THE 109

UNIVERSITE PARIS XI

UNIVERSITE PARIS VI

Institut National Agronomique PARIS-GRIGNON

DEA

ECOPHYSIOLOGIE ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS D'INVERTEBRES TERRESTRES

1992-1993

ETUDE DES INTERACTIONS DU NEMATODE *RADOPHOLUS SIMILIS* (COBB, 1893) THORNE 1949, AVEC DIFFERENTES VARIETES DE BANANIERS ET VARIABILITE DE LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES DE CES VARIETES

Catherine VALETTE

Rapport de stage effectué
sous la direction de J.L. SARAH
Laboratoire de Nématologie
CIRAD-FLHOR

CIRAD-FLHOR - Avenue du Val de Montferrand - BP 5035 - 34032 MONTPELLIER cedex

DK 5220

THE 104

UNIVERSITE PARIS XI
UNIVERSITE PARIS VI
Institut National Agronomique PARIS-GRIGNON

DEA

ECOPHYSIOLOGIE ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS D'INVERTEBRES TERRESTRES

1992-1993

ETUDE DES INTERACTIONS DU NEMATODE *RADOPHOLUS SIMILIS* (COBB, 1893) THORNE 1949, AVEC DIFFERENTES VARIETES DE BANANIERS ET VARIABILITE DE LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES DE CES VARIETES

Catherine VALETTE

Rapport de stage effectué
sous la direction de J.L. SARAH
Laboratoire de Nématologie
CIRAD-FLHOR

CIRAD-FLHOR - Avenue du Val de Montferrand - BP 5035 - 34032 MONTPELLIER cedex

Remerciements

Je remercie vivement Monsieur Sarah pour son accueil au sein de son laboratoire de nématologie du CIRAD FLHOR, pour ses conseils et son soutien.

Je remercie également Monsieur Boisseau qui a pris le temps de m'initier aux techniques de nématologie et de photographie, et Madame Teissier pour la mise en page de ce mémoire.

Merci à Monsieur Soler et à Monsieur Marchal pour leur aide concernant la mise au point, la réalisation des manipulations physiologiques et l'interprétation des résultats.

Merci à Monsieur Lebrun pour ses conseils techniques.

Merci à toutes les personnes du laboratoire de cytogénétique du CIRAD et en particulier à Monsieur Escoute et à Madame Triaire pour m'avoir guidée dans la réalisation des coupes histologiques.

Enfin, je remercie tout particulièrement les membres du laboratoire de nématologie CIRAD-ORSTOM pour leurs encouragements, leur patience et surtout leur bonne humeur.

RESUME

Etude des interactions du nématode *Radopholus similis* (Cobb, 1913) avec différentes variétés de bananiers et variabilité de la teneur en composés phénoliques de ces variétés.

Les modalités concernant la migration préférentielle de *Radopholus similis* (Cobb, 1913), population originaire de Côte d'Ivoire, vers la variété sensible Poyo (AAA, sous groupe Cavendish) et la variété partiellement résistante Yangambi (AAA, sous groupe Ibota) ainsi que la pénétration des nématodes dans les racines de ces deux mêmes variétés ont été étudiées.

La variété Yangambi apparaît répulsive pour les nématodes, alors que la variété Poyo ne semble pas être attractive. *R. similis* pénètre moins rapidement dans les racines de la variété Yangambi que dans celles de la variété Poyo. Mais, *R. similis* est présent, 48 heures après inoculation, dans les plants des deux cultivars. Ces résultats complètent les observations de F. Blavignac (1989) et C. Sabatini (1991) sur les différences d'évolution des populations de nématodes à l'intérieur des racines.

En parallèle, l'analyse comparative des phénols présents dans six cultivars (dont Poyo et Yangambi) a montré l'existence de différences de la teneur en composés phénoliques selon les variétés.

Les études ici réalisées constituent une approche à la compréhension des mécanismes de la résistance variétale.

Mots-clés: bananiers, composés phénoliques, dynamique de pénétration, migration préférentielle, nématodes phytophages, résistance variétale, *Radopholus similis*.

SUMMARY

Study of the interactions between the *Radopholus similis* nematode and different varieties of bananas and variability of the content in phenol compounds of the varieties.

Research has been carried out on the modes of preferential migration of *Radopholus similis* (Cobb, 1913), which originated in the Ivory Coast, into the sensitive Poyo variety (AAA, Cavendish sub-group) and the partially resistant Yangambi variety (AAA, Ibota sub-group), as well as on the penetration of nematodes into the roots of these two varieties.

The nematodes seem to be repelled by the Yangambi, whereas the Poyo does not seem to attract them. *R. similis* penetrates the roots of the Yangambi less rapidly than those of the Poyo. But it can be found in the plantlets of both cultivars, 48 hours after inoculation. These results complete the observations made by F. Blavignac in 1989 and C. Sabatini in 1991 on the different rates of evolution of the nematodes' populations inside the roots of the plantlets.

Similarly, a comparative analysis of the phenols present in six varieties (including Poyo and Yangambi) has shown up the existence of a difference in the phenol make up according to the varieties.

The research undertaken here is an approach to understanding the mechanisms of resistance among varieties.

Key-words : Bananas, phenol compounds, dynamic of penetration, preferential migration, plant parasitic nematode, *Radopholus similis*, resistant varieties.

S O M M A I R E

	Pages
I - INTRODUCTION	1
II - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	4
1 - L'HOTE	4
2 - LE NEMATODE	5
2.1 - Anatomie	5
2.2 - Biologie	5
2.3 - Répartition géographique	6
2.4 - Variabilité biologique	6
2.5 - Relations bananier-nématode	7
3 - SENSIBILITE VARIETALE	7
III - MATERIELS ET METHODES	8
1 - LES NEMATODES	8
2 - LE MATERIEL VEGETAL	8
3 - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	11
IV - RESULTATS	17
1 - ETUDE COMPARATIVE DE L'ATTRACTIVITE DE DEUX VARIETES DE BANANIERS	17
2 - ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE PENETRATION DES NEMATODES DANS LES RACINES DE DEUX VARIETES, PAR HISTOLOGIE	18
3 - MISE EN EVIDENCE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE ET ANALYSE COMPARATIVE DES PHENOLS PRESENTS DANS 6 CULTIVARS	19
V - DISCUSSION	23
1 - MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS EXPERIMENTALES	23
2 - ATTRACTION ET PENETRATION DES NEMATODES DANS LA RACINE	24
VI - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES D'AVENIR	27
Bibliographie	
Annexes I à VIII	

I - INTRODUCTION

Jusqu'au début du 20° siècle, la banane était considérée comme un produit rare, de luxe dans les pays tempérés. Son commerce ne s'est développé que depuis 1870, date des premières exportations vers les pays tempérés. Même si la banane d'exportation ne représente que 12 % de la production mondiale, elle est, de nos jours, un des piliers de l'économie de pays tels que la Côte d'Ivoire ou encore l'Amérique Latine dont elle constitue une des principales sources de revenus. C'est ce que les Anglo-saxons appellent couramment "l'industrie bananière" (Champion "le bananier" 1963).

Mais la banane, qu'elle soit "banane dessert" ou "banane à cuire" (les deux principales catégories de bananes) est attaquée par de nombreux ravageurs et parasites. Ainsi *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne 1949, nématode endoparasite migrateur *Pratylenchidae*, est un des plus dangereux ravageurs de la culture bananière (Adiko, 1988). Il est présent dans toutes les zones de production. Suite à l'extension de la culture commerciale, des rejets contaminés ont été plantés dans des sols jusque là sains. *R. similis* est le plus répandu des nématodes inféodés au bananier (Sarah, 1989 ; Gowen et Quénéhervé, 1990).

R. similis est directement responsable de dégâts racinaires ayant pour conséquences un mauvais ancrage du bananier dans le sol (donc facilement déracinable par le vent), une réduction de la croissance (perturbation de la nutrition minérale et hydrique), ou encore entrainant une production de régimes de petite taille.

Egalement, par les lésions qu'il cause au parenchyme cortical, il ouvre la voie à des pathogènes, parasites secondaires, tels que les champignons. On peut citer en exemples l'interaction *R. similis & Cylindrocladium macrosporum*, considéré comme le principal parasite fongique d'origine tellurique sur racines de bananiers en Martinique (Loridat, 1989), ou encore *R. similis & Fusarium oxysporum* (Folkerstema, 1987). Les pathogènes amplifient les nécroses racinaires initiées par *R. similis*.

L'association peut être spécifique. Ainsi, *R. similis* est indispensable à la pénétration d'*Aspergillus stromaticum* dans la racine (Pinochet et Stover, 1980).

Elle peut être aspécifique. Ainsi, *Fusarium oxysporum* interagit le plus souvent avec *R. similis* mais aussi avec *Helicotylenchus multicinctus* (Folkerstema, 1987).

Pendant longtemps, la prolifération des nématodes et notamment de *R. similis*, n'a pu être limitée que par lutte chimique, donc par des mesures de lutte aprés plantation telles que l'emploi de nématicides de types carbamates ou organophosphorés dont la plupart sont systémiques. Parmi les plus utilisés : l'aldicarbe, le fénamiphos (systémiques) ou encore l'ethoprofos (non systémique) (Jones & Reynolds, 1983). Les inconvénients de ces produits résident dans leur toxicité envers la plante et ses consommateurs, et envers l'environnement. Pour être efficaces, ils doivent, en plus, être utilisés dans des proportions énormes dans certains pays (15 à 20 kg de matière active / ha / an, Sarah 1989).

Les recherches se sont multipliées dans le but de trouver des méthodes alternatives non toxiques pour la plante et son environnement, pour à terme, mettre en place un programme de lutte intégrée (Cayrol et Djian - Caporalino et Pachaud - Mattei, 1993). Parmi ces méthodes, on trouve des mesures de lutte avant plantation telles qu'un assainissement du sol, même partiel, par les techniques de jachère et de rotations culturales (plantes non hôtes de *R. similis*), par inondation du sol de quelques semaines équivalent à une jachère nue de dix à douze mois (Sarah et al., 1983 ; Mateille, Foncelle et Ferrer, 1988) ou encore telles qu'un assainissement des plants (Quénéhervé et Cadet, 1985) et plus récemment l'utilisation de plants indemnes de nématodes obtenus par la technique de micropropagation *in vitro* (Sarah, 1990).

Actuellement, l'accent est mis sur la résistance variétale qui pourrait devenir une des principales composantes des stratégies de lutte intégrée. Ainsi, la variété Yangambi est plus résistante aux attaques de *R. similis* que la variété Poyo dite sensible (Sarah et al., 1992); c'est à dire que la croissance des populations de nématodes parasitant le cultivar Yangambi est limitée par rapport au Poyo.

Les études ici réalisées constituent une approche à la compréhension des mécanismes de résistance des bananiers aux nématodes.

La première partie s'intéresse au comportement des nématodes vis à vis de la plante, en comparant : La migration préférentielle de *R. similis* entre deux cultivars, l'un partiellement résistant, l'autre sensible (attractivité et/ou répulsion, lors de la phase préinfectieuse) et la dynamique de pénétration de *R. similis* dans les racines de ces deux mêmes cultivars par des observations histologiques, visant à déterminer si la pénétration est ralentie dans les plants résistants (barrières physiques et/ou chimiques).

Suite à une blessure ou à une infection des tissus du bananier, la concentration des phénols augmente et joue un rôle important dans l'inhibition de la croissance des parasites et de l'activité de leurs enzymes hydrolytiques (Beckman et Mueller, 1969). R. Mahajan (1992) a démontré que certains composés phénoliques avaient un haut degré d'activité nématicide (Coumestrol et Juglone entrainent 100 % de mortalité). Mateille (1992) a prouvé que le métabolisme des phénols racinaires est lié à la fois à la variété et à l'espèce de nématodes, ainsi la variété Gros Michel, partiellement résistante, a une concentration phénolique supérieure à celle de la variété Poyo, et la pénétration de *R. similis* est plus rapide dans les racines du Poyo que du Gros Michel. Mace (1963) a décrit des cellules spécialisées dans les racines de bananiers, contenant d'importantes concentrations d'un phénol identifié comme étant la 3 hydroxytyramine (= dopamine).

On peut donc émettre l'hypothèse d'un rapport entre le degré de résistance d'un plant et sa composition en dérivés phénoliques et leur concentration relative.

La seconde partie des expériences ici réalisées a donc pour but d'étudier les variations qualitative et quantitative des phénols présents dans 6 cultivars et donc la corrélation éventuelle de la résistance ou tolérance, avec tel ou tel composé phénolique préformé dans le plant (Schlösser, 1980).

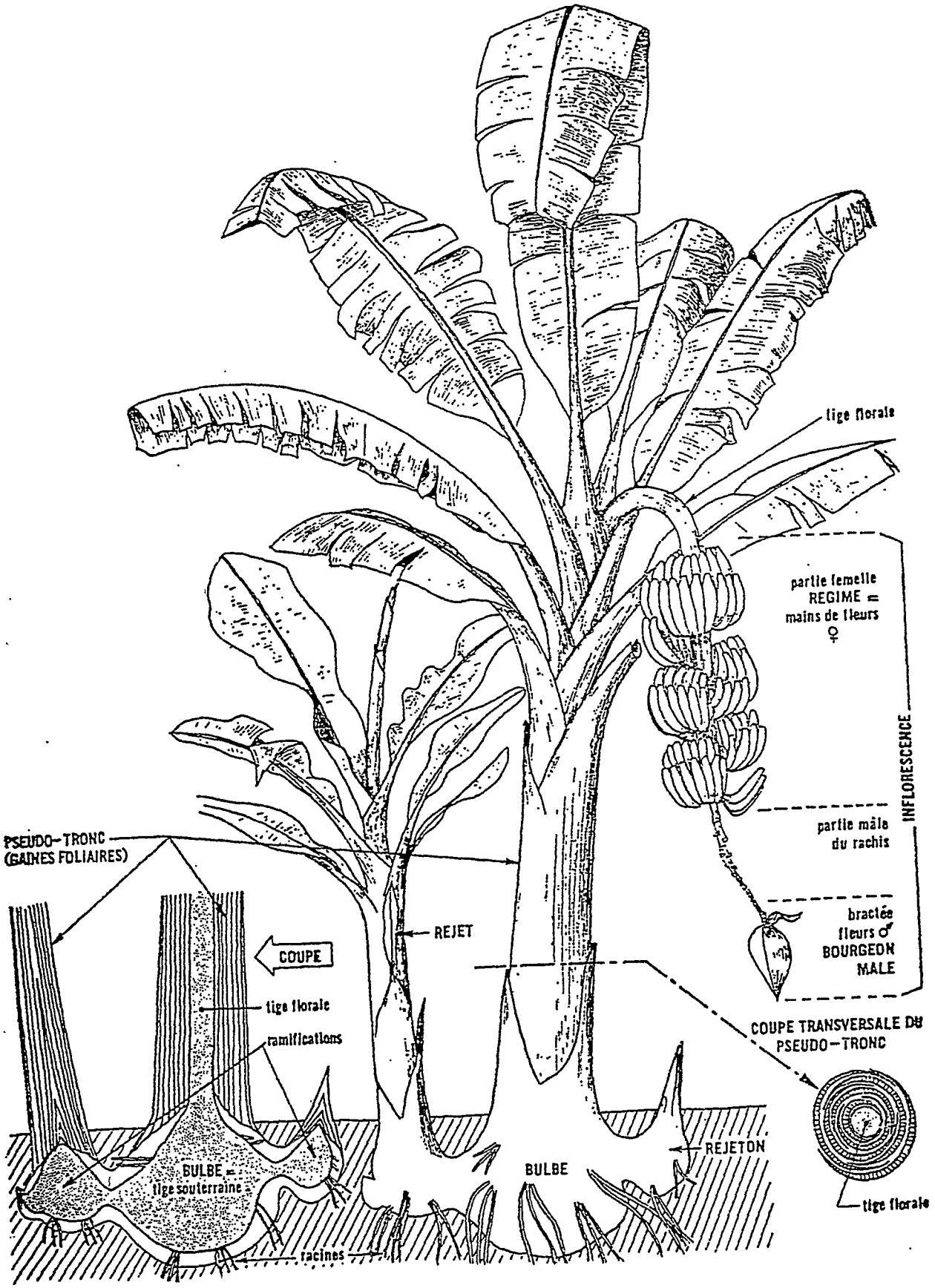


Figure n°1: VUE SCHEMATIQUE D'UN BANANIER A LA FRUCTIFICATION, ET DE SES REJETS (d'aprés Champion, 1963).

II - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1 - L'HOTE

Le bananier est une monocotylédone, appartenant à la famille des Musacées.

La section *Eumusa* du genre *Musa* regroupe tous les bananiers comestibles à fruits parthénocarpiques (Champion, 1963; Horry, 1989).

Il est admis que les variétés actuelles de bananiers sont issues du croisement de deux espèces diploïdes fertiles, *Musa acuminata* Colla et *Musa balbisiana* Colla, de génôme noté respectivement AA et BB. Lors de ces croisements, certains processus génétiques tels que la polyploïdie ou la parthénocarpie sont intervenus et ont abouti à la formation de variétés triploïdes et tétraploïdes. Les variétés sont classées selon leur génôme (Stover et Simonds, 1987).

* Triploïdes AAA : Ce groupe comprend les variétés à fruits doux, dont celles du sous-groupe Cavendish (Poyo, par exemple) les plus cultivés pour l'exportation, citons aussi le sous-groupe Red ou la variété Yangambi (sous groupe Ibota).

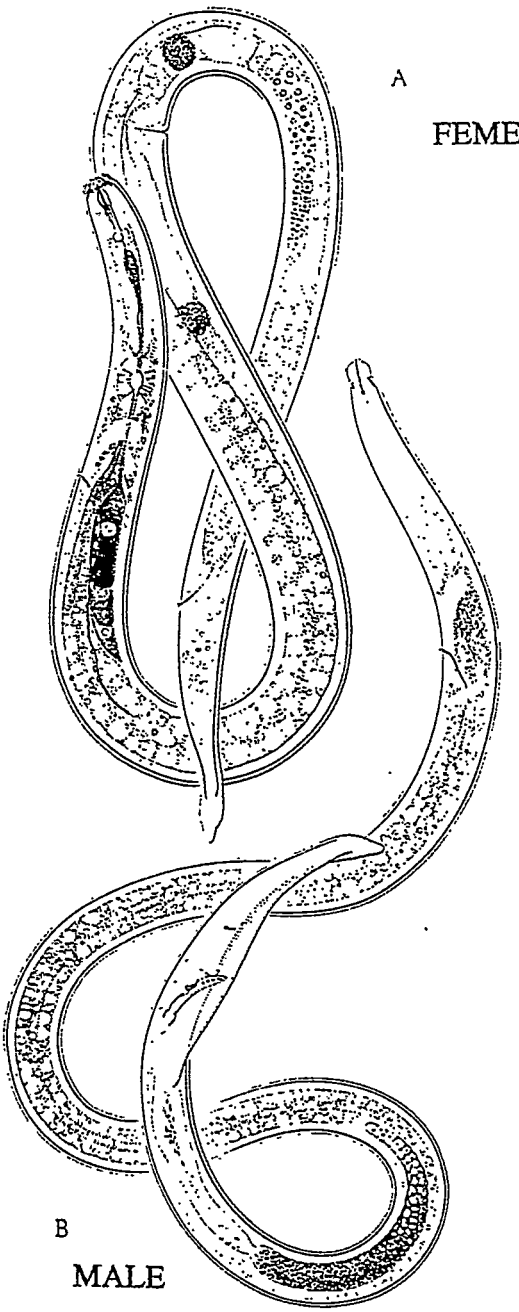
* Triploïdes AAB : Ce groupe renferme des variétés à fruits doux et à cuire, notamment le sous-groupe des plantains.

* Triploïdes ABB : Variétés à cuire.

Les plantains et autres bananes à cuire constituent la base de l'alimentation humaine dans de nombreux pays de la zone tropicale alors que les triploïdes AAA sont les plus exportés donc les plus importants économiquement.

Le bananier est une plante herbacée de grande taille. La tige vraie est souterraine, et improprement appelée rhizome ou bulbe. Ce bulbe émet de nombreuses racines cylindriques et donne des ramifications latérales appelées rejets qui assurent la pérennité.

RADOPHOLUS SIMILIS



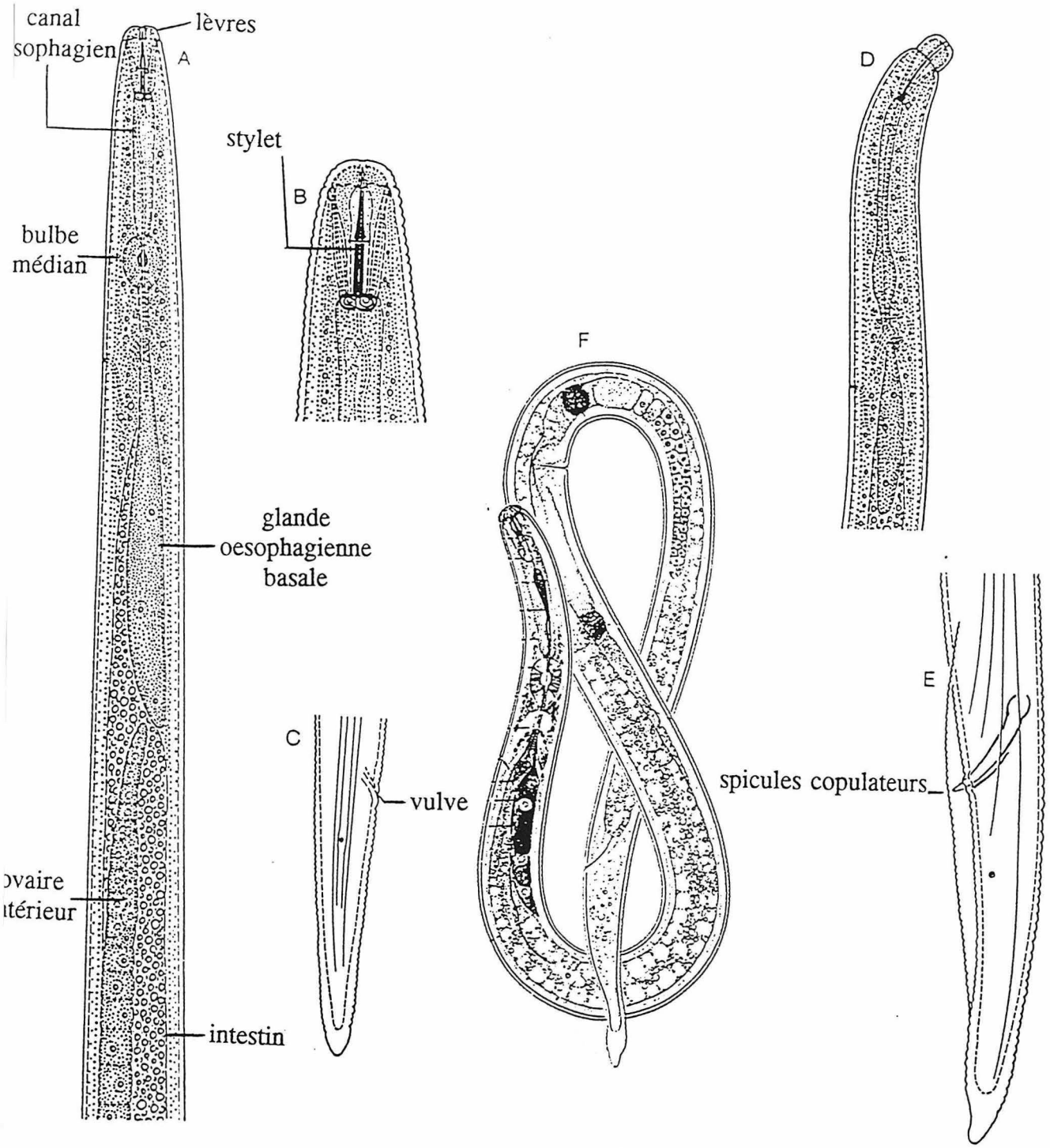


Figure n°2: RADOPHOLUS SIMILIS (COBB)

A - Région antérieure d'une femelle.

B - Tête d'une femelle. L = 590 - 670 μm

C - Région postérieure d'une femelle.

D - Région antérieure d'un mâle. L = 520 - 880 μm

E - Région postérieure d'un mâle.

L = longueur du corps

F - Jeune femelle.

(tiré de "Plant Nematology" par S.M.AYOUB)

Les feuilles possèdent une partie basale bien développée appelée "gaine foliaire". L'ensemble des gaines foliaires imbriquées forme `le pseudo-tronc ou faux-tronc ; il est droit, cylindrique, rigide et peut atteindre 6 à 8 m dans le cas de certaines variétés géantes. La moyenne étant de 2 à 4 m pour les variétés les plus répandues. Aprés avoir produit environ 30 feuilles fonctionnelles (ce nombre varie selon les variétés), le méristème central subit une action hormonale qui stoppe la différenciation des ébauches foliaires et détermine celle de l'inflorescence.

