles (Damodaran *et al.*, 2009 ; Mateille, 1994 ; Zhou *et al.*, 2001), parce que cette enzyme intervient en amont dans les processus de formation des nécroses. La partie annoncée sur l'analyse des feuilles D aurait permis de vérifier la propagation des systèmes de résistance à l'ensemble de la plante. Par ailleurs, les nombreux travaux présentant l'apparition de nouveaux isoenzymes après le stress (Mohanty *et al.*, 1986 ; Damodaran *et al.*, 2009) soulignent l'intérêt, déjà envisagé, d'établir par électrophorèse le profil des enzymes. Les échantillons ont été conservés par le laboratoire afin de compléter l'étude engagée par le stage et de pouvoir s'orienter vers des recherches plus ciblées. Une démarche expérimentale accompagnée d'études exploratoires en ce sens a d'ailleurs déjà été proposée au responsable de l'unité de recherche pour le prochain quadriennal. La finalité est de réussir à améliorer les pratiques culturales au sein des systèmes de cultures pour renforcer les effets positifs des mécanismes de résistance de l'ananas et du bananier contre les nématodes.

## BIBLIOGRAPHIE

- **Avallone, S., Guiraud, J-P., Brillouet J-M., Teisson C.**, Enzymatic browning and biochemical alterations in black spots of pineapple, (2003) *Current Microbiology* **47**, 113-118.
- **Baaziz, M.**, Les peroxydases des plantes. Aspects théoriques et applications pratiques, (2006) Deuxième Congrès International de Biochimie, Agadir, Maroc.
- **Beckers, G.J.M. & Spoel, S.H.**, Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate, (2005) *Plant Biology* **8** (1), 1-10.
- **Bertrand, M.**, Le Flhoran 41 et les autres nouvelles variétés d'ananas du CIRAD, essais de conservation au froid, essais de transformation et tests sensoriels de dégustation, (2004) Mémoire de DESS, CIRAD Martinique.
- **Boffmann**, Le brunissement enzymatique et son inhibition, (2002) TP de Biochimie, IUP Agroalimentaire, Université de la Réunion.
- **Chen, Y.H., & Chang, D.C.N.**, A study of the histochemical and fine structural changes induced by southern root-nematodes in tomato, (1980) *National Science Council Monthly, ROC* **8**, 813-826.
- **Chinnasri, B., Sipes, B.S. & Schmitt, D.P.**, Effects of Inducers of Systemic Acquired Resistance on Reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in Pineapple (2005) *Journal of Nematology* **38**(3) 319-325.
- **Damodaran, T., Kumar, N., Kavino, M.**, Breeding and evaluation of Musa hybrids resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubence race 1, (2009) *Fruits* **64**, 3-12.
- **Dawson, R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M.**, Data for Biochemical Research, Third edition, (1986) Oxford University Press.
- **Daire, X., Simonin, G.**, Mécanismes de défense chez les plantes, Application à la protection phytosanitaire de la vigne. (2008), INRA, centre de Dijon.
- **Elsen, A., Gervacio, D., Swennen, R. & De Waele, D.**, AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in Musa sp.: a systemic effect (2008), *Biomedical and Life Science* **18**, 251-256.

