

Table des matières

Partie 1 :

<i>Introduction</i>	5
---------------------	---

Partie 2: Synthèse bibliographique

<i>Chapitre 1 : Le bananier</i>	7
---------------------------------	---

1.1. Historique	7
1.2. Taxonomie	7
1.3. Aspect botanique	8
1.4. L'inflorescence et le développement des fruits	9
1.5. La maturation des fruits	10
1.6. Composition de la banane	11

<i>Chapitre 2 : Itinéraire technique de la production d'exportation</i>	13
---	----

2.1. De la plantation à la récolte	13
2.2. La récolte	14
2.3. Les opérations à la station d'emballage	15
2.4. Le transport des fruits et leur mise sur le marché	16

<i>Chapitre 3 : Le marché international de la banane</i>	17
--	----

<i>Chapitre 4: Les maladies de conservation des bananes causées par Colletotrichum musae</i>	19
--	----

4.1. La pourriture de couronne et l'anthracnose	19
4.2. Les variations de sensibilité des bananes à <i>C. musae</i> et l'impact de la physiologie du fruit	19

<b>Chapitre 5 : Apport de la biologie moléculaire dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la variation de sensibilité des bananes à <i>C. musae</i></b>	<b>21</b>
<b>5.1. Introduction</b>	<b>21</b>
<b>5.2. Mise en évidence de gènes différemment exprimés</b>	<b>21</b>
<b>5.3. La cDNA-AFLP</b>	<b>23</b>
5.3.1. Introduction	23
5.3.2. Principe	23
5.3.3. Avantages	24
5.3.4. Inconvénients	25
5.3.5. Application de la méthode	25
<b>5.4. Les méthodes d'extraction d'ARN</b>	<b>26</b>
 <b><u>Partie 3:</u></b>	
<b>Objectifs du travail</b>	<b>28</b>
 <b><u>Partie 4: Matériels et méthodes</u></b>	
<b>1. Travailler avec les ARN et l'environnement RNase Free</b>	<b>29</b>
 <b>2. Matériel végétal</b>	 <b>29</b>
 <b>3. Description des protocoles d'extraction d'ARN utilisés</b>	 <b>29</b>
<b>3.1. Protocole « Wan et Wilkins modifié »</b>	<b>29</b>
3.1.1. Introduction	29
3.1.2. Principe	30
<b>3.2. Protocole de Liu <i>et al.</i> (1998)</b>	<b>31</b>
3.2.1. Introduction	31
3.2.2. Principe	31
<b>3.3. Protocole d'extraction basée sur le Trizol ls Reagent®</b>	<b>32</b>
3.3.1. Introduction	32
3.3.2. Principe	32

<b>3.4. Protocole d'extraction basée sur le Trizol ls Reagent® et adapté pour le matériel riche en polysaccharides</b>	<b>33</b>
3.4.1. Introduction	33
3.4.2. Principe	33
<b>3. 5. Protocoles d'extraction utilisant les tampons d'extraction GITC et GHCL de Gehrig <i>et al.</i> (2000)</b>	<b>34</b>
3.5.1. Introduction	34
3.5.2. Principe	34
3.5.3. Description de l'extraction avec le tampon GITC	35
3.5.4. Description de l'extraction avec le Tampon GHCL	35
<b>3. 6. Protocole de Mehar H. Asif <i>et al.</i> (2000)</b>	<b>35</b>
3.6.1. Introduction	35
3.6.2. Principe	35
 <b>4. Analyse quantitative et qualitative de l'ARN extrait</b>	 <b>37</b>
<b>4.1. Introduction</b>	<b>37</b>
<b>4.2. Remise en suspension des ARN</b>	<b>37</b>
<b>4.3. Mesure des absorbances</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Analyse quantitative des ARN extraits</b>	<b>37</b>
<b>4.5. Analyse qualitative des ARN extraits</b>	<b>38</b>
4.5.1. Lecture des absorbances	38
4.5.2. Migration sur gel d'agarose	38
 <b><u>Partie 5: Résultats et discussions</u></b>	
 <b>1. Extractions d'ARN totaux à partir de bananes vertes</b>	 <b>40</b>
<b>1.1. Résultats</b>	<b>40</b>
<b>1.2. Discussion</b>	<b>42</b>
 <b>2. Extractions d'ARN totaux à partir de peau de bananes jaunes</b>	 <b>44</b>
<b>2.1. Résultats</b>	<b>44</b>
<b>2.2. Discussion</b>	<b>47</b>

---

<b>3. Extractions d'ARN totaux à partir de pulpe de bananes jaunes</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Résultats</b>	<b>50</b>
<b>3.2. Discussion</b>	<b>53</b>
 <b>4. Discussion générale</b>	 <b>55</b>
 <b><u>Partie 6: Conclusions et perspectives</u></b>	 <b>58</b>

## Introduction

Le terme « banane » englobe les différents types de « bananes dessert » et de « bananes à cuire » rencontrés dans le monde, y compris les « bananes plantains ». La plante est cultivée dans plus de 120 pays sur près de 10 millions d'hectares. En termes de valeur brutes de production, les bananes occupent la quatrième place parmi les plantes alimentaires cultivées dans le monde après le riz, le blé et le maïs. Près de 90% de la production sont issus de petits agriculteurs, produisant pour la consommation domestique et les marchés locaux.

En Occident, la « banane dessert » d'exportation est la plus connue alors qu'elle ne représente que 10% de la production mondiale. Ces trente dernières années, la production mondiale de « bananes dessert » a plus que doublé et les exportations ont triplé de volume. Elle s'est également accélérée depuis 1990 pour devenir actuellement l'une des principales productions mondiales de fruits. Pendant la période comprise entre 1985 et 2002, le volume des bananes exportées dans le monde a enregistré un taux de croissance annuel moyen sans précédent de 5,3%, soit deux fois celui des 24 années précédentes. L'industrie de la banane engendre donc de toute évidence une source vitale de revenus, d'emplois et de recettes d'exportation pour la majeure partie des pays exportateurs, principalement les pays en développement, où 98% de la production mondiale sont enregistrés.

Cependant, des pertes importantes à l'exportation sont enregistrées suite au développement de maladies de conservation qui affectent sévèrement la qualité des fruits. Les pourritures de couronne et l'anthracnose sont les deux principales maladies de post-récolte des bananes d'exportation. Elles se développent au cours du stockage et du mûrissement des bananes. L'anthracnose résulte de l'action unique de *Colletotrichum musae* tandis que les pourritures de couronne sont causées par l'action d'un complexe parasitaire dont *C. musae* fait partie. Le développement de ces maladies entraîne également des « mûrs d'arrivage » (Slabaugh et Grove, 1982). Ces derniers résultent d'un effet indirect de la contamination des fruits par *C. musae*. Ils sont provoqués par l'éthylène provenant des tissus nécrosés et des champignons. Il en résulte une réduction de la durée de vie verte des fruits et une maturation accélérée de ceux-ci qui entraîne une dévalorisation du produit, des difficultés de commercialisation sur le marché européen et donc des pertes économiques importantes.

Des variations dans l'expression des symptômes ont été observées pour les deux maladies. Ces variations sont d'ordre spatial et temporel et sont liées à ce que l'on appelle une variation du potentiel de qualité du fruit. L'expression des maladies de conservations est

dépendante d'un certain nombre de facteurs rencontrés à différentes étapes de la production bananière (depuis la bananeraie jusqu'à la mise sur le marché) et qui influencent la physiologie des fruits et donc leurs réponses aux attaques fongiques. Ces dernières sont contrôlées et régulées par l'expression de certains gènes. Une des approches pour comprendre les phénomènes et réactions impliqués dans la variation de sensibilité des bananes aux maladies de conservation en relation avec l'état physiologique de celles-ci à la récolte, consiste à identifier les gènes impliqués dans ces processus et à étudier leur expression.

La cDNA-AFLP est une technique moléculaire permettant l'analyse de gènes différemment exprimés entre plusieurs populations de cellules. La mise au point de cette technique sur le modèle « banane » permettra de caractériser les mécanismes cellulaires et les déterminants génétiques qui sous-tendent les réactions de sensibilité des bananes aux maladies post-récolte causées par *C. musae*.

Cette caractérisation devrait permettre une meilleure compréhension des deux maladies et de l'interaction hôte-pathogène ainsi que le développement d'une méthode de lutte plus réfléchie et efficace. A l'heure actuelle, la méthode utilisée est le traitement fongicide systématique après la récolte. Cependant, la lutte chimique pose certains problèmes. L'apparition de phénomènes de résistance aux fongicides a été observée. Les traitements ne sont pas toujours efficaces et les consommateurs demandent une diminution de ceux-ci, particulièrement en post-récolte. L'identification des gènes impliqués dans les variations de sensibilité mènera à la sélection de marqueurs moléculaires qui permettront peut-être l'identification de lots plus ou moins sensibles à *C. musae* au moment de la récolte. L'identification de ces lots pourrait servir, d'une part, à développer une lutte raisonnée, efficace et permettre une orientation des lots vers différents types de marchés. D'autre part, après identification de marqueurs moléculaires caractérisant l'état physiologique au moment de la récolte, il peut être envisagé de les utiliser afin d'obtenir une récolte homogène ayant un état physiologique reproductible, ce qui est impossible à l'heure actuelle.

## Chapitre 1 : Le bananier

### 1.1. Historique

L'origine géographique du bananier se situe en Asie du Sud-est, dans les jungles de Malaisie, d'Indonésie et des Philippines où plusieurs variétés sauvages existent encore de nos jours. L'extension de la culture a accompagné les grandes migrations humaines. Les premiers citoyens européens à la découvrir étaient les membres de l'armée d'Alexandre Le Grand au cours de leur campagne d'Inde en 327 avant Jésus-Christ (Atlas des Départements français d'outre-mer, 1982). Les Arabes l'ont importée en Afrique et les Portugais aux îles Canaries. L'introduction de la culture sur le continent Sud-Américain s'est faite à la suite des missions d'explorations des Espagnols et des Portugais. Son implantation aux Amériques s'est d'abord faite par la République Dominicaine en 1516 et s'est poursuivie vers l'Amérique Centrale et du Sud (Manuel du planteur, 1998). La domestication des bananiers a abouti à des cultivars stériles et parthénocarpiques.

Les productions bananières ont commencé à faire l'objet d'échanges internationaux dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Avant cette date, les Européens et les Nord-américains ne pouvaient les apprécier par manque de moyens appropriés à leur conservation et leur transport. Le développement des lignes de chemin de fer ainsi que les innovations technologiques dans le domaine du transport maritime réfrigéré leur ont permis de devenir le fruit le plus largement échangé à travers le monde.

### 1.2. Taxonomie

Les bananiers sont souvent différenciés en fonction de la qualité de leurs fruits et sont dits de type « dessert » pour les variétés riches en sucre, ou « à cuire » pour les variétés riches en amidon. Ceux de type dessert sont des monocotylédones classées de la manière suivante (Bakry *et al.*, 1997):

Ordre : Zingibérales

Famille : *Musaceae*

Genre : *Musa*

Le genre *Musa* est divisé en 4 sections : *Australimusa* ( $2n=2x=20$ ), *Callimusa* ( $2n=2x=20$ ), *Rhodochlamys* ( $2n=2x=22$ ) et *Eumusa* ( $2n=2x=22$ ).

Les bananes comestibles sont principalement issues de deux espèces sauvages diploïdes :

*Musa acuminata* Colla

*Musa balbisiana* Colla

Leurs génomes sont respectivement notés A et B depuis que Simmonds et Shepherd ont proposé cette représentation en 1955. Ces deux espèces se reproduisent par voie sexuée et par multiplication végétative à partir des rejets provenant du développement des bourgeons axillaires de la tige souterraine. Les plantes de ces deux espèces produisent des fruits remplis de graines.

Leur évolution et leur domestication par l'homme ont permis l'obtention des variétés actuelles qui sont généralement des clones triploïdes, stériles et parthénocarpiques. Elles sont issues soit de la seule espèce *M. acuminata* (AAA) soit de croisements interspécifiques entre *M. acuminata* et *M. balbusiana* (groupes AAB et ABB) (Fig. 1). Les variétés diploïdes (AA) et (AB) ainsi que les clones tétraploïdes interspécifiques sont plus rares.

On retrouve des types « dessert » parmi tous les grands groupes de bananiers mais ceux qui sont utilisés pour la culture d'exportation comme la Grande-Naine, la Poyo, la Gros-Michel et la Williams sont principalement des triploïdes de l'espèce *M. acuminata* AAA appartenant au sous-groupe des « Cavendish ». Ce sous-groupe représente à lui seul 47% de la production mondiale de bananes et 98% des bananes commercialisées dans le monde (Arias, 2004).

### 1.3. Aspect botanique

Le bananier est une herbe géante dont le pseudo-tronc, formé par l'emboîtement des gaines foliaires, mesure de 1 à 8 mètres (Champion, 1963) (Fig.2).

Les feuilles sont émises par le méristème terminal de la tige vraie souterraine improprement appelée « bulbe ». Les nouvelles feuilles se déroulent au sommet du pseudo-tronc et sont donc de plus en plus jeunes en se rapprochant du sommet. Par convention, elles sont numérotées de la plus jeune à la plus âgée (Bakry *et al.*, 1997). Le nombre de feuilles varie selon le cultivar et les conditions environnementales (Jones, 1999). Leur durée de vie varie entre 70 et 200 jours et leur surface foliaire peut atteindre 2 m<sup>2</sup>. Cette surface importante leur permet de canaliser les eaux de pluie au moment de la floraison (Stover et Simmonds, 1987).

Le bourgeon situé à l'aisselle de chaque feuille donne éventuellement naissance à un rejet. A la fin de la phase végétative, le changement de fonctionnement du méristème central



provoque la croissance et l'allongement de la tige vraie au cœur du pseudo-tronc puis l'émergence de l'inflorescence (Bakry *et al.*, 1997). Sept à neuf mois après la plantation du rejet, l'inflorescence se forme à la base du pseudo-tronc, et environ 1 mois plus tard, elle émerge au centre de la couronne de feuilles. Les fruits peuvent être récoltés entre 90 et 150 jours après l'émergence de l'inflorescence (Seymour, 1993).

#### **1.4. L'inflorescence et le développement des fruits**

Dans le cas des variétés Cavendish comme la Grande-Naine, la floraison intervient dès qu'une trentaine de feuilles sont émises (Bakry *et al.*, 1997).

L'inflorescence du bananier se caractérise par un pédoncule robuste recourbé vers le bas et d'environ 1m de long. Elle est constituée de spathes pourpres, déhiscentes, disposées en hélice, qui se soulèvent avant de tomber rapidement et à l'aisselle desquelles naissent les rangées simples ou doubles de fleurs (Fig.3). Ce sont les premières rangées de fleurs, appelées mains, qui forment les régimes de fruits. Ces premières rangées sont constituées de fleurs femelles avec un ovaire infère comprenant trois loges carpellaires à l'intérieur desquelles deux rangées d'ovules sont insérées sur un placenta axillaire et des étamines non fonctionnelles. Les ovaires se remplissent de pulpe pour former le fruit sans pollinisation ni formation de graines. Cependant, les fruits de certains clones cultivés produisent des graines lorsqu'ils sont pollinisés.

Les mains sont composées de 10 à 30 fleurs ou doigts insérés sur le coussinet et sont numérotées à partir de la première main dégagée. A l'anthèse, les doigts sont dirigés vers le bas et se redressent progressivement pour atteindre, en plus ou moins 15 jours, le stade appelé « stade doigts horizontaux ».

Après les fleurs femelles, apparaissent deux à trois mains de fleurs neutres avec toutes les pièces florales avortées, suivies par les mains de fleurs mâles constituées d'ovaires réduits et d'étamines bien développées. Les fleurs mâles tombent au fur et à mesure de leur libération, dénudant ainsi la partie inférieure de la hampe (Fig.4).

Chez certains cultivars, la croissance du méristème terminal de l'inflorescence s'interrompt immédiatement après la sortie des premières fleurs femelles. Mais, en général, la croissance de l'inflorescence se poursuit indéfiniment pour former le bourgeon mâle ou popote (Fig.4),

constitué de la superposition des bractées. S'il n'est pas coupé, ce bourgeon mâle prolongera sa croissance jusqu'à la maturité des fruits et la fanaison de la tige.

### **1.5. La maturation des fruits**

La vie des fruits se caractérise par un phénomène important. En effet lorsque certaines conditions sont remplies, on assiste à une série de phénomènes comme des changements de couleur, de saveur, la production de composés volatils, des modifications de la texture du fruit, etc... Ces phénomènes traduisent des variations métaboliques au niveau cellulaire : c'est la maturation (Hartmann, 1992). En 1960, Biale a classé les fruits en deux catégories : les fruits climactériques comme la pomme et la banane qui présentent une crise respiratoire liée à la maturation et les fruits non-climactériques, comme la cerise ou le citron, chez qui cette crise n'existe pas.

Les deux phases physiologiques de la maturation de la banane sont les phases pré- et post-climactériques. La phase pré-climactérique est considérée comme la phase de « vie verte » de la banane et la phase post-climactérique précède la sénescence du fruit. Le passage d'une phase à l'autre s'effectue à la suite d'une période d'intense respiration (Omoaka, 2000).