La récolte des régimes de fruits encore verts, marque le terme de l'existence du bananier. C'est un rejet qui croît alors à son tour pour assurer un nouveau cycle de production (Cf. fig.1).

2 - LE NEMATODE

2.1 - ANATOMIE

R. similis fait partie des nématodes phytoparasites (Loos, 1962). Sa taille est inférieure à 1 mm.

Il est caractérisé par une tête bien différenciée, un stylet, un bulbe oesophagien basal glandulaire recouvrant la partie antérieure de l'intestin. La femelle possède 2 ovaires.

Le dimorphisme sexuel est marqué. Ainsi le stylet et l'oesophage sont beaucoup plus développés chez la femelle que chez le mâle. Le mâle présente un renflement de la partie céphalique (Cf. fig.2).

2.2 - BIOLOGIE

R. similis appartient à la famille des *Pratylenchidae*. C'est un endoparasite migrateur; endoparasite car il vit et se nourrit à l'intérieur d'un autre organisme appelé hôte (Philemon, 1986), et migrateur car il conserve sa mobilité aprés avoir pénétré à l'intérieur des racines et garde ainsi la capacité de les quitter.

Tout le cycle biologique se déroule à l'intérieur des racines, et les générations se succèdent aussi longtemps que les tissus présentent des conditions favorables de vie et d'alimentation. Dès que cela n'est plus le cas, *R. similis* quitte la racine et passe dans le sol à la recherche d'une nouvelle racine dans laquelle il pénètre.

Tout le système racinaire est susceptible d'être attaqué simultanément.
Le cycle complet d'oeuf à oeuf, dure 20 jours, à une température comprise entre 25 et 30° C. La femelle de *R. similis* pond 4 à 5 oeufs par jour, pendant 2 semaines. Il existe 4 stades juvéniles tous infestants. En période favorable, l'accroissement de population peut être de 1 à 20 en 45 jours (Sabatini, 1991).

En l'absence de plantes hôtes, les nématodes peuvent survivre jusqu'à 10 mois dans le sol (Sarah, 1989).

2.3 - REPARTITION GEOGRAPHIQUE

R. similis est une espèce particulièrement redoutable, non seulement par le fait de sa nocivité, puisqu'elle provoque des dégâts considérables chez plusieurs cultures tropicales, mais aussi par sa répartition géographique.

Ainsi, *R. similis* est présent dans toutes les régions de production de bananes, à l'exception d'Israël et des îles Canaries (ACTA-FNGPC, 1971), contrées dans lesquelles les conditions climatiques favorables au développement de *R. similis* ne sont pas réunies à longueur d'année (Sarah, 1989).

2.4 - VARIABILITE

En 1956, Ducharme et Birchfield ont montré l'existence de 2 races physiologiques de *R. similis* morphologiquement identiques, mais différant par leur faculté à infester les racines de bananier et de citrus (Blake, 1961; O'Bannon, 1977).

Van Weerdt, en 1957, a tenté d'obtenir l'infestation de citrus par *R. similis* du bananier et a échoué. Les nématodes de l'espèce "bananier" ne peuvent se reproduire dans les citrus. Par contre, *R. similis* " citrus " attaque le bananier et possède un spectre d'hôtes trés étendu puisqu'il affecte de nombreuses cultures telles que celles du café, maïs, noix de coco, canne à sucre mais aussi des mauvaises herbes (Philemon, 1986).

Les 2 races diffèrent par leur nombre de chromosomes. *R. similis* (citrus) en possède 5 paires alors que *R. similis* (banane) en possède généralement 4 paires (Huettel *et al.*, 1982, Huettel *et al*, 1984). Ces races ont été élevées au rang d'espèces par Huettel *et al.* en 1984.

Les 2 espèces sont reproductivement isolées, les phéromones sexuelles différant (Blake, 1966).

Par ailleurs, l'étude de populations issues de plusieurs zones bananières d'Amérique Centrale a montré qu'il existe de nombreux pathotypes distincts par leur taux de reproduction dans les bananiers (Edwards et Wehunt, 1967). Ceci peut expliquer les différences de pathogénicité entre populations de *R. similis*, et par conséquent les différences de dégâts observées selon les régions (Sarah et al., 1993).

2.5 - RELATIONS BANANIER-NEMATODE

Grâce à leur stylet développé, les femelles et les larves pénètrent dans les racines de bananier. La plupart des nématodes pénètre préférentiellement près de l'extrémité racinaire, en arrière du méristème (Blake, 1967), alors que toute la longueur de la racine est disponible puisqu'aucune lignification n'intervient avec l'âge de la racine. Les nématodes se déplacent entre les cellules du parenchyme cortical, provoquant ainsi la formation de galeries, et se nourissent de leur cytoplasme. Alors que le noyau augmente de taille puis se désintègre, le cytoplasme se rétracte, la membrane cellulaire se rompt et entraîne la formation d'une cavité au sein des tissus du bananier.

Le cylindre central n'est jamais envahi par *R. similis*, l'endoderme épaissi jouant peut-être le rôle de barrière (Blake, 1961).

Dès 72 h, la racine peut présenter, extérieurement, à l'endroit de la pénétration du nématode, un tiret de couleur rouge brique, qui au fil des jours, s'élargira et se développera en profondeur.

3 - SENSIBILITE VARIETALE

La majorité des triploïdes AAA, AAB, ABB sont sensibles aux attaques de *R. similis* (Pinochet, 1988).

La présence de *R. similis* dans les plantains de certaines zones de Côte d'Ivoire est due à la proximité des cultures de bananes d'exportation telles que celles de la variété Poyo, véritables sources d'inoculum de *R. similis* (Sarah, 1985). Toutefois, les plantains sont généralement moins attaqués, vraisemblablement du fait de leur mode de culture moins intensif (Adiko, 1988).

La variété Yangambi (AAA) s'est révélée partiellement résistante et présente donc, un grand intérêt dans un programme de sélection variétale (Sarah et al., 1992).

Photo n°1 : Dispositif utilisé pour la culture monoxénique de *Radopholus similis* sur carottes.

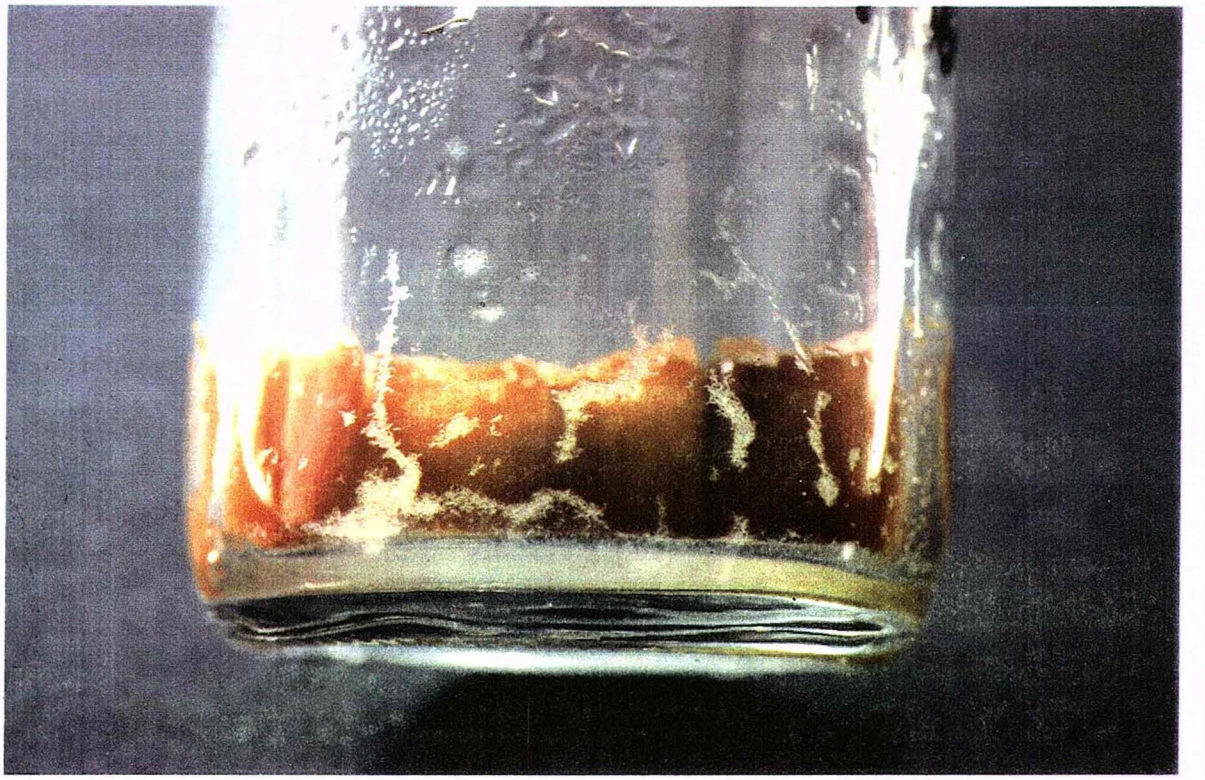


Photo n°2 : *Radopholus similis* migrant sur les parois du flacon.

III - MATERIELS ET METHODES

1 - LES NEMATODES

Les nématodes utilisés lors des inoculations appartiennent à l'espèce *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne 1949.

La population étudiée est originaire de Côte d'Ivoire, population hautement pathogène comme démontré par F. Blavignac (1989) et confirmé par C. Sabatini (1991) (Sarah *et al.*, 1993). *R. similis* est issu de culture monoxénique sur carottes (Cf. annexe I), méthode d'élevage adaptée de celle mise au point par O'Bannon et Taylor (1968) et Boncato et Davide (1980).

Les nématodes se développent dans des disques de carottes positionnés au-dessus d'un fond de gélose, d'environ 5 mm, dans des flacons d'un volume de 100 ml (Cf. photo n°1). La gélose permet le maintien d'une humidité suffisante. Au bout de 4 semaines, les nématodes commencent à apparaître sur les parois des flacons (Cf. photo n°2). Ils sont alors facilement récupérables par lavage à l'eau stérile. Les nématodes recueillis sont alors comptés dans un volume aliquote. La concentration de la suspension initiale est ensuite facilement ajustable par dilution. A l'aide d'une micropipette, le volume (environ 1 ml) correspondant à l'inoculum souhaité est alors prélevé et réparti, le plus équitablement possible, sur les racines à inoculer.

2 - LE MATERIEL VEGETAL

Les bananiers utilisés sont issus de micropropagation végétative *in vitro* (Cf annexe II). Ils sont donc parfaitement sains, surtout dépourvus de nématodes. Seules des variétés triploïdes sont utilisées (Cf. photo n°3).

* ETUDE COMPARATIVE DE L'ATTRACTIVITE DE 2 VARIETES POUR LE NEMATODE

2 variétés triploïdes sont utilisées :

* **Poyo cv 901 (AAA)** sous groupe Cavendish. Cultivar sensible.
* **Yangambi km 5 (AAA)** sous groupe Ibota. Cultivar partiellement résistant.

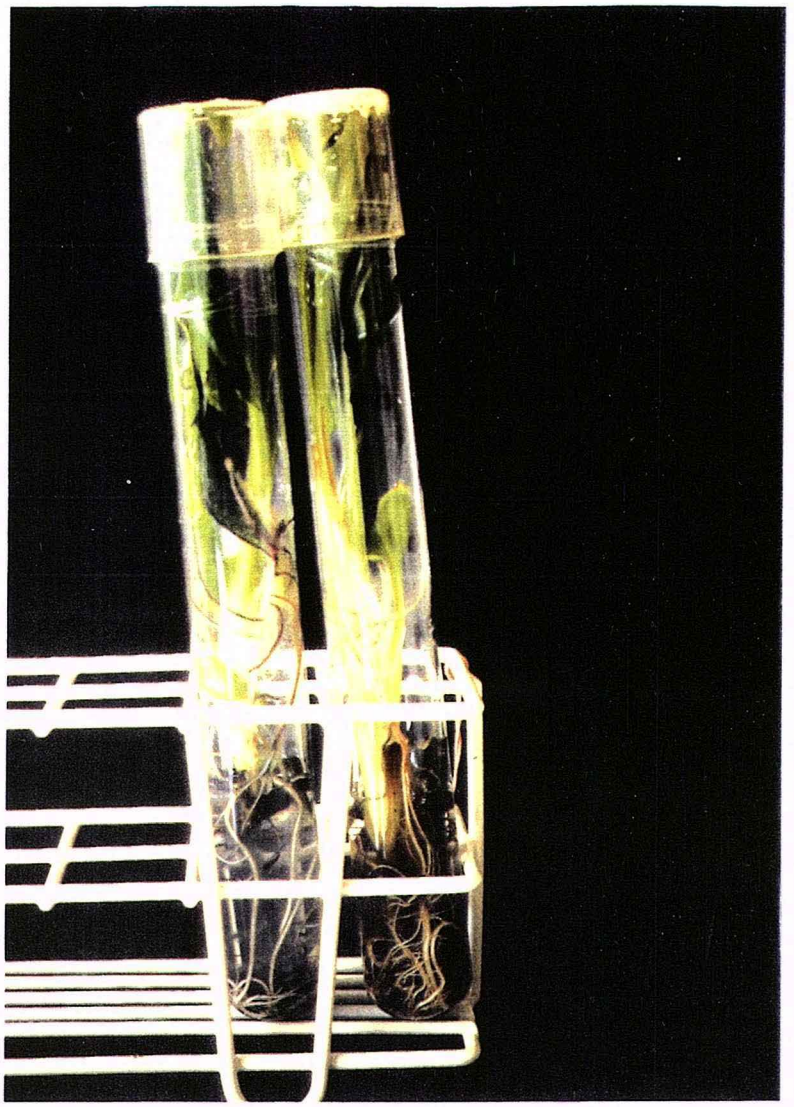


Photo n°3 : Bananiers cultivés *in vitro*.

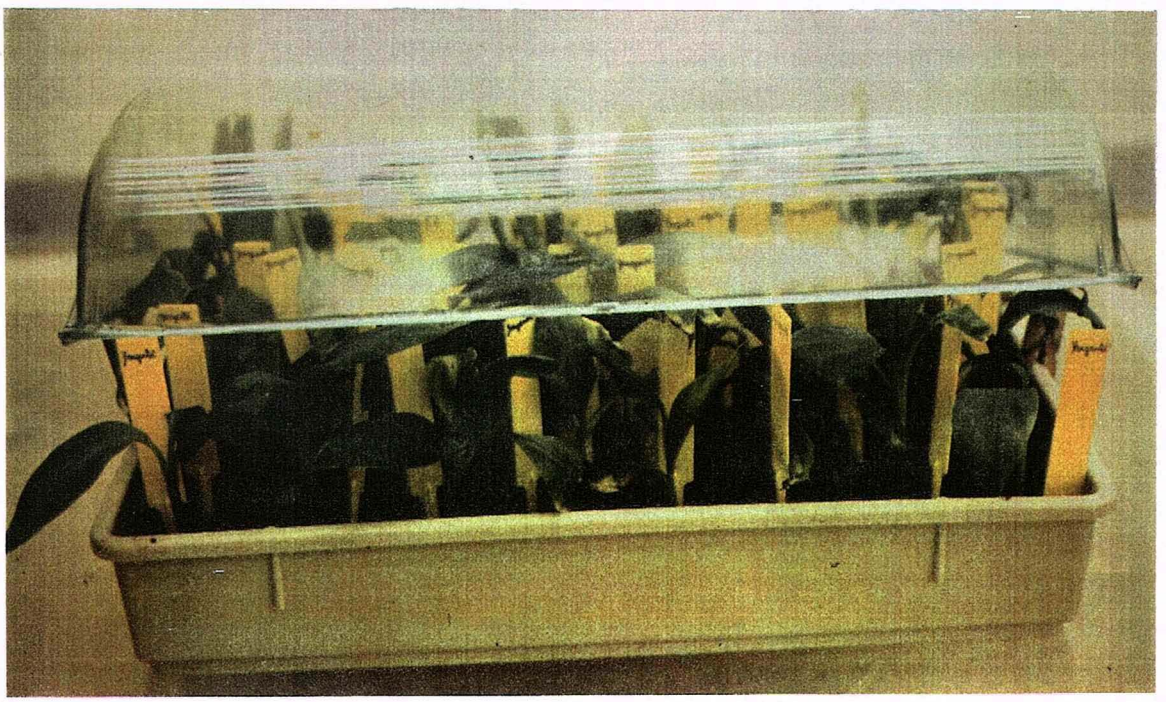


Photo n°4 : Miniserre utilisée pour le sevrage de bananiers provenant de micropropagation *in vitro*.

Les bananiers utilisés sont directement issus de la micropropagation végétative *in vitro*, sans période d'acclimatation préalable.

Ils sont sortis des tubes et mis en place dans les compartiments 1 et 3 du dispositif expérimental, pour les variétés Poyo et Yangambi respectivement (détails du dispositif p. 11).

* ETUDES HISTOLOGIQUES DE LA DYNAMIQUE DE PENETRATION DES NEMATODES DANS LES RACINES

2 variétés triploïdes de groupe génomique "AAA" sont utilisées :

* **Poyo cv 901 (AAA)** sous groupe Cavendish. Cultivar sensible.
* **Yangambi km 5 (AAA)** sous groupe Ibota. Cultivar partiellement résistant.

Les plants issus de la micropropagation sont sortis des tubes au bout d'un mois environ et placés dans du sable de Fontainebleau stérilisé, additionné d'engrais : Engrais NPK (N : 15 % ; P : 11 % ; K : 13 %) à libération retardée contenant de la magnésie ainsi que des oligo-éléments tels que le bore, le cuivre, le molybdène ou encore le zinc, d'une durée d'action de 3 à 4 mois, à raison de 4 grammes environ par pot.

Les pots (de dimensions 7.5 x 7.5 x 8 cm) contenant les plants sont placés dans une cellule climatique (28° C, 80 % d'humidité relative, photopériodisme 12 h/12 h).

Durant la première semaine de croissance à l'air libre, et de façon à maintenir un taux d'hygrométrie élevé, les plants sont arrosés tous les jours et placés dans une mini-serre (Cf. photo n°4). Cette dernière permet ainsi une acclimatation progressive des jeunes plants à l'air libre.

Ensuite, ils ne seront plus arrosés que tous les deux jours. Un mois plus tard, les plants sont sortis des pots, les racines soigneusement nettoyées à l'eau courante. Ils sont alors prêts à être utilisés pour les expériences d'inoculation.

Photo n°5 : Bananiers de la variété Poyo issus de micropropagation *in vitro*, placés dans la cellule climatique.

* RECHERCHE DE COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES RACINES

6 variétés triploïdes de 3 groupes génomiques différents sont utilisées :

* **Poyo cv 901 (AAA)** sous groupe Cavendish. Cultivar sensible.
* **Yangambi km 5 (AAA)** sous groupe Ibota. Cultivar partiellement résistant.
* **Fougamou (ABB)** Sensibilité inconnue.
* **Cachaco (ABB)** Cultivar sensible.
* **Pisang ceylan (AAB)** Cultivar partiellement résistant.
* **Red yade (AAB)** Cultivar moyennement résistant.

Le nombre de plants utilisés lors de cette expérience, est de 9 pour les variétés Poyo, Yangambi, Cachaco, Pisang ceylan, Red yade, et de seulement 6 pour la variété Fougamou (disponibilité réduite).

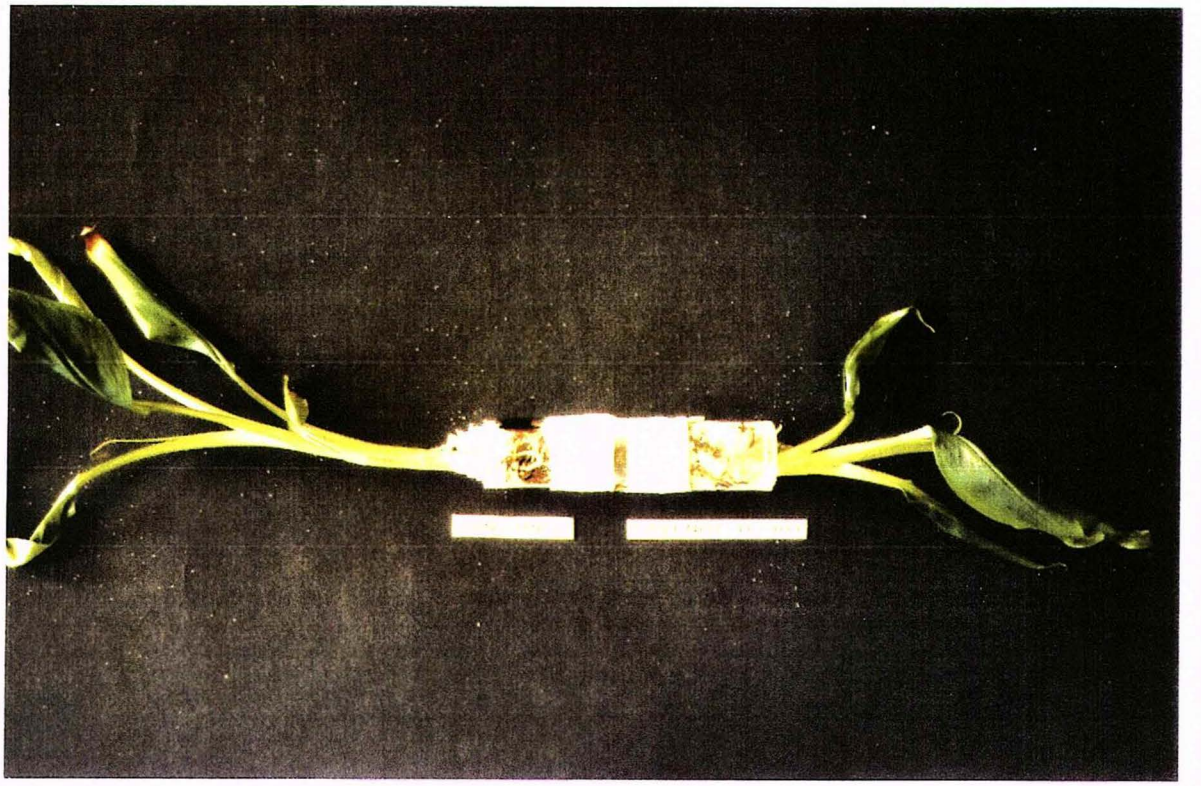
Les plants issus de la micropropagation *in vitro* sont sortis des tubes et placés dans du terreau, stérilisé dans un four Pasteur à 180° C pendant 1 heure, et additionné d'engrais à libération retardée.

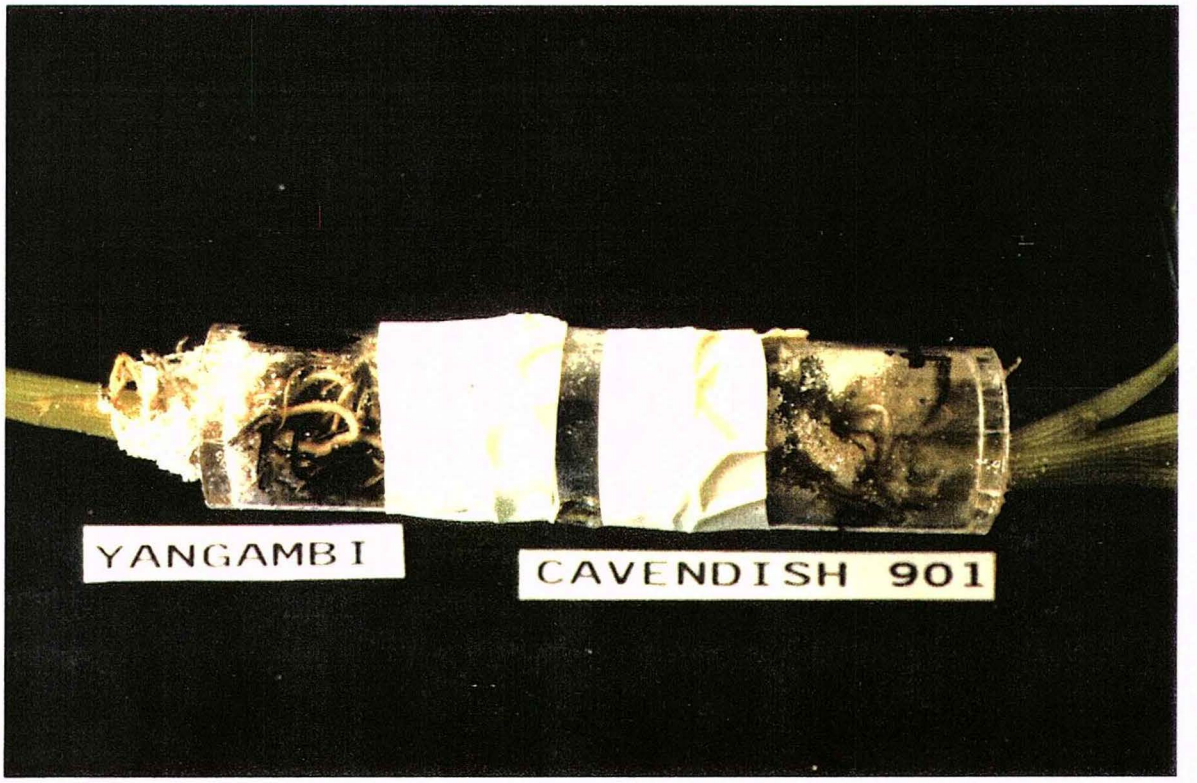
Comme dans le cas des études histologiques, les plants sont acclimatés progressivement à l'air libre.