- **Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S., Smith, F.A.,** Enzymatic studies on the metabolism of vascular-arbuscular micorrhizas. V. Is H<sup>±</sup>ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces ?, (1991) *New Phytology* **117**, 61-76.
- **Giebel, J. & Dopierala, U.,** Phenol-oxidase activity in resistant and susceptible potato roots infected with the golden nematode (*Globodera rostochiensis* Woll.), (1982) *Prace Naukowe IOR Pozan* **24**, 23-26.
- **Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., Kuc, J.,** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*, (1982) *Physiology Plant Pathology* **20**, 73-82.
- **Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C., Martins, L.M.,** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, (1999) *Annual Review of Biochemistry* **68**, 383-424.
- **Kay, E., Leland, M., Jow, Y.,** Peroxidase isoenzymes from horseradish roots, (1967) *Journal of Biochemistry* **242**, 2470-2473.
- **Koo, S.C., Howe, G., A.,** A Critical Role for the TIFY Motif in Repression of Jasmonate Signaling by a Stabilized Splice Variant of the JASMONATE ZIM-Domain Protein JAZ10 in *Arabidopsis*<sup>[C].[W]</sup>, (2009) *The Plant Cell* **21**, 131-145.
- **Lacoeuilhe, JJ., Py, C., Teisson, C.,** L'ananas, sa culture, ses produits (1984) Edition GP Maisonneuve et Larose, Paris.
- **Loake, G. & Grant, M.,** Salicylic acid in plant defense – the players and protagonists, (2007) *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 466-472.
- **Mateille, T.,** Biologie de la relation plante-nématodes ; perturbations physiologiques et mécanismes de défense des plantes (1994) *Nematologica* **40**, 276-311.
- **Marquez, O., Krzysztof, N.W., Oliart, R.M., Violeta, T.P.,** Purification and characterization of cell wall-bound peroxidase from vanilla bean, (2007) *LWT-Food Science and Technology*.
- **Martinez, M., Baccou, J.C., Bresson, E., Daniel, J.F., Jalloul, A., Montillet, J.L., Geiger, J.P., Assigbetse, K., Nicole, M.,** Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in the local



and systemic resistance of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* race 18, (2000) *Plant Physiology* **122**, 757-766.

- **Martinez, C., Blanc, F., Le Claie, E., Besnard, O., Nicole, M., Baccou, J.C.**, Active cellulase elicits concomitant jasmonate and salicylic pathways in melon plants (*Cucumis melo*) white heat-denaturated cellulase induces the salicylic acid-dependent pathway only, (2001) *Plant Physiology* **125**, 334-344.
- **Mayer, A.M.**, Polyphenol oxidase and peroxidase in plants – recent progress, (1987), *Phytochemistry* **26**, 11-20.
- **Mayer A.M., Haul E., Shaul R.B.**, Assay of catechol oxidase, a critical comparison of method, (1965) *Phytochemistry* **5**, 783-789.
- **Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiron, B., Cohen, E., Fuchs, Y.**, Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit and bell pepper by methyl jasmonate, (1996) *Canadian Journal of Botany* **74**(6), 870-874.
- **Mohanty, K. C., Ganguly, A.K. & Dasgupta, D. R.**, Development of peroxidase activities in susceptible and resistant cultivars of cowpea inoculated with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, (1986) *Indian Journal of Nematology* **16**, 252-256.
- **Neves, V.A., & Da Silva M.A.**, Polyphenol Oxidase from Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*), 2007 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 2424-2430.
- **Nicole. M., Daniel, J.F., Bresson, E., Martinez, C., El Bachir, O., Lopez, F., Assigbetsé, K., Fernandez, D., Montillet, J.L., Geiger, J.P.**, The hypersensitive reaction of cotton to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*, (1998) *Recent Research Developments in Microbiology* **2**, 641-654.
- **Nicole, M.**, Hormones et Résistances des plantes (2008) UMR “Résistance des Plantes aux Bioagresseurs”.
- **Ngoc Truong An, D.**, Impact de l’emploi d’un éliciteur sur le développement et les contaminations du bananier, (2008) Mémoire de Master, CIRAD Martinique.