La banane, comme tous les fruits climactériques, a la particularité d'émettre aux cours de sa maturation d'importantes quantités d'un régulateur de croissance de nature gazeuse : l'éthylène. L'éthylène est une hormone de croissance associée à la maturation des fruits mais aussi à la réponse des plantes aux blessures, aux attaques de pathogènes et à d'autres stress (Arshad et Frankenberger, 2002). Cette hormone joue également un rôle dans le développement des symptômes de maladies. La forte activité respiratoire et le dégagement d'éthylène qui accompagnent la maturation sont nécessaires à l'induction des modifications physico- et bio-chimiques (Seymour, 1993). Bien que l'éthylène soit intimement liée dans l'initiation de la maturation des fruits climactériques, son mode d'action n'est pas connu de manière précise. Après la récolte, d'infimes quantités d'éthylène sont produites ce qui déclenche une augmentation de la respiration du fruit (Omoaka, 2000). Les blessures provoquent également des dégagements d'éthylène qui causent la maturation prématurée des fruits et augmentent le développement post-récolte de maladies de conservations (Ploetz *et al.*, 2003). Il est également reconnu que les champignons et moisissures produisent de l'éthylène en grande quantité, ce qui provoque également la maturation précoce des fruits contaminés (Biale, 1960 cité par Hartmann, 1992).

Pour augmenter la vie pré-climactérique des fruits il est conseillé d'avoir une bonne température de conservation après la récolte et de prévenir l'accumulation d'éthylène dans les zones de stockage.

Au cours de la maturation des bananes, les principaux changements rencontrés sont les suivants (Seymour, 1993):

- Une modification des pigments : La teneur en chlorophylle passe de 50-100µg/g de poids frais à presque zéro lorsque les fruits sont mûrs, tandis que le niveau de caroténoïdes de 8µg/g de poids frais reste constant.
- Des changements dans les parois cellulaires : le ramollissement des fruits lors de la maturation semble être intimement lié aux changements de structure des parois cellulaires et notamment à des dégradations enzymatiques de pectine. La dégradation de l'amidon semble également impliquée dans le ramollissement des tissus (Prabha et Bhagyalakshmi, 1998).
- Une modification de la composition de la banane influençant son goût. En particulier, l'amidon est transformé en sucre.
- Des modifications dans les composés volatils.

## 1.6. Composition de la banane

La composition de la banane (incluant la teneur en pigment, en d'amidon, en sucres et la nature de ses composés volatils) et ses activités enzymatiques dépendent de nombreux paramètres tels que le cultivar, les facteurs externes influençant la croissance du fruit et son état de maturité (Brat *et al.*, 2004 ; Zude, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Chang *et al.* (1990) ont observé d'importantes variations au niveau de la teneur en amidon, en tanins, en sucre mais également au niveau de l'activité pectinesterase, amylase et polyphénoloxydase entre les productions des différentes saisons et entre des bananes de stades de maturité différents.

Les bananes vertes subissent des changements biochimiques durant leur maturation. Ces changements incluent l'augmentation des polysaccharides solubles, des composés organiques, le clivage de la chlorophylle et la polymérisation des composés phénoliques (Lizada *et al.*, 1990).

La figure 5 reprend les principaux éléments rencontrés chez une banane verte de type Cavendish. L'eau et les carbohydrates constituent à eux seuls 90% du poids frais du fruit (Ngeze, 1994). A la récolte la pulpe fraîche des bananes desserts contient en moyenne 72,5% d'eau et la peau 89,9%. Au cours de la maturation la teneur en eau de la pulpe augmente

tandis que celle de la peau diminue d'une part par transpiration et d'autre part à cause de la pression osmotique élevée dans la pulpe (John et Marchal, 1995).

Les lipides et protéines ne sont présents qu'à l'état de traces. Les protéines représentent 1,2 % en moyenne de poids frais d'une banane verte (Ngeze, 1994). La teneur et la composition lipidique varient également au cours de la maturation du fruit (Wade et Bishop, 1978). Les lipides sont faiblement représentés mais jouent cependant un rôle important comme support d'arômes naturels dans le fruit. Les principaux acides gras rencontrés sont: l'acide palmitique, oléique, linoléique et linolénique avec une tendance à la perte d'acides gras insaturés au cours de la maturation (Seymour, 1993).

La plus grande modification biochimique durant la maturation est l'hydrolyse de l'amidon en sucres simples. Les bananes vertes contiennent un taux élevé d'amidon insoluble. Lors de la récolte, l'amidon est le constituant le plus abondant de la pulpe de banane en comparaison au glucose, fructose et saccharose (Lizada *et al.*, 1990). Ces derniers sont les trois principaux types de sucres rencontrés au sein des bananes mûres dans les proportions de 1:1:2 (Prabha et Bhagyalakshmi, 1998; Omoaka, 2000). Le saccharose apparaissant avant le glucose et le fructose. En terme de pourcentage de poids sec, chez la Cavendish, la teneur en amidon passe de 70-80% à moins de 1% en fin de phase climactérique tandis que les sucres, principalement le sucrose, représentent alors de 10 à plus de 16% en poids frais du fruit indiquant un taux élevé de conversion (Zhang *et al.*, 2005). Cette conversion durant la maturation des fruits implique différentes enzymes et de nombreuses voies de transformation encore inédites à l'heure actuelle (Zhang *et al.*, 2005). Toutefois, on sait que les amylases sont impliquées dans l'hydrolyse de l'amidon mais probablement pas dans la synthèse du saccharose (Zhang *et al.*, 2005) .

Les bananes contiennent d'autres composés hydrosolubles tels que les pectines et les acides aminés (Omoaka, 2000). Les hémicelluloses diminuent de 2,4% à 0,9% en poids de matière sèche au cours de la maturation et les pectines, quant à elles, passent de 1,1% à 0,8%. Aucun changement n'est par contre observé pour la cellulose (Prabha et Bhagyalakshmi, 1998).

Les bananes contiennent également les éléments majeurs suivants: Na, K, Ca, Mg et P ainsi que du Fe, Cu, Zn, Mn et B qui sont les éléments mineurs. Leur concentration varie également en fonction de divers paramètres comme le stade de maturité, le cultivars, les conditions de croissance et l'origine des bananes (Hardisson *et al.*, 2001).

Les bananes, et particulièrement la peau, sont des fruits riches en composés phénoliques. On y retrouve par exemple du 3,4-dihydroxyphenyléthylamine, 3,4-dihydroxyphenylalanine et de la dopamine (Seymour, 1993). Ces composés provoquent le brunissement des tissus lorsqu'ils sont oxydés par l'enzyme polyphénoloxydase. La dopamine est le principal substrat du brunissement des bananes (Palmer, 1971). Sa concentration dans la pulpe de bananes immatures est d'environ 50mg/g de pulpe fraîche et diminue de la moitié lorsque le fruit mûrit. Dans la peau des fruits verts sa concentration est en moyenne de 700mg/g de peau fraîche et la maturation réduit sa concentration à moins d'un tiers. Le taux de brunissement de la pulpe est fonction de la concentration en dopamine et en acide ascorbique (lequel inhibe le processus de brunissement) plutôt que la concentration seule en polyphénoloxidase (Weaver et Charley, 1974). Les tanins sont solubles dans l'eau et se retrouvent dans la peau et la pulpe du fruit (Turner, 1997). Mendez *et al.* (2003), ont observé que la teneur en composés phénoliques varie d'une région de production à l'autre tel que constaté entre les plantations de Ténérife et d'Equateur.

## Chapitre 2 : Itinéraire technique de la production d'exportation

Les bananes destinées à l'exportation peuvent être cultivées par de petits planteurs indépendants (présence forte dans les Caraïbes et en Equateur), par des Compagnies nationales comme Banacol ou Uniban-Turbana en Colombie ou par des entreprises multinationales de taille importante (leur présence est plus forte en Amérique Centrale et va grandissant en Afrique et en Asie). Les trois multinationales principales sont Chiquita Brands, Dole Foods et Fresch Del Monte Produce. Deux autres compagnies importantes sont Fyffes (le premier distributeur européen de produits frais) et Noboa Corporation (marque Bonita), premier exportateur équatorien.

Les différentes étapes rencontrées, de la plantation à la commercialisation, varient notamment en fonction de la structure de la filière et du pays, mais les grandes lignes sont conservées. Ainsi, de la plantation à la consommation, la banane dessert d'exportation exige de nombreuses opérations. Celles rencontrées dans les Antilles françaises sont détaillées ci-après à titre d'exemple :

### 2.1. De la plantation à la récolte

Les soins à effectuer sur la parcelle sont les suivants (Manuel du planteur, 1998) :

- **L'œilletonnage** consiste à sélectionner les rejets qui assureront le renouvellement des bananiers afin de garder la structure de la population constante.
- **L'effeuillage** assure la protection des fruits. Il faut éliminer certaines feuilles susceptibles d'abîmer les fruits par frottement après émergence de la tige.
- **Le marquage** se fait au stade « doigts horizontaux » et permet les prévisions de récolte. En effet, les différents régimes arrivés à ce stade sont marqués d'une bande de couleur spécifique dans le but de connaître leur âge et de prévoir la date de récolte à un âge physiologique déterminé. Les régimes arrivés au stade 900°C jours (voir point 2.2.) après le marquage sont récoltés la même semaine et les ouvriers se basent sur la couleur de coupe de la semaine pour effectuer la récolte des régimes. A chaque semaine de marquage correspond une couleur (Fig.6a et 6b).
- **Le haubannage** est une technique qui a pour but d'éviter la chute des régimes sous l'action du vent ou du poids du régime lorsque le système racinaire est défectueux. Le haut de la hampe est ainsi tenu par un ou deux brins de ficelle attachés aux pieds voisins (Fig.7).
- **L'engainage** consiste à emballer le régime dans une gaine plastique afin de tamponner les variations de température, de présenter une barrière mécanique contre les parasites et de protéger les fruits contre les agressions mécaniques dues par exemple aux frottements des feuilles (Fig.8).
- **L'ablation des fausses mains et de la popote** assure un bon allongement de l'ensemble des fruits (Fig.9).

## 2.2. La récolte

Les bananes destinées à l'exportation sont récoltées vertes et immatures. L'état physiologique des fruits au moment de la récolte conditionne leur évolution ultérieure en mûrisserie et notamment la vitesse de développement des champignons (Hostachy *et al.*, 1990).

L'intervalle de temps séparant le stade « doigts horizontaux » de la récolte s'appelle l'intervalle fleur-coupe et est soumis à une loi de la température. Il est donc possible de prévoir la récolte à partir de la date de marquage des régimes à l'aide d'une bande de couleur et de l'utilisation des données météorologiques. Le stade optimal de récolte des bananes d'exportation est basé sur la somme thermique de 900°C jours, calculée entre le jour de marquage au stade « doigts horizontaux » et la récolte avec un seuil minima de 14°C

considéré comme 0°C. En effet, en dessous de ce seuil de 14°C les températures ne sont pas comptabilisées dans le calcul des 900°C jours.

$$\text{Semaine de récolte} = \text{Somme } (T^{\circ}\text{moyenne/jour} - 14^{\circ}\text{C}) = 900^{\circ}\text{C jours}$$

Une récolte à 900°C jours permet un bon compromis entre le remplissage du fruit (grade à la récolte) et son potentiel de conservation appelé « durée de vie verte » qui correspond à l'intervalle de temps séparant la récolte de la crise respiratoire. Cependant, la physiologie de la banane est influencée par de nombreux facteurs qui ne sont pas encore connus ou maîtrisés et le calcul des prévisions de récoltes à 900°C jours n'est pas toujours suffisant pour obtenir un état physiologique reproductible.

La récolte du régime marque le début du dépérissement du pied-mère qui est alors coupé. Sa suppression enlève la dominance apicale sur le rejet préalablement sélectionné et permet de poursuivre la culture.

### **2.3. Les opérations à la station d'emballage**

Les régimes récoltés sont disposés sur des coussins protecteurs dans un camion avant d'être déchargés et suspendus dans une penderie (Fig.10a). Toutes ces opérations nécessitent beaucoup d'attention. En effet, les blessures occasionnées pendant la récolte et le conditionnement des fruits aggravent les dégâts causés par les champignons durant le transport et le mûrissement, d'où la nécessité de réduire ces blessures (Hostachy *et al.*, 1990). Arrivés à la station d'emballage, les régimes subissent les opérations successives suivantes (Manuel du planteur, 1998) :

- **L'épistillage** : consiste à enlever le reste des pièces florales à l'extrémité du fruit (Fig.10b).
- **Le dépattage** : consiste à désolidariser les mains de la hampe florale, en utilisant un couteau courbe et en maintenant une partie suffisante de la couronne sur les mains (Fig.10c). Ceci est réalisé afin de permettre la découpe en bouquets sans perte de fruits et avec une couronne de section carrée (Fig.10e).
- **La découpe** : les mains sont découpées en bouquets de trois à huit fruits exempts de défaut (Fig.10d). Ceux des extrémités des mains et ceux présentant des défauts sont éliminés.
- **Le trempage** : les fruits sont d'abord plongés dans le bac de dépattage où les mains sont découpées en bouquets. Ces derniers passent ensuite dans les bacs de rinçage (Fig.10f). Le

temps d'immersion dans ces deux bacs doit être suffisant pour permettre l'écoulement du latex au niveau des zones de découpe. Le latex y est floculé par des agents acidifiants comme le sulfate d'aluminium. Les bouquets sont ensuite récupérés et placés sur des plateaux disposés sur un tapis roulant qui les emmène vers les tunnels de traitement fongicide (Fig.10g).

- **Les traitements fongicides :** visent à réduire le développement de maladies post-récolte et se font principalement par un passage dans un tunnel d'aspersion (Fig.10h).
- **La pesée des fruits et l'emballage :** un assemblage de bouquets doit permettre d'obtenir des cartons de 18,5 kg qui seront stockés sur des palettes empilées dans des containers (Fig.11a). Ceux-ci seront amenés au port et reliés à une prise de froid (Fig.11b). Le délai de coupe/mise au froid ne doit pas excéder 24 h. La mise au froid permet d'une part, de minimiser la production d'éthylène et de retarder le processus de maturité et d'autre part, de réduire le développement de champignons éventuellement présents (Krauss et Johanson, 2000).

## **2.4. Le transport des fruits et leur mise sur le marché**

Les cartons de bananes, maintenus à une température de 13°C afin de ralentir leur activité métabolique, sont transportés par bateau (Fig.11c) jusqu'au pays de destination.

La période séparant la récolte de l'initiation de la maturation est appelée « durée de vie verte » (DVV). Les bananes d'exportation doivent avoir une DDV supérieure au temps du transport en bateau. Dans ce cas, la fin de la DDV coïncide avec le déclenchement artificiel en mûrisserie de la maturation des bananes.

Avant d'être mises sur le marché, les bananes subiront un traitement en mûrisserie de quelques jours afin de déclencher artificiellement la maturation par un apport d'éthylène exogène pendant 24 heures, à une dose de 1000 µl/L et à une température de 14°C-18°C.

Si la durée de vie verte des bananes est inférieure à la durée du transport en bateau, les bananes arrivent mûres dans le pays importateur et ne peuvent être commercialisées. Ce phénomène s'appelle les « mûrs d'arrivage ». Par ailleurs, les champignons impliqués dans le développement des maladies de conservation ont un effet sur la réduction de la DDV et provoquent régulièrement des « mûrs d'arrivage ».



## **Chapitre 3 : Le marché international de la banane**

Les bananes sont cultivées dans l'ensemble des régions tropicales et jouent un rôle clé dans l'économie de nombreux pays. En terme de valeur brute de production, les bananes représentent, par ordre d'importance, la quatrième culture vivrière du monde après le riz, le blé et le maïs. Elles sont cultivées dans plus de 120 pays sur près de 10 millions d'hectares et constituent autant une denrée de base qu'une marchandise d'exportation. La production mondiale de banane s'est accélérée depuis 1990 pour devenir actuellement l'une des principales productions mondiales de fruits. Selon la FAO, le montant annuel total des exportations mondiales est évalué à plus de 4 milliards de dollars américains. Pendant la période comprise entre 1985 et 2002, le volume des bananes exportées dans le monde a enregistré un taux de croissance annuel moyen sans précédent de 5,3%, soit deux fois celui des 24 années précédentes. L'industrie de la banane engendre donc de toute évidence une source vitale de revenus, d'emplois et de recettes d'exportation pour la majeure partie des pays exportateurs, principalement les pays en développement où 98% de la production mondiale sont enregistrés.

Le commerce international de la banane est très complexe et suscite une certaine animosité entre quelques pays européens, particulièrement la France, et les Etats-Unis. Il peut être divisé en trois systèmes d'échanges internationaux. Le premier comprend les Etats-Unis et le Canada qui ne cultivent pas de bananes et s'approvisionnent en Amérique latine. Le second système (Europe) comprend l'ensemble du continent et les pays de l'ex-URSS pour la demande, et les pays d'Amérique latine, d'Afrique occidentale et de l'Europe ultra périphérique (Caraïbes, Madère, Canaries) pour l'offre. Le troisième système d'échanges (Asie) se compose des pays d'Asie et du Moyen-Orient qui se fournissent principalement aux Philippines et en Equateur.

Depuis des années, les Européens et les Américains se livrent une guerre commerciale autour de la banane. Jusqu'en 1993, les bananes "dollars" étaient importées sans frais de douane à travers les filières intégrées des sociétés américaines qui en contrôlent la production, le transport, le mûrissage et la distribution. Cette exonération de droits permet aux dites entreprises de réaliser des bénéfices colossaux, le fruit étant produit à très bas prix en Amérique Latine.