Lorsque les plants sont âgés de 3 à 4 mois (Cf. photo n°5), à l'exception du cultivar Fougamou, âgé de 5 mois car ayant une croissance bien moins rapide que celle des autres variétés, ils sont retirés des pots en prenant garde de ne pas léser les racines.

Celles-ci sont alors nettoyées à l'eau courante, les plants sont mesurés.

Une fois les racines fraîchement coupées et pesées, elles sont rapidement congelées à l'azote liquide puis lyophilisées. Elles sont ensuite finement broyées, l'extraction spécifique des phénols totaux peut alors commencer (Cf annexe IV) ; elle sera suivie par l'analyse des composés extraits par les techniques d' HPLC (High Performance Liquid Chromatography), HPTLC (High Performance Thin Liquid Chromatography), densitométrie et spectrophotométrie UV.





Photos n°6 et 7 : Dispositif expérimental de l'étude comparative de l'attractivité de deux variétés.

3 - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

* DEROULEMENT DES EXPERIENCES ET DISPOSITIFS

Etude comparative de l'attractivité de deux variétés.

DOSE INOCULUM : 400 Nématodes

2 facteurs sont observés :

1° facteur : Variétés

2 objets : - Poyo cv 901

- Yangambi km 5

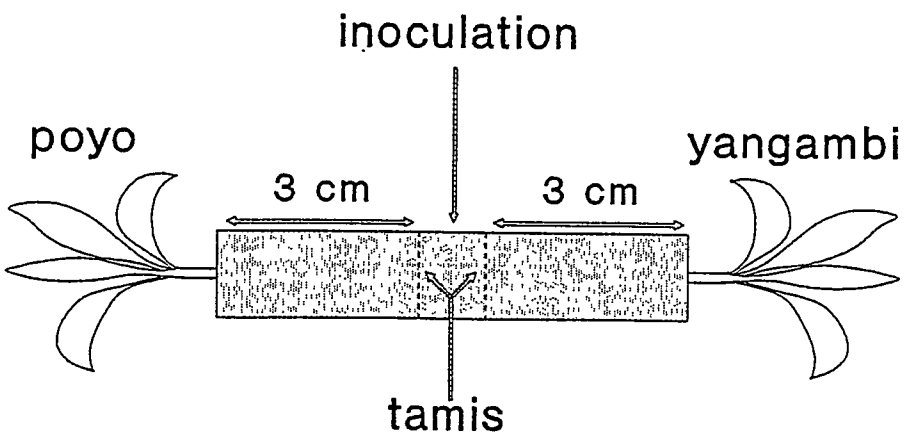
2° facteur : Dates d'observation

2 objets : - 24 h

- 48 h

Il y a un plant par objet, 4 objets et 5 répétitions, soit au total 20 plants (10 Poyo et 10 Yangambi).

* DISPOSITIF EXPERIMENTAL



Le dispositif expérimental est formé d'un tube plastique de longueur 7 cm et de diamètre égal à 2 cm, ouvert aux deux extrémités et rempli de sable de Fontainebleau (Cf. photos n°6 et 7).

Le tube est coupé en 3 tronçons, grâce à une scie à métaux; des tamis de 250 μm permettant le passage des nématodes, sont placés aux extrémités des compartiments 1 et 3 en contact avec le compartiment 2 et également à chaque extrémité du compartiment 2.

La base des plants est placée dans les compartiments 1 et 3 (compartiment 1 : variété Poyo; compartiment 3 : variété Yangambi). L'inoculation des nématodes est effectuée dans le compartiment médian 2. Des tamis destinés à maintenir le sable lors du montage, sont soigneusement ajustés et collés par la chaleur aux bases des compartiments.

Une humidité élevée, durant toute la durée de l'expérience, est indispensable à la survie des plants. Ainsi, les dispositifs reposent sur du sopalin humide et en sont également recouverts. Ils sont placés dans une cellule à 28° C et 80 % d'humidité. 5 dispositifs dont les compartiments 1 et 3 sont dépourvus de plants, servent de témoins.

Aprés 24 h, les 5 premiers dispositifs sont démontés, les nématodes de chacun des 3 compartiments sont extraits par la méthode de centrifugation-flottation décrite en annexe III, puis dénombrés.

Aprés 48 h, le contenu des 5 autres dispositifs est à son tour examiné.

Etudes histologiques de la dynamique de pénétration des nématodes dans les racines.

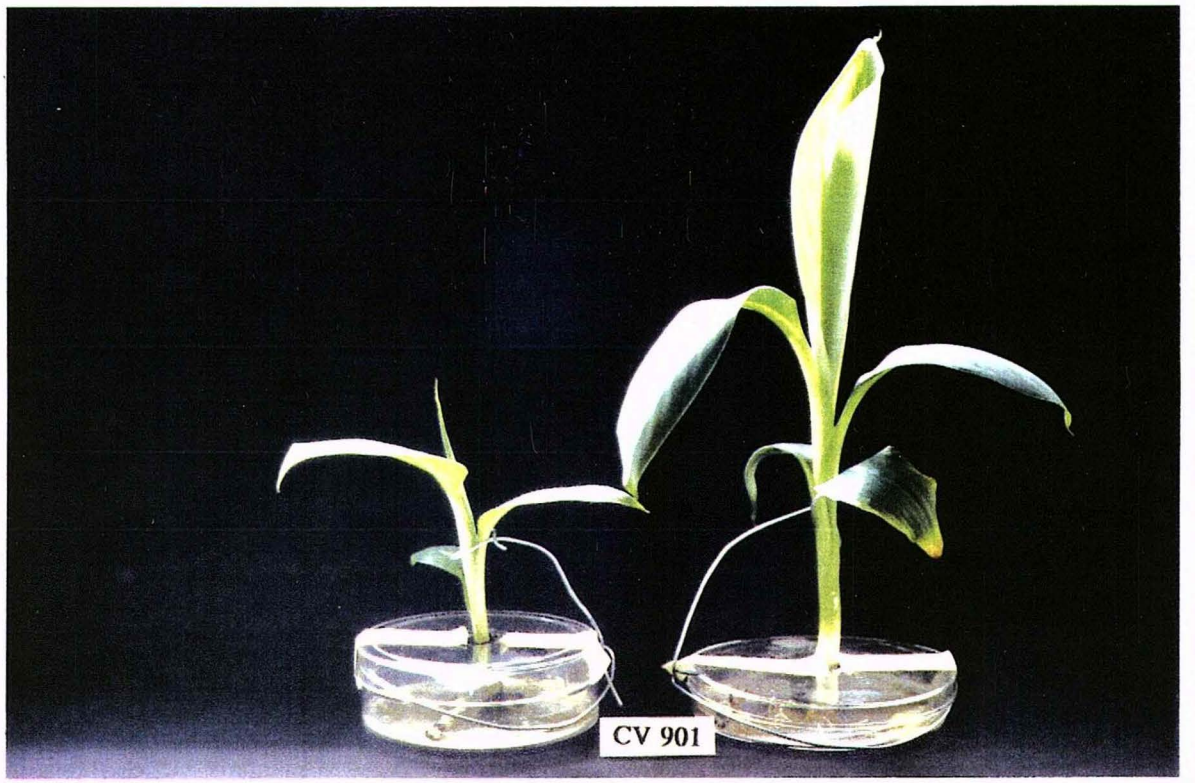
DOSE INOCULUM : 100 nématodes par plant.

2 facteurs sont observés :

1° facteur : Variétés

2 objets : - Poyo cv 901

- Yangambi km 5



Photos n°8 et 9 : Dispositif expérimental de l'étude de la dynamique de pénétration des nématodes dans les racines.

2° facteur : Dates d'observation aprés inoculation

4 objets : * 24 h

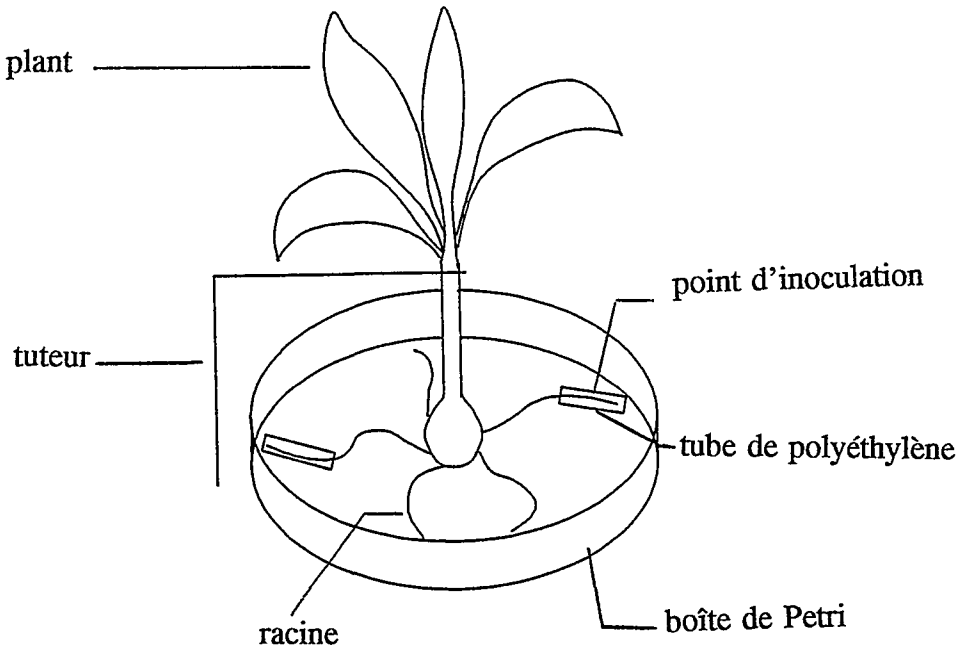
* 48 h

* 72 h

* 96 h

Dix plants de chaque variété (3 à 24 h, 3 à 48 h, 2 à 72 h, 2 à 96 h) ont été utilisés.

DISPOSITIF EXPERIMENTAL



Les plants à inoculer sont placés dans une boîte de Pétri (9 cm de diamètre, 1,6 cm de hauteur). Il sont maintenus droits par un fil de fer servant de tuteur. On pratique une ouverture de 1 cm environ de diamètre au centre du couvercle de chaque boîte, pour permettre le passage du pseudo - tronc. Le couvercle est fendu en deux parties pour permettre l'inoculation des racines. Du sable de Fontainebleau stérilisé est disposé sur le fond de la boîte. Le plant est posé dessus et les racines sont ensuite recouvertes de sable. Le sable sert de substrat pour les nématodes. En effet, ceux-ci se déplacent dans la pellicule d'eau entourant les particules solides du sol.

L'extrémité de chaque racine est enfilée dans un embout conique de polyéthylène percé d'un trou (Cf. photos n°8 et 9). Ce dispositif vise à permettre une inoculation, la plus précise

TABLEAU A - CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE

VARIETES	ECHANTILLONS	HAUTEUR DU PLANT (en cm)	POIDS FRAIS RACINAIRE (en g)	POIDS SEC RACINAIRE (en g)
CACHACO	CA2	26	26	0,93
	CA3	35	10	0,27
RED YADE	RY10	27	38	1,17
	RY11	43	29	0,95
	RY12	37	25	0,73
	RY13	42	28	0,87
POYO	CV19	28	22	0,67
	CV20	32	18	0,47
	CV21	36	17	0,61
	CV22	40	18	0,63
PISANG CEYLAN	PC28	42	37	1,54
	PC31	48	27	0,96
YANGAMBI	Y37	34	47	1,75
	Y39	32	36	1,39
FOUGAMOU	F46	16	10	0,3
	F47	16	8	0,10
	F48	20	18	0,56
	F49	23	20	0,71
	F50	19	17	0,53
	F51	19	17	0,47

possible, des nématodes sur la racine. Les coupes histologiques étant trés fines (3μm), il est nécessaire de connaître avec un maximum de précision, l'endroit où les nématodes ont été déposés, donc l'endroit au niveau duquel ils sont supposés avoir pénétré. Les racines sont coupées en morceaux de 2 à 3 mm et fixées 24 à 96 heures après inoculation.

Après déshydratation, imprégnation et inclusion dans la résine, les morceaux sont coupés au microtome à 3 μm et les coupes obtenues sont colorées après montage, à l'Acide Périodique Schiff + Aniline Blue Black mettant en évidence les polysaccharides, les protéines et les noyaux (Cf annexe V).

120 coupes, horizontales et transversales, de chaque échantillon sont pratiquées.

Mise en évidence qualitative et quantitative des phénols présents dans 6 cultivars.

L'objectif de ces expériences est de chercher une corrélation éventuelle de la résistance ou de la tolérance d'un cultivar avec tel ou tel composé phénolique, et la détermination éventuelle des relations entre le métabolisme phénolique et le mécanisme de résistance. Ces études poursuivent les travaux menés par T. MATEILLE (1992). Dans le cadre de ce travail, seuls des plants non infestés par les nématodes sont utilisés. Il s'agit de mettre en évidence d'éventuelles différences des composantes phénoliques préformées entre les variétés, avant une réaction de défense hypothétique.

L'analyse quantitative de la teneur en phénols totaux présente dans les extraits racinaires de 6 cultivars a été réalisée par la technique de spectrophotométrie en UV à 689 nm. Selon la disponibilité en plants de chaque cultivar, de 2 à 6 extraits racinaires ont été testés (Cf Tableau A).

Une gamme étalon est réalisée selon le protocole suivant :

- 3 ml de Na2CO3 5 % dans H2O.
- Echantillon de 150 μl.

acide p.coumarique (solution à 20 mg/ml)	méthanol
0	150
10	140
25	125
50	100
100	50
150	0

- 50 μl de réactif Folin Ciocalteu.

On laisse reposer 1 h 30 à 25° C et on mesure la densité optique à 689 nm par spectrophotométrie UV. 50 μl de chaque extrait méthanolique racinaire sont ensuite testés.

Les analyses quantitative et qualitative se feront par HPLC à longueur d'onde fixe (High Performance Liquid Chromatography) à 280 et 320 nm, HPLC à barettes diodes et HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) avec analyse au densitomètre. Cette analyse permet de mettre en évidence des variations qualitatives de la teneur en phénols totaux, entre les extraits méthanoliques des 6 cultivars. Deux types de chromatographes ont été utilisés.

Un premier, trés sensible, dit "à longueur d'onde fixe", grâce auquel les échantillons (Cf tableau A) ont été analysés à 2 longueurs d'onde caractéristiques des phénols : 280 et 320 nm.

Un second, à barettes diodes, moins sensible que le premier, grâce auquel les échantillons (Cf tableau A) ont été analysés à 280 nm, 320 et 360 nm. L'intérêt de ce chromatographe est sa faculté à délivrer les spectres d'absorption de chaque pic entre 240 et 400 nm. Il permet également de superposer les chromatogrammes d'un même échantillon aux 3 longueurs d'onde caractéristiques des phénols: 280, 320 et 360 nm.

L'analyse chromatographique sur couche mince ou HPTLC utilise des plaques d'aluminium revêtues de cellulose (Merck, 0,1 mm d'épaisseur). Le solvant utlisé est le M.F.E (méthyl-isobutyl-cétone, acide formique, eau (3:1:2, V/V/V) en mono-dimensionnelle.
La couleur de fluorescence, des différents groupes de phénols, sous lumière UV permet une première caractérisation. Elle peut être modifiée par exposition des plaques aux vapeurs d'ammoniaque et permettre ainsi une identification plus sûre.

TABLEAU I - ETUDE COMPARATIVE DE L'ATTRACTIVITE DE 2 VARIETES DE BANANIER

*** Répartition des nématodes récoltés dans les trois compartiments du dispositif expérimental, 24 h après inoculation, en l'absence de bananiers (témoins)**

DISPOSITIF	1	2	3	4	5	TOTAL
Nombre de nématodes						
Compartiment 1	44	70	46	60	43	**263**
Compartiment 2	93	98	92	155	162	**600**
Compartiment 3	46	62	38	57	36	**239**
% de nématodes						
Compartiment 1	24	30,4	26,1	22	17,8	**23,8**
Compartiment 2	50,8	42,6	52,3	57	67,2	**54,5**
Compartiment 3	25,1	27	21,6	21	15	**21,7**
Nombre total de nématodes récupérés	183	230	176	272	241	**1 102**
% total de nématodes récupérés par rapport aux inoculés	**45,75**	**57,5**	**44**	**68**	**60,25**	**55,1**

Compartiment 1, 2, 3 : sans bananier (Inoculation dans le compartiment 2)

Nombre de nématodes inoculés : 400 par répétition soit 2 000 au total

TABLEAU II - ETUDE COMPARATIVE DE L'ATTRACTIVITE DE 2 VARIETES DE BANANIER (POYO & YANGAMBI)

*** Répartition des nématodes récoltés dans les trois compartiments du dispositif expérimental, 24 h après inoculation, en présence de bananiers**

DISPOSITIF	1	2	3	4	5	TOTAL
Nombre de nématodes						
Compartiment 1	41	83	41	48	86	**299**
Compartiment 2	145	31	173	213	158	**720**
Compartiment 3	17	26	19	30	15	**107**
% de nématodes						
Compartiment 1	20,2	59,3	17,6	16,5	33,2	**26,5**
Compartiment 2	71,4	22,1	74,2	73,2	61,0	**64,0**
Compartiment 3	8,4	18,6	8,2	10,3	5,8	**9,5**
Nombre total de nématodes récupérés	203	140	233	291	259	**1 126**
% total de nématodes récupérés par rapport aux inoculés	**50,8**	**35**	**58,3**	**72,8**	**64,8**	**56,3**

Compartiment 1 : avec bananier (Poyo)
Compartiment 2 : compartiment d'inoculation
Compartiment 3 : avec bananier (Yangambi)

Nombre de nématodes inoculés : 400 par répétition soit 2 000 au total

TABLEAU III - ETUDE COMPARATIVE DE L'ATTRACTIVITE DE 2 VARIETES DE BANANIER (POYO & YANGAMBI)

*** Répartition des nématodes récoltés dans les trois compartiments du dispositif expérimental, 48 h après inoculation, en présence de bananiers**

DISPOSITIF	1	2	3	4	5	TOTAL
Nombre de nématodes						
Compartiment 1	93	48	31	30	9	**211**
Compartiment 2	73	88	99	74	89	**423**
Compartiment 3	40	30	11	15	9	**105**
% de nématodes						
Compartiment 1	45,2	28,9	22,0	25,2	8,4	**28,6**
Compartiment 2	35,4	53,0	70,2	62,2	83,2	**57,2**
Compartiment 3	19,4	18,1	7,8	12,6	8,4	**14,2**
Nombre total de nématodes récupérés	206	166	141	119	107	**739**
% total de nématodes récupérés par rapport aux inoculés	**51,5**	**41,5**	**35,3**	**29,8**	**26,8**	**37,0**

Compartiment 1 : avec bananier (Poyo)
Compartiment 2 : compartiment d'inoculation
Compartiment 3 : avec bananier (Yangambi)
Nombre de nématodes inoculés : 400 par répétition soit 2 000 au total

TABLEAU IV - RESULTATS ET GROUPES HOMOGENES DETERMINES PAR LE TEST DE NEWMAN - KEULS
(au seuil de 5 % avec estimation)

	Moyenne du nombre de nématodes récupérés		
	24 h après inoculation (sans bananier)	**24 h après inoculation (avec bananiers)**	**48 h après inoculation (avec bananiers)**
Compartiment 1	52,6 cd	55,4 cd	42,2 d
Compartiment 2	120,0 b	173,8 a	84,6 c
Compartiment 3	47,8 cd	25,8 de	21,0 de

Les moyennes accompagnées de la même lettre ne sont pas significativement différentes.

IV - RESULTATS

1 - ETUDE COMPARATIVE DE L'ATTRACTIVITE DE DEUX VARIETES DE BANANIERS

Les résultats sont consignés dans les tableaux I à III. Les observations des dispositifs témoins et des dispositifs avec plants, à 24 h puis 48 h après inoculation, sont analysées indépendamment.
Des analyses de variance ont été réalisées sur toutes les variables et le test de Newman et Keuls (au seuil de 5 %) a permis de classer les moyennes.
Le traitement des données a été réalisé sur le logiciel STATITCF (Cf tableau IV).

* Dispositifs témoins (TABLEAU I)

Sur 2000 nématodes inoculés au total, seuls **55,1 %** ont été récupérés, soit un peu plus d'un nématode sur deux (Cf TABLEAU I). Le compartiment 2 (ou compartiment d'inoculation) présente, à chacune des 5 répétitions, un nombre de nématodes jusqu'à 4 fois supérieur à celui des compartiments 1 et 3 pris séparément.
Les quantités de nématodes dans les compartiments 1 et 3 ne sont pas significativement différentes (Cf TABLEAU I et IV).
L'observation à la loupe binoculaire montre que les nématodes, extraits des 3 compartiments, sont tous trés mobiles.

* Dispositifs avec plants : **24 heures post inoculation** (TABLEAU II)

Le pourcentage total de nématodes récupérés est de **56 %**, soit sensiblement identique à celui des dispositifs témoins (Cf TABLEAU II). Le compartiment 2 (compartiment d'inoculation) présente un nombre de nématodes significativement supérieur à celui de chacun des deux autres compartiments, comme observé dans le cas des dispositifs témoins.
On constate par ailleurs, dans les 5 répétitions, la présence d'un nombre de nématodes significativement supérieur dans le compartiment 1 (Poyo) mais non différent du compartiment 1 témoin, de 1 à 5 fois plus, à celui dénombré dans le compartiment 3 (Yangambi)
Cf TABLEAU II.

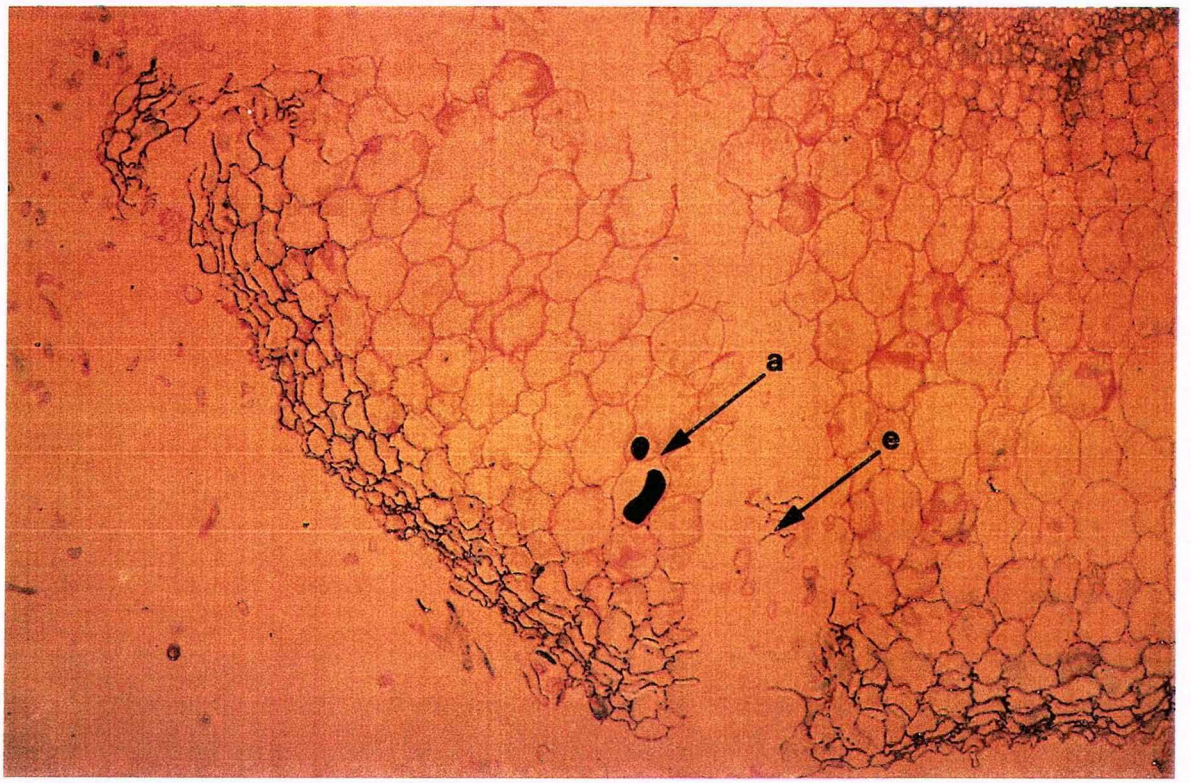


Photo n°10 : Coupe transversale d'une racine de la variété Poyo prélévée 24 heures après inoculation (grossissement : 30).