- **Pajot, E., Sandy, M., Guerrand, J., Chirapongsatunkul, N., de Ruffay, P., Kauffmann, S., Maxant, F.X., du Mérac, H.,** TTF5, fertilisant pouvant stimuler des défenses naturelles de plantes contre des pathogènes sur tabac, fraise et vigne, travaux sur un mélange (2007) *Phytoma* **603**, 38-41.
- **Pickett, J.A., Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A.,** Stressful “memories” of plants : Evidence and possible mechanisms (2007) *Plant Science* **173**, (6) 603-608.
- **Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I.,** Flavonoid oxidation in plants : from biochemical properties to physiological functions, (2006) *Plant Science* **12**(1) 1360-1385.
- **Rescigno, A., Sollai, F., Rinaldi, A.C., Soddu, G., Sanjust, E.,** Polyphenol oxidase activity staining in polyacrylamide electrophoresis gels, (1997) *Journal of biochemical and biophysical methods* **34**, 155-159.
- **Schoener, S., & Krause, G.H.,** Protective systems against oxygen species in spinach : response to cold acclimation in excess light, (1990) *Planta* **180**(3), 383-389.
- **Sikora, R.A., Pocasangre L., Zum Felde, A., Niere, B., T. Vu, T., Dababat, A.A.** Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes, (2008) *Journal of biological control* **46**(1) 15-23.
- **Soler, A.,** Maturation et sénescence de l’ananas en Côte d’Ivoire, (1991) thèse soutenue à Montpellier II.
- **Stepanova, A., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L., Xie, D., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G., Alonso, J.,** TAA1-Mediated Auxin Biosynthesis Is Essential for Hormone Crosstalk and Plant Development, (2008) *Cell* **133**(1), 177-191.
- **Stewart, R.J., Sawyer, B.J.B., Robinson, S.P.,** Blackheart development following chilling in fruit of susceptible and resistant pineapple cultivars, (2002) *Australian Journal of Experimental Agriculture* **42**, 195-199.
- **Teisson, C., Martin-Prevel, P., Combres, J.C., Py, C.,** A propos du brunissement interne de l’ananas, accident de réfrigération, (1978) *Fruits* **33**(1), 48-50.
- **Teisson, C.,** Le brunissement interne de l’ananas, (1979) *Fruits* **34**(4), 245-261.

- **Teisson, C., Combres, J.C.**, Le brunissement interne de l'ananas, chapitre III : Symptomatologie, (1979) *Fruits* **34**(5), 315-339.
  
- **Thorne, C.J.R.**, (1978) *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry Partie I* (B104).
  
- **Vallad, G.E. & Goodman, R.M.**, Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture (2003) *Crop Science* **44**, 1920-1934.
  
- **Wuyts, N., De Waele, D., Swennen, R.**, Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots, (2006) *Plant physiology and Biochemistry* **44**, 308-314.
  
- **Zhou, Y., Dahler, J.M., Underhill, S.J.R., Wills, R.B.H.**, Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit, (2003) *Food chemistry* **80**, 565-572.
  
- **Internet** : [www.cirad.fr](http://www.cirad.fr)  
[www.ogm.org](http://www.ogm.org)

# *ANNEXES*

## **Annexe 1**

### Présentation du dispositif PRAM



Laboratoire d'agrophysiologie, Cirad, UR 26



Collection d'ananas sur la parcelle d'expérimentation de Rivière-Lézarde, Saint-Joseph



Vue des serres d'ananas sur le site de l'habitation Petit-Morne, Lamentin



Vue d'ensemble du PRAM

## **Annexe 2**

### Présentation de l'appareillage utilisé pour les protocoles



***Photo d'une cellule d'agitation Amicon***

Lors de l'ultrafiltration Une pression d'azote est appliquée sur la membrane semi perméable, dont la limite d'exclusion est 30kDa. Les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 30kDa, constituent le perméat, les molécules dont la masse moléculaire est supérieure restent sur la membrane, il s'agit du rétentat.



***Photo du spectrophotomètre uv-visible (Cary 100 Scan, Varian, Australie)***

Avec son double faisceau, il permet la lecture des deux cuves simultanément afin de recalibrer la mesure en fonction de la valeur du blanc.

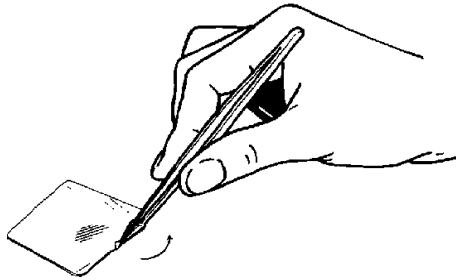


***Photo du PhastSystem sur lequel sont effectuées les électrophorèses***

## Annexe 3 Présentation du principe du Phastsystem

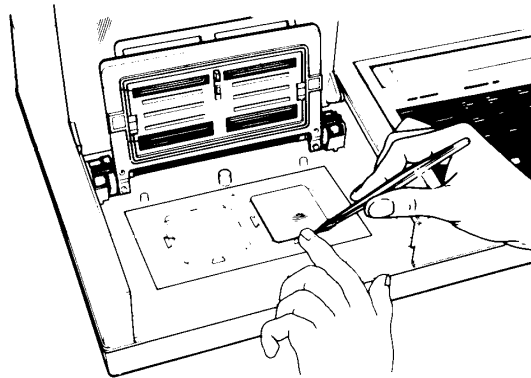
### Principales étapes de l'électrophorèse