Effective depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1993, l'Organisation Commune du Marché de la Banane (OCMB), créée dans le cadre de la mise en place du marché unique européen, a institué un régime d'aides compensatoires destiné à assurer un revenu minimum aux producteurs

européens. Mais la commission dut immédiatement faire face à une double pression: celle des multinationales américaines et celle du front de refus des principaux importateurs de bananes "dollars": l'Allemagne et le Benelux. Les bananes européennes et celles des pays ACP, plus chères, bénéficient d'importantes aides de l'Union Européenne. En effet, elles sont produites avec des coûts de main-d'œuvre bien plus élevés que les bananes sud-américaines et dans des conditions climatiques moins favorables. En avril 1994, l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) est créée et dénonce rapidement le principe des quotas spécifiques mis en place par l'Union Européenne. En effet, le marché européen, l'un des plus importants et des plus rentables, absorbe chaque année 3,9 millions de tonnes de manière contingentée: 850 000 tonnes de production communautaire en provenance des îles dont 150 000 tonnes de Guadeloupe, 857 000 tonnes venant des pays ACP sans frais de douane et 2,2 millions de tonnes des pays d'Amérique Latine, dont les bananes dites « bananes dollars ». Ces dernières sont commercialisées par des firmes principalement américaines et sont soumises aux droits de douane. L'OCMB privilégie ainsi les bananes communautaires et les bananes des pays ACP par un système de prix garanti et d'aides compensatoires.

Ce système est jugé discriminatoire et non conforme aux règles du commerce international par l'OMC. Aussi, malgré une première modification de l'OCMB, le 1<sup>er</sup> janvier 1999 sous la pression des producteurs de « bananes dollars » et une diminution consécutive des droits de douane pour ces pays, le nouveau régime européen d'importation est à nouveau dénoncé par l'OMC qui conteste, en particulier, le principe des quotas spécifiques.

Ainsi, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2006, la protection communautaire et celle des pays ACP ne seraient plus assurées que par les droits de douane. A partir de cette date, la concurrence avec les « bananes dollars » risque donc de s'accroître et les prix payés aux producteurs pourraient diminuer. De plus, la qualité de la banane européenne et ACP souffre d'une mauvaise réputation. En effet, les accidents de maturation et les maladies de conservation en diminuent la qualité.

## **Chapitre 4: Les maladies de conservation des bananes causées par *Colletotrichum musae***

### **4.1. La pourriture de couronne et l'antracnose**

La pourriture de couronne et l'antracnose constituent les deux principales maladies de post-récolte des bananes d'exportation (Krauss *et al.*, 1998). Elles se développent au cours du stockage et du mûrissage des bananes. L'antracnose résulte de l'action unique de *C. musae* tandis que les pourritures de couronne sont causées par l'action d'un complexe parasitaire dont *C. musae* fait partie. Ce champignon ainsi que les maladies qui lui sont associées ont été signalées dans tous les pays où la culture du bananier est pratiquée et dans tous les pays importateurs (CAB international, 2000).

Ces deux maladies entraînent des pertes importantes à l'exportation en affectant sévèrement la qualité des fruits. Cette mauvaise qualité est caractérisée par le développement de nécroses sur les fruits (Fig. 12 et 13) et de « mûrs d'arrivage » (Slabaugh et Grove, 1982). Ces derniers résultent d'un effet indirect de la contamination des fruits par *C. musae*. Ils sont provoqués par l'éthylène provenant des tissus nécrosés et des champignons. Il en résulte une réduction de la durée de vie verte des fruits et une maturation accélérée de ceux-ci qui entraîne une dévalorisation du produit, des difficultés de commercialisation sur le marché européen et donc des pertes économiques importantes (Nolin, 1989).

### **4.2. Les variations de sensibilité des bananes à *C. musae* et l'impact de la physiologie du fruit**

Des variations dans l'expression des symptômes ont été observées pour les deux maladies (Chillet et de Lapeyre de Bellaire, 1996 ; Chillet *et al.*, 2000 ; Lukezic *et al.*, 1967 ; Lassois, 2003 ; Demoulin *et al.*, 2004). Ces variations sont d'ordre spatial et temporel et sont liées à ce que l'on appelle une variation du potentiel de qualité du fruit. La figure 14 montre que ce potentiel de qualité se définit comme ayant une composante physiologique qui conditionne la sensibilité des fruits et une composante pathologique. Cette dernière est fonction, d'une part de la pollution du fruit, c'est-à-dire la quantité de conidies qui atteignent le fruit, et d'autre part du taux de contamination du fruit c'est-à-dire la quantité de conidies qui formeront un appressorium.

En accord avec cette hypothèse, un tel potentiel s'élaborerait pendant la phase de croissance des bananes et dépendrait entre autre des facteurs pédoclimatiques de la zone de production ainsi que des pratiques agricoles intervenant aux différentes étapes de la production (Chillet et de Lapeyre de Bellaire, 1996). Ces facteurs influencent la composante physiologique du potentiel en déterminant notamment la nutrition minérale et la disponibilité en eau des plants de bananiers (Chillet et de Lapeyre de Bellaire, 1996).

Frossard *et al.*, (1977) ont quant à eux précisé que la sensibilité des fruits aux pourritures de la couronne variait non seulement d'un régime à l'autre, mais également, sur un même régime, d'une main à l'autre.

Les différences de sensibilité observée entre régimes récoltés le même jour démontre l'importance de la physiologie de la banane dans l'expression des symptômes. Elle prouve que, même si le seuil de 900°C jours permet d'homogénéiser la récolte, il n'a cependant pas permis d'atteindre un état physiologique reproductible.

Il semble maintenant bien établi que divers facteurs déjà cités, comme les conditions de croissance du bananier, les facteurs pédo-climatiques et les pratiques culturales influencent la sensibilité des bananes à *C. musae* ainsi qu'à d'autres champignons. Néanmoins, les processus sous-jacents n'ont pas encore été mis en évidence.

## **Chapitre 5 : Apport de la biologie moléculaire dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la variation de sensibilité des bananes à *C. musae***

### **5.1. Introduction**

Le développement des maladies post-récolte causées par *C. musae* est fonction de deux facteurs importants: la pression d'inoculum rencontrée et la réponse physiologique du fruit à cette pression. Les réponses biologiques du fruit, et notamment son évolution physiologique et sa sensibilité aux champignons, sont contrôlées et régulées par l'expression de certains gènes liés à des voies métaboliques particulières. Si le génome est identique dans chacune des cellules d'un organisme donné, les gènes peuvent avoir une expression différenciée dans le temps (propre à un stade du développement), dans l'espace (propre à un type cellulaire) et caractéristique d'un état donné.

Une des approches pour comprendre les phénomènes et réactions impliqués dans la variation de sensibilité des bananes aux maladies de conservation en relation avec l'état physiologique de celles-ci à la récolte, consiste à identifier les gènes impliqués dans ces processus via l'étude de leur expression.

### **5.2. Mise en évidence de gènes différemment exprimés**

L'analyse de l'expression des gènes peut s'effectuer à partir des ARNm ou des protéines. Malgré les progrès enregistrés par la protéomique, l'étude de l'expression des gènes à travers le transcriptome reste moins complexe à mettre en œuvre. Cependant, son principal inconvénient est le biais introduit par les phénomènes s'opérant au moment de la traduction ou de l'adressage de la protéine.

L'évolution et les progrès réalisés tant en biologie moléculaire qu'en génie génétique offrent de nos jours un large éventail de techniques pour étudier l'expression différentielle de gènes dans un tissu donné à partir des transcrits. Les méthodes utilisées doivent idéalement répondre à plusieurs critères (Liang *et al.*, 1995):

- visualisation de la plupart des ARNm transcrits dans la cellule,

- reproductibilité élevée,
- comparaison possible entre ARNm issus de différentes sources,
- facilité et rapidité de mise en œuvre,

Il existe différentes techniques permettant l'analyse de l'expression différentielle d'un gène. Massart (2005) les classe en 3 catégories :

- Les techniques d'hybridation : hybridation différentielle et soustractive
- Les techniques basées sur la PCR : Differential display, RAP-PCR, cDNA-AFLP
- Les puces à ADNc

La technologie des puces à ADN ou bio-puces connaît à l'heure actuelle un essor important et suscite l'intérêt dans la communauté scientifique. Grâce à cette technologie, la mesure simultanée du niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes voire d'un génome entier placé dans des conditions physiologiques ou pathologiques différentes, est rendue possible.

Son utilité est scientifiquement incontestable car la connaissance du niveau d'expression différentielle d'un gène constitue notamment une avancée vers la connaissance de sa fonction et l'identification de nouveaux outils de diagnostic. Les puces à ADNc assurent depuis une dizaine d'années le compromis entre fiabilité et rapidité. Malheureusement, cette technique n'est applicable qu'aux organismes qui sont génétiquement bien caractérisés.

Un consortium international a été créé en juillet 2001 dans le but de séquencer le génome du bananier qui sera ainsi la première espèce végétale exclusivement tropicale à être séquencée. Cependant, la génomique des bananiers en est à ses balbutiements et les informations sur la séquence du génome sont encore restreintes (Dickman, 2004). Comptant seulement 11 chromosomes et un total de 500 à 600 millions de paires de bases, le génome du bananier est l'un des plus petits parmi les espèces végétales et les chercheurs espèrent donc parvenir rapidement à des résultats.

Parmi les autres techniques, la cDNA-AFLP a retenu notre attention car elle répond bien aux critères émis par Liang *et al.* (1995) et est plus facile à mettre en œuvre que les techniques d'hybridation. Reijans *et al.* (2003) ont comparé les techniques cDNA-AFLP et micro-arrays chez *Saccharomyces cerevisiae* et leurs résultats montrent que la cDNA-AFLP est une très bonne alternative aux micro-arrays. Ramonell et Somerville (2002) présentent également la cDNA-AFLP comme une très bonne alternative aux micro-arrays dans les travaux de découverte de gènes.

### 5.3. La cDNA-AFLP

#### 5.3.1. Introduction

Cette technique dérive de l'AFLP (amplified fragment length polymorphism), basée sur une amplification PCR et développée à l'origine pour cartographier l'ADN génomique par Vos *et al.* (1995). L'AFLP a été adaptée à l'analyse de l'expression d'ARNm dans le domaine du végétal et la cDNA-AFLP est décrite pour la première fois par Bachem *et al.* (1996). Depuis son introduction en 1996, cette technique est devenue un outil de référence pour l'étude des gènes différemment exprimés.

#### 5.3.2. Principe

La cDNA-AFLP consiste en la comparaison au moyen de la RT-PCR des populations d'ARNm transcrits par différentes populations de cellules. Ce large screening permet de mettre en évidence la transcription différentielle de gènes dont la fonction est "*a priori*" inconnue.

Elle permet la comparaison de transcriptomes issus de cellules ou tissus similaires et l'isolement de gènes différemment exprimés ainsi que leur identification (Bachem *et al.*, 1998 ; Bachem *et al.*, 2001 ; Van der biesen *et al.*, 2000 ; Durrant *et al.*, 2000).

La technique implique trois étapes (Kuhn, 2001):

- restriction de l'ADNc et ligation d'adaptateurs,
- amplification sélective,
- analyse sur gel des fragments amplifiés.

« Après rétrotranscription, l'ADNc double brin synthétisé est digéré par un couple d'enzymes de restriction possédant un site de reconnaissance de 4 paires de bases pour l'un et de 6 paires de bases pour l'autre. Les extrémités des fragments digérés sont ensuite liguées à des adaptateurs spécifiques à chaque site de restriction. Tous les ADNc digérés et ligués sont alors amplifiés grâce à un couple d'amorces s'hybridant chacune avec un des deux adaptateurs. Cette étape, appelée pré-amplification, produit de nombreux fragments différents qui ne peuvent être séparés sur un gel de polyacrylamide. Une seconde amplification, appelée

amplification sélective, est réalisée au moyen d'amorces sélectives. Ces amorces contiennent, en plus de la séquence de l'adaptateur, une, deux ou trois bases supplémentaires en 3' qui permettent d'amplifier sélectivement les fragments d'ADNc possédant en 5' les nucléotides complémentaires. Dès lors, seul un petit nombre de fragments, séparables sur un gel de polyacrylamide, est amplifié. Le marquage radioactif d'une des deux amorces permet de visualiser les fragments par autoradiographie. » (Massart, 2005).

### 5.3.3. Avantages

La technique cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996 ; Reijans *et al.*, 2003) présente les avantages suivants:

- elle permet de travailler sans "*a priori*" et ne nécessite pas de connaissance préalable sur les gènes à étudier. Elle est donc adaptée à l'identification de nouveaux gènes (Ramonell et Somerville, 2002 ; Feron, 2004);
- plus de deux populations d'ARNm peuvent être comparées simultanément et elle permet d'amplifier l'ensemble des ADNc rétrotranscrits ;
- sa reproductibilité est très élevée (Matz et Luckyanov, 1998; Khun, 2001; Campalans *et al.*, 2001 ; Feron, 2004) et peut atteindre 100%;
- elle présente un taux de faux positifs faible, inférieur à celui d'autres techniques similaires telle que le differential display (Matz et Luckyanov, 1998; Khun, 2001; Campalans *et al.*, 2001).
- La technique est très sensible et permet une détection des transcrits présents en faible quantité (Savelkoul, 1999 ; Ramonell et Somerville, 2002; Feron, 2004). Bachem *et al.* (1998) ont évalué la sensibilité de la cDNA-AFLP à une copie d'ARNm par cellule.
- Son coût reste faible et elle ne nécessite pas de matériel spécifique ce qui en fait une technique abordable pour des laboratoires de moindre dimension (Ramonell et Somerville, 2002).

Sa reproductibilité et son faible taux de faux positifs proviennent principalement de l'utilisation d'amorces spécifiques et d'une température d'hybridation élevée (de 63°C à 56°C) lors des amplifications.



#### 5.3.4. Inconvénients

Malgré ses nombreux avantages, la cDNA-AFLP présente néanmoins quelques inconvénients. Un seul ARNm initial peut entraîner l'amplification de plusieurs fragments ce qui contribue à compliquer l'interprétation des résultats (Matz et Luckyanov, 1998 ; Lorkowski, 2004). D'autre part, les ADNc ne possédant pas les sites de restriction des enzymes utilisés ne sont pas analysés par la méthode (Habu *et al.*, 1997 et Lorkowski, 2004 cité par Massart, 2005).

Ramonell et Somerville (2002) soulignent d'une part que la technique ne fournit pas de données quantitatives au sujet de l'abondance relative de transcrits, contrairement aux microarrays e, d'autre part, que les informations sur les gènes différemment exprimés sont limitées aux bandes qui sont séquencées.

De plus, les relations entre les transcrits et les protéines ne sont pas toujours linéaires.

#### 5.3.5. Application de la méthode

La cDNA-AFLP et son application aux plantes a été décrite pour la première fois par Bachem *et al.*, (1996), qui ont analysé l'expression différentielle de gènes dans des systèmes *in vitro* de tubérisation de *Solanum tuberosum*. Par la suite la cDNA-AFLP a encore été appliquée sur ce modèle (Trindade *et al.*, 2003 ; Trindade *et al.*, 2004)

Habu *et al.*, (1997) ont comparé les ARNm de deux lignées d'*Ipomoea purpurea*. La technique a également été appliquée pour identifier les gènes différemment exprimés chez les génotypes de riz sensibles et résistants au froid (Ivashuta *et al.*, 1997) et ceux exprimés lors d'un stress hydrique chez une variété de riz tolérante à la sécheresse (Rodríguez *et al.*, 2005). Elle a également servi dans l'analyse des ARNm chez *Arabidopsis thaliana* (de Diego *et al.*, 2005 ; Mondego *et al.*, 2003). Signalons que *Arabidopsis* est une plante modèle très précieuse qui a servi dans diverses branches de la biologie végétale et notamment en pathologie et en physiologie. Son étude a fourni de nombreuses indications directement applicables aux plantes cultivées. Cependant, il s'agit d'une dicotylée et le riz est préféré comme modèle d'étude pour établir des liens avec le bananier.

La cDNA-AFLP a également permis de mettre en évidence des parallèles intéressants entre les réponses des plantes aux pathogènes et aux contraintes environnementales et l'expression des gènes qui établissent ces réponses (Ramonell et Somerville, 2002). Ditt *et al.* (2001 ; 2005) ont mis en évidence les gènes de défense exprimés chez *Ageratum conyzoides* lors d'une infection à *Agrobacterium tumefaciens*. Zhang *et al.* (2003) ont exploité la cDNA-AFLP pour isoler des gènes de blé et de rouille qui sont exprimés à certains moments de l'infection. Chen *et al.* (2003) ont étudié les gènes différemment exprimés entre une variété de blé résistant aux stress osmotiques et une variété sensible.

La cDNA-AFLP a également été appliquée sur d'autres modèles que les modèles végétaux comme par exemple sur les ARNm provenant de mammifères tels que les ARNm de chevaux (Cappelli *et al.*, 2005) et de rats (Fukuda *et al.*, 1999), mais aussi de champignons (Avrova *et al.*, 2003), levures (Reijans *et al.*, 2003) et bactéries (Decorosi *et al.*, 2005).

#### **5.4. Les méthodes d'extraction d'ARN**

La mise au point d'une méthode d'extraction efficace et reproductible d'ARN est la première étape à effectuer avant même la mise au point de la cDNA-AFLP. L'efficacité d'une méthode d'extraction d'ARN est évaluée par la quantité, la qualité et l'intégrité des ARN obtenus. L'extraction d'ARN totaux et messagers de bonne qualité, débarrassés de protéines, d'ADN génomique et des métabolites secondaires, est cruciale pour les analyses moléculaires comme la cDNA-AFLP.

Certaines difficultés viennent compliquer le travail d'extraction d'ARN. En effet, comparé à l'ADN, l'ARN est relativement instable et cela est largement dû à la présence des ribonucléases (RNases) qui dégradent les molécules d'ARN. Les RNases sont stables, ne requièrent pas de cofacteurs et sont effectives en très petites quantités. Ces enzymes sont véritablement difficiles à inactiver et il est donc primordial de limiter les contaminations par des RNases exogènes en appliquant les précautions décrites en détail au chapitre 1 de la partie matériel et méthode. De plus, certains produits sont ajoutés au cours des extractions afin de limiter l'action des RNases endogènes. Ainsi, l'isothiocyanate de guanidine et la protéinase K permettent de dénaturer les protéines et donc de limiter l'action des RNases et la dégradation des ARN (Nassuth *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 1998 ; Asif *et al.*, 2000, Wan et Wilkins, 1994).