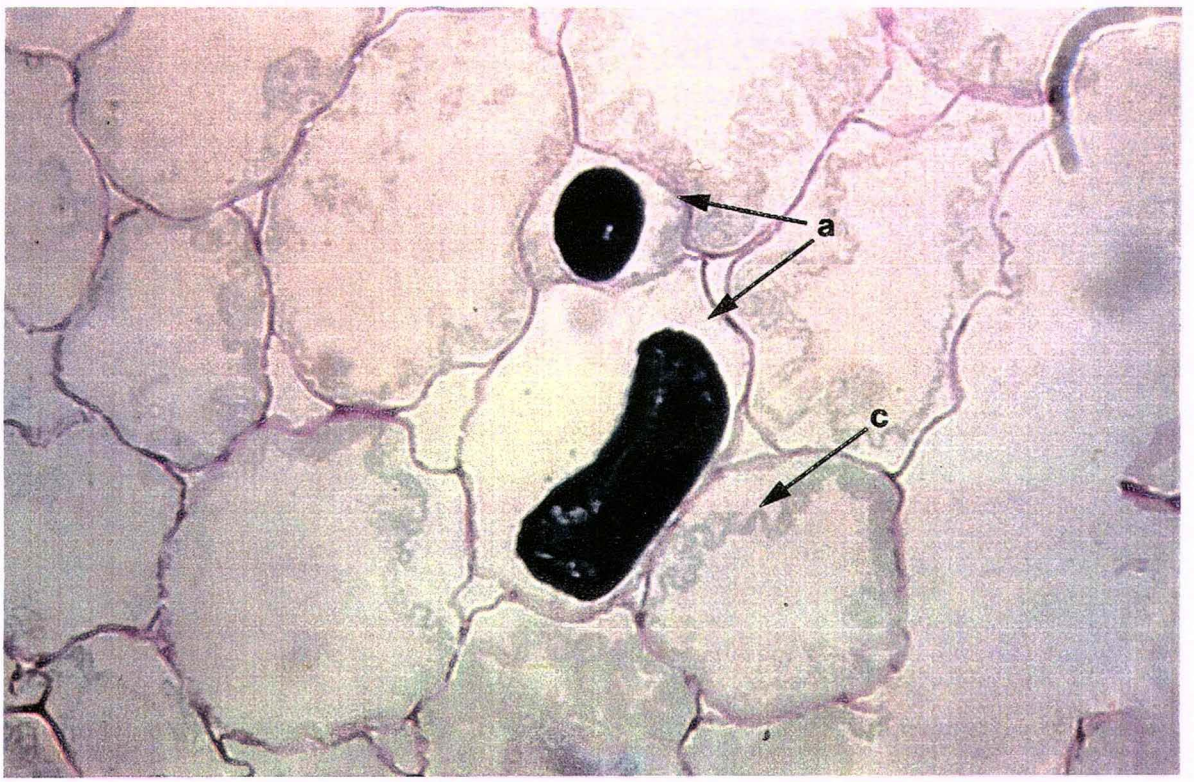


Photo n°11 : Coupe transversale d'une racine de la variété Poyo prélevée 24 heures après inoculation (grossissement : 150).

a : nématode; **c** : cytoplasme rétracté; **e** : lésions créées par le nématode

Les nématodes présents dans les compartiments 1 et 3 (compartiments avec plants) sont, en grande majorité, immobiles ou très faiblement mobiles, alors que ceux présents dans le compartiment médian sont eux très mobiles.
Comme observé avec les dispositifs témoins, on constate donc que les nématodes sont très mobiles dans le compartiment dépourvu de plant.

* Dispositifs avec plants : **48 heures post inoculation** (TABLEAU III)

Sur 2000 nématodes inoculés au total, seuls 37 %, ont été récupérés (Cf TABLEAU III). Ce nombre est donc significativement inférieur à ceux observés dans les cas précédents. La différence est proche de 20 %.
Comme à 24 heures, le nombre de nématodes présent dans le compartiment 2 (compartiment d'inoculation) est significativement supérieur à celui des deux autres compartiments. Le nombre de nématodes observé dans le compartiment 1 (Poyo) est supérieur à celui observé dans le compartiment 3 (Yangambi), la moyenne de nématodes dans le compartiment 1 étant de 40,2 nématodes, et seulement de 21 nématodes dans le compartiment 3 (Cf tableau IV). Comme dans le cas des observations "24 heures post inoculation", les nématodes présents dans les compartiments 1 (Poyo) et 3 (Yangambi) sont en majorité trés peu mobiles, alors que ceux du compartiment 2 font preuve d'une grande mobilité.

2 - ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE PENETRATION DES NEMATODES DANS LES RACINES DE DEUX VARIETES, PAR HISTOLOGIE

* Observation des coupes histologiques

La réalisation de coupes de bananiers non inoculés (coupes témoins) n'a pas permis de mettre en évidence de différences de structures majeures, entre les variétés Poyo et Yangambi. En effet, ni tannins, ni lignine, ni subérification des tissus n'ont été décelés (Akai *et al*, 1980).

Dès 24 h après inoculation, on constate que certains nématodes ont pénétré dans les racines de Poyo (Cf. photos n° 10 et 11) alors qu'aucun nématode n'a été trouvé dans les tissus de la variété Yangambi avant 48 h (Cf. photo n°14). La pénétration de *R. similis* dans les racines de la variété Yangambi semble donc être moins rapide que dans celles de la variété Poyo.

On constate la présence de nématodes dans les racines des 2 variétés, 48 h après inoculation (Cf. photos n°12, 13 et 14).

Photo n°12 : Coupe longitudinale d'une racine de la variété Poyo prélevée 48 heures après inoculation (grossissement : 60).

Photo n°13 : Coupe longitudinale d'une racine de la variété Poyo prélevée 48 heures après inoculation (grossissement : 300).

a : nématode; **b** : noyau et nucléoles de taille importante; **d** : galerie provoquée par le nématode; **e** : lésions créées par le nématode; **f** : grains d'amidon

Dés 72 h après l'inoculation, on remarque, par l'observation de coupes transversales et longitudinales, de nombreuses lésions du parenchyme cortical, à la fois chez Poyo et chez Yangambi (Cf. photo n°15). A cette date, seules certaines racines de la variété Poyo présentent, extérieurement, des lésions se traduisant par des tirets rouge brique.

PERTURBATIONS HISTOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES INDUITES PAR LE PASSAGE DES NEMATODES.

Les perturbations du tissu racinaire provoquées par la pénétration et le déplacement des endoparasites migrateurs que sont les nématodes, sont nombreuses. Ils causent notamment de gros dégâts au parenchyme cortical en se déplaçant entre les assises cellulaires créant ainsi des galeries (Cf. photo n°12). Dès 72 h après inoculation, on peut constater une rétraction du cytoplasme des cellules dont se nourrissent les nématodes.

La rupture des membranes cellulaires entraine la formation, au sein des tissus, de cavités aux contours irréguliers à ne pas confondre avec les lacunes présentes dans les racines saines mais régulières le long d'une même assise cellulaire (Cf. photo n°10). Comme Sabatini (1991) l'avait auparavant observé, les grains d'amidon sont anormalement abondants. Ils sont moins nombreux dans une racine saine (Cf. photo n°12).

Cette étude a également permis de confirmer l'absence d'attaque du cylindre central par *R. similis*. On remarque également sur les coupes, que les nématodes se situent le plus souvent dans la partie basale des racines (Cf photos n°15, 16 et 17). Sabatini (1991) a également constaté que les lésions étaient localisées à ce niveau.

3 - MISE EN EVIDENCE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE ET ANALYSE COMPARATIVE DES PHENOLS PRESENTS DANS 6 CULTIVARS

* Analyse colorimétrique des phénols totaux : Cf. en annexe VI, fig. 4, 5, 6 et 7

Cette analyse a permis de démontrer une variabilité quantitative intra variétale assez importante, ainsi CV19 et CV22 ont le même poids racinaire sec, pour une teneur en phénols trés différente (Cf Tableau A et B).

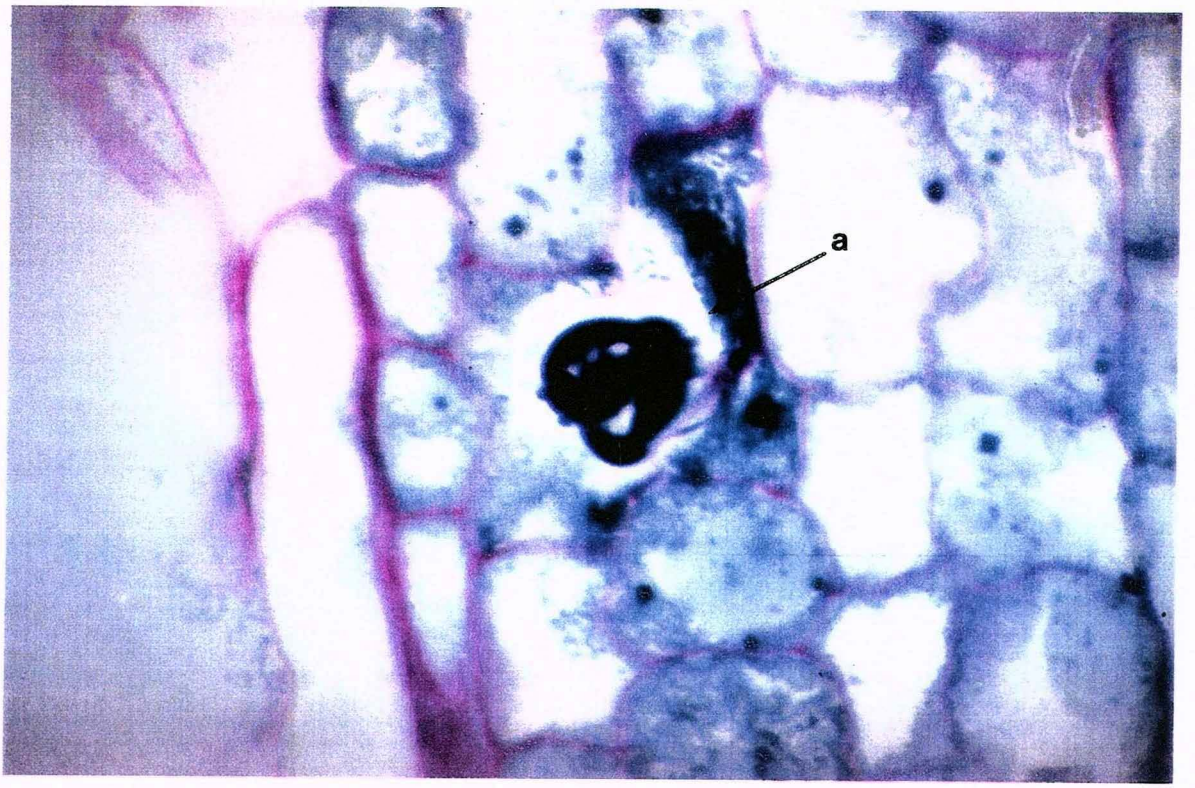


Photo n°14 : Coupe transversale d'une racine de la variété Yangambi prélevée 48 heures après inoculation (grossissement : 300).

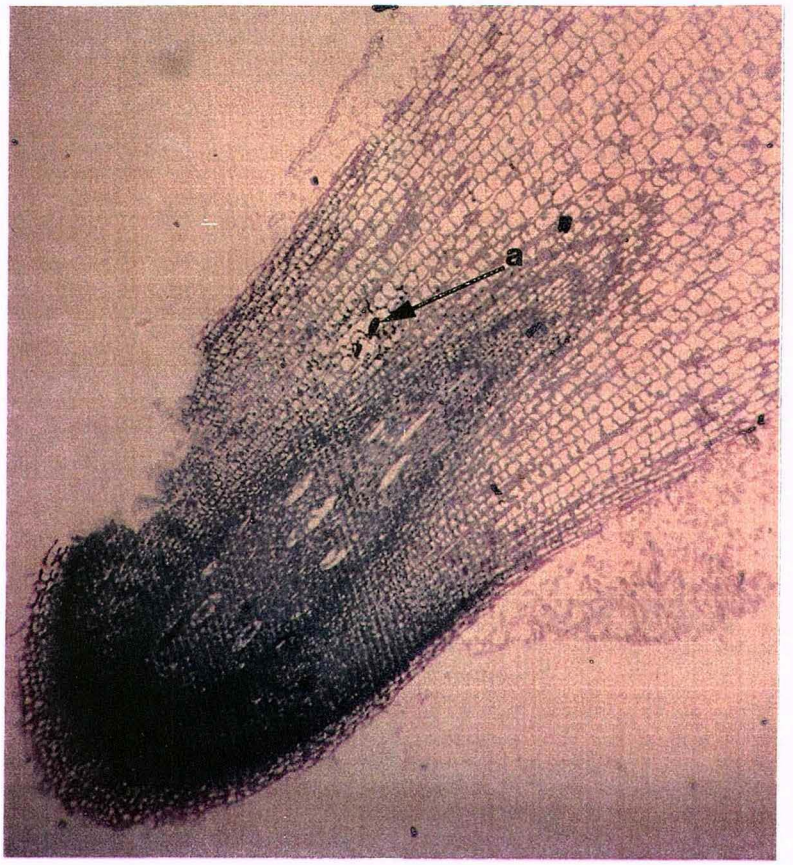


Photo n°15 : Coupe longitudinale de l'extrémité d'une racine de la variété Yangambi prélevée 72 heures après inoculation (grossissement : 60).

a : nématode

TABLEAU B - ANALYSES DES ECHANTILLONS PAR SPECTROPHOTOMETRIE

VARIETES	ECHANTILLONS	D.O.	EQUIVALENT ACIDE P. COUMARIQUE (mg/ml)
CACHACO	CA2	0,269	16
	CA3	0,099	4,3
RED YADE	RY10	0,200	9,5
	RY11	0,327	23
	RY12	0,197	12
	RY13	0,198	12
POYO	CV19	0,132	5,4
	CV20	0,164	8,5
	CV21	0,201	12,5
	CV22	0,213	13,2
PISANG CEYLAN	PC28	0,490	
	PC31	0,220	10,5
YANGAMBI	Y37	0,201	9,5
	Y39	0,239	15,8
FOUGAMOU	F46	0,093	3,2
	F47	0,056	1,7
	F48	0,159	7,2
	F49	0,247	12,2
	F50	0,100	3,4
	F51	0,118	4,5

L'analyse colorimétrique des substances phénoliques racinaires a montré que les extraits méthanoliques racinaires issus de plants possédant un poids sec racinaire élevé, ne sont pas nécessairement les plus riches en phénols totaux (Exemple : Y37; Cf Tableau A et B). Il ne semble donc pas exister de relation directe entre le poids sec racinaire d'une variété et sa teneur en phénols totaux.

Le Cachaco et le Poyo, variétés sensibles, malgré un poids sec racinaire faible, semblent être parmi les plus riches en phénols totaux (Cf fig. 4 et 5). La variété résistante, Yangambi, malgré un poids racinaire sec important, n'est pas riche en phénols totaux (exprimé en équivalent ac. coumarique) (Cf fig. 4).

La prise en compte du paramètre "Hauteur de plant" (mesure du faux tronc en cm) permet de donner une dimension biologique à cette expérience. En effet, dans des conditions normales, ce paramètre est un bon indicateur de l'état de croissance du plant. Globalement, la teneur en phénols est proportionnelle au rapport "Hauteur de la partie aérienne / Poids sec de la partie racinaire". Ainsi, CV 21 et CV 22 qui ont tous deux un rapport "Hauteur de la partie aérienne / Poids sec de la partie racinaire" élevé ont aussi une teneur en phénols totaux élevée (fig. 7).

L'analyse de la fig. 6 semble indiquer que l'augmentation de la teneur en phénols totaux est plus rapide chez la variété sensible (Cachaco) et moins rapide dans le cas de la variété résistante (Yangambi).

* Analyse par HPLC:

Il existe de nombreuses similitudes entre les chromatogrammes des échantillons des six cultivars testés. Ainsi, l'aspect général des chromatogrammes est identique chez toutes les variétés à l'exception des Cavendish.

L'observation des chromatogrammes révèle la présence de deux groupes de pics.
Le premier groupe présente un spectre d'absorption caractéristique à 280 nm. Il s'agit de composés de la famille des flavanes. Le second groupe présente un spectre d'absorption caractéristique à 327 nm. Il s'agit de dérivés de l'acide férulique. Les pics autres que ceux de ces deux groupes sont des mélanges de plusieurs composés phénoliques ou proches des phénols.

La variabilité qualitative intra - variétale est faible.

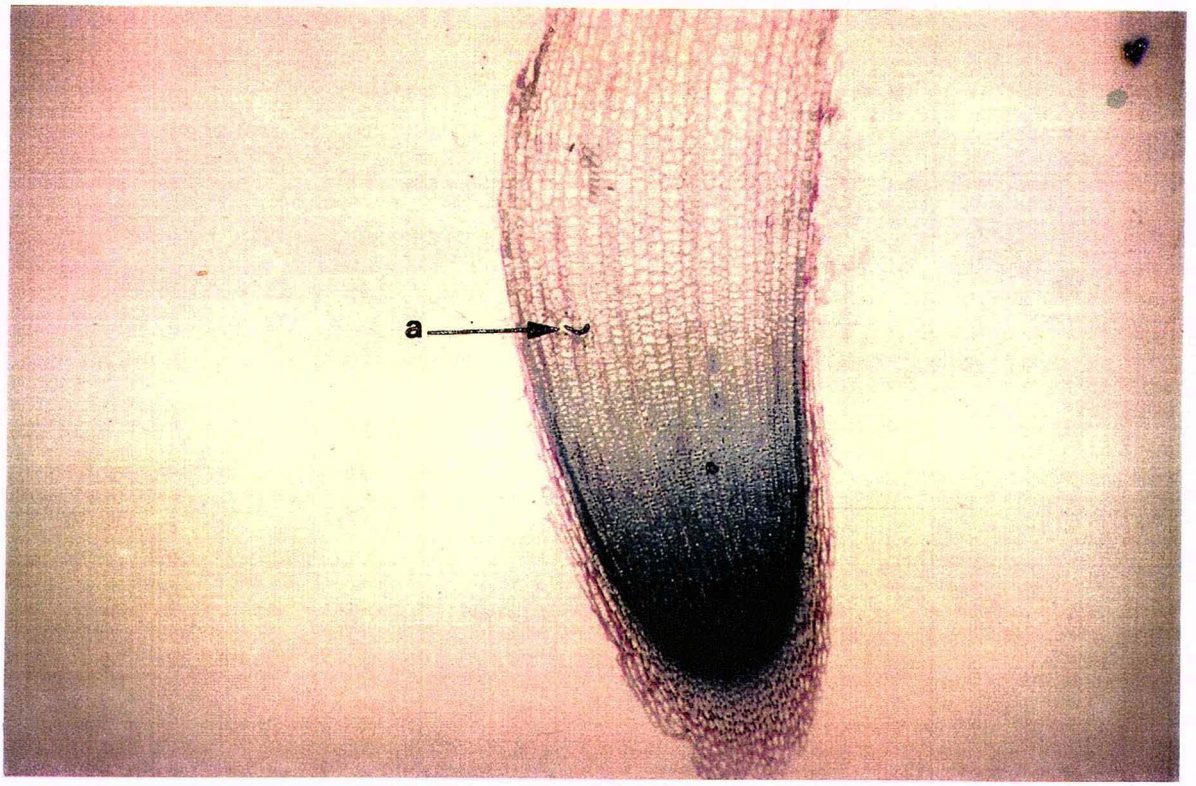


Photo n°16 : Coupe longitudinale de l'extrémité d'une racine de la variété Poyo prélevée 48 heures après inoculation (grossissement : 30).

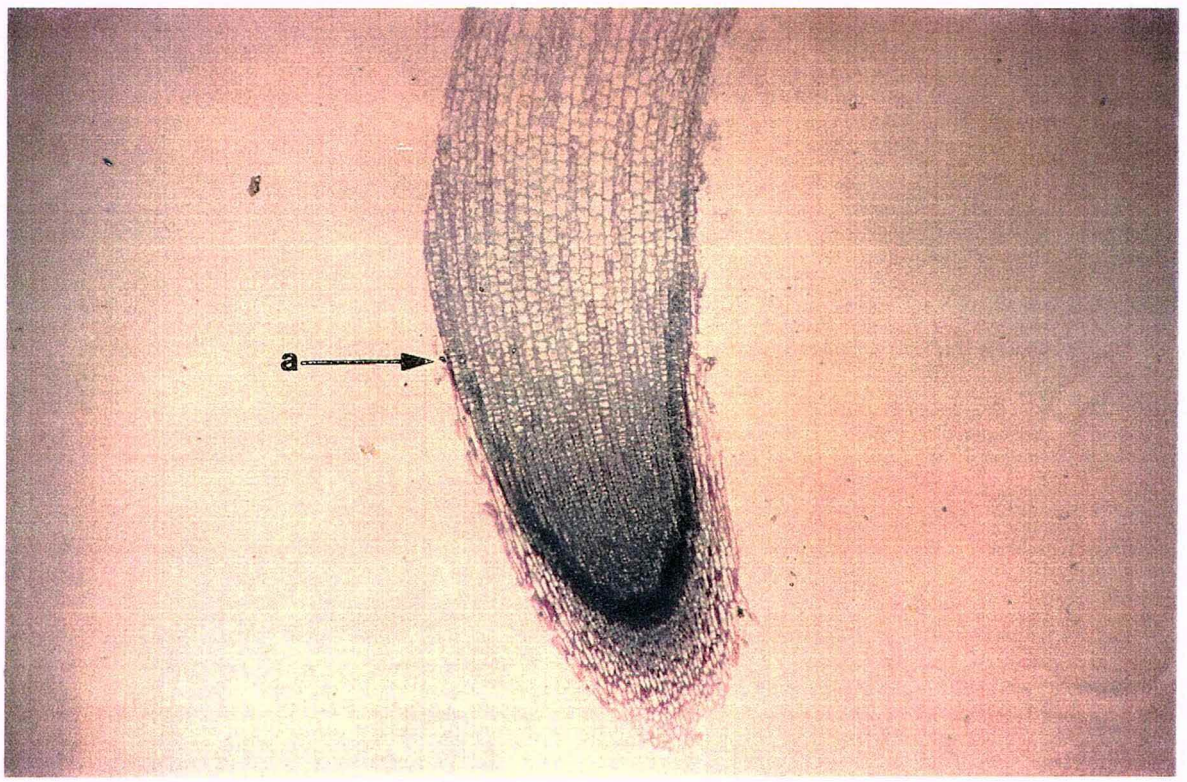


Photo n°17 : Coupe longitudinale de l'extrémité d'une racine de la variété Poyo prélevée 48 heures après inoculation (grossissement : 30).

a : nématode

Analyse des extraits méthanoliques par le chromatographe à longueur d'onde fixe

Cf. en annexe VII, fig.8, 9, 10 et 11.

L'analyse des chromatogrammes de chacune des variétés et leur comparaison ont permis de mettre en évidence des similitudes (mêmes groupes de pics) mais aussi des différences qui pourraient se révéler intéressantes dans le cadre de ces études. Ainsi, à une longueur d'onde de 280 nm (Cf. fig 8 et 9), on constate que 2 pics de temps de rétention, T = 20,7 mn et T = 21,7 mn sont présents chez tous les cultivars à l'exception de Y 37 (variété Yangambi résistante). Un groupe de pics possédant un temps de rétention à peu prés égal à 38 mn, présente une amplitude plus grande chez Y 37 (résistant) que dans le cas des autres variétés.

Lorsqu'on analyse et compare les chromatogrammes réalisés à une longueur d'onde de 320 nm (Cf. fig 10 et 11), on constate qu'un pic de temps de rétention égal à 24,5 mn existant chez Y 37 et PC 28, 2 variétés de résistance partielle, est absent du chromatogramme de CV19, RY 10, F 49 et trés faible chez CA 1.

Analyse des extraits méthanoliques par le chromatographe à barettes diodes

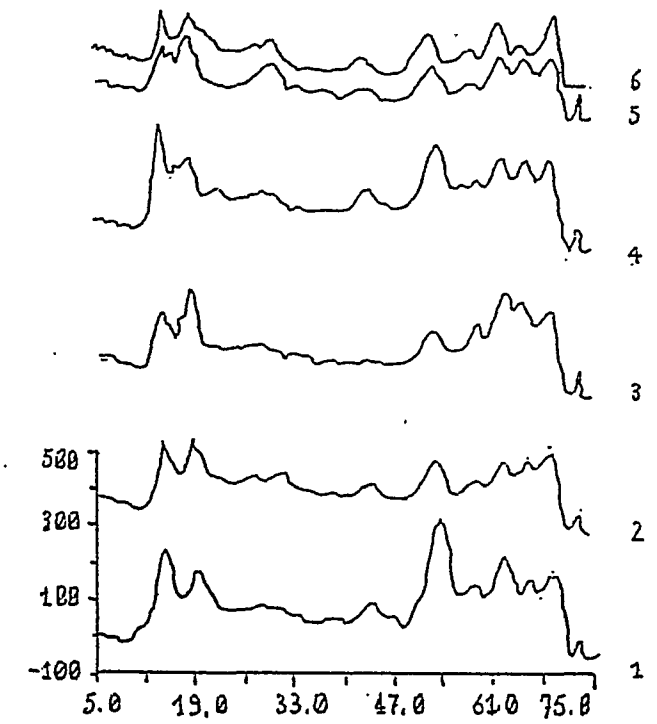
Cf. en annexe VIII, chromatogrammes et spectres.