1



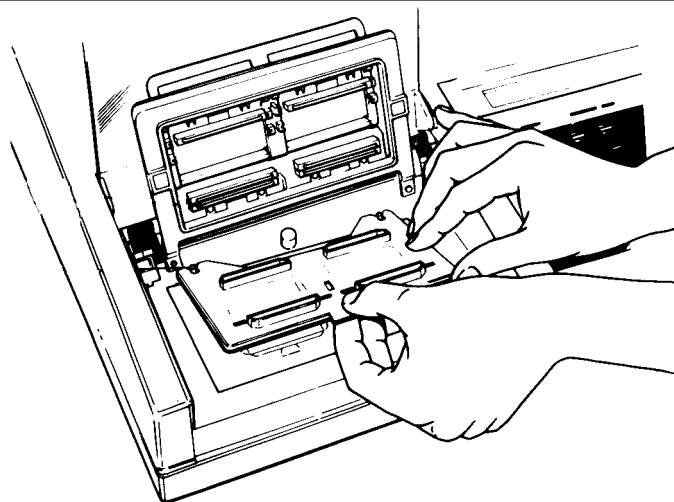
Enlever la languette de protection.

2



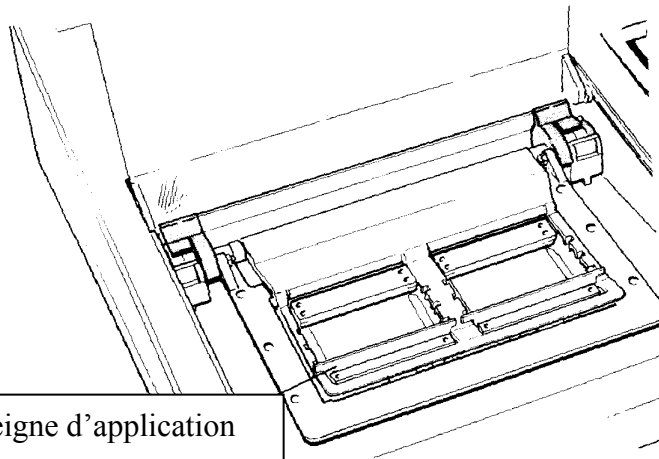
Déposer le gel sur la surface de refroidissement.

3



Mettre le bloc tampon puis les tampons.



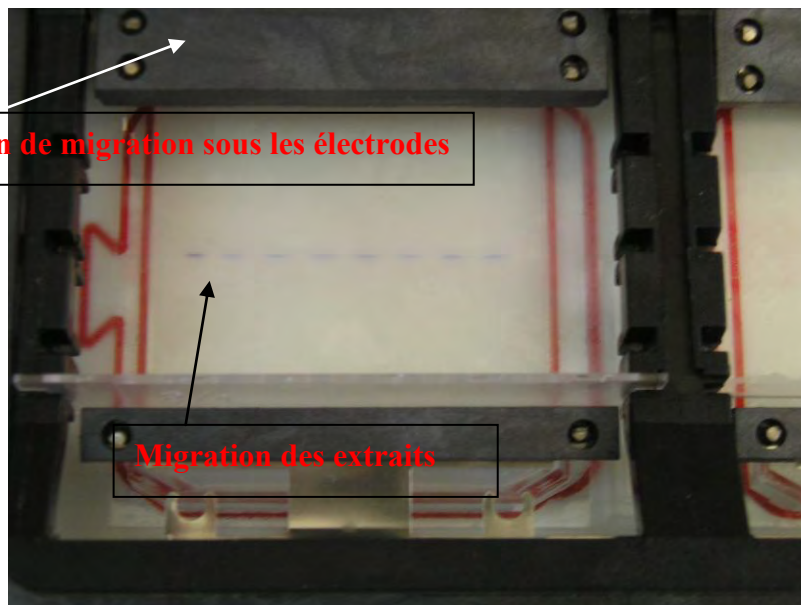


Peigne d'application

4

Appliquer les peignes contenant les extraits.