Il existe de nombreuses méthodes d'extractions décrites dans la littérature qui sont effectuées en quelques heures avec un minimum de matériel sur la plupart des organismes (Gerstein, 2001 ; Assubel, 1994). Cependant, ces méthodes dites traditionnelles ainsi que les kits commerciaux disponibles ne sont pas toujours efficaces pour extraire des ARN de tissus végétaux (Chang *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 1998 ; Wan et Wilkins, 1994 ; Gerhig *et al.*, 2000 ; Mehar h. Asif *et al.*, 2000 ; Gao *et al.*, 2001). En effet, les auteurs travaillant sur des techniques d'extractions d'ARN s'accordent sur les difficultés d'obtenir des molécules d'ARN de très bonne qualité et en quantité suffisante à partir de tissus végétaux riches en composés phénoliques, polysaccharidiques et autres substances interférant lorsqu'on utilise des procédures d'isolation d'ARN conventionnelle (Wan et Wilkins, 1994 ; Gerhig *et al.*, 2000 ; Mehar h. Asif *et al.*, 2000).

Les composés phénoliques sont rapidement oxydés ce qui leur permet de se lier ou de co-précipiter avec les molécules d'ARN formant ainsi des complexes insolubles qui seront probablement éliminés lors des extractions et qui rendent donc les ARN inutilisables. De plus, les contaminations par les composés phénoliques altèrent la qualité des molécules d'ARN obtenues. Il est donc indispensable de les inactiver ce qui complique largement les procédures d'extraction d'ARN (Gerhig *et al.*, 2000). Divers produits sont ajoutés au cours des procédures d'extraction afin de limiter les problèmes causés par les composés phénoliques. Le PVP (polyvinyl pirolidone) les complexe et les anti-oxydants comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol les empêchent également d'agir (Salzman *et al.*, 1999). Le borate permet de les piéger en formant avec eux des complexes insolubles via les ponts hydrogènes (Mbéguié-A-Mbéguié, 2000).

Certains métabolites de plantes comme les polysaccharides ont des propriétés physico-chimiques similaires aux acides nucléiques ce qui rend difficile leur élimination lors des préparations d'ARN. Les polysaccharides peuvent co-précipiter et contaminer les ARN durant les extractions et affecter ainsi le rendement et la qualité (Asif *et al.*, 2000 ; Gerhig *et al.*, 2000). L'acétate de potassium permet de précipiter les polysaccharides et les extractions au phénol/chloroforme/alcool isoamylique permettent d'éliminer les polysaccharides mais aussi les composés secondaires. (Nassuth *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 1998 ; Asif *et al.*, 2000, Wan et Wilkins, 1994). Le phénol est un agent organique dénaturant qui précipite les protéines.

De plus, certains métabolites et contaminants introduits lors des procédures de purification (comme les sels ou phénol) peuvent inhiber certaines réactions enzymatiques ou causer, d'une part des variations dans les mesures spectrophotométriques et d'autre part des interférences au cours de la migration des ARN totaux sur gel.

---

## Objectifs du travail

Cette étude s'intègre dans un projet visant à identifier les mécanismes cellulaires et les déterminants génétiques qui sous-tendent les réactions de sensibilité des bananes aux maladies de conservation causées par *C. musae*. L'identification de ces mécanismes se fera par l'étude des gènes différemment exprimés au niveau transcriptionnel entre des bananes tolérantes et sensibles à ces maladies et permettra d'identifier des marqueurs moléculaires de sensibilité. La réussite de l'analyse de ces gènes étant largement dépendante de la qualité et de la pureté des ARNm, un effort important doit être consenti afin d'obtenir un extrait contenant des ARNm de bonne qualité et en quantité suffisante pour procéder à leur analyse.

L'isolement d'ARN de qualité à partir des tissus de banane est difficile à cause du taux élevé de polysaccharides, polyphénols et autres substances interférant lorsqu'on utilise des procédures d'isolement d'ARN conventionnelles. Ces substances ne diminuent pas seulement le rendement mais la faible qualité de l'ARN le rend presque inutilisable. Il est donc essentiel d'employer une méthode permettant de d'éliminer efficacement ces contaminants sans affecter le rendement.

Il existe dans la littérature un certain nombre de protocoles d'extractions d'ARN de végétaux riches en composés phénoliques et polysaccharidiques.

Le but de cette étude est d'en tester certains, de les comparer afin d'obtenir des ARNm de qualité et en quantité suffisante et de pouvoir sélectionner le protocole le plus adéquat à la réalisation de la cDNA-AFLP. Cette démarche a été effectuée sur deux types de tissus de banane à savoir la pulpe et la peau et à deux moments différents, en phase pré- et post-climactérique.

## **1. Travailler avec les ARN et l'environnement RNase Free**

Afin de limiter les contaminations par des ribonucléases (RNases), il est impératif d'appliquer certaines précautions permettant l'établissement d'un environnement RNase-free. Ces précautions s'appliquent aux matériels et aux réactifs utilisés et sont décrites en annexes 1 et 2.

Les sources les plus fréquentes de contaminations sont les mains (la peau), les bactéries et pourritures qui sont présentes dans les particules de poussières en suspension dans l'air ou sur le matériel de laboratoire (Ambion, 2005).

De plus, toutes les manipulations concernant les ARN sont réalisées sur glace afin de limiter leur dégradation.

## **2. Matériel végétal**

Les bananes employées appartenaient toutes à la variété Grande-Naine du cultivar « Cavendish ». Les méthodes d'extraction d'ARN ont été testées sur peau et pulpe de bananes vertes, avant le traitement de celles-ci à l'éthylène, et sur peau et pulpe de bananes mûres. Que ce soit de peau ou de pulpe de bananes vertes ou mûres, les échantillons sont finement broyés dans un mortier à l'aide d'azote liquide. Le mortier avait préalablement été passé une nuit au four à 180°C pour éliminer les RNases.

## **3. Description des protocoles d'extraction d'ARN utilisés**

### **3.1. Protocole « Wan et Wilkins modifié »**

#### **3.1.1. Introduction**

Ce protocole est basé sur celui présenté par Wan et Wilkins (1994). Il a été modifié par une équipe du CIRAD-FLHOR (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, section cultures fruitières, légumières et horticoles) de Neufchâteau en Guadeloupe et transmis à titre personnel par Didier Mbéguié-A-Mbéguié.

### 3.1.2. Principe

Le tampon d'extraction se compose des éléments suivants :

- 200 mM de BORAX
- 2% de PVP 40
- 30 mM EGTA
- 1% de SDS
- 10 mM DTT(dithitritol) en poudre
- 1% de sodium déoxycholate
- 0,5% Igépal CA-630

Le tout a été dissous à chaud et le pH ajusté à 9,0 avant d'autoclaver la solution. Le tampon a été stocké à TEMPÉRATURE ambiante jusqu'à son utilisation.

La procédure d'extraction s'effectue sur 2 jours :

#### JOUR 1 (4h)

Le tampon d'extraction a été préalablement mis à chauffer 10 minutes dans un bain à 80°C avant d'en prélever 1,2 ml et de l'ajouter à 0,24g de matériel végétal finement et fraîchement broyé. Le tout a été homogénéisé à la main et par passage au polytron à vitesse maximale. Ensuite, 0,6 mg de protéinase K ont été ajoutés et l'ensemble a été agité vigoureusement à la main et mis à incuber 1h30 à 42°C sous faible agitation. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 20 min à 17 210g et à 4°C et le surnageant a été récupéré dans un tube préalablement refroidi. Du chlorure de lithium 10M a été ajouté au surnageant afin d'obtenir une concentration finale de 2M. Le tout a été mélangé vigoureusement et mis à incuber durant une nuit à 4°C.

#### JOUR 2 (3h):

Les échantillons récupérés ont immédiatement été mis à centrifuger 20 min à 38 700 g et à 4°C. Le surnageant a été éliminé par renversement du tube et 100 µl de LiCl 2M froid ont été ajoutés au culot. Les échantillons ont été de nouveau mis à centrifuger 5 minutes à 38 700 g et à 4°C, le surnageant a été éliminé à l'aide d'une pipette et le culot d'ARN a été dissous dans 600 µl d'eau DEPC froide. Les échantillons ont ensuite été mis 15 minutes sur glace en agitant régulièrement et doucement et mis à centrifuger à 38 700 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été soigneusement récupéré et les protéines contaminantes ont été éliminées

par une extraction au phénol-phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) et chloroforme/alcool isoamylique (24/1) comme suit :

- 600 µl de phénol ont été ajoutés au surnageant. Le tout a été vortexé et mis à centrifuger 5 minutes à 16 600 g 4°C afin d'y récupérer le surnageant.
- 600 µl du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) ont été ajoutés au surnageant et le tout a été mélangé au vortex et mis à centrifuger 5 minutes à 16 600 g 4°C afin d'y récupérer le surnageant.
- 600 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) ont été ajoutés au surnageant et le tout a été mélangé au vortex et mis à centrifuger 5 minutes à 16 600 g 4°C afin d'y récupérer le surnageant.

De l'acétate de potassium 5M pH 5,5 a été ajouté au surnageant de manière à obtenir une concentration finale de 0,2M. L'ensemble a été mélangé au vortex et incubé 15 minutes sur glace avant d'être centrifugé 10 minutes à 16 600 g à 4°C. Enfin, le surnageant a été récupéré et 2,5 volumes d'éthanol pur lui ont été ajoutés. Le tout a été vortexé et les ARN ont ainsi été mis à précipiter au moins une nuit à -20°C.

### 3.2. Protocole de Liu *et al.* (1998)

#### 3.2.1. Introduction

Ce protocole est issu de Liu *et al.* (1998).

#### 3.2.2. Principe

Le tampon d'extraction se compose des réactifs suivants :

- Tris HCl 100 mM pH 7,5
- NaCl 500 mM
- EDTA 25 mM pH 8
- SDS 1,5%
- PVP 40 2%
- 2-β mercaptoéthanol 0,7%

La manipulation complète se réalise en 5H.

Le tampon d'extraction est ajouté au matériel végétal fraîchement et finement broyé à raison de 0,7 ml par 0,14g de matériel végétal. L'ensemble a été vortexé et mis à incuber 10 minutes à température ambiante en agitant de temps en temps. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16 600 g pendant 15 min à température ambiante pour précipiter les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré (un volume V) et 1/3 d'acétate de sodium 5M pH 6 à 0°C y a été ajouté. Le tout a été vortexé et laissé 30 min sur glace avant d'être centrifugé 15 minutes à 4°C et à 16 600 g. Un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) a été ajouté au surnageant et l'ensemble a été vortexé et centrifugé à 16 600 g pendant 10 min et à 4°C. Cette opération a été effectuée deux fois. Le surnageant a été récupéré et un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) lui a été ajouté. Le tout a été une nouvelle fois vortexé et centrifugé à 16 600 g pendant 10 min et à 4°C. Le surnageant a été récupéré et 0,8 V d'isopropanol lui ont été ajoutés avant de laisser l'ensemble 15 minutes sur glace et de le centrifuger 15 min à 4°C et à 17 210g. Le surnageant a été éliminé et le culot a été rincé avec 1ml d'éthanol 70%. Le tout a été légèrement vortexé et centrifugé à 17 210g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot mis à sécher 10 minutes dans l'étuve à 37°C avant d'être dissous dans 400 µl d'eau DEPC et de procéder à une nouvelle extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1) suivie d'une au chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Deux volumes d'éthanol pur ont été ajoutés au surnageant et le tout a été stocké au moins une nuit à -20°C.

### **3.3. Protocole d'extraction basée sur le Trizol ls Reagent<sup>®</sup>**

#### **3.3.1. Introduction**

Ce protocole est décrit dans le mode d'emploi du TRIZOL ls Reagent<sup>®</sup> Invitrogen life technologie.

#### **3.3.2. Principe**

Le matériel végétal fraîchement et finement broyé a été pesé et 400mg ont été ajoutés à 5 ml de Trizol. Le tout a été incubé 5 min à température ambiante et 0,2 ml de chloroforme par ml de Trizol ont été ajoutés. Les échantillons ont été agités 15 secondes vigoureusement à la main et incubés 10 min à température ambiante avant d'être centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant a été récupéré et 0,5 ml d'isopropanol par ml de Trizol initial ont été ajoutés. Le tout a été mélangé et mis à incuber 10 min à TEMPÉRATURE ambiante avant d'être centrifugé à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le



culot d'ARN a été rincé une fois avec de l'éthanol 75% à raison d'1ml/ml de Trizol initial. Les échantillons ont été vortexés et stockés au moins une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Protocole d'extraction basée sur le Trizol Is Reagent<sup>®</sup> et adapté pour le matériel riche en polysaccharides**

#### **3.4.1. Introduction**

Ce protocole est décrit dans le mode d'emploi du TRIZOL Is Reagent<sup>®</sup> Invitrogen life technologie.

#### **3.4.2. Principe**

Le matériel végétal fraîchement et finement broyé a été pesé et 400mg ont été ajoutés à 5 ml de Trizol. Le tout a été centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et le surnageant récupéré a été incubé 5 min à température ambiante avant d'y ajouter 0,2 ml de chloroforme par ml de Trizol. Les échantillons ont été agités 15 secondes vigoureusement à la main et incubé 2-3 min à température ambiante avant d'être centrifugés à 12 000 g à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min. Le surnageant a été récupéré et 0,25 ml d'isopropanol par ml de Trizol initial ont été ajoutés ainsi que 0,25 ml/ml de Trizol initial d'un mélange de citrate de sodium 0,8M et de chlorure de sodium 1,2M. Le tout a été mélangé et mis à incuber 10 min à température ambiante avant d'être centrifugé à 12 000 g pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN a été rincé une fois avec de l'éthanol 75% à raison d'1ml/ml de Trizol initial. Les échantillons ont été vortexés et stockés au moins une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3. 5. Protocoles d'extraction utilisant les tampons d'extraction GITC et GHCL de Gehrig *et al.* (2000)

#### 3.5.1. Introduction

Ces protocoles sont issus de ceux proposés par Gehrig *et al.* (2000).

#### 3.5.2. Principe

Selon Gehrig *et al.* (2000) l'ajout de PEG (polyéthylène glycol) de haut poids moléculaire permet d'effectuer des extractions très efficaces. Le rendement obtenu est supérieur à celui obtenu avec des méthodes basées sur le PVP 40 (polyvinylpyrrolidone).

- Composition du tampon d'extraction GITC
  - Guanidine isothiocyanate 5M.
  - Tris-HCL pH 8 50mM
  - Citrate de sodium pH 7,5 25mM
  - N-lauryl sarcosine 0,5 %
  - $\beta$ -mercaptoéthanol 0,1 M.
- Composition du tampon d'extraction GHCL.
  - Hydrochloride de guanidine 6,5M
  - Tris-HCL pH 8 100mM
  - acetate de sodium 0,1M pH 5,5
  - $\beta$ -mercaptoéthanol 0,1 M.
- Autres produits.
  - Citrate de sodium pH 4 2M
  - Eau DEPC autoclavée
  - PEG-HMW (20.000)
  - Isopropanol
  - Phénol/Chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1.
  - NaCl 2M

### 3.5.3. Description de l'extraction avec le tampon GITC

Le matériel végétal fraîchement et finement broyé a été pesé et 1% de PEG-HMW ainsi que 1ml de tampon d'extraction ont été ajoutés par 0,1g de tissus. Les échantillons ont été mis en incubation durant 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugés pendant 20 minutes à 4° C et à 8 000 g. Le surnageant a été récupéré et 0,1ml de citrate de sodium pH 4 à 2M et 0,7 ml de Phénol/Chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 lui ont été ajoutés. Le tout a été vortexé et incubé 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé à 8 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et 0,7ml d'isopropanol lui ont été ajoutés. Les échantillons ont été vortexés et stockés au moins une nuit à - 20°C.

### 3.5.4. Description de l'extraction avec le Tampon GHCL

Le matériel végétal fraîchement et finement broyé a été pesé et 1% de PEG-HMW ainsi que 1ml de tampon d'extraction ont été ajoutés par 0,1g de tissus. Les échantillons ont été mis en incubation durant 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugés pendant 20 minutes à 4° C et à 8 000 g. Le surnageant a été récupéré et 0,1ml de citrate de sodium pH 4 à 2M, 0,5 ml de chlorure de sodium 2M et 0,7 ml de Phénol/Chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 lui ont été ajoutés. Le tout a été vortexé et incubé 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé à 8 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et 0,7ml d'isopropanol lui ont été ajouté. Les échantillons ont été vortexé et stocké au moins une nuit à - 20°C.

## 3. 6. Protocole de Mehar H. Asif *et al.* (2000)

### 3.6.1. Introduction

D'après: Mehar H. Asif *et al.* (2000). Ces derniers ont mis au point leur protocole d'extraction en se basant sur celui décrit par Chang *et al.* (1993).

### 3.6.2. Principe

Le tampon d'extraction incomplet se compose des éléments suivants :

- 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium brommide)
- Tris-HCl 100mM pH 8 (acide trichloro-acétique)
- EDTA 20mM pH 8

- NaCl 1,4M

Le tout a été mélangé et autoclavé.

Le jour de la manipulation le tampon d'extraction a été complété avec 1 µl de 2-mercaptoéthanol par ml de tampon.