La série de pics ayant un spectre d'absorption à 280 nm est plus variable d'un échantillon à un autre d'une même variété que la série de pics ayant un spectre d'absorption à 327 nm.

Le pic de plus grande amplitude (temps de rétention autour de 21 mn) présente un spectre d'absorption différent des autres, à 2 longueurs d'onde : 260 nm et 290 nm. On constate en analysant son chromatogramme, que ce pic est constitué de la superposition d'un pic se distinguant à 280 nm, et d'un second présent à 320 nm, tous 2 ayant le même temps de rétention. Il s'agit donc d'un composé faisant partie des flavanes.

* Analyse des extraits méthanoliques par HPTLC et densitométrie

La comparaison variétale à 280 nm de 6 extraits appartenant chacun à un cultivar confirme la présence de similitudes. Chaque pic correspond à une bande du chromatogramme sur couche mince (analyse des chromatogrammes sur couche mince au densitomètre).



Comparaison variétale.
Absorption à 280 nm.

1- CA1 (Cachaco)
2- RY 10 (Red Yade)
3- CV 19 (Poyo)
4- PC 28 (Pisang Ceylan)
5- Y 37 (Yangambi)
6- F 49 (Fougamou)

V - DISCUSSION

1 - MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les expériences ici réalisées utilisent des plants issus de la micropropagation végétative *in vitro*. Cette technique présente de nombreux avantages. D'abord et surtout, la certitude de l'absence de nématodes dans les plants, alors qu'il existe un risque évident lorsque se sont des petits rejets, prélevés au champ, qui sont utilisés. De plus, elle assure une bonne homogénéité des plants, puisqu'ils ont tous la même origine (clone). De même, les plants issus de la multiplication *in vitro* demandent moins de place pour se développer et des manipulations beaucoup moins lourdes que s'il s'agissait de rejets; ils permettent ainsi d'utiliser des dispositifs simples.

Toutefois, la faible taille des plants peut constituer un inconvénient pour la quantification des composés phénoliques. En effet, pour réaliser à la fois des analyses quantitativement et qualitativement intéressantes, il faut disposer d'extraits méthanoliques nombreux, de volume abondant et concentré. Autrement dit, une grande disponibilité de plants par cultivar est nécessaire, ils doivent en plus posséder un système racinaire important. Ainsi, la comparaison des chromatogrammes issus des 2 types de chromatographes n'est pas évidente. En effet, le chromatographe à longueur d'onde fixe étant beaucoup plus sensible que celui à barettes diodes, tous les pics des chromatogrammes issus du premier ne sont pas forcément représentés sur ceux issus du second. Des extraits racinaires plus concentrés auraient, sans doute, permis une comparaison précise des pics des 2 types de chromatogrammes.

Le sable de Fontainebleau stérile, comme substrat de croissance des plants de l'étude de la pénétration des nématodes, a été choisi car moins adhérant que le terreau aux racines et de granulométrie favorable au déplacement des nématodes. Toutefois ce substrat peut présenter des inconvénients. Lorsqu'il est humide, il a tendance à se compacter et à provoquer une asphyxie des racines se traduisant par la formation de balais de sorcière, ceci pouvant être gênant lors de manipulations de longue durée. Par ailleurs, la texture abrasive du sable peut éventuellement entraîner des microtraumatismes lors des manipulations.

La technique d'inoculation a été mise au point, pour une localisation aussi précise que possible des nématodes sur la racine. Toutefois, l'observation des coupes histologiques a montré qu'elle devait être encore améliorée.

2 - ATTRACTION ET PENETRATION DES NEMATODES DANS LES RACINES

Lors de l'étude des dispositifs témoins, la moyenne des nématodes dans les compartiments 1 et 3, dépourvus de bananiers, n'est pas significativement différente (ce qui montre un déplacement au hasard des nématodes).
Le nombre de nématodes récupérés dans le compartiment Poyo, 24 heures après inoculation, n'est pas significativement différent du nombre de nématodes récupérés dans les compartiments sans bananier, lors des études témoins.
Par contre, le nombre de nématodes récupérés dans le compartiment Yangambi, toujours 24 heures après inoculation, est significativement inférieur à celui des compartiments témoins.

Puisque le nombre de nématodes est presque identique dans les compartiments sans bananier (témoin) et Poyo, 24 heures après inoculation, on peut en déduire que les Poyo n'attirent pas les nématodes mais qu'il semble que les Yangambi aient une action répulsive sur les nématodes.

Dans l'étude de la pénétration des nématodes dans les racines, on constate que celle-ci est moins rapide dans les plants de la variété Yangambi que dans les plants de la variété Poyo. Toutefois, la présence de lésions provoquées par le nématode, 72 heures aprés inoculation, dans des proportions similaires, dans les tissus des 2 variétés, indique qu'à l'intérieur des racines, les nématodes provoquent des dommages aussi bien dans une variété que dans l'autre.

Dans les études de pénétration des nématodes dans les racines, on a constaté que la plupart des nématodes pénétraient dans la partie basale racinaire, aussi bien chez Poyo que Yangambi.

On peut supposer l'existence d'un phénomène d'attraction qui pourrait être dû à un flux de substances nutritives des feuilles vers les racines, ou à l'émission par cette zone, de substances attractives pour le nématode, par exemple, des exsudats racinaires (Caswell, 1991).

L'absence de différences structurales majeures visibles entre les variétés minimise fortement l'hypothèse d'une barrière mécanique chez la variété résistante limitant la pénétration des nématodes.
La barrière pourrait donc être plutôt de nature chimique.
Lors de l'étude de l'influence des variétés Yangambi et Poyo sur l'attraction et/ou la répulsion des nématodes, 55,1 % seulement des nématodes inoculés dans les dispositifs témoins, ont été récupérés. Il existe donc une perte importante de matériel lors de la manipulation d'extraction (environ 45 %). Ce pourcentage est le même dans les dispositifs avec bananiers, 24 heures aprés inoculation; on peut donc penser que la quantité de nématodes ayant pénétré dans les plants peut être considérée comme négligeable. Par contre, 48 heures après inoculation, dans les dispositifs avec bananiers, on observe une diminution de 20 % de la quantité totale de nématodes récupérée. Elle pourrait correspondre au pourcentage de nématodes ayant pénétré dans les racines.
On a vu, lors de l'étude de la pénétration des nématodes, que dés 24 heures, certains d'entre eux ont pénétré dans les racines de la variété Poyo.
Dans l'étude concernant la migration préférentielle, ce n'est que 48 heures après inoculation, qu'on suppose une pénétration des nématodes. Ceci pourrait être du au fait que les nématodes une fois déposés dans le compartiment médian doivent migrer jusqu'aux racines présentes dans les compartiments 1 et 3 (avec bananiers), alors qu'ils étaient directement déposés sur la racine, lors des études de dynamique de pénétration (pas d'étape de migration).

L'immobilité constatée des nématodes dans les compartiments 1 (Poyo) et 3 (Yangambi) laisse supposer l'existence d'une influence du plant sur la mobilité des nématodes. On peut penser que la proximité immédiate des racines est détectée par les nématodes, et entraine ainsi une immobilisation avant pénétration. Ceci correspondrait à un arrêt du comportement de recherche avant le passage à un comportement de pénétration.

Lors de l'étude de la distribution quantitative et qualitative des phénols totaux dans les variétés de bananiers, on observe les différences suivantes:
D'une part, l'absence de 2 pics du chromatogramme de Y 37 issu du chromatographe à longueur d'onde fixe, présents chez les autres variétés, pouvant être des flavanes car ayant un spectre d'absorption caractéristique à 280 nm, d'autre part, l'importance du groupe de pics (temps de

rétention environ égal à 38 mn) chez le cultivar Yangambi, montre l'existence d'une corrélation entre ces composés et la réponse variétale.

La présence relevée seulement chez les cultivars partiellement résistants, du pic caractérisé par un temps de rétention égal à 24,5 mn et absorbant à 320 nm, pourrait laisser supposer l'existence d'une relation entre certains composés phénoliques et le phénomène de résistance variétale.

Deux groupes de pics se dégagent de l'observation des chromatogrammes issus du chromatographe à barettes diodes. L'examen des spectres d'absorption a permis de les caractériser.

Le premier groupe a un spectre d'absorption caractéristique à 280 nm, ce sont donc des flavanes.

Le second a un spectre d'absorption caractéristique à 327 nm, ce sont donc des dérivés de l'acide férulique.

Lors d'analyses portant sur des feuilles, A. Beveraggi en 1992, a signalé la présence de dérivés de l'acide férulique uniquement dans les feuilles de la variété Yangambi, on constate dans cette étude, leur présence dans les racines de l'ensemble des variétés testées. On ne peut donc différencier Yangambi par la présence d'acide férulique.

VI- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES D'AVENIR

L'étude comparative de plusieurs variétés de bananiers, concernant la migration préférentielle et la pénétration des *R. similis* dans les racines a permis de mettre en évidence l'existence de différences entre cultivars.

Ainsi, *R. similis* migre moins vers les racines de la variété Yangambi que vers celles de la variété Poyo. En fait, il semblerait que les racines de la variété Yangambi soient répulsives pour le nématode.
Cette hypothèse doit cependant être confirmée par la réalisation de nouveaux essais. Ainsi, des études utilisant le sable seul, dans lequel auraient poussé les variétés à tester, ainsi que des dispositifs comportant un seul plant (Poyo + sable seul et Yangambi + sable seul), permettraient de développer les résultats obtenus et notamment de savoir si d'éventuels exsudats racinaires sont à l'origine de la migration préférentielle de *R. similis* vers le Poyo ou si une modification du milieu par le métabolisme racinaire entre en jeu (échange d'ions entre la racine et le milieu extérieur par exemple).

La pénétration de *R. similis* semble être plus rapide dans la variété Poyo que Yangambi. L'observation de coupes de racines infestées et non infestées par les nématodes en microscopie électronique à transmission, permettrait de réaliser une analyse beaucoup plus approfondie concernant l'ultrastructure des tissus. Egalement, la mise en évidence des perturbations engendrées par le nématode et des relations hôte-parasite n'en serait que meilleure.

L'analyse comparative des phénols présents dans des plants sains de 6 cultivars a permis de mettre en évidence des variations qualitatives et quantitatives intéressantes d'un cultivar à un autre. Toutefois, les composés susceptibles de jouer un rôle dans ces variations, n'ont pu être isolés (mélange de composés).

Des techniques telles que la spectrophotométrie de masse le permettraient.

Les études ici réalisées ne constituent qu'une approche préliminaire et il paraît intéressant de poursuivre dans cette voie. Ainsi, des études sur la variabilité biochimique, menées sur des plants infestés par *R. similis* complèteraient nos observations et nous permettraient de progresser dans la connaissance des mécanismes inhérents à la résistance variétale.

BIBLIOGRAPHIE

ACTA - FNPG 1971. Les nématodes des cultures.

ADIKO, A. 1988. Plant-parasitic nematodes associated with plantain *Musa paradisiaca* (AAB), in the Ivory Coast. Revue de Nématologie 11 (1) : 109-113.

AKAI, S., FUKUTOMI, M. 1980. Preformed internal physical defenses *in : Plant disease. An advanced treatise. Volume 5 : How plants defend themselves. Horsfall JG and Cowling* EB (Ed) Academic Press, New York 139-159.

AYOUB, S.M. 1980. Plant Nematology : An agricultural training aid.

BECKMAN, C.H. and MUELLER, W.C. 1969. Distribution of phénols in specialized cells of Banana roots.

BEVERAGGI, A. 1992. Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercospora fijiensis* responsable de la maladie des raies noires. Thèse, montpellier (France).

BLAKE, C.D. 1961. Root rot of bananas caused by *Radopholus similis (Cobb)* and its control in New South Wales. Nematologica 6 : 295-310.

BLAKE, C.D. 1966. The histological changes in bananas roots caused by *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multicinctus*. Nematologica 12 : 129-137.

BLAKE, C.D. 1967. Nematode parasites of banana and their control.

BLAVIGNAC, F. 1989. Contribution à la mise au point de tests précoces d'étude de la sensibilité des bananiers au nématode *Radopholus similis (Cobb)* D.A.A (1989).

BONCATO, A.A., DAVIDE, R.G. 1980. *Radopholus similis* on Cavendish banana in Davao Del Norte: II. Culture and pathogenicity. Phil. Agr.63 : 120-125.

CASWELL, E.P., TANG, C.S., DE FRANCK, J., APT, W.J. 1991. Influence des exsudats radiculaires de *Chloris gayana* et *Tagetes patula* sur *Rotylenchulus reniformis*. Revue de nématologie, vol. 14, n°4.

CHAMPION, J. 1963. Le bananier.

CAYROL, J.C., DJIAN-CAPORALINO, C., PACHAUD-MATTEI. 1993. Les biopesticides à l'assaut des nématodes du sol. La Recherche n° 250, janvier, vol. 24.

DUCHARME, E.P., BIRCHFIELD, W. 1956. Physiological races of the burrowing nematode. Phytopatology, 46 : 615-616.

EDWARDS, D.J., WEHUNT, E.J. 1971. Host range of *Radopholus similis* from banana areas of Central America with indications of additionnal races. Plant disease reporter n° 5, mai, vol. 55.

FOLKERSTEMA, S. 1987. The complex of nematodes, fungi and soil on banana *cv. Poyo*, in the Ivory Coast. ?

GOWEN, S.R., QUENEHERVE, P. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. Plant Parasitic Nematode in Subtropical and Tropical Agriculture, C.A.B International.Pp : 431-460.

HUETTEL, R.N., DICKSON, D.W., KAPLAN, D.T. 1982. Sex attractants and behaviour in the two races of *Radopholus similis*. Nematologica 28 : 360-369.

HUETTEL, R.N., DICKSON, D.W., KAPLAN, D.T. 1984. R. citrophilus (Nematoda) a sibling species of *Radopholus similis*. Proceedings of the Helminthological society of Washington, 51 : 32-35.

HUETTEL, R.N., DICKSON, D.W., KAPLAN, D.T. 1984. Chromosome number of populations of *Radopholus similis* from North, Central and South America, Hawaï and Indonesia. Revue de nématologie 7 (2) : 113-116.

HORRY, J.P. 1989. Chimiotaxonomie et organisation génétique dans le genre *Musa*. Revue Fruits, Vol. 44, n°9.

JONES, R.K., REYNOLDS, R.E. 1983. Chemical control of *Radopholus similis*, burrowing nematode. Subtropica, Vol. 4, juin, n° 6.

LOOS, C.A. 1962. Studies of the life-history and habits of the burrowing nematode, *Radopholus similis* ; the cause of the black-head disease of banana. Proceeding of the Helminthological society of Washington, 29 (1) : 43-52.

LORIDAT, P. 1989. Etude de la microflore fongique et des nématodes associés aux nécroses de l'appareil souterrain du bananier en Martinique. Mise en évidence du pouvoir pathogène du genre *Cylindrocladium*. Fruits, vol 44 (11) : 587-598.

MACE, M.E. 1963. Histochemical localization of phenols in healthy and diseased banana roots. Physiologia plantarum 16 : 915-925.

MAHAJAN, R., KAUR., BAJAJ. 1992 . Nematicidal activity of phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. Nematol. medit 20 : 217-219

MATEILLE, T., FONCELLE, B., FERRER, H., 1988. Lutte contre les nématodes du bananier par submersion du sol. Revue de nématologie 11 (2) : 235-238.

MATEILLE, T. 1992. Contribution à l'étude des relations hôte-parasite entre le bananier *Musa acuminata* (groupe AAA) et trois nématodes phytophages : *Radopholus similis, Helicotylenchus multicinctus* et *Hoplolaimus pararobustus (Tylenchida)*. Thèse ORSTOM 1992.

O'BANNON, J.H., TAYLOR, A.L. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. Phytopathology 58 : 385.

O'BANNON, J.H., 1977. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. Journal of Nematology 9 (1) : 16-25.

PHILEMON, C. 1986. *Radopholus similis :* The burrowing nematode of banana. Harvest, Vol. 12, n°1.

PINOCHET, J.G., STOVER, R.H. 1980. Fungi in lesions caused by burrowing nematodes on bananas and their root and rhizome rotting potential. Trop. Agricul. Vol. 57, n° 3, juillet.

PINOCHET, J. 1988. Comments on the difficulty in breeding bananas and plantains for resistance to nematodes. Revue de nématologie 11 (1) : 3-5.

QUENEHERVE, P., CADET, P. 1985. Etude de la dynamique de l'infestation en nématodes transmis par les rhizomes du bananier cv *Poyo* en Côte d'Ivoire. Revue de nématologie 8 (3) : 257-163.

SABATINI, C. 1991. Etude de la sensibilité des bananiers à *Radopholus similis* (Cobb, 1913) (Nematoda Pratylenchidae). Contribution à la mise au point d'un test de criblage variétal et approche des réponses physiologiques de la plante aux attaques de ce nématode. D.A.A 1991.

SARAH, J.L. 1985. Les nématodes des bananiers plantains en Côte d'Ivoire. I.A.R.P.B. Proceedings of the third meeting.P : 88-93.

SARAH, J.L. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. Nematropica (19) 2 : 199-216.

SARAH, J.L. 1990.. Les nématodes et le parasitisme des racines de bananiers. Revue FRUITS n° spécial bananes IRFA.p 60-67.

SARAH, J.L., Lassoudière, A., Guérout, R. 1983. La jachère nue et l'immersion du sol: Deux méthodes intéressantes de lutte intégrée contre *R. similis* (Cobb, 1913) dans les bananeraies des sols tourbeux de Côte d'Ivoire. Fruits 38 : 35-42.

SARAH, J.L., Blavignac, F., Sabatini, C., Boisseau, M. 1992. Une méthode de laboratoire pour le criblage variétal des bananiers vis à vis de la résistance aux nématodes. Fruits 47 (5) : 559-563.

SARAH, J.L., Sabatini, C., Boisseau, M. 1993. Differences in pathogenicity to banana (*Musa* sp cv Poyo) among isolates of *R. similis* from different production areas of the world. Nematropica 23 (1) : 75-79.

SCHLÖSSER. 1980. Article issu de How plants defend themselves? Horsfall. J.G., Cowling. E.B Vol. 5, p. 333 à 338.

STOVER, R.H., SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas. Willey J. et Sons (ed). New York.

VAN WERDT, L.G. 1960. Studies on the biology of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949.III. Embryology and post embryonic development. Nematologica, 5 : 43-51.

ANNEXE I

CULTURE MONOXENIQUE DE *R. SIMILIS* SUR CAROTTES

adapté par M. Boisseau et J.L. Sarah

d'aprés O'Bannon et Taylor (1968) et Boncato et Davide (1980)

Toutes les opérations suivantes se font sous une hotte à flux laminaire.

Préparation des flacons

On prépare une solution d'agar à 1 %. Aprés autoclavage, on ajoute de la dihydrosteptomycine à 500 ppm lorsque le milieu a atteint une température de 50° C (chauffage au four à micro-ondes). Cette solution est répartie à raison de 10 ml environ dans des flacons de volume 100 ml, préalablement autoclavés.

Préparation des carottes

Des carottes de bonne taille, trés fraîches et exemptes de lésions sont lavées à l'eau courante. Elles sont ensuite trempées dans de l'alcool à 95°C, flambées rapidement, épluchées et découpées en rondelles de 1 à 2 cm d'épaisseur.

Deux à trois rondelles sont déposées dans chaque flacon qui sera ensuite conservé à 28°C, pendant une semaine, afin de vérifier l'absence de contamination.

Préparation des nématodes

Les nématodes présents dans des fragments de racines de bananier sont récupérés par macération dans l'eau, pendant 24 à 48 heures, en assurant un apport d'oxygène (bullage). Les nématodes migrateurs sortent des racines et passent à travers un kleenex dans l'eau de filtrage qui est ensuite récupérée, et décantée (Cf. Fig. n°3).

Sous une loupe binoculaire, on prélève exclusivement *Radopholus similis* pour assurer une culture monoxénique. On désinfecte ensuite superficiellement les nématodes provenant de racines de bananier ou d'une culture monoxénique antérieure sur carottes. Pour cela, on dépose les

nématodes dans des microtubes contenant de l'eau stérile. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 3 minutes à 2500 tours/mn. Le surnageant est enlevé à l'aide d'une pipette stérile et le culot est désinfecté au chlorure mercurique à 0.01 % ; nouvelle centrifugation pendant 2 minutes, le surnageant est éliminé comme précédemment. On rince à l'eau stérile, on centrifuge et on élimine le surnageant. On désinfecte ensuite le culot au sulfate de dihydrostreptomycine sulfate (2 g/l), on centrifuge et on élimine le surnageant. On rince ensuite 2 fois à l'eau stérile.

Inoculation des nématodes sur carottes

On dépose 1 à 2 gouttes de la suspension de nématodes (environ 50) sur les rondelles de carottes. Les flacons sont placés dans une étuve à 28°C. Un mois plus tard, les premiers nématodes migrent sur les parois des flacons et peuvent être récupérés.

ANNEXE II

MILIEU DE CROISSANCE - MILIEU DE PROLIFERATION

	Milieu de croissance du bananier MS	Milieu de prolifération du bananier M3
Macro-elts	100 ml/l	100 ml/l
KH2PO4	200 mg/l	/
Micro-elts	1 ml/l	1 ml/l
FeDTA	5 ml/l	5 ml/l
Vitamines Morel	2 ml/l	2 ml/l
Saccharose	40 g/l	40 g/l
Gelrite	2 à 3 g/l	2 à 3 g/l
Charbon	200 mg/l	/
BAP	/	20 ml/l

Ces milieux ont été mis au point pour les bananes douces (AAA) mais peuvent être utilisés pour les plantains (AAB).

La multiplication du bananier passe par les étapes suivantes :

-Mise en culture initiale : P1

-Croissance des individus isolés dans le milieu MS : P2

-Prolifération dans le milieu M3 : P3

-Croissance des individus isolés à partir de P3

-Prolifération idem à P3

-Etc ...

-Sevrage

ANNEXE III

METHODE D'EXTRACTION DES NEMATODES

Les contenus de chacun des 3 compartiments du dispositif sont récupérés dans 3 godets de 250 ml. Le mélange de nématodes et de sable est centrifugé en présence de kaolin à 3000 tours/mn pendant 5 mn. Le kaolin permet de "cimenter" le culot. L'eau surnageante est éliminée, et le culot est remis en suspension dans du sulfate de magnésium (densité = 1,15) pour séparer les nématodes de leur substrat. Il est ensuite centrifugé comme précédemment. Le surnageant est récupéré et concentré sur un tamis de 5 μm contenant les nématodes. Les nématodes sont ensuite dénombrés sous le microscope.

ANNEXE IV

TECHNIQUE D'EXTRACTION DES PHENOLS TOTAUX

Les racines de chaque échantillon, aprés avoir été nettoyées, coupées, pesées, congelées à l'azote liquide et lyophilisées, sont broyées. Chaque broyat est ensuite pesé sur la balance de précision.

Dans un bécher, on verse la poudre de racines à laquelle on ajoute 25 ml de méthanol à 80 % et 200 mg de cystéine (anti - oxydant). L'ensemble est mis à agiter. Il est ensuite filtré, et le résidu solide est récupéré. L'opération est répétée 3 fois. Le résidu final est placé dans un tube à essai et conservé au réfrigérateur.

Le filtrat total est transvasé dans un ballon à fond plat et on fait évaporer le méthanol par réfrigération. La phase aqueuse du filtrat est ainsi récupérée. Le filtrat est alors versé dans une ampoule à décanter avec 50 ml d'éther de pétrole. L'ensemble est mélangé. L'opération est répétée tant que l'éther de pétrole est coloré. La phase aqueuse (phase du bas), est ensuite récupérée dans une éprouvette graduée, on ajoute 10 ml d'H_2PO_4 puis on complète par de l'eau distillée jusqu'à 50 ml. On ajoute ensuite 10 g de sulfate d'ammonium.

Une fois dissoute, la solution est versée dans une ampoule à décanter dans laquelle on ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle. Après mélange, on récupère la phase d'acétate d'éthyle (phase du haut) que l'on verse dans un ballon à évaporation. Le résidu est lavé par 5 ml de méthanol. La solution obtenue est répartie à l'aide d'une seringue, dans 3 petits flacons qui seront ultérieurement utilisés lors des chromatographies.