---



Fin de migration sous les électrodes

Migration des extraits

5

Migration des extraits.

---

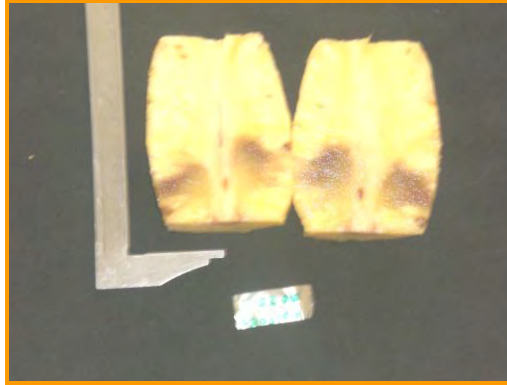
6

Révélation puis exploitation des électrophorogrammes.



## **Annexe 4**

### Présentation des expérimentations



***Photo du brunissement interne***




***Photo de l'expérimentation sous serre***



***Photo de vitro plants de bananiers***

## Annexe 5

### Résultats du comptage des nématodes

	<b>LABORATOIRE DE NEMATOLOGIE</b>	<b>Enregistrement</b>	<b>Date d'application:11/06/07</b>  <b>Code:E-TE-06/NEMA</b>  <b>Révision :00</b>
	<b>DOCUMENT QSE</b>	<b>FICHE DE RESULTATS</b>	

Echantillons prélevés le :	27/07/09	Groupement :	<b>CIRAD</b>
Par:	Karell	Plantation :	Ananas
Echantillons reçus le :	27/07/09	Localité :	Petit Morne
Echantillons extraits le :	28/07/09	Propriétaire :	
Résultats remis le :	03/08/09		


Nature de l'échantillon : Racines  
 Culture : Ananas

Comptages par espèce :

- Crico: Criconémoides Sp
- Para: Paratylenchus
- Melo: Meloidogyne
- Sp
- Heli: Helicotylenchus
- Roty: Rotylenchus Reniformis

N°Labo	Parcelle	Nématodes dans 100 g de racines					
		Crico	Para	Melo	Heli	Roty	Prat
571	RL 53 stifenia	0	0	0	70	0	0
572	Cayenne	0	0	0	217	0	0
573	MD2 Meja 0,1mM	0	0	0	501	0	0
574	MD2 Stifenia	0	0	0	448	0	0
575	RL53 Meja 01mM	0	0	0	1923	0	0
576	MD2 sain	0	0	0	69	0	0
577	Cayenne Meja	0	0	0	754	0	0
578	Cayenne sain	0	0	0	248	0	0
579	RL 53Meja	0	0	0	0	0	0

ANNEXE 5 (suite)

	<b>LABORATOIRE DE NEMATOLOGIE</b>	<b>Enregistrement</b>	Date d'application:11/06/07  Code:E-TE-06/NEMA  Révision :00
	<b>DOCUMENT QSE</b>	<b>FICHE DE RESULTATS</b>	

Echantillons prélevés le :	00/01/00	Groupement :	<b>0</b>
Par:	0	Plantation :	0
Echantillons reçus le :	27/07/09	Localité :	CIRAD
Echantillons extraits le :	Karell	Propriétaire :	
Résultats remis le :	27/07/09		

Nature de l'échantillon : Racines  
 Culture : Ananas

Comptages par espèce : Ananas  
 0  
 Crico:Criconémoides Sp  
 Para: Paratylenchus  
 Melo: Meloidogyne Sp  
 Prat: Pratylenchus

N°Labo	Parcelle	Nématodes dans 100 g de racines					
		Crico	Para	Melo	Heli	Roty	Prat
580	Cayenne nématodes	181	0	0	0	271	0
581	MD2 Nématodes	1588	0	0	84	3010	0
582	RL53 nématodes	Pas de Racines					