La réalisation complète de l'extraction nécessite deux jours :

### JOUR 1

Le tampon d'extraction complet préalablement chauffé au bain-marie à 65°C a été ajouté au matériel végétal fraîchement et finement broyé à raison de 1ml par 0,1g de tissus. Le tout a été homogénéisé à l'ultraturax à vitesse maximum pendant 2 minutes puis incubé à 65°C pendant 1h en vortexant légèrement toutes les 15 min. Les échantillons ont ensuite été refroidis à température ambiante et un volume égal du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1) leur a été ajouté. Ils ont été vortexés et centrifugés à 12 000 g à température ambiante pendant 15 min. Les surnageants ont été récupérés et un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique 24/1 leur a été ajouté. Ils ont de nouveau été vortexés et centrifugés à 12 000 g à température ambiante pendant 15 min. Le surnageant (volume V) a été récupéré et du LiCl 10M lui a été ajouté de manière à obtenir une concentration finale de 3M. Le tout a été mis à 4°C durant une nuit pour précipiter les ARN.

### JOUR 2

Les échantillons ont été centrifugés 20 min à 4°C à 17 000 g et les culots ont été resuspendus dans 500 µl dans de l'eau DEPC. Pour aider à remettre en suspension, les éppendorfs ont été placés 5min à 50°C au bain-marie en vortexant de temps en temps. Le même volume de phénol leur a été ajouté et ils ont été vortexés et centrifugés 5 minutes à 17 000 g et à 4°C. Le surnageant a été récupéré et 500 µl du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 leur ont été ajoutés. Ils ont été de nouveau vortexés et centrifugés à 17 000 g et 4°C pendant 5 minutes et 500 µl du mélange chloroforme/alcool isoamylique 24/1 ont été ajoutés au surnageant. Le tout a été vortexé et centrifugé à 17 000 g et 4°C pendant 5 minutes. Un volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 égal à 1/30 de V et un volume d'éthanol égal à 1/10 de V ont été ajoutés à la phase aqueuse (volume V). Ce mélange a été vortexé et laissé sur glace pendant 30 min avant d'être centrifugé 25 min à 4°C et à 17 000 g. Le surnageant a été récupéré et de l'acétate de sodium 3M pH 5,2 lui a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,3M. Pour finir, 3 volumes d'éthanol 100% ont été ajoutés et les ARN ont été mis à précipiter au moins une nuit à -20°C.

## **4. Analyse quantitative et qualitative de l'ARN extrait**

### **4.1. Introduction**

Les mesures d'absorbance à 260 et 280 nm permettent de donner une première indication sur le rendement ainsi que sur la qualité (taux de pureté) des extractions d'ARN. De plus, la migration des échantillons sur un gel d'agarose et leur visualisation sous U.V. permettent également de vérifier la qualité, la pureté et l'intégrité de l'ARN total extrait. Avant de procéder à ces mesures, les ARN doivent être remis en suspension.

### **4.2. Remise en suspension des ARN**

Les ARN conservés à -20°C ou -80°C doivent être remis en suspension dans de l'eau DEPC. Pour ce faire, les échantillons ont été sortis du congélateur et centrifugés 1h à 17 000 g à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot a été rincé trois fois avec 200 µl d'éthanol 70% froid. Une centrifugation à 17 000 g à 4°C pendant 5 min a été effectuée entre chaque rinçage. Le surnageant a été éliminé et le culot séché sous la hotte à 37°C en inversant les tubes eppendorfs pendant 5 à 10 min.

Le culot séché a été resuspendu dans 25 µl d'eau DEPC à 4°C dont 5 µl étaient destinés pour la lecture des absorbances et les 20 µl restant étaient conservés pour être déposés ultérieurement sur le gel d'agarose en conditions non dénaturantes.

### **4.3. Mesure des absorbances**

Les 5 µl de la solution d'ARN remis en suspension comme expliqué au point précédent et destinés à être analysés au spectrophotomètre ont été mélangés à 395 µl d'eau DEPC à 4°C par vortexage. Les 400 µl ainsi constitués de la solution à analyser ont été introduits dans des cupules en quartz pour procéder aux lectures des absorbances. Celles-ci ont été effectuées grâce à un spectrophotomètre à U.V. (SmartSpec<sup>TM</sup> 3000, BioRad). Les absorbances à 260nm et 280nm ont été enregistrées. Le blanco était constitué de 400 µl d'eau DEPC.

### **4.4. Analyse quantitative des ARN extraits**

La quantité d'acides nucléiques des échantillons a été estimée sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration en ARN de 40µg/ml pour autant que le rapport d' $A_{260}/A_{280}$  indique une bonne pureté de l'échantillon. En effet, les sels

contaminants, les protéines et les solvants organiques peuvent faussement augmenter l'absorbance à 260nm (Gerstein, 2001)

Le rendement d'extraction a été déterminé grâce à la formule suivante, pour autant que l'absorbance à 260nm soit comprise entre 0,1 et 1.

$$[\text{ARN}] \mu\text{g/ml} = A_{260} * 40 * Y$$

Le facteur \* Y correspondant au facteur de dilution.

Dans chaque cas, à partir de la concentration en [ARN]  $\mu\text{g/ml}$ , la concentration a été calculée en [ARN]  $\mu\text{g/g}$  de matériel végétal.

## **4.5. Analyse qualitative des ARN extraits**

### **4.5.1. Lecture des absorbances**

La pureté d'un échantillon peut-être estimée à partir des absorbances relatives à 260nm et 280nm. Les protéines absorbent à 280nm et les lectures d'absorbance à 280 permettent d'identifier d'éventuelles contaminations par celles-ci. Le degré de pureté de l'échantillon est donné par les rapports  $A_{260}/A_{280}$ . Pour être considéré comme relativement pur, l'échantillon d'ARN doit avoir un rapport d' $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,8 et 2,1.

### **4.5.2. Migration sur gel d'agarose**

#### **4.5.2.1. Introduction**

La migration des échantillons sur un gel d'agarose (1,2%) permet de vérifier la qualité et la pureté des ARN totaux extraits. Sur gel, les différents fragments d'ARN migrent à des vitesses différentes selon leur taille. Les éléments suivants peuvent être visualisés grâce à un agent intercalant fluorescent (bromure d'éthidium) après exposition aux rayons U.V. (Promega.com, 2005):

- ARN ribosomiques : les ARNr 18s et 28s se présentent sous forme de deux bandes d'une taille approximative de 2000 et 4000 nucléotides chez les plantes. Si il n'y a pas de dégradation, la bande de la sous-unité 28s apparaîtra deux fois plus intense que la 18s.

- ARN de transfert : Les ARNt sont visibles sous forme d'une traînée lumineuse constituée d'ARN de faible poids moléculaire.
- ARN messagers : Les ARNm étant de taille variable, leur présence est révélée par l'apparition d'une légère traînée lumineuse tout au long de la migration.
- ADN génomique : la visualisation de bandes de haut poids moléculaire indique la présence d'ADN génomique.

L'ARNm représente moins de 5% de l'ARN total. La majorité des ARN présents dans une cellule sont des ARN ribosomiques pour environ 80% et des ARN de transfert pour environ 16% (Gerstein, 2001).

#### 4.5.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose en conditions non dénaturantes

Ce type d'électrophorèse permet de séparer les molécules d'acides nucléiques sans affecter leur structure secondaire comme les boucles dans le cas des ARN.

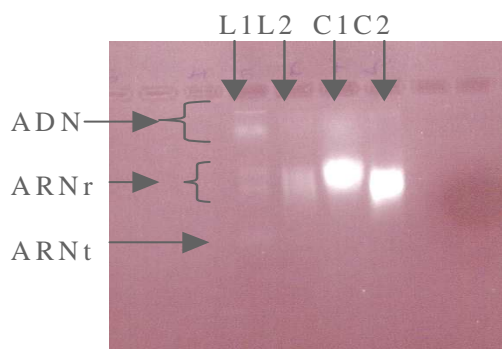
La concentration en agarose a été fixée à 1,2%. Pour préparer un gel de 100ml, 1,2g d'agarose RNase-free a été ajouté à 10ml de Tampon MAE 10X concentré (MOPS 0,4 M; Acétate de sodium 0,1 M pH 7 ; EDTA 10mM pH 8) et 90ml d'eau DEPC. Le tout a été chauffé et le bromure d'éthidium RNase-free a ensuite été ajouté à raison de 0,1µg/ml de gel. Le gel coulé a été mis à polymériser 20 à 30 minutes et a été submergé par le tampon de migration constitué de 700 ml de Tampon MAE 1X concentré. Ce dernier a été conservé au frigo jusqu'à son ajout dans la cuve. Le tampon de chargement (50% glycerol ; EDTA 1mM pH 8,0 ; 0,25% bleu de bromophénol) a été ajouté aux échantillons à analyser à raison de 5 µl de tampon/20 µl d'échantillon. Les échantillons ont ensuite été chargés dans les puits et la migration a été réalisée sous un voltage constant de 60V. Les migrations ont été effectuées systématiquement sur glace. La révélation des bandes a été réalisée par exposition aux U.V.

# 1. Extractions d'ARN totaux à partir de bananes vertes

## 1.1. Résultats

Des extractions d'ARN de peau et de pulpe de bananes vertes ont été réalisées avec les quatre protocoles suivants : le protocole du Trizol, le protocole du Trizol modifié, le protocole Liu *et al.* (1998) et le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableau 1 et 2 pour les extractions effectuées respectivement sur peau et pulpe. Les observations des ARN totaux sur gel sont présentées à la figure 14 pour les méthodes Wan et Wilkins (1994) modifié et Liu *et al.* (1998).



**Figure 14:** Visualisation des ARN totaux extraits sur gel d'agarose non dénaturant 1,2%.

L1: extraction avec protocole Liu *et al.* (1998) sur peau de bananes vertes.

L2: extraction avec protocole Liu *et al.* (1998) sur pulpe de bananes vertes.

C1: extraction avec protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur peau de bananes vertes.

C2: extraction avec protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur pulpe de bananes vertes.



**Tableau 1:** Comparaison des rendements d'extractions et des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  d'extraits d'ARN totaux obtenus à partir de peau de bananes vertes finement broyées.

Protocole	Répétition.	[ $\mu$ g/g de matière broyée	$A_{260}/A_{280}$	Visualisation sur Gel.
Trizol	3	[166 - 196]	[0,9 - 1,1]	Pas de bande
Trizol Modifié	2	[85 - 96]	[1,9 - 2]	Pas de bande
Liu <i>et al.</i> (1998)	2	[57- 65]	2,2	Bandes visibles et faibles (L1)
Wan et Wilkins (1994) modifié	2	[23- 40]	2	Bandes $\pm$ résolues (C1).

**Tableau 2:** Comparaison des rendements d'extractions et des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  d'extraits d'ARN totaux obtenus à partir de pulpe de bananes vertes finement broyées.

Protocole	Répétition.	[ $\mu$ g/g de matière broyée	$A_{260}/A_{280}$	Visualisation sur Gel.
Trizol.	3	[405 - 902]	[1 - 1,2]	Pas de bande
Trizol Modifié.	2	[19 - 57]	[0,1 - 3,4]	Pas de bande
Liu <i>et al.</i> (1998)	2	[62-64]	[2,4- 2,6]	Bandes faiblement dégradées. (L2)
Wan et Wilkins (1994) modifié	2	[18 - 23]	[1,2 - 2,2]	Bandes +/- résolues (C2).

## 1.2. Discussion

A première vue le protocole du Trizol donne les rendements les plus élevés en terme de quantité ( $\mu\text{g}$ ) d'extraits d'ARN par g de matière végétale broyée (que ce soit la pulpe ou la peau de banane verte). Cependant, les rapports  $A_{260}/A_{280}$  sont inférieurs à 1,2 et traduisent une forte contamination des échantillons par les protéines et probablement par d'autres composés. Gerstein (2001) rapporte qu'un rapport d' $A_{260}/A_{280} < 1,8$  indique une contamination probable par les protéines. Une extraction au PCAI (Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique) permet d'augmenter le rapport d'absorbance mais entraîne une perte de rendement pouvant parfois atteindre 40%. Un rapport d' $A_{260}/A_{280} < 1,8$  peut également traduire une contamination par des solvants organiques résiduels sur les ARN comme le phénol ou le chloroforme.

La faible pureté obtenue ne rend pas fiable les valeurs de rendement. En effet, le calcul du rendement se base sur la valeur d'absorbance à 260nm. Celle-ci peut être augmentée par la présence de composés ayant leur pic d'absorption maximal à 260 nm ou proche de 260 nm et qui faussent donc le calcul de la concentration en ARN. Les observations faites au cours de l'extraction confortent l'hypothèse d'une forte contamination. En effet, la difficulté de remise en suspension du culot laisse supposer une contamination par les polysaccharides qui rendent le culot compact. Les polysaccharides solubles ont des propriétés physico-chimiques similaires à ceux de l'ARN. Dès lors, ils peuvent co-précipiter et contaminer l'ARN durant l'extraction affectant ainsi le rendement et la qualité (Longemann *et al.*, 1987).

Sur peau de banane verte, le protocole du Trizol modifié a permis d'améliorer la qualité de l'extraction par rapport au Trizol. Le rapport d' $A_{260}/A_{280}$  est compris entre 1,8 et 2 pour les deux répétitions. Par contre, les très mauvais rapports d' $A_{260}/A_{280}$ , obtenus sur pulpe de banane verte, indiquent que l'extraction est fortement contaminée ce qui rend de surcroît les rendements d'extraction complètement erronés. La difficulté de remise en suspension du culot persiste renforçant la possibilité de contamination par les polysaccharides.

De plus, aucun des deux protocoles basés sur le Trizol ne permet d'obtenir des bandes d'ARN sur gel (résultats non présentés). Etant donné que l'absence de bande sur gel est un facteur limitant dans le choix d'un protocole d'extraction d'ARN, ces deux protocoles ne sont pas retenus pour effectuer des extractions à partir de peau et de pulpe de bananes vertes.

L'utilisation du protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur peau de banane verte permet d'obtenir un bon rapport d' $A_{260}/A_{280}$  indiquant une bonne qualité d'extraction. Cette qualité est légèrement inférieure lorsque l'extraction est réalisée avec le protocole Liu *et al.* (1998). Par contre, pour les extractions effectuées sur pulpe de banane verte, ni le protocole Liu *et al.* (1998) ni celui modifié de Wan et Wilkins (1994) n'a permis d'obtenir un rapport d' $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,8 et 2,1.

La migration des ARN totaux sur gel montre de meilleurs résultats avec Liu *et al.* (1998) qu'avec Wan et Wilkins (1994) modifié que ce soit sur peau ou sur pulpe. En effet, les extractions avec le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié présentent des bandes non distinctes (Figures 14: bandes C1), tandis qu'on retrouve les bandes ADN, ARNr et ARNt pour les extractions sur peau réalisées avec le protocole Liu *et al.* (1998) (Figure 14: bandes L1) et 2 bandes correspondant aux ARNr pour les extractions à partir de pulpe réalisées avec le même protocole (Figure 14: bandes L2). Les spots lumineux visibles sur les bandes C1 et C2 de la figure 14 correspondent à la taille des ARNr laissant espérer une bonne extraction. Le manque de netteté des bandes provient peut-être de la formation de structures secondaires faisant penser à des dégradations. L'utilisation d'un gel dénaturant pourrait contribuer à améliorer la qualité des bandes en favorisant leur séparation.

Les rendements d'extractions obtenus sur pulpes avec la méthode Wan et Wilkins (1994) modifié sont largement inférieurs à ceux obtenus sur peau. Par contre, les extractions réalisées avec le protocole de Liu *et al.* (1998) ont abouti à des rendements similaires sur peau et sur pulpe et ces rendements sont supérieurs à ceux obtenus avec la méthode Wan et Wilkins (1994) modifié. En outre, le protocole proposé par Liu *et al.* (1998) présente certains avantages par rapport à celui de Wan et Wilkins (1994) modifié. En effet, sa réalisation est moins coûteuse et elle peut être effectuée sur deux jours tandis que trois sont nécessaires pour Wan et Wilkins (1994) modifié. Elle semble donc la plus appropriée pour effectuer des extractions d'ARN à partir de peau de bananes vertes.

Il serait utile de reprendre ces deux protocoles en tentant d'améliorer la qualité des extractions, de limiter les dégradations et d'effectuer les électrophorèses en conditions dénaturantes afin de pouvoir les discriminer dans des conditions optimales et de sélectionner ainsi la méthode la plus adéquate pour la suite des manipulations.

## 2. Extractions d'ARN totaux à partir de peau de bananes jaunes

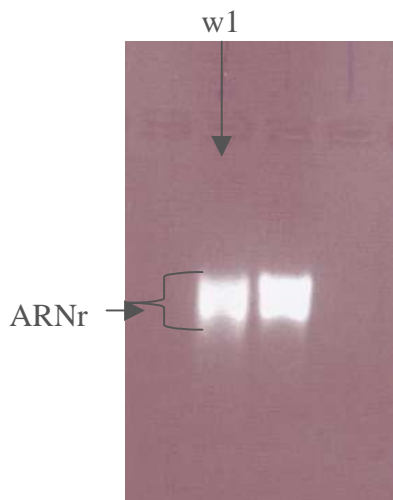
### 2.1. Résultats

Des extractions d'ARN de peau de bananes jaunes ont été réalisées avec les sept protocoles suivants : Trizol, Trizol modifié, Liu *et al.* (1998), Wan et Wilkins (1994) modifié, Mehar H. Asif *et al.* (2000), et les deux protocoles décrits par Gehrig *et al.* (2000) et nommés GITC et GHCL.