ANNEXE V

REALISATION ET COLORATION DE COUPES FINES EN RESINE

Réalisation des coupes

Les racines sont coupées en morceaux de 2 à 3 mm. Ils sont fixés avec du Glutaraldéhyde Paraformaldéhyde Caféine et placés 48 h au réfrigérateur à 4°C. Passé ce délai, la conservation s'effectue dans de l'alcool 70° (premier bain durant 30 mn puis nouveau bain durant au minimum 1 h) ; suit alors le protocole de déshydratation.

1. Ethanol 95° 15 mn
2. Ethanol 95° 30 mn
3. Ethanol 100° 15 mn à vide
4. Ethanol 100° 30 mn

On laisse ensuite les échantillons toute la nuit dans l'alcool 100°.

Aprés 24 h, imprégnation des échantillons.

1. Résine éthanol 2 h (vide pendant 15 mn)
2. Résine imprégnation 24 h

Aprés 24 h, inclusion des échantillons dans la résine puis coupe au microtome à 3 μm.

Coloration : Acide Périodique Schiff(APS) + Aniline Blue Black

1. DNPH (Acide acétique, Eau distillée, dinitroprényl) pendant 15 mn à l'obscurité.
2. Lavage à l'eau distillée.
3. Hydrolyse par l'acide périodique à 1 % pendant 5 mn.
4. Lavage à l'eau distillée.
5. Coloration par le réactif de Schiff pendant 10 mn à l'obscurité.
6. Lavage à l'eau distillée.
7. Coloration dans l'Aniline Blue Black portéepréalablement à 48°C pendant 7 mn.
8. Lavage rapide à l'eau courante.
9. Régression dans l'acide acétique à 7 %.
10. Séchage et montage à l'historésine.

Interprétation: Les polysaccharides et les protéines sont oxydés par l'APS et donnent une réaction APS positive (rose pâle), noyau et nucléoles apparaissent en bleu noir.

ANNEXE VI

ANALYSE AU SPECTROPHOTOMETRE UV

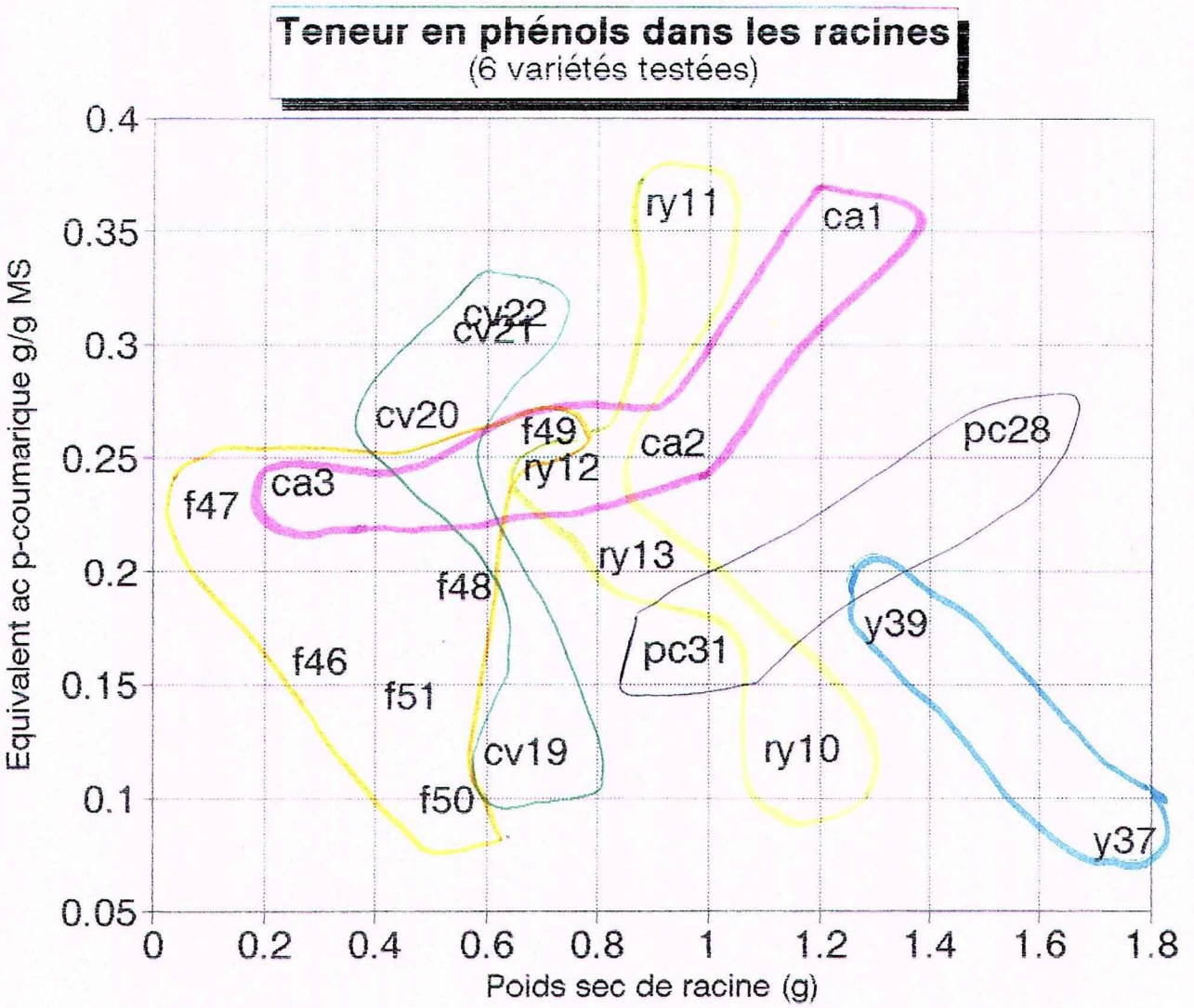


Figure n°4

MS : Matière sèche racinaire.

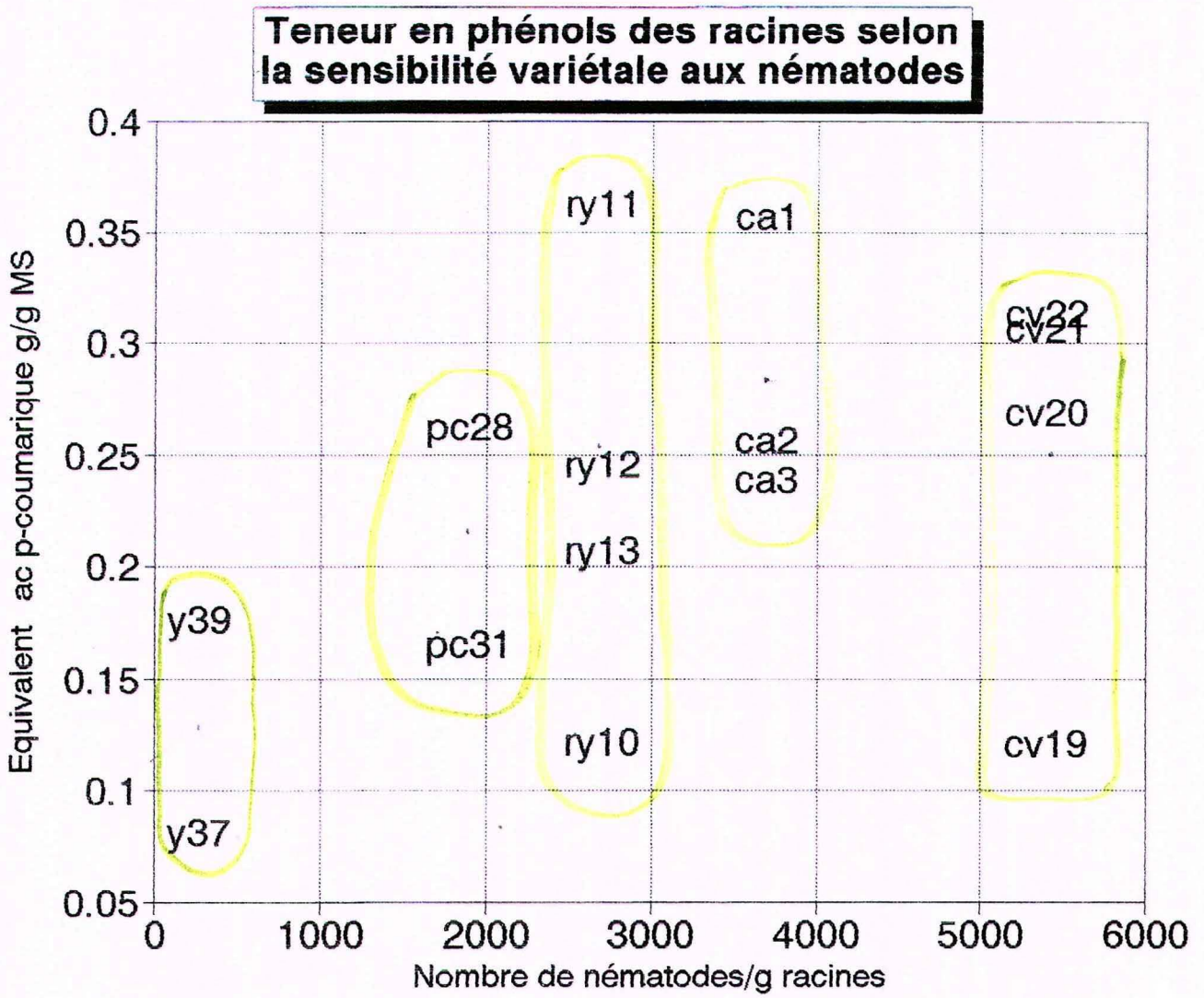


Figure n°5

MS : Matière sèche racinaire.

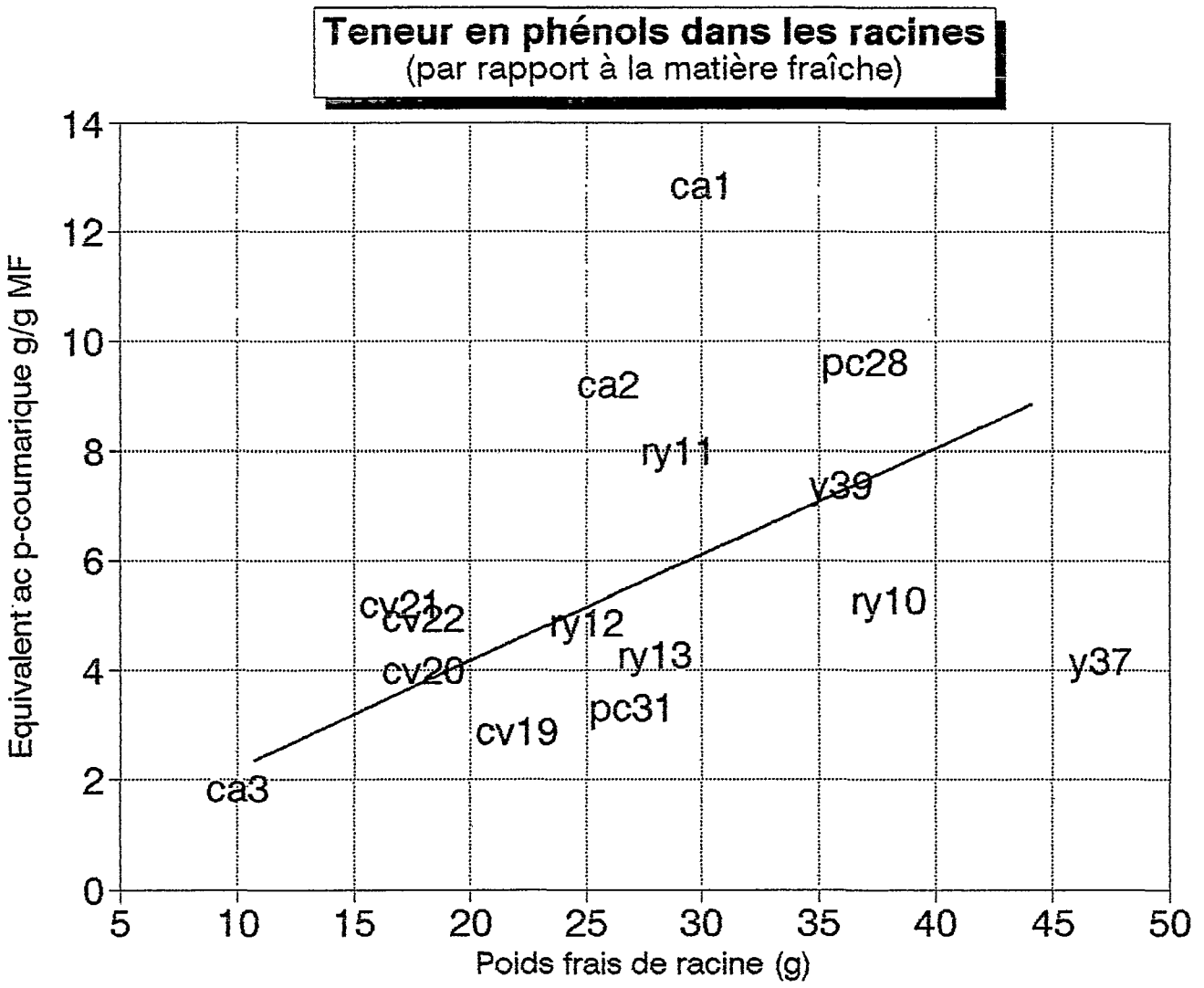


Figure n°6

MF : Matière fraîche racinaire.

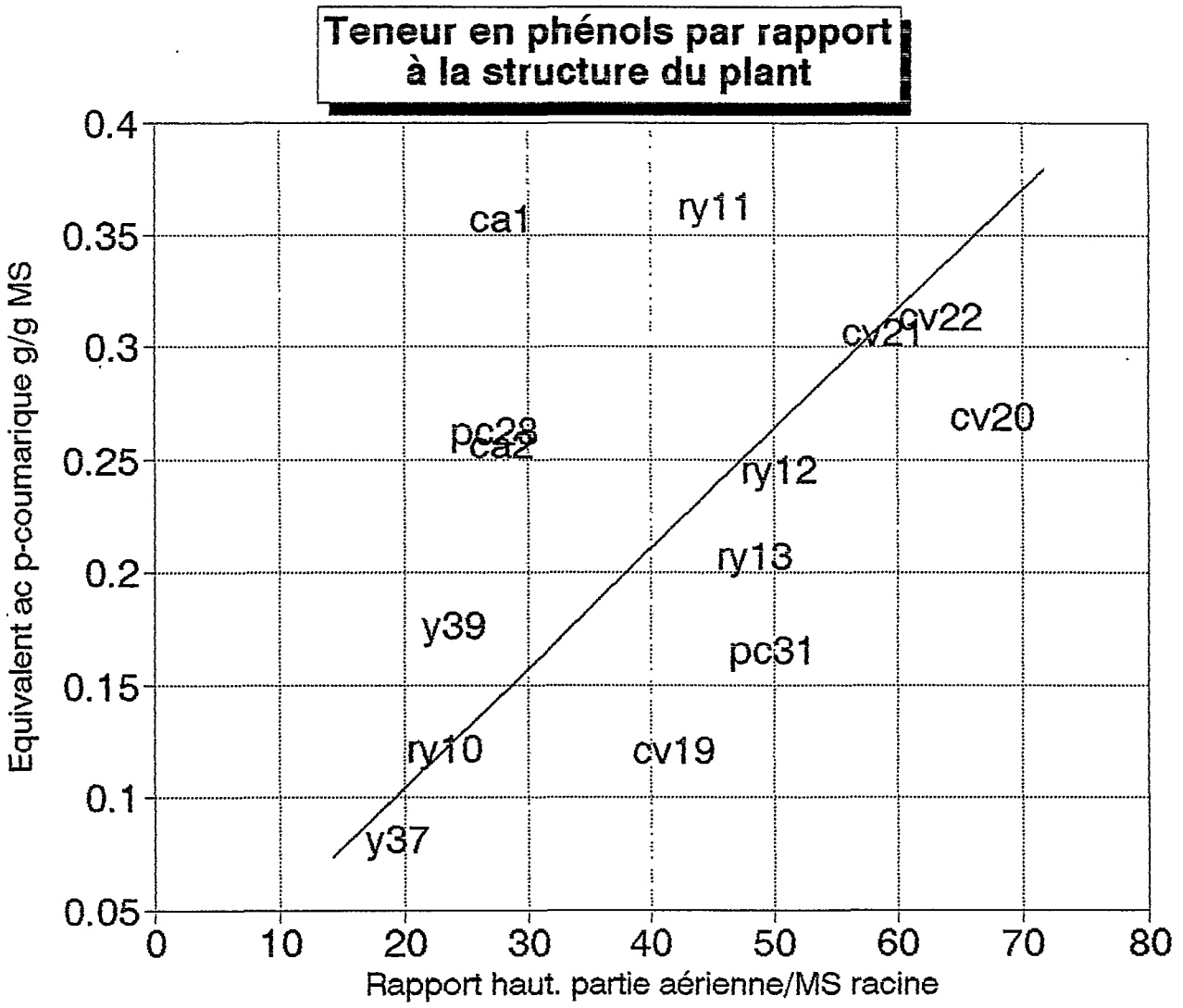


Figure n°7

MS : Matière sèche racinaire.

ANNEXE VII

ANALYSE PAR HPLC
A LONGUEUR D'ONDE FIXE

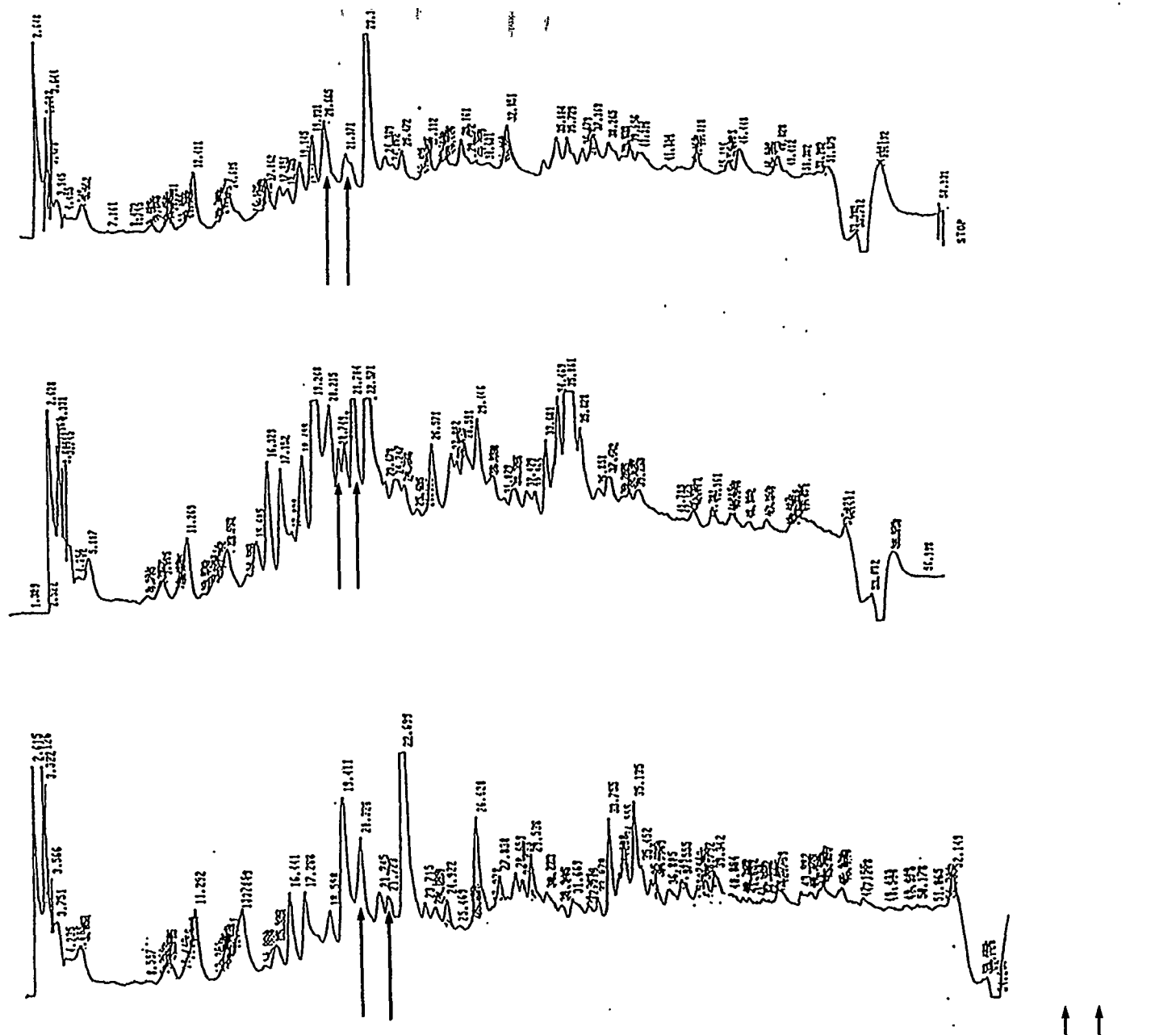


Figure n°8 : Chromatogrammes des échantillons CV19, CA1 et RY10 (de haut en bas) à 280 nm, à partir du chromatographe à longueur d'onde fixe.

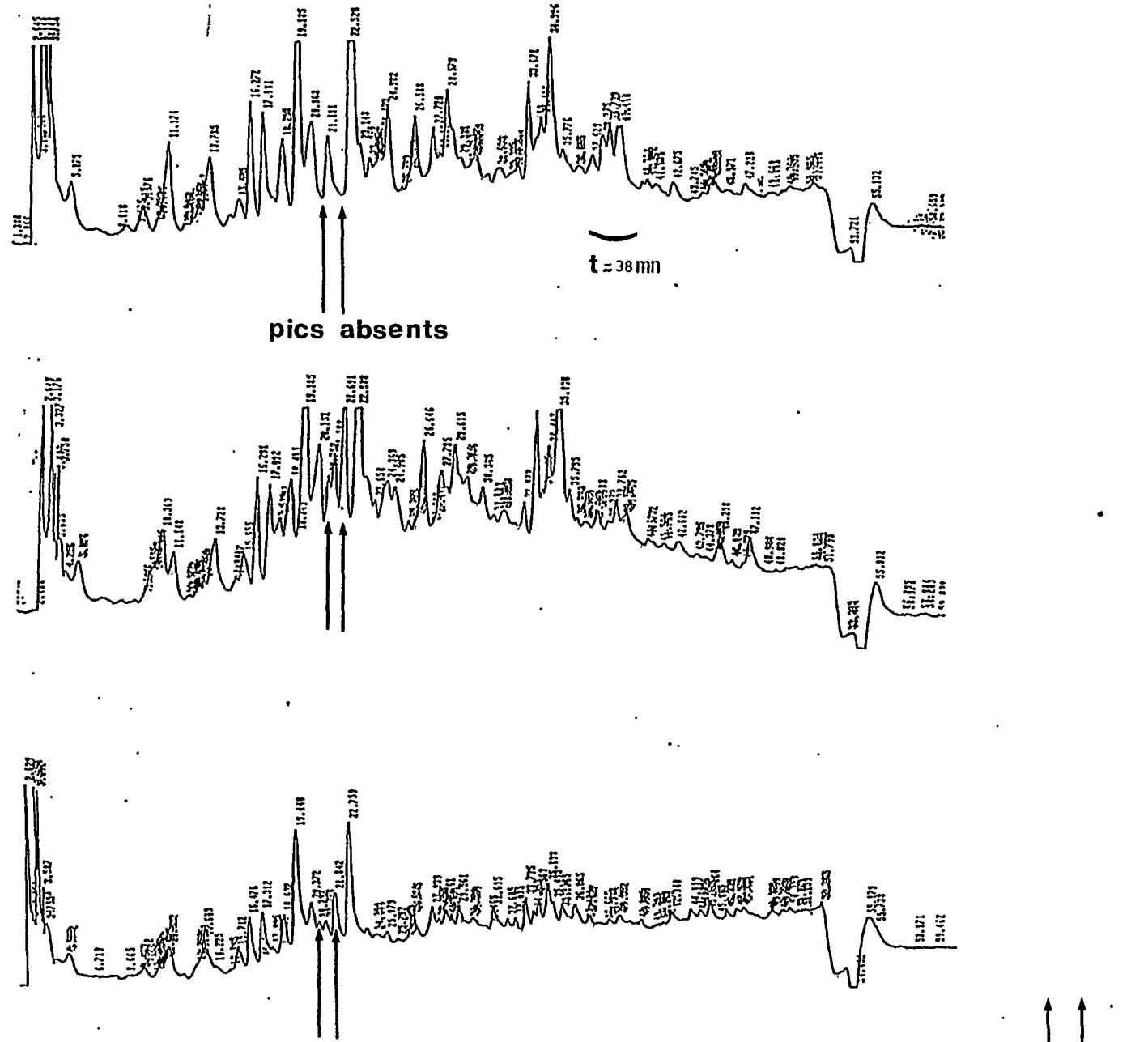


Figure n°9 : Chromatogrammes des échantillons **Y37, PC28** et **F49** (de haut en bas) à 280 nm, à partir du chromatographe à longueur d'onde fixe.

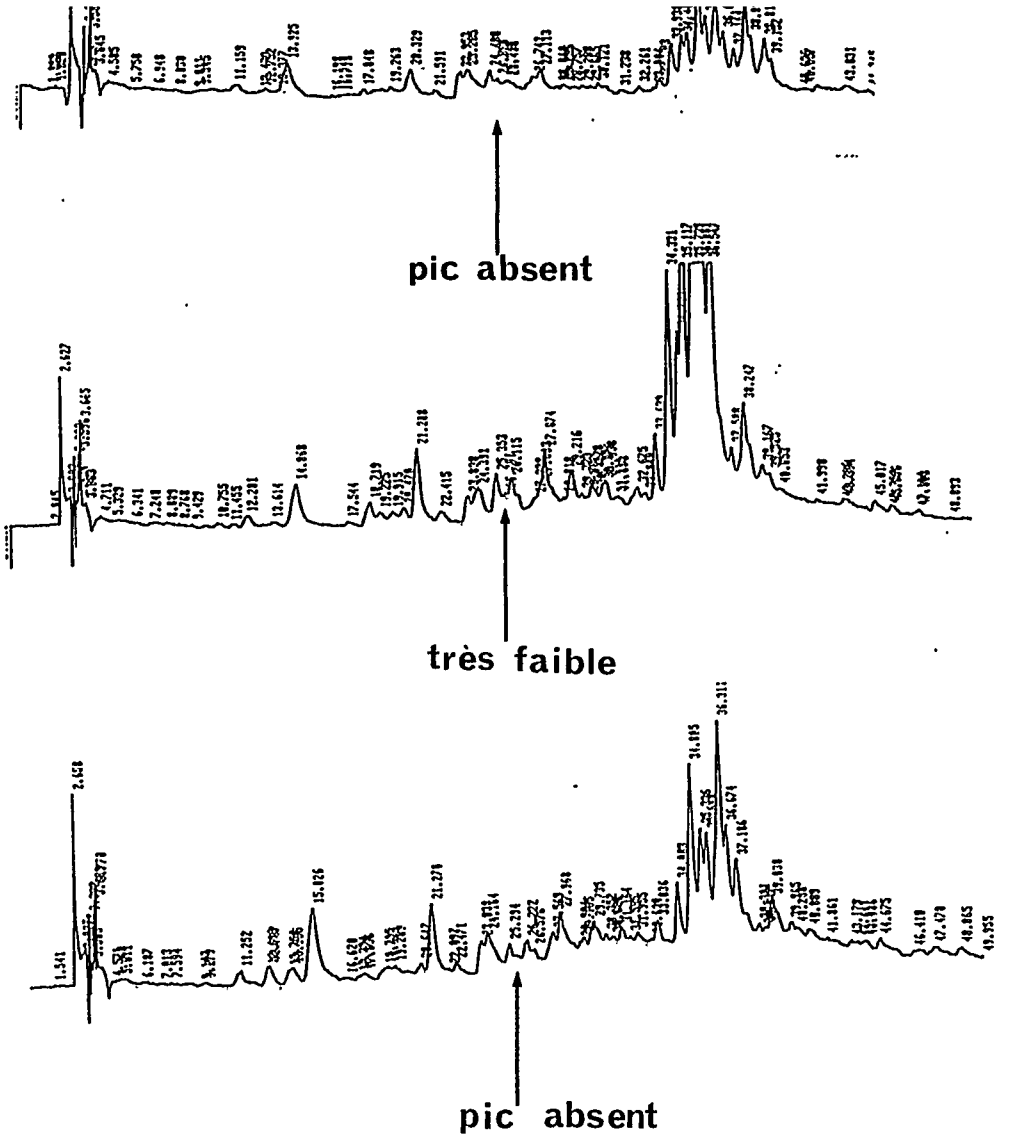


Figure n° 10 : Chromatogrammes des échantillons CV19, CA1 et RY10 (de haut en bas) à 320 nm, à partir du chromatographe à longueur d'onde fixe.

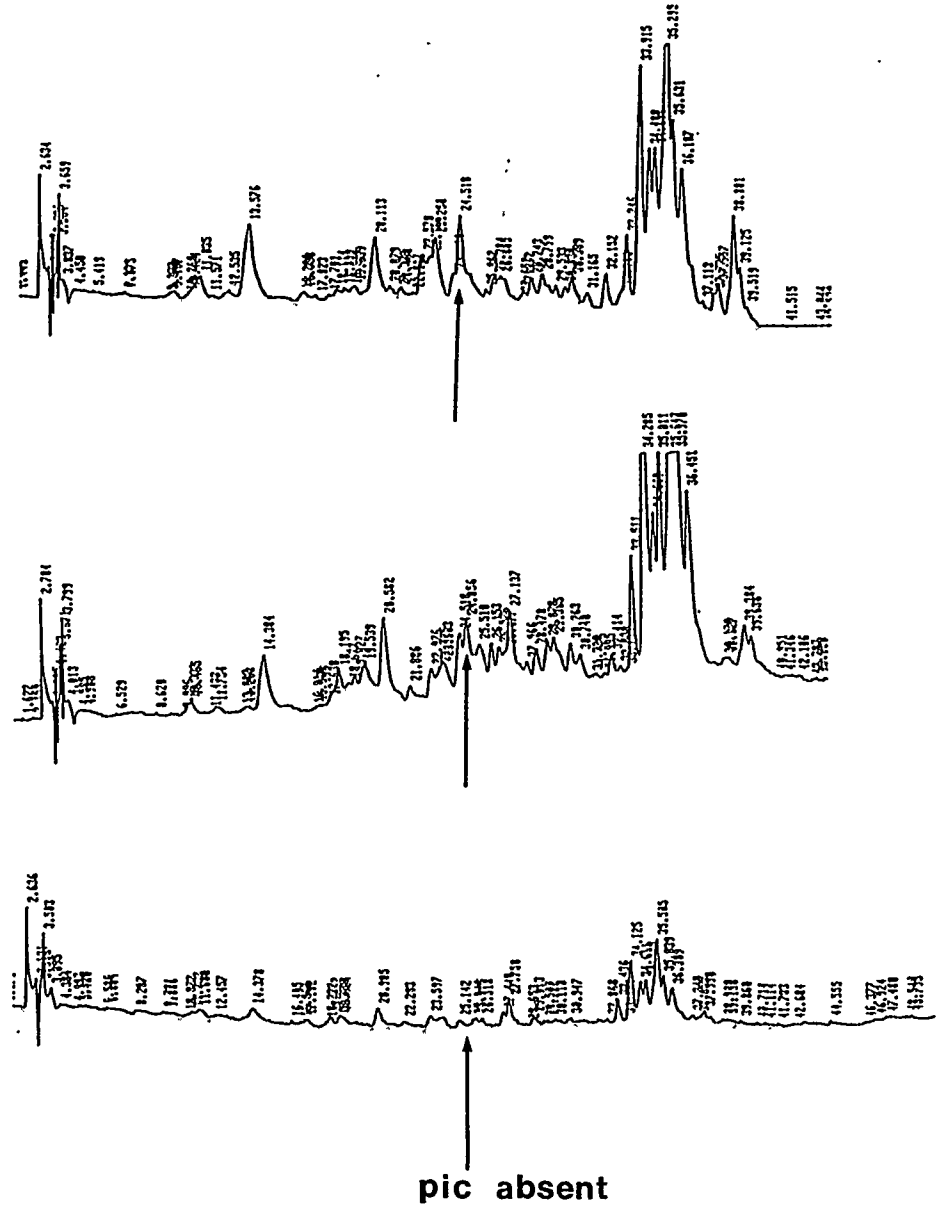
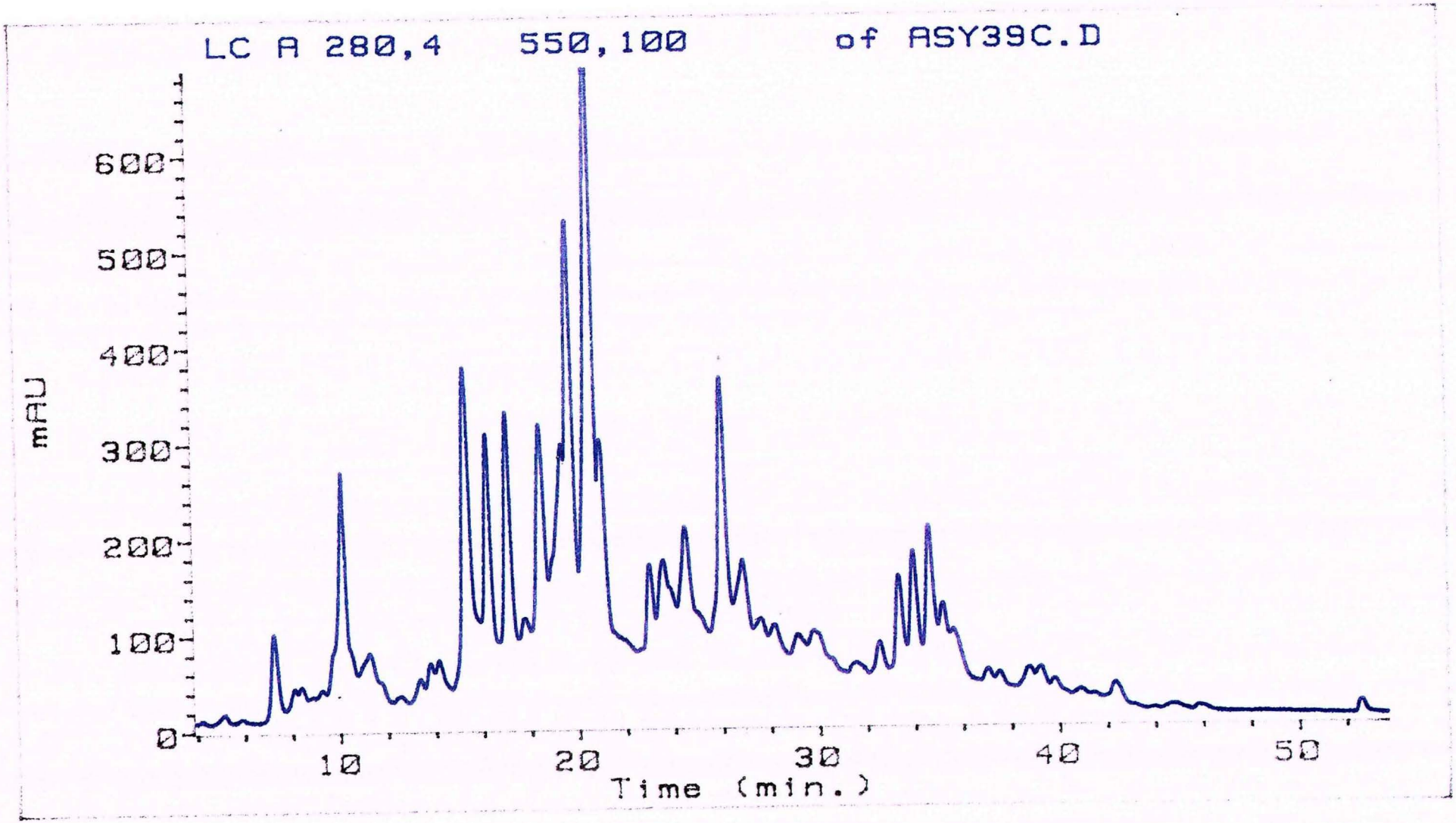


Figure n° 11 : Chromatogrammes des échantillons Y37, PC28 et F49 (de haut en bas) à 320 nm, à partir du chromatographe à longueur d'onde fixe.

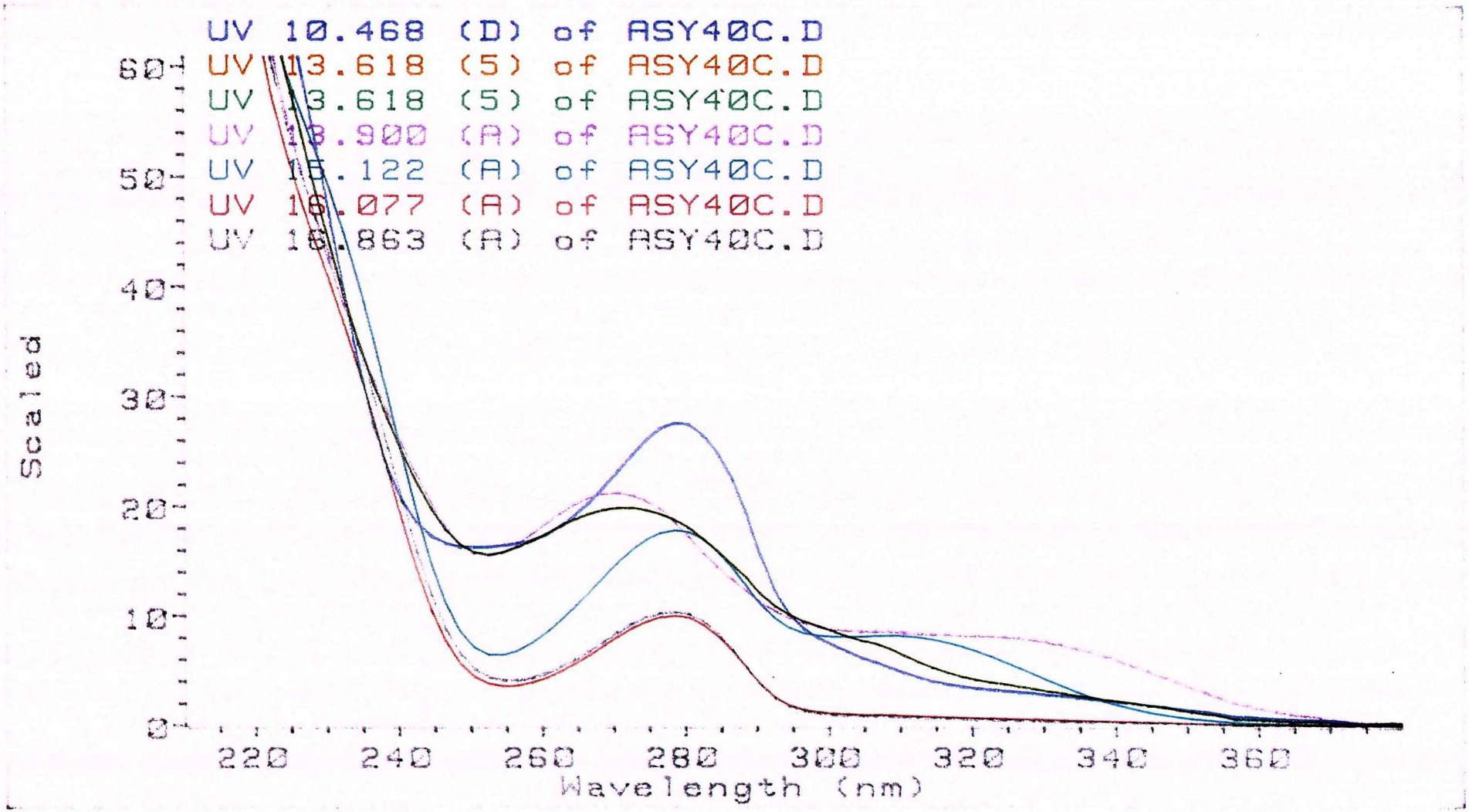
T = 24,5 mn

ANNEXE VIII

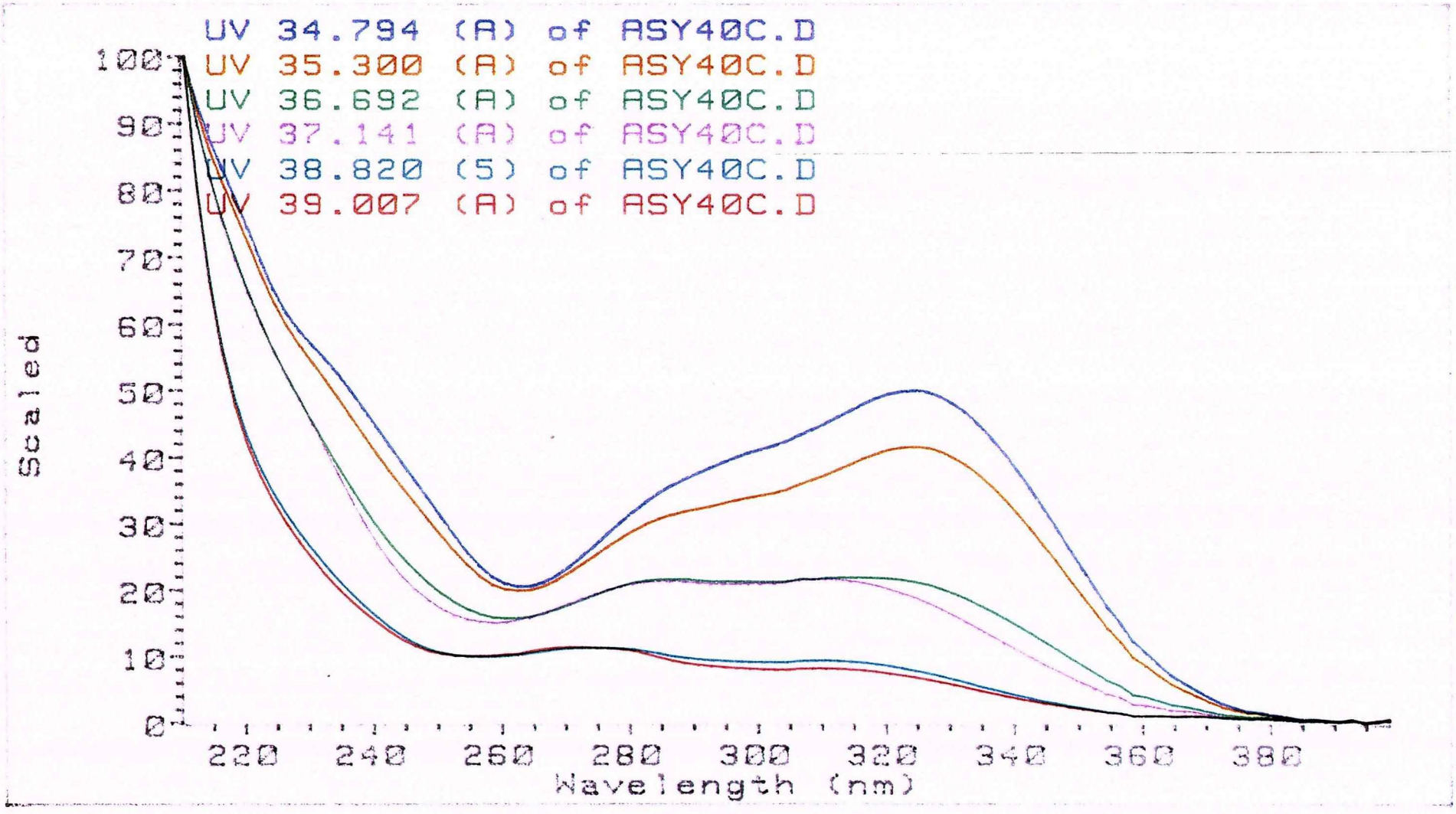
ANALYSE PAR HPLC
A BARETTES DIODES



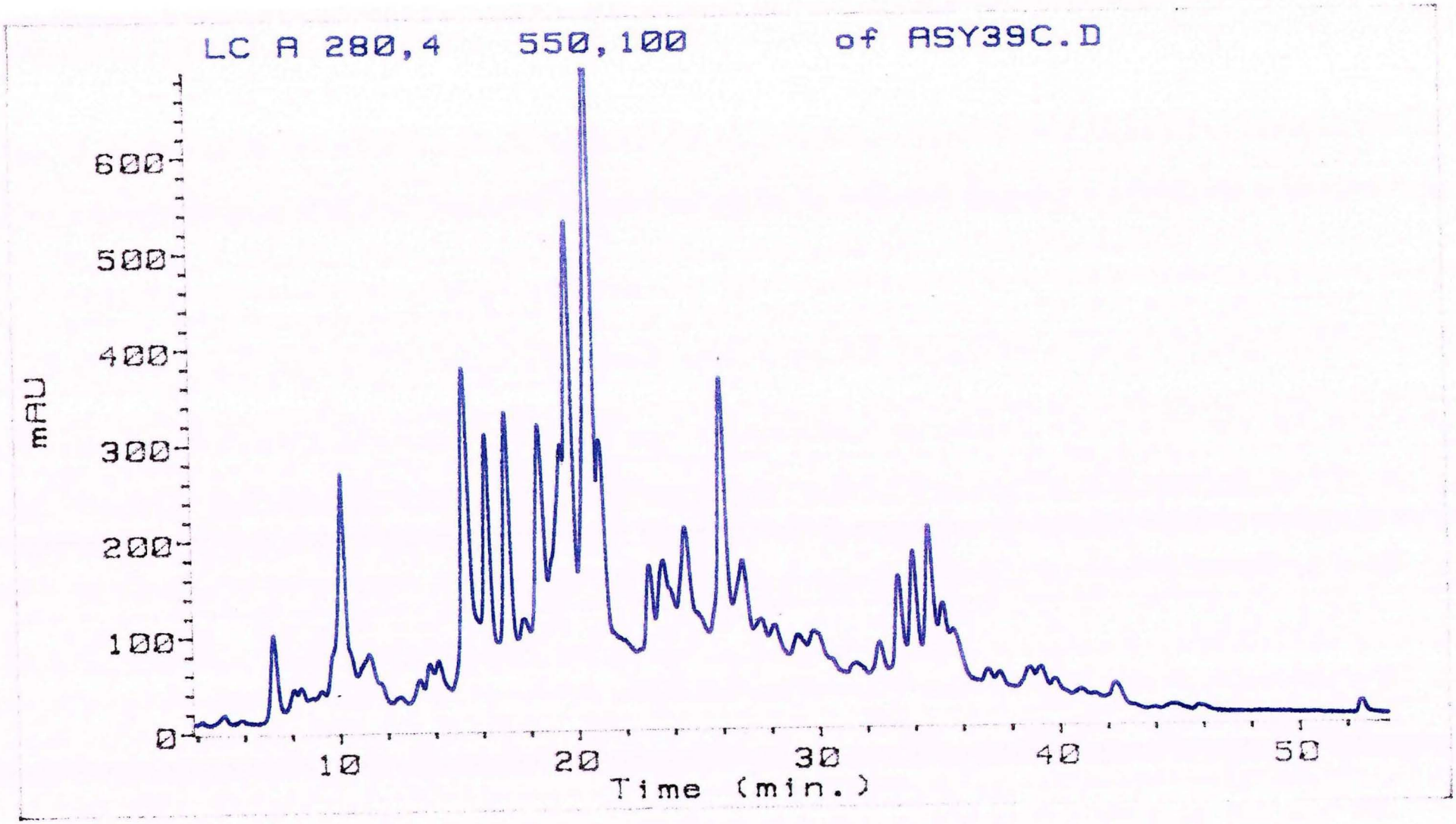
CHROMATOGRAMME DE Y39



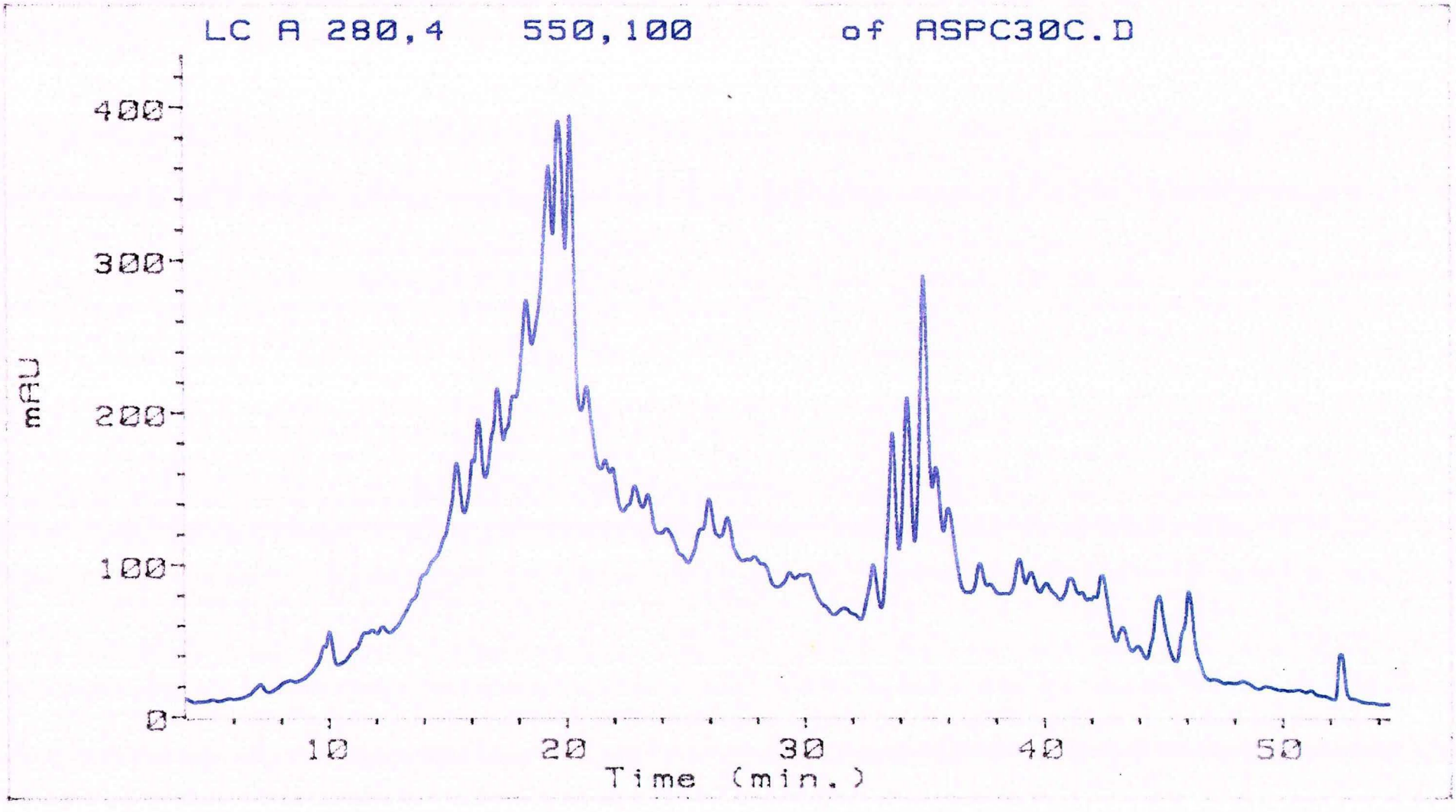
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES FLAVANES (échantillon Y40)