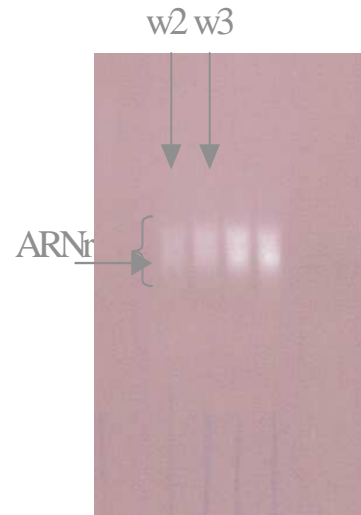
Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 3. Les observations des ARN sur gel sont présentées aux figures 15a, b et c pour la méthode « Wan et Wilkins (1994) modifié », aux figures 15c et d pour la méthode GHCL de Gehrig *et al.* (2000) et à la figure 15f pour la méthode Liu *et al.* (1998).

**Tableau 3 :** Comparaison des rendements d'extractions et des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  d'extraits d'ARN totaux obtenus à partir de peau de bananes jaunes finement broyées. \* : indique que certains rendements n'ont pu être calculés car la valeur d' $A_{260}$  était inférieure à 0,1.

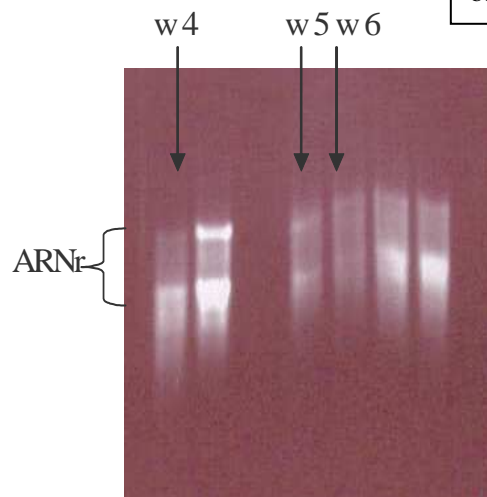
Protocole	Répétition	[ $\mu\text{g/g}$ ] matière végétal	$A_{260}/A_{280}$	visualisation sur gel
Trizol	5	[60 - 180] ou *	[0,9 - 1,2]	pas de bande
Trizol modifié	4	719 Ou *	[0,9 - 1,1]	pas de bande
Liu <i>et al.</i> (1998)	2	[30-53]	[1,7-1,8]	Bandes (Figure 15f)
	3	*	[0,7 - 0,9]	Pas de bande
Wan et Wilkins (1994) modifié	5	*	[1,7-2,3]	Bandes (w1; w2; w3; w4; w5; w6) <b>Figures 15a, b et c</b>
Mehar H. Asif <i>et al.</i> (2000)	2	[11 - 36]	[1,3 - 2,4]	pas de bande
GITC Gehrig <i>et al.</i> (2000)	6	[33 - 130]	[1,5 - 1,9]	pas de bande
GHCL Gehrig <i>et al.</i> (2000)	5	[53 -122]	[1 -1,5]	pas de bande
	4	[63 -130]	[1,1 - 1,4]	bandes (G1, G2, G3, G4) <b>Figures 15d et e</b>



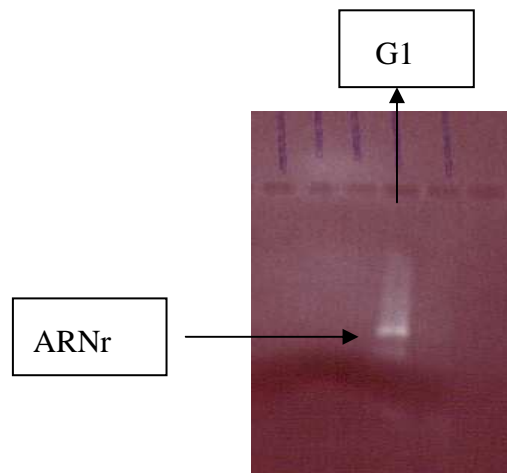
**Figure 15a:** visualisation sur gel d'agarose 1.2% des ARN totaux. W1 correspond à une extraction réalisée avec le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur peau de banane jaune.



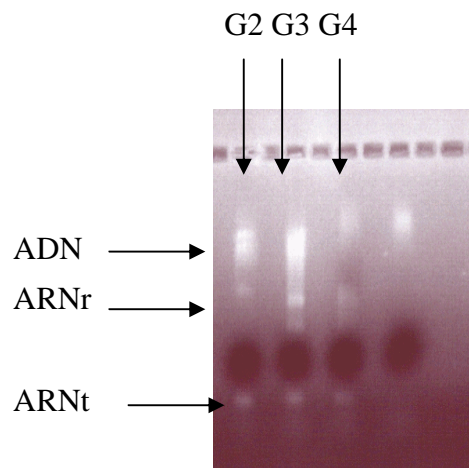
**Figure 15b:** Visualisation sur gel d'agarose 1.2% des ARN totaux. W2 et W3 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur peau de banane jaune.



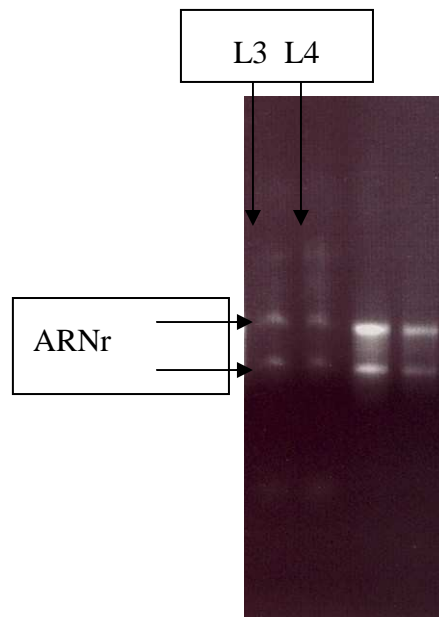
**Figure 15c:** Visualisation sur gel d'agarose 1.5% des ARN totaux. W4, W5 et W6 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur peau de banane jaune.



**Figure 15d** : Visualisation sur gel d'agarose 1,3% des ARN totaux. G1 correspond à une extraction réalisée avec le protocole GHCL de Gehrig *et al.* (2000) sur peau de banane jaune.



**Figure 15e** : Visualisation sur gel d'agarose 1,3% des ARN totaux. G2, G3, G4 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole GHCL de Gehrig *et al.* (2000) sur peau de banane jaune.



**Figure 15f** : Visualisation sur gel d'agarose 1,3% des ARN totaux. L3 et L4 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole Liu *et al.* (2000) sur peau de banane jaune.

## 2.2. Discussion

Les résultats obtenus avec les protocoles Trizol et Trizol modifié ne permettent pas d'avoir des extractions d'ARN totaux de bonne qualité. Cela se justifie par l'absence des bandes sur gel (résultats non présentés) et l'indice de pureté donné par le rapport  $A_{260}/A_{280}$  qui est  $\leq$  à 1,2. Cette faible pureté de l'échantillon d'ARN ne rend pas fiable les valeurs d' $A_{260}$  pour les raisons d'interférences déjà évoquées auparavant. De plus, tout comme dans les cas d'extractions à partir de bananes vertes, la difficulté de resuspendre le culot dans l'eau DEPC persiste, laissant supposer une contamination par des polysaccharides. Ces deux protocoles ne sont donc pas retenus pour la suite des manipulations. De même, les essais réalisés avec le protocole de Mehar H. Asif *et al.* (2000) ne donnent pas satisfaction. En effet, aucune bande n'est visible sur gel (résultats non présentés) et l'indice de qualité donné par le rapport d' $A_{260}/A_{280}$  est faible.

En se basant sur les rapports d' $A_{260}/A_{280}$ , l'utilisation du protocole GITC de Gehrig *et al.* (2000) permet d'avoir une meilleure qualité d'extraction et un rendement suffisant en ARN. Cependant, l'absence des bandes sur gel (résultats non présentés) n'a pas permis de retenir ce

protocole. En effet, les rendements et les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  seuls ne sont pas fiables car ils peuvent être faussés par la présence et la contamination des composés autres que l'ARN et ayant des propriétés physico-chimiques similaires.

Les extractions réalisées avec le protocole GHCL de Gehrig *et al.* (2000) fournissent des rendements suffisants mais peu fiables de part les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1 et 1,5.

La visualisation sur gel nous permet d'avoir des bandes d'ARNr, d'ADN et d'ARNt pour certains essais (figure 15 d et e) et une absence de bande pour d'autres essais. Ceci indique un manque de reproductibilité de la méthode. Ainsi, ce protocole est lui aussi inapproprié pour effectuer des extractions d'ARN à partir de peau de bananes jaunes.

Les extractions réalisées avec le protocole Liu *et al.* (1998) sur peau des bananes jaunes ne permettent pas de conclure de manière définitive sur l'efficacité et la reproductibilité de ce protocole. Dans 2 cas sur 5, les résultats sont très encourageants avec des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,7 et 1,8, des rendements largement acceptables et des bandes sur gel clairement séparées et non dégradées avec la bande 28S deux fois plus intense que la 18S (Figure 15f). Mais les 3 autres répétitions présentent un indice de pureté en moyenne inférieur à 1, des rendements plus faibles et aucune bande n'est visible sur gel (résultats non présentés). La différence entre les deux premières répétitions et les trois dernières réside dans le tampon d'extraction. Bien que les deux préparations de ce tampon soient censées être identiques, une erreur dans la seconde préparation pourrait expliquer les différences observées. Ce protocole présentant les avantages de coût et de temps cités précédemment et ayant permis d'obtenir à deux reprises des résultats très positifs, il est important de tester à nouveau son efficacité.

Les extractions réalisées avec le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié ont donné de très bons rapports d' $A_{260}/A_{280}$ . Ces derniers sont compris entre 1,7 et 1,9 pour 4 répétitions et concernant la cinquième répétition le rapport est de 2,3. De plus, lors de la migration sur gel des bandes de la taille des ARNr étaient systématiquement présentes même si leur séparation ou leur distinction n'était pas toujours possible (Figure a et b). L'augmentation de la concentration en agarose dans le gel (1,5% d'agarose) a permis une meilleure séparation des bandes (figure 15c). La réalisation de migrations en conditions dénaturantes permet une meilleure séparation et résolution des bandes d'ARNr (Mbéguié-A-Mbéguié, communication personnelle. 2005). Les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  et la présence de bandes lors de la migration indiquent que cette méthode d'extraction paraît adéquate pour fournir des échantillons



d'ARN, de bonne qualité, utilisables pour la cDNA-AFLP. Par contre, les rendements ne peuvent être calculés car les valeurs d'absorbance sont  $< 0,1$ . Il faut donc envisager d'effectuer les extractions sur une plus grosse quantité de matériel végétal afin de situer les absorbances à 260nm dans la zone comprise entre 0,1 et 1. Ainsi, le rendement de la méthode pourra être évalué et une comparaison de cette méthode avec celle développée par Liu *et al.* (1998) pourra être effectuée.

### **3. Extractions d'ARN totaux à partir de pulpe de bananes jaunes**

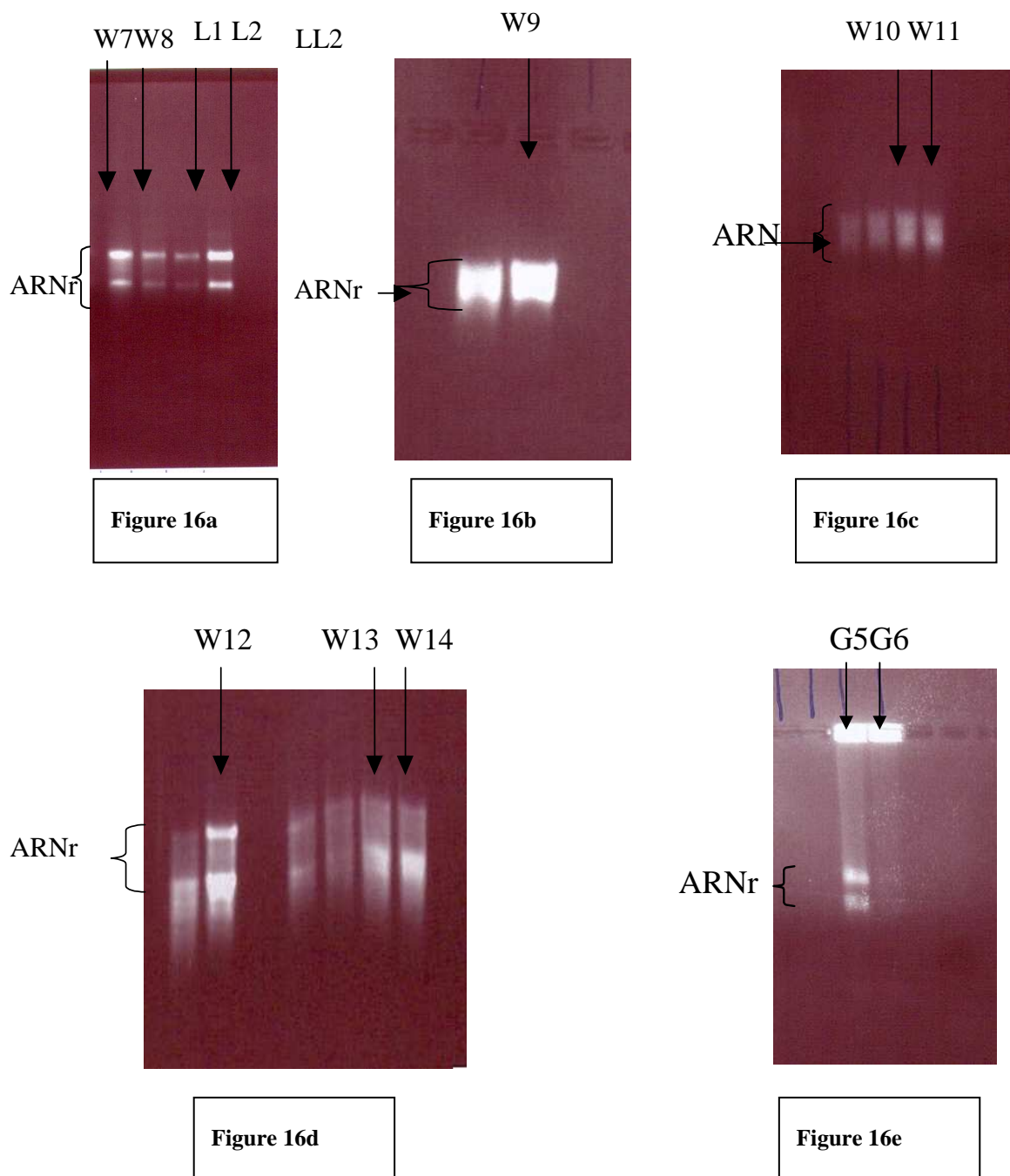
#### **3.1. Résultats**

Des extractions d'ARN sur pulpe de bananes jaunes ont été réalisées avec les sept protocoles suivants : Trizol, Trizol modifié, Liu *et al.* (1998), Wan et Wilkins (1994) modifié, Mehar H. Asif *et al.* (2000), et les deux protocoles décrits par Gehrig *et al.* (2000) et nommés GITC et GHCL.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4. Les observations des ARN sur gel sont présentées aux figures 16a, b, c et d pour la méthode « Wan et Wilkins (1994) modifié », à la figure 16e pour la méthode GHCL de Gehrig *et al.* (2000) et à la figure 16a pour la méthode Liu *et al.* (1998).

**Tableau 4:** Comparaison des rendements d'extractions et des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  d'extraits d'ARN totaux obtenus à partir de pulpe de bananes jaunes finement broyées. \* : indique que certains rendements n'ont pu être calculés car la valeur d' $A_{260}$  était inférieure à 0,1.

protocole	Répétition	[µg/g] matière végétale	$A_{260}/A_{280}$	visualisation sur gel
Trizol	5	[134 - 254] ou *	[0,5 - 1,3]	Pas de bande
Trizol modifié	4	[24 - 32]	[1 - 1,3]	Pas de bande
Liu <i>et al</i> (1998)	2	*	[1,8- 2]	Bandes (L1et L2) (Figure 16a)
	3	*	[0,8 – 1,2]	Pas de bande
Wan et Wilkins (1994) modifié	8	[40 - 83]	[1,3 - 1,8]	Bandes(W7; W8; W9; W10; W11; W12; W13; W14) (Figure 16 a,b,c et d)
Mehar H. Asif <i>et al.</i> (2000)	2	51,2	[0,7 - 1,5]	Pas de bande
GITC Gehrig <i>et al.</i> (2000)	6	[106 - 313]	[1 -2,3]	Pas de bandes
GHCL Gehrig <i>et al.</i> (2000)	2	[70 - 209]	[0,6 - 1,3]	Bandes G5 et G6 (Figure 16e)
	4	[57 - 173]	[0,9 - 2,1]	Pas de bandes



**Figure 16 :** Visualisation sur gel d'agarose des ARN totaux. La concentration en agarose est de 1,2% pour les figures a, b, c et e et de 1,5% pour la figure d. W7, W8, W9, W10, W11, W12, W13, W14 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole Wan et Wilkins (1994) modifié sur pulpe de banane jaune. G5 et G6 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole Gehrig *et al.* (2000) sur pulpe de banane jaune. L1 et L2 correspondent à des extractions réalisées avec le protocole Liu *et al.* (1998) sur pulpe de banane jaune.

### 3.2. Discussion

Comme pour les précédentes extractions d'ARN totaux, les deux protocoles d'extractions basés sur le Trizol ne sont donc pas adéquats pour donner une extraction de bonne qualité. Ils ne permettent pas d'avoir un indice de pureté satisfaisant et l'absence de bande persiste (résultats non présentés). Le rendement paraît être satisfaisant mais ne peut être pris en considération au vu de la faible qualité de l'extraction. De plus, la difficulté de remise en suspension du culot dans l'eau DEPC peut refléter une contamination par les polysaccharides.

Les résultats obtenus avec le protocole Mehar H. Asif *et al.* (2000) et avec le protocole GITC de Gehrig *et al.* (2000) montrent l'inefficacité de ceux-ci pour procéder à des extractions d'ARN sur pulpe de bananes jaunes. En effet, aucune bande n'est visible sur gel (résultats non présentés) et les bons rendements d'extractions obtenus ne sont pas fiables à cause de la faible qualité de l'extraction reflétée par les rapports d' $A_{260}/A_{280}$ .

Le protocole GHCL de Gehrig *et al.* (2000) permet d'avoir dans certains cas des bandes d'ARNr qui peuvent être visualisées sur le gel (Figure 16e), et dans d'autres cas rien de visible sur gel (résultats non présentés). L'indice de pureté est généralement faible et variable et est compris entre 0,6 et 2,1. Le rendement est suffisant mais est également très variable. La reproductibilité de ce protocole est insuffisante. En outre, aucun paramètre connu de l'expérimentateur ne permet d'expliquer la variabilité des résultats. Pour toutes ces raisons, ce protocole n'est pas retenu pour effectuer des extractions d'ARN sur pulpe de bananes jaunes.

Les extractions réalisées avec le protocole Wan et Wilkins (1994) permettent d'obtenir des bandes sur gel d'agarose. Ces bandes sont dans certains cas distinctes et dans d'autres cas non distinctes. Les rendements d'extraction obtenus sont suffisants et les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,3 et 1,8. Gerstein (2001) explique qu'un rapport d' $A_{260}/A_{280}$  de deux assure une pureté de l'ARN mais qu'un rapport inférieur n'a probablement pas une grande incidence sur les résultats. De plus, selon cet auteur, la firme Ambion a fait des tests de RT-PCR avec des échantillons dont le rapport d' $A_{260}/A_{280}$  était compris entre 1,4 et 1,8 et ils ont obtenus de bons résultats. Les bandes obtenues sur gel ne présentent pas de dégradation importante. Ce protocole est reproductible et semble donc être le plus adapté à l'extraction d'ARN de pulpe de bananes jaunes.

Les résultats des extractions faites avec le protocole Liu *et al.* (1998) semblent indiquer un manque de reproductibilité de la méthode. En effet, deux extractions sur cinq se sont révélées être de bonne qualité de par les bons rapports d' $A_{260}/A_{280}$  obtenus et par la présence d'ARNr après migration des échantillons sur gel. Par contre les trois autres extractions ne donnent pas de résultats satisfaisants. Les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  sont très faibles et aucune bande n'est visible sur le gel après migration. Comme dans le cas des extractions sur peau de bananes jaunes, la principale différence entre les deux séries d'extraction réside dans le fait que le tampon d'extraction n'était pas issu de la même préparation dans les deux cas. Le même phénomène ayant été observé sur peau et sur pulpe, il semble donc évident qu'un facteur externe a négativement influencé les 3 dernières extractions que ce soit sur pulpe ou sur peau. Il serait donc utile de retester cette méthode car elle présente certains avantages de temps et de coût par rapport à l'autre seule méthode présentant des résultats valables sur pulpe de bananes jaunes, c'est-à-dire la méthode proposée par le CIRAD : Wan et Wilkins (1994) modifié.

Il faut également remarquer que les rendements d'extraction n'ont pu être calculés pour la méthode Liu *et al.* (1998) car les valeurs d'absorbance à 260nm étaient largement inférieures à 0,1. Il est donc indispensable d'effectuer les nouvelles extractions à partir d'une quantité de matériel végétal supérieure à celle utilisée dans ces cas.

## 4. Discussion générale

Bien que plusieurs protocoles d'extractions soient proposés dans la littérature pour parvenir à une extraction d'ARN totaux de bonne qualité, les controverses entre les différents auteurs de ces protocoles et les résultats obtenus dans la pratique pour les différentes extractions sur bananes vertes et jaunes, pulpe et peau confirment la difficulté d'obtenir une extraction d'ARN de qualité, en quantité suffisante et de manière reproductible.

Les essais d'extractions réalisés avec le Trizol n'ont en aucun cas permis d'obtenir des ARN de qualité et en quantité suffisante. Ceci est en accord avec les observations faites par d'autres auteurs. En effet, les méthodes classiques d'extraction d'ARN sont généralement basées sur l'utilisation de l'isithiocyanate de guanidine comme c'est le cas pour le Trizol. Plusieurs auteurs ont testé ces méthodes traditionnelles pour effectuer des extractions à partir de tissus riches en composés phénoliques et polysaccharidiques. Wu *et al.* (2002) et Wan et Wilkins (1994) les ont testées sur coton, Geuna *et al.* (1998) sur raisins, Gehrig *et al.* (2000) sur différents tissus végétaux et sont arrivés à la même conclusion : les techniques traditionnelles ne permettent pas d'obtenir des résultats satisfaisants sur les tissus testés. Le Trizol comprend dans sa composition de l'isothiocyanate de guanidine et fait partie de ces méthodes traditionnelles fréquemment utilisées. Liu *et al.* (1998) avaient testé ce produit sur feuilles, racines et fruits du bananier et avaient obtenus de bons résultats pour les deux premiers types de tissus mais pas pour les fruits. Le Trizol présentant des avantages de coûts et de temps incontestables comparé aux autres techniques d'extractions disponibles, nous avons souhaité le tester dans le cadre de notre étude malgré les informations peu encourageantes par rapport à son efficacité sur les tissus riches en composés phénoliques et polysaccharidiques.

Le protocole développé par Chang *et al.* (1993) a été testé à plusieurs reprises et les résultats présentés par les différents auteurs sont contradictoires. Selon Wu *et al.* (2002) ce protocole permet d'obtenir de bons rendements sur coton (bien qu'inférieurs à 200µg d'ARN/g de matière végétale broyée) mais la qualité de l'ARN était mauvaise et l'ARN présentait de fortes dégradations. Salzman *et al.* (1999) ainsi que Gehrig *et al.* (2000) l'ont testé sur différentes espèces végétales et n'ont obtenu aucun résultat satisfaisant. Par contre, Gooding and Robinson (2001), Medina-Suarez *et al.* (1997), Clendennen et May (1997), Drury *et al.* (1999) et Martin-Rodriguez *et al.* (2003) ont obtenu avec cette méthode de bons résultats sur différents tissus de bananes. Cependant, ils ne donnent aucune indication sur les rendements. Mehar H. Asif *et al.* (2000) obtenaient de bons résultats avec le protocole proposé par Chang *et al.* (1993) mais la technique semblait manquer de reproductibilité. Pour

cette raison, ils l'ont légèrement modifiée et leur technique leur permettait d'obtenir des rendements d'extractions compris entre 80 et 150 µg d'ARN/g de matière végétale, des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  situés entre 1,8 et 2 et ce à partir de peau et de pulpe de bananes vertes et jaunes et à différents stades de maturités. Cependant, malgré ces résultats encourageants, les extractions effectuées à partir de bananes jaunes dans notre travail à l'aide du protocole de Chang *et al.* (1993) modifié par Mehar H. Asif (2000) n'ont jamais permis d'obtenir des ARN de qualité.

Avant de développer leur propre méthode, Gehrig *et al.* (2000) avaient testé celle proposée par Salzman *et al.* (1999), mais sans succès. Les deux méthodes, appelées GITC et GHCL, testées dans le cadre de ce travail et développées par Gehrig *et al.* (2000) comprenaient respectivement dans la composition du tampon d'extraction de l'isothiocyanate de guanidine et de l'hydrochloride de guanidine. Les auteurs ont obtenus de bons résultats sur les différentes espèces végétales testées avec des rendements d'extractions de 25 à 65 µg d'ARN/g de matière végétale et des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  compris entre 1,6 et 2. Notre étude a montré que les extractions effectuées sur bananes mûres avec ces deux protocoles donnent des résultats mitigés et peu reproductibles.

La méthode proposée par Liu *et al.* (1998) peut être effectuée en 4h. Les essais réalisés dans notre travail montrent que cette technique est encourageante sur peau et pulpe de bananes mûres et non mûres. Liu *et al.* (1998) avaient uniquement testé leur protocole sur tissus de bananes mûres et ils obtenaient des rapports d' $A_{260}/A_{280}$  situés entre 1,9 et 2 et des bandes sur gel clairement résolues et sans dégradation. Nous obtenons des résultats similaires sur bananes jaunes mais également sur bananes vertes ce qui n'avait pas été mis en évidence par les auteurs. Cependant, ils ne donnent aucune information sur le rendement de leur méthode et aucune comparaison ne peut donc être effectuée à ce niveau.

Wan et Wilkins (1994) ont mis au point leur protocole pour être utilisé sur le coton. Ils ont cependant testé l'efficacité de celui-ci sur riz, tomate et blé. Les rendements obtenus étaient compris entre 300 et 1500µg d'ARN/g de matière végétale. Wu *et al.* (2002) ont testé le protocole proposé par Wan et Wilkins (1994) sur coton et ils ont obtenus des rendements compris entre 300 et 1000µg d'ARN/g de matière végétale avec peu ou pas de dégradation. Cependant, ils ont observés que dans certains tissus, l'ARN isolé était systématiquement partiellement dégradé. Ils ont émis l'hypothèse que cela pouvait être causés par une concentration en RNases endogènes élevée dans ces tissus. Ils ont également testé l'impact



sur le rendement et la qualité des ARN de l'ajout de protéinase K au cours de l'extraction. La protéinase K permet de multiplier le rendement par 2,5 et de diminuer les dégradations.

La version modifiée proposée par les chercheurs du CIRAD permet, selon eux, d'obtenir des rendements de 55 à 120 µg d'ARN/g de matière végétale sur peau de banane et de 100 à 200 µg d'ARN/g de matière végétale à partir de pulpe de banane et ce, à différents stades de maturité. Dans ce travail, les rendements d'extractions obtenus sur peau de bananes jaunes n'ont pu être calculés car l' $A_{260}$  était inférieur à 0,1. Aucune comparaison de rendements ne peut donc être effectuée. Par contre, sur pulpe, nous obtenons des rendements compris entre 40,4 et 83,2 µg d'ARN/g de matière végétale ce qui est inférieur aux rendements évoqués par les chercheurs du CIRAD.

## Conclusions et perspectives

Ce travail a pour originalité la comparaison de différentes techniques d'extraction d'ARN totaux à partir de tissus végétaux riches en composés phénoliques et polysaccharidiques. Une telle comparaison n'a pour l'instant jamais fait l'objet d'une publication que ce soit sur banane ou sur toute autre espèce végétale présentant des difficultés pour l'extraction des ARN.

Les différentes méthodes testées dans ce travail étaient, pour certaines, aisées et rapides à réaliser et pour d'autres beaucoup plus complexes à mettre en œuvre. Il ressort de cette étude que, quels que soient le type de tissus et le stade de maturité des bananes, les méthodes sélectionnées pour leur simplicité et leur rapidité n'ont pas permis d'obtenir des ARN de qualité. C'est le cas des méthodes du Trizol et du Trizol modifié. La méthode développée par Mehar H. Asif *et al.* (2000) et testée dans cette étude sur pulpe et peau de bananes mûres n'a pas non plus permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Les méthodes GITC et GHCL de Gehrig *et al.* (2000), bien que plus complexes que les trois précédentes, restaient plus économiques et moins longues à réaliser que celles proposées par Liu *et al.* (1998) et par le CIRAD (Wan et Wilkins, 1994, modifié). Cependant la méthode GITC n'a pas prouvé son efficacité ni sur pulpe ni sur peau de bananes jaunes. Quant à la méthode GHCL, certains bons résultats sur gel ont été obtenus mais elle présentait un manque de reproductibilité important ce qui rendait son utilisation inenvisageable. De plus, les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  étaient systématiquement et largement inférieurs à 1,8.

Ainsi, seules les techniques proposées par Liu *et al.* (1998) et par le CIRAD (Wan et Wilkins, 1994, modifié) ont permis d'obtenir des ARN.

Sur peau de bananes vertes, les deux protocoles donnent de bons résultats. La qualité de l'extraction est meilleure avec le protocole du CIRAD qu'avec celui de Liu *et al.* (1998) tandis que ce dernier donne de meilleurs rendements d'extractions. Des traînées lumineuses sont parfois observées sur gel (surtout dans le cas du protocole du CIRAD) laissant penser qu'il y a des dégradations. Cependant, ces traînées peuvent être le résultat des structures secondaires des ARN. Des migrations effectuées en conditions dénaturantes devraient permettre d'éclaircir ce point et de sélectionner, parmi ces deux méthodes, la plus adaptée. En effet, les migrations sur gel en conditions dénaturantes permettent la séparation des ARN dénaturés uniquement en fonction de leur taille. Contrairement aux ADN, les ARN possèdent un haut degré de structures secondaires assez stables qui perturbent la migration

électrophorétique et faussent l'estimation du poids moléculaire. Le formaldéhyde, utilisé comme agent dénaturant, permet de déstabiliser les appariements entre bases et d'ainsi supprimer les structures secondaires de l'ARN.

Sur pulpe de bananes vertes, les rendements semblent meilleurs avec le protocole Liu *et al.* (1998). Toutefois, les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  ne sont pas satisfaisants que ce soit avec l'une ou l'autre méthode et les valeurs de rendements doivent être prises avec précaution. Les résultats obtenus sur gel sont encourageants et la réalisation de migrations en conditions dénaturantes devrait également, dans ce cas, favoriser une meilleure séparation des bandes. Toutefois, pour l'instant, la méthode Liu *et al.* (1998) est privilégiée de par sa rapidité d'exécution et son coût de réalisation inférieur à la méthode proposée par le CIRAD.

Sur peau de bananes jaunes, les deux méthodes donnent de bons résultats. Cependant, les rendements de la méthode du CIRAD n'ont pu être calculés car l' $A_{260}$  était systématiquement inférieur à 0,1 ce qui laisse penser que la méthode de Liu *et al.* (1998) est plus efficace. De plus, celle-ci montre de meilleurs rapports d' $A_{260}/A_{280}$ . Malheureusement, un manque de reproductibilité dans la méthode de Liu *et al.* (1998) met en doute son efficacité et de nouveaux essais doivent être réalisés afin de sélectionner la méthode la plus efficace sur peau de bananes jaunes.

Sur pulpe de bananes jaunes, le même problème de reproductibilité a été observé avec la technique de Liu *et al.* (1998). Cependant, cette technique a permis d'obtenir de très bons rapports d' $A_{260}/A_{280}$  ainsi que des bandes clairement séparées et non dégradées lors de la migration sur gel. Les essais réalisés avec le protocole du CIRAD ont également permis d'obtenir des bons résultats sur gel. Mais les rapports d' $A_{260}/A_{280}$  sont légèrement moins bons que ceux obtenus avec Liu *et al.* (1998). Par contre, avec Liu *et al.* (1998) l' $A_{260}$  était insuffisante que pour pouvoir calculer la concentration en ARN.

De nouveaux essais devront permettre de discriminer les deux méthodes et de sélectionner la plus appropriée pour effectuer des extractions d'ARN de pulpe de bananes jaunes.

La réalisation des essais supplémentaires nécessaires à chacun des 4 types d'extraction va rapidement permettre de sélectionner pour chaque cas la méthode d'extraction la plus efficace permettant d'obtenir des ARN de qualité, en quantité suffisante, et de manière reproductible.

Grâce à cet outil, l'identification de gènes différemment exprimés via l'étude des ARNm pourra être envisagée sur peau et pulpe de bananes non mûres et mûres.

Plus particulièrement, dans notre cas, les méthodes d'extractions d'ARN sélectionnées seront valorisées dans l'étude des mécanismes cellulaires et des déterminants génétiques qui sous-tendent les réactions de sensibilité des bananes aux maladies de conservation causées par *C. musae*. L'identification de ces mécanismes se fera par l'étude des gènes différemment exprimés au niveau transcriptionnel entre des bananes tolérantes et sensibles à ces maladies et permettra d'identifier des marqueurs moléculaires de sensibilité.

La technique cDNA-AFLP a été sélectionnée pour identifier les gènes différemment exprimés entre des bananes sensibles et tolérantes à *C. musae*. Cette sélection a été effectuée sur base des avantages et des inconvénients (cfr 5.3.de la synthèse bibliographique) que présente cette technique. De plus, elle est utilisée et maîtrisée depuis plusieurs années dans notre laboratoire et a clairement démontré ses avantages par rapport à d'autres techniques également basées sur la PCR comme le differential display et la RAP-PCR.

La mise en évidence des gènes régulant la sensibilité des bananes à *C. musae* permettra une meilleure compréhension des relations *C. musae*/banane. De plus, l'identification de lots plus ou moins sensibles à *C. musae* au moment de la récolte, pourrait servir, d'une part, à développer une lutte raisonnée, efficace et permettre d'envisager une orientation des lots vers différents types de marchés. D'autre part, après identification de marqueurs moléculaires caractérisant l'état physiologique au moment de la récolte, il peut être envisagé de les utiliser afin d'obtenir une récolte homogène ayant un état physiologique reproductible, ce qui est impossible à l'heure actuelle.

Ce projet visant à la caractérisation moléculaire des variations de sensibilité des bananes à *C. musae* s'articule autour de quatre étapes principales: (a) la mise au point des techniques de biologie moléculaire nécessaires à l'identification de marqueurs moléculaires; (b) la recherche de marqueurs moléculaires permettant de mettre en évidence précocement des différences de sensibilité à la maladie entre bananes; (c) la validation des marqueurs moléculaires en conditions réelles; (d) le séquençage et l'analyse des fonctions géniques.

**Arias P., Dankers C., Liu P. et Pilkauskas P.** (2004). L'économie mondiale de la banane 1985-2002. FAO, Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome 2004.

**Arshad M. and Frankenberger WT.** (2002). Ethylène. Dordrecht, NL : Kluwer Academic press.

*Atlas des Départements français d'Outre-Mer.* La Guadeloupe. Ed. CNRS. 1982

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. Moore D.D. Seidman J.A., Struhl K.** (1994). Current protocols in molecular biology. Wiley Interscience New-york.

**Avrova A., Venter E., Birch P. and Whisson S.** (2003). Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Genetics and Biology*. **40-1**, 4-14.

**Bachem CW, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG** (1996). Visualization of differential genes expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of genes expression during potato tuber development. *Plant journal* **9**: 745-753.

**Bachem CW., Oomen R., Visser R.** (1998), Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 157–173, 1998.

**Bachem C., Horvath B., Trindade L., Claassens M., Davelaar E., Jordi W. and Visser R.** (2001). A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development. *The Plant Journal*. **25-6**: 595-604.

**Bakry F., Carreel F., Caruana M.L., Côte F.X., Jenny C. et Tezenas du Montcel H.**(1997). Les bananiers. Dans : *L'amélioration des plantes tropicales*, Charrier A., Hamon S., Jacqot M. , Nicolas D. (eds.), Montpellier, CIRAD, ORSTOM, 109-139.

**Bauer D, Warthoe P, Rohde M, and Struss M** (1994) PCR methods and applications manual supplement, pp S805-809. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Biale J.B.** (1960). Respiration of fruits. In W. Ruhland ed: *Handbuch der pflanzenphysiologie*. 12-2. Pp : 536-586.

**Brat P., Yahia A., Chillet M., Bugaud C., Bakry F., Reynes M. et Brillouet JM.** (2004). Influence of cultivar, growth altitude and maturity stage on banana volatile compound composition. *Fruits*, **59**; 75-82.

**CABI** (2000). Crop protection compendium.

**Campalans A., Pages M., Messegueur R.** (2001). Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond. *Tree Physiology*. **21**: 633-643.

**Cappelli K., Porceddu A., Verini-Supplizi A., Capomaccio S., De Marchis F., Falcinelli M., Gaiti A. and Silvestrelli M.** (2005). cDNA AFLP-based techniques for studying transcript profiles in horses. *Research in Veterinary Science*. 79-2. 105-112.

**Champion J.** (1963). Le bananier. Paris, Maisonneuve et Larose, 263pp.

**Chang S, Puryear J Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* **11**: 113 – 116.

**Chang W.H., Hwang Y.J. and Wei T.C.** (1990). Chemical composition and enzyme activity of taiwan northern banana fruit of different maturity and harvested in different seasons. *Acta Horticulturae*, **275**. 621-629.

**Chen G., Ma W., Huang Z., Xu T., Xue Y. and Shen Y.** (2003). Isolation and characterization of *TaGSK1* involved in wheat salt tolerance. *Plant Science*. **165**: 1369-1375.

**Chen W., Tang D., Suo J., Zhang Y. and Xue Y.** (2001). Expressional profiling of genes related to pollination and fertilization in rice. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 324-12. 1111-1116.

**Chillet M. et de Lapeyre de Bellaire L.** (1996a). Conditionnement en polybag pour le contrôle de l'antracnose de blessures des bananes. *Fruits*, **51**, 163-172.

**Chillet M. et de Lapeyre de Bellaire L.** (1996b). Elaboration de la qualité des bananes au champ. Détermination de critères de mesure. *Fruits*, **51**, 317-326.

**Chillet M, de Lapeyre de Bellaire L., Dorel M, Joas J, Dubois C, Marchal J and Perrier X.** (2000). Evidence for the variation in susceptibility of bananas to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae* and the influence of edaphic conditions. *Scientia Horticulturae* **86**(1): 33-47.

**Ching-Yi Wan and Thea A. Wilkins.,** (1994). Analytical biochemistry **223**: 7-12: A modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L).

**Clendennen S. and May G.** (1997). Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* **115**: 463-469.

**Decorosi F., Viti C., Mengoni A., Bazzicalupo M. and Giovannetti L.** Available online 4 June 2005. Improvement of the cDNA-AFLP method using fluorescent primers for transcription analysis in bacteria. *Journal of Microbiological Methods*.

**de Diego J., Rodríguez F., Rodríguez Lorenzo J., Grappin P. and Cervantes E.** Available online 3 August 2005. cDNA-AFLP analysis of seed germination in *Arabidopsis thaliana* identifies transposons and new genomic sequences. *Journal of Plant Physiology*.

**Demoulin G., de Lapeyre de Bellaire L., Lassois L. et Jijakli H.** (2005). Facteurs explicatifs des pourritures de couronnes dans les plantations commerciales de banane export du Cameroun et méthodes de lutte alternatives. Rapport synthétique interne. 17p.

**Dickman M.** (2004). Les plantes modèles peuvent-elles contribuer à améliorer le bananier par la voie biotechnologique. *Infomusa*, **13-2**, 6-11.

**Ditt R., Nester E., Comai L.** (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biology*. **19**: 10954-10959.

**Ditt R., Nester E. and Comai L.** (2005). The plant cell defense and *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*. 247-2, 207-213.

**Drury R., Hortensteiner S., Donnison I., Bird C. and Seymour G.** (1999). Chlorophyll catabolism and gene expression in the peel of ripening banana fruits. *Physiologia Plantarum*, **107**: 32-38.

**Durrant W., Rowland O., Piedras P., Hammond-Kosack K., Jones J.** (2000). CDNA-AFLP reveals a striking overlap in race specific resistance and wound response gene expression profiles. *The Plant Cell*, **12**: 963-977.

**Feron R.** (2004). Application to the mRNA Capture Kit in cDNA-AFLP. *Biochemica*, n°3.

**Frossard P., Laville E. et Plaud G.** (1977). Etude des traitements fongicides appliqués aux bananes après récolte. Action de l'imazalil. *Fruits*, **32**, 673-677.

**Fukuda T., Kido A., Kajino K., Tsutsumi M., Miyauchi Y., Tsujiuchi T., Konishi Y. and Hino O.** (1999). Cloning of Differentially Expressed Genes in Highly and Low Metastatic Rat Osteosarcomas by a Modified cDNA-AFLP Method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 261-1. 35-40.

**Gao J., Liu J., Li B., Li Z.** (2001). Isolation and purification of functional total RNA from blue grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. *Plant molecular biology reporter*. 19 : 185a-185i.

**Gehrig H. Winter K., Cushman J., Borland A. and Taybi T.** (2000). An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* , **18**: 369-376.

**Geuna F., Harting H. and Scienza A.** (1998). A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. *Plant Molecular Biology Reporter*, **16**: 61-67.

**Gerstein A.S.** (2001). Molecular biology problem solver . A laboratory guide. Editeur New York : Wiley-Liss.

**Gooding P. and Robinson S.** (2001). Polyphenol oxidase activity and gene expression in the fruit of Goldfinger bananas. *Infomusa*, **10-2**: 17-22.



**Habu Y., Fukada-Tanaka S., Hisatomi Y and Iida S.** (1997). Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism-Based mRNA Fingerprinting Using a Single Restriction Enzyme That Recognizes a 4-bp Sequence' *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **234-2** : 516-521.

**Hartmann C.** (1992). La sénescence des végétaux. Hermann-Paris. Editeurs des sciences et des arts.

**Hardisson A., Rubio C., Baez A., Martin M., Alvarez R., Diaz E.** (2001). Mineral composition of the banana (*Musa asuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chemistry* ; **73** : 153-161.

**Hostachy B., Vegh I., Leroux P., Jacquemot E., Foucher S. et Pigou R.** (1990). Bananes de Martinique : Incidence des problèmes fongiques sur la qualité. *Phytoma*, **420**, 37-43.

**INIBAP** Networking bananas and plantains (septembre 2001).

**John and Marchal.** (1995). Ripening and biochemisry of the fruit. In : Gowen, S. eds. *Bananas and plantains*. Chapman and Hall, London, pp. 434-467.

**Jones D.R.** (1999). Diseases of banana, abaca and enset. *Cabi Publishing*.

**Krauss U., Bidwell R. and Ince J.** (1998). Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown rot of banana. *Biological control*, **13**, 111-119.

**Krauss U. and Johanson A.** (2000). Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands. *Crop Protection*, **19**, 151-160.

**Kuhn E.** (2001). From library screening to micro-arrayx technology: Strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Journals of Botany*. **87**: 1349-1358.

**Lassois Ludivine** (2003). Contribution à la mise au point d'une méthode de lutte biologique contre la maladie des pourritures de la couronne de la banane. Gembloux : FUSAGx, 85p (*Travail de fin d'études*)

**Liang P and Pardee AB** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967–971.

**Liang P., Bauer D., Averboukh L., Warthoe P., Rohrwild M., Muller H., Strauss M. and Pardee A.B.** (1995). Analysis of altered gene expression by differential display. *Method Enzymol.*, **254**, 304-321.

**Liu J., Goh C., Loh C., Liu P. and Pua E.** (1998). A Method for Isolation of Total RNA from Fruit Tissues of Banana. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 1-6.

**Lizada MCC et al.**, (1990) Ripening of banana. In: Hasson and pantastico Er B (eds), Banana pp 65-83. ASEAN Food Handling Bureau, Kuala Lumpur.

**Logemann J et al.**, (1987) Improved method for isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16 - 20

**Lukezic F. L., Kaiser J. and Martinez M.M.** (1967). The incidence of crown rot of boxed bananas in relation to microbial population of the crown tissue. *Canadian Journal of Botany*, **45**, 413-421.

**Manuel du planteur** (1998). SICABAM, Service Agrotechnique

**Marin-Rodriguez M., Smith D., Manning K., Orchard J. and Seymour G.** (2003). Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant molecular biology*, **51** : 851-857.

**Massart S. (2005).** Identification par la cDNA-AFLP de gènes potentiellement impliqués dans les propriétés de biocontrôle de la levure *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman (souche K), un agent antagoniste de *Botrytis cinerea* Pers. sur pommes en conservation. Thèse de doctorat. FUSAGX.

**Matz M and Luckyanov SA. (1998).**, Different strategies of Differential display: areas of application, *Nucleic Acids Research* **26**: 5537-5543

**Mbéguié-A-Mbéguié D.** (2000). Isolement, identification et caractérisation de gènes impliqués dans la maturation de l'abricot (*Prunus armenica* L.). Thèse de doctorat. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille.

- Mehar H. Asif Dahawn P., Nath P.** (2000). A simple procédure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**:109-115.
- Medina-Suarez R., Manning K., Fletcher J., Aked J., Bird C. and Seymour G.** (1997). Gene expression in the pulp of ripening bananas. *Plant Physiol.* **115**: 453-461.
- Mendez C., Forster M., Rodriguez-Delgado M., Rodriguez-Rodriguez E. et Romero C.** (2003). Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife and Ecuador. *Eur. Food Res. Technol.* **217**: 287-290.
- Mondego J., Simões-Araújo J., de Oliveira D. and Alves-Ferreira M.** (2003). A gene similar to bacterial translocase I (mra Y) identified by cDNA-AFLP is expressed during flower bud development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 164-3. 323-331.
- Nassuth A., Pollari E., Helmeczy K., Dewart S., Kofalvi S.** (2000). Improved RNA isolation extraction and one tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. virol. Methods.* **90**: 37-49.
- Ngeze P.B.** (1994). Bananas and their management. Editeur Bukoba (Tanzanie) : Kagera Writers and Publishers Co-operative Society.
- Nolin J.** (1989). Qualité et traitement fongicide. IRFA/CIRAD.
- Omoaka P.O.** (2000). Postharvest physiology, ripening and quality evaluation in banana (*Musa sp.*) fruits. *Leuven : KUL*. Thèse de doctorat.
- Palmer J.K.** (1971). The banana. In : Hulme, A.C. (ed). *The biochemistry of fruits and their products*. Academic Press, London, pp. 65-105.
- Ploetz R.C., Thomas J.E. and Slabaugh W.R.** (2003). Disease of banana and plantain. In : *Diseases of tropical fruit crops*. Edited by Ploetz R.C. CABI Publishing.
- Prabha T. and Bhagyalakshmi N.** (1998). Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. *Phytochemistry.* **48-6**: 915-919.

**Ramonell K. and Somerville S.** (2002). The genomics parade of defense responses: to infinity and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, **5-4** : 291-294.

**Reijans M., Lascaris R., Groeneger A., Wittenberg A., Wesselink E., van Oeveren J., de Wit E., Boorsma A., Voetdijk B., van der Spek H.** (2003). Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and genechip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*. **82-6**. 606-618.

**Rodríguez M., Canales E., Borroto C., Carmona E., López J., Pujol M. and Borrás-Hidalgo M.** Available online 12 September 2005. Identification of genes induced upon water-deficit stress in a drought-tolerant rice cultivar. *Journal of Plant Physiology*.

**Savelkoul P., Aarts H., De Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J., Schouls L. and Lenstra J.** (1999). Amplified fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of clinical microbiology*: 3083-3091.

**Salzman R., Fujita T., Zhu-Salzman K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A.** (1999). An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*. **17**: 11-17.

**Seymour G.B.** (1993) Banana. In : Biochemistry of fruit ripening. Seymour G.B., Taylor J.E. and Tucker G.A.. Eds Chapman and Hall.

**Slabaugh W. R. and Grove M.D.** (1982). Postharvest diseases of bananas and their control. *Plant disease*, **66**, 746-750.

**Stover R.H. and Simmonds N.W.** (1987). Bananas. Essex, Longman, third edition, 468 pp.

**Trindade L., Horvath B., Bachem C., Jacobsen E. and Visser R.** (2003). Isolation and functional characterization of a stolon specific promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Gene*, 303-16. 77-87.

**Trindade L., Horvath B., Berloo R. and Visser R.** (2004). Analysis of genes differentially expressed during potato tuber life cycle and isolation of their promoter regions. *Plant Science*, **166-2**. 423-433.

**Turner D.W.** (1997). Bananas and Plantains. In : *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits*. S.K. Mitra. CAB International.

**Van der Biezen E., Juwana H., Parker J., Jones J.** (2000). cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13-8** :895-898.

**Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Pelemans J., Kuiper M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* **23**: 4407-4414.

**Wade N.L. and Bishop D.G.** (1978). Changes in the lipid composition of ripening banana fruits and evidence for associated increase in cell membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta*, **529**: 454-464.

**Wan C. and Wilkins T.** (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton. *Analytical Biochemistry.* **223**:7-12.

**Weaver C. and Charley H.** (1974). Enzymatic browning of ripening bananas. *Journal of food science* **39**.

**Wu Y., Llewellyn D., Dennis E.** (2002). A quick and easy method for isolating good quality RNA from cotton tissues. *Plant Molecular Biology Reporter.* **20**: 213-218.

**Zhang L., Meakin H. and Dickinson M.** (2003) Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat using cDNA-AFLP. *Molecular Plant Pathology.* **4-6**: 469-477.

**Zhang P., Whistler R., BeMiller J., Hamaker B.** (2005). Banana starch: production, physicochemical properties and digestibility – A review. *Carbohydrate Polymers.* **59**: 443-458.

**Zude M.** (2003). Non-destructive prediction of banana fruit quality using VIS/NIR spectroscopy. *Fruits*, **53**; 135-142.

Sites internet visités:

[www.promega.com](http://www.promega.com): RNA Analysis notebook. Mise à jour: janvier 2004. Consultation: mars 2004.

[www.ambion.com](http://www.ambion.com): Consultation Mars 2004.

### **Annexe 1 :**

#### Travailler dans un environnement RNases-free. Les précautions à prendre avec le matériel

- La préparation du matériel, la manipulation des échantillons et la réalisation des manipulations s'effectuent avec des gants régulièrement renouvelés.
- Toute la verrerie utilisée doit passer la nuit dans un four à une température minimum de 180°C afin d'inactiver les RNases.
- Le matériel en plastique (embouts pour pipettes, tubes type « eppendorfs », ...) est prélevé dans des sacs neufs dont l'usage est réservé aux manipulations des ARN
- Le matériel ne pouvant être passé au four (matériel d'électrophorèse, bouchon de bouteilles « schott », etc...) ainsi que la table de travail sont traités soit avec un inhibiteur de RNase (Rnase ERASE, ICN biomedical) soit mis à tremper durant une nuit dans une solution de SDS 1%.

## Annexe 2 :

### Travailler dans un environnement RNases-free. Les précautions à prendre avec les réactifs

- Les solvants et réactifs utilisés sont prélevés à partir de bouteilles encore scellées. Ces bouteilles sont réservées aux manipulations relatives à l'extraction d'ARN et les prélèvements de produits se font avec des spatules préalablement passées au four à 180°C durant une nuit.
- A l'exception des solutions contenant du Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris), l'eau et les solutions aqueuses préparées sont traitées avant leur utilisation avec du diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1%. Ce dernier est un inhibiteur de RNase. Un ml de DEPC est ajouté par litre de solution et après une nuit d'agitation sous hotte, les solutions sont autoclavées 20 minutes à 120°C pour dénaturer le DEPC.
- Pour les solutions contenant du Tris, la démarche est différente car le DEPC dénature le Tris. Dans ce cas, il faut renforcer les précautions en vue d'éviter des contaminations par des RNases. Les solutions de Tris à préparer sont 10 × concentrées. La quantité voulue de Tris est pesée dans un berlin RNase-free et mise en solution dans de l'eau DEPC autoclavée. Il faut toujours prévoir 10 % de volume de solution en plus. Ce volume additionnel sert à calculer la quantité d'HCl ou de NaOH concentré à utiliser en vue d'ajuster le pH. Ce volume est multiplié par 10 et cette quantité est ajoutée à la solution de Tris. La solution obtenue est transvasée dans une bouteille Schott RNase-free.