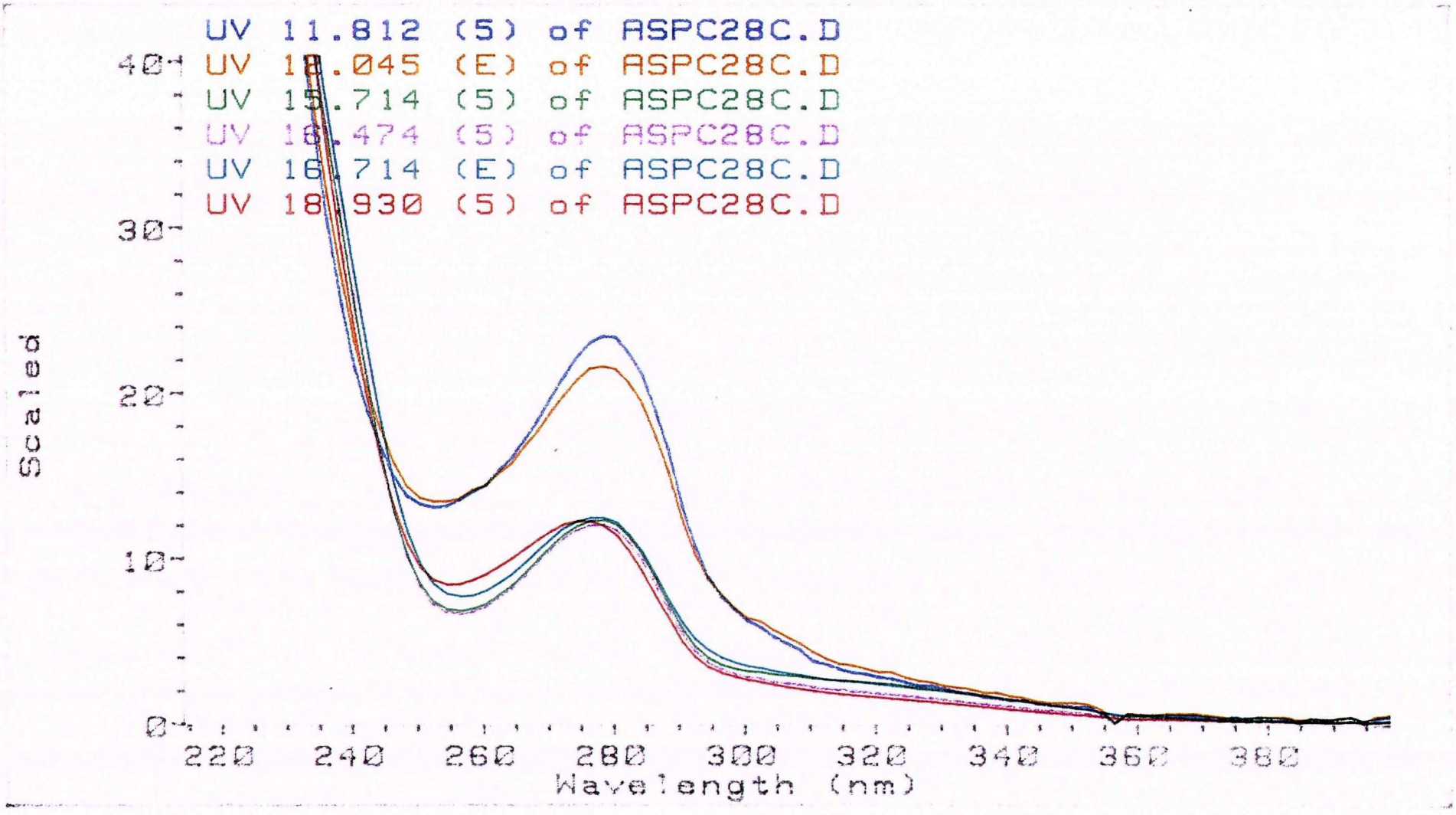
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES DERIVES DE L'ACIDE FERULIQUE
(échantillon Y40)



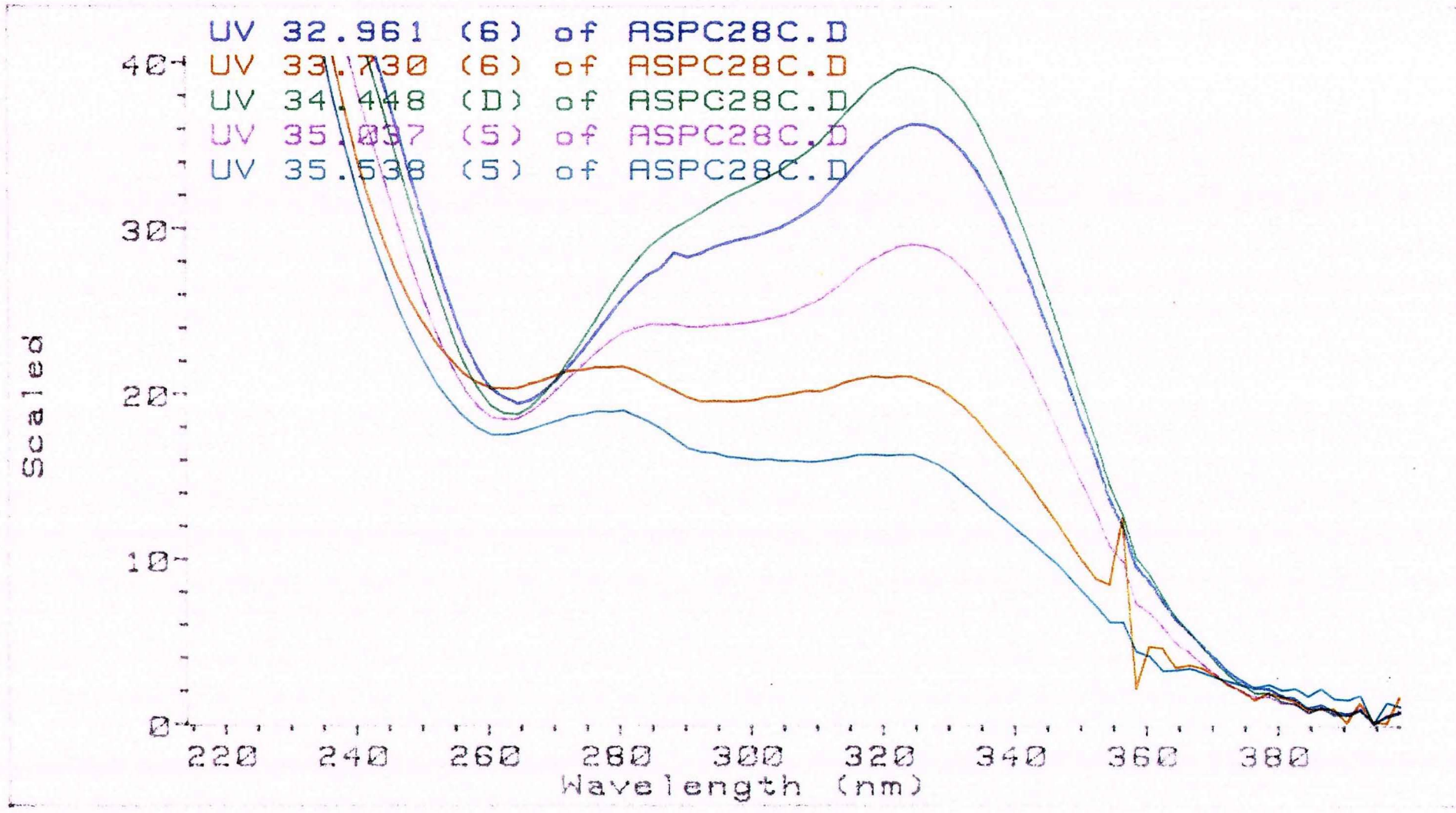
CHROMATOGRAMME DE Y39



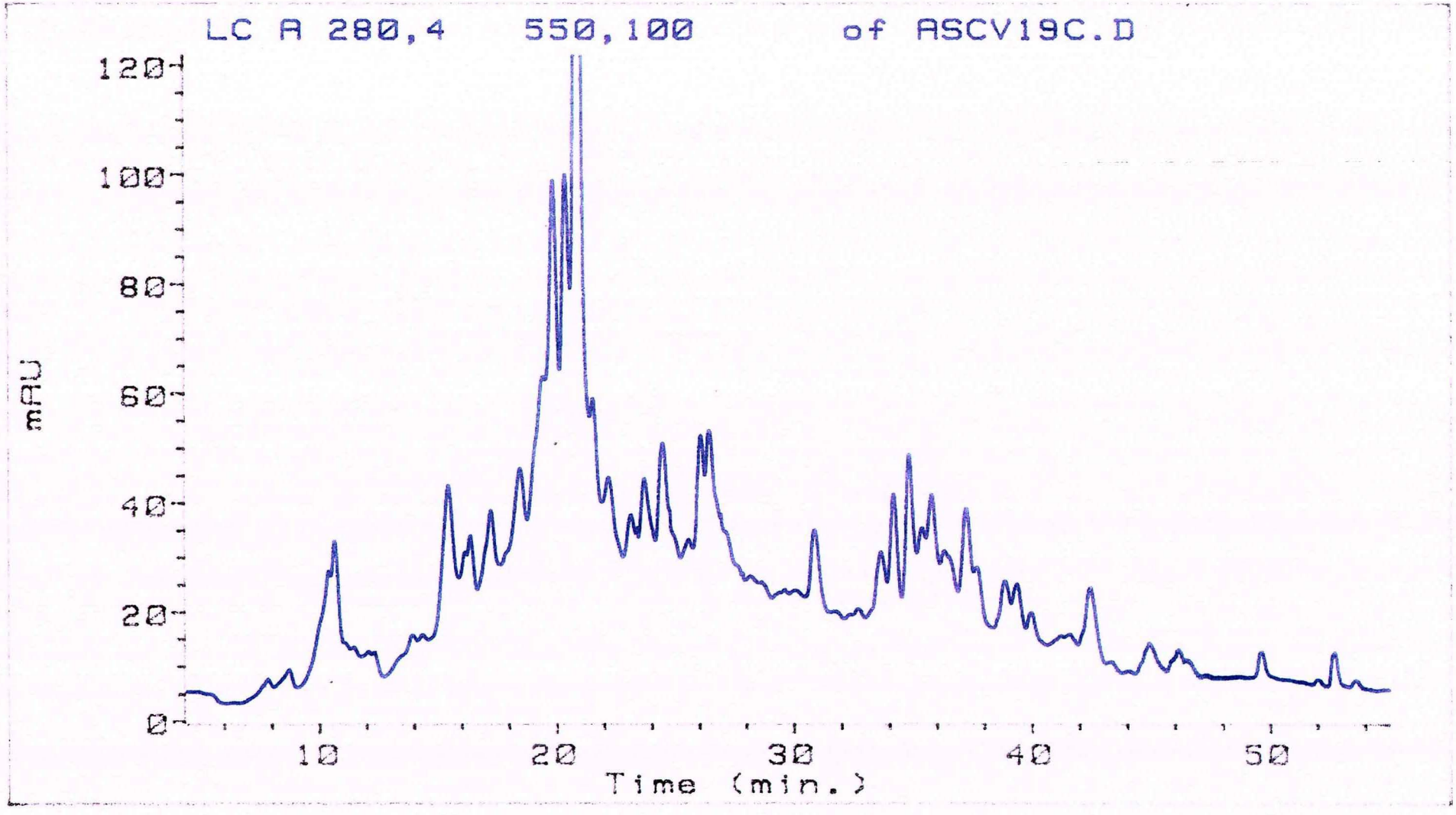
CHROMATOGRAMME DE PC30



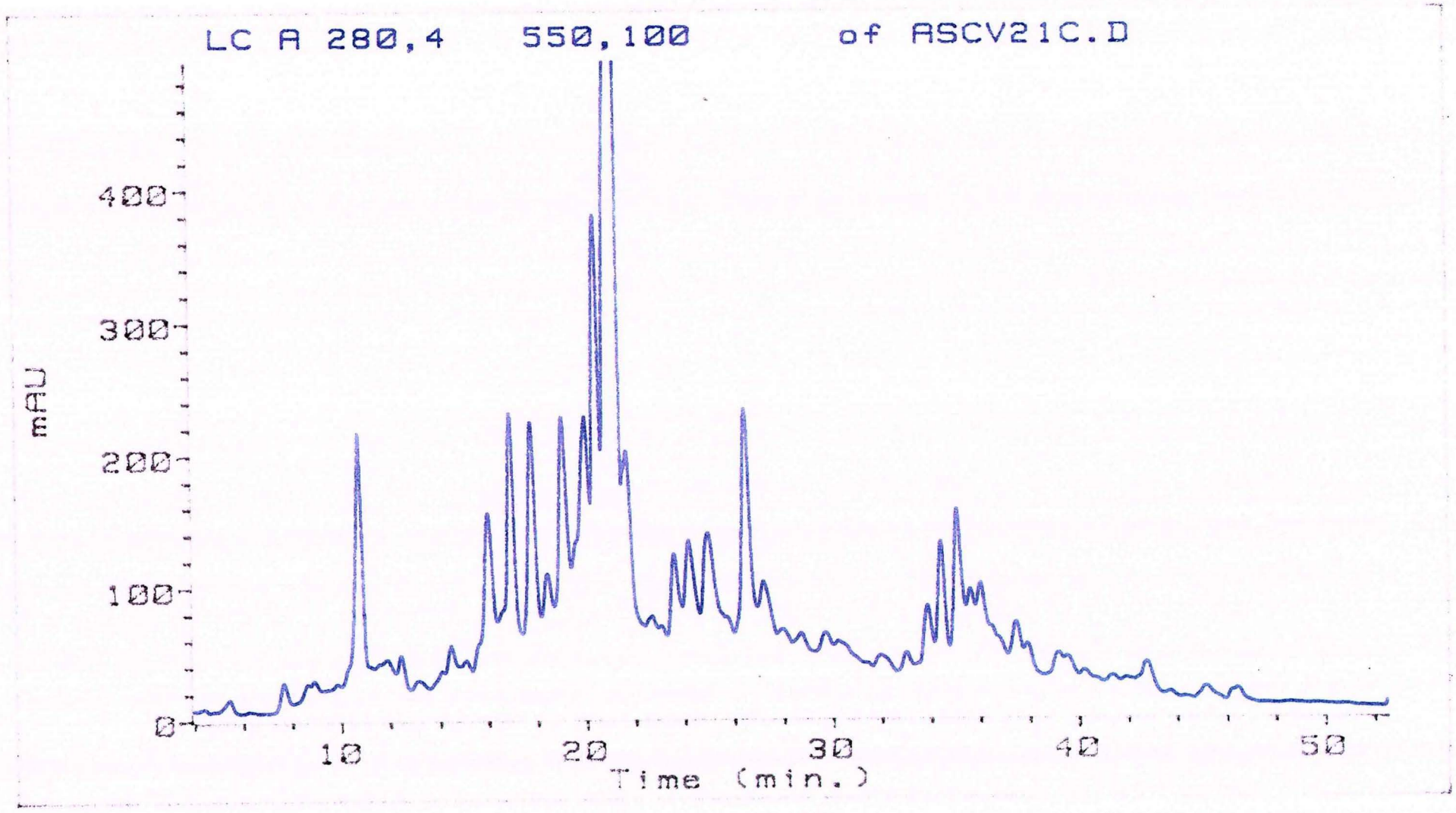
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES FLAVANES (échantillon PC30)



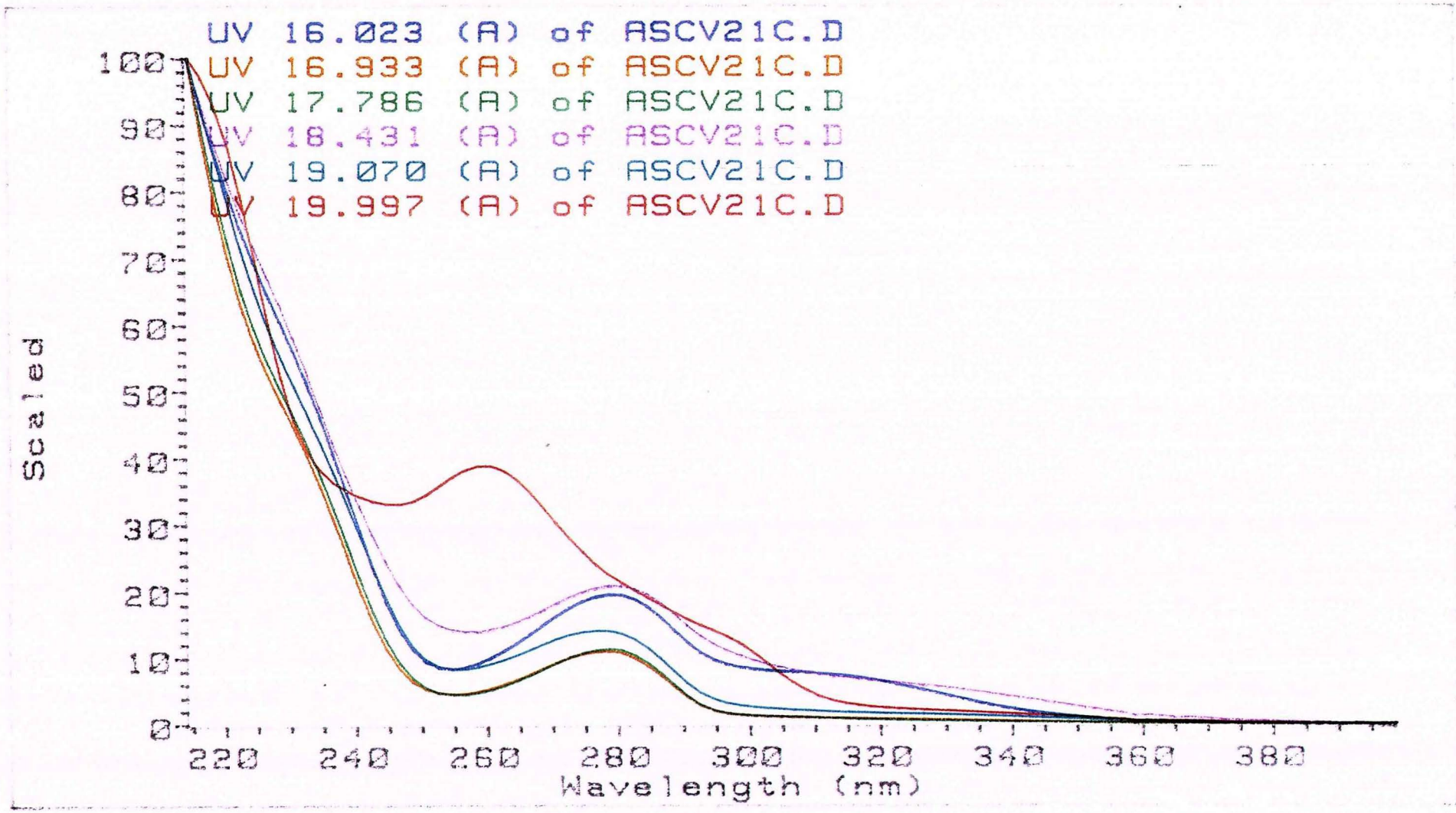
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES DERIVES DE L'ACIDE FERULIQUE
(échantillon PC30)



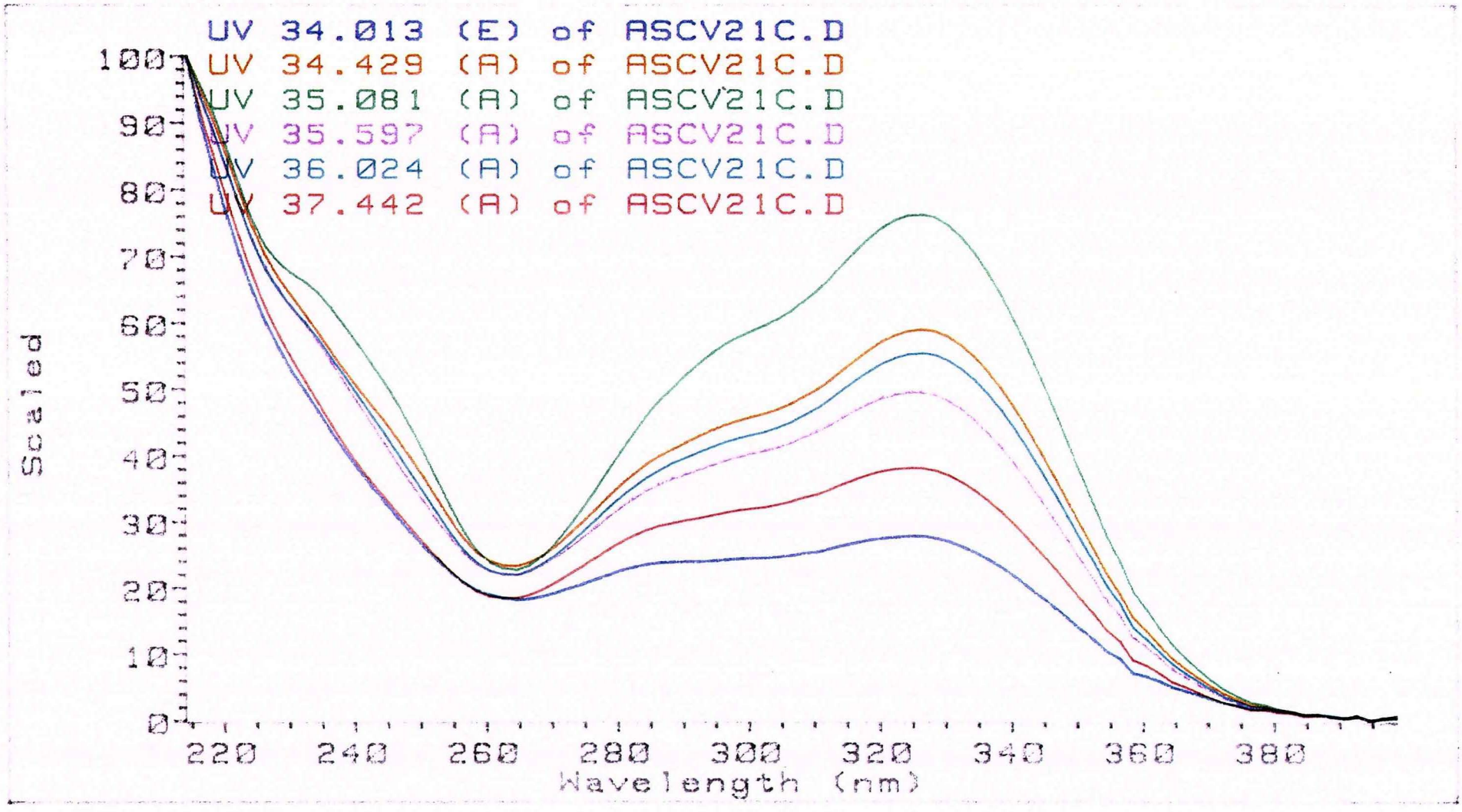
CHROMATOGRAMME DE CV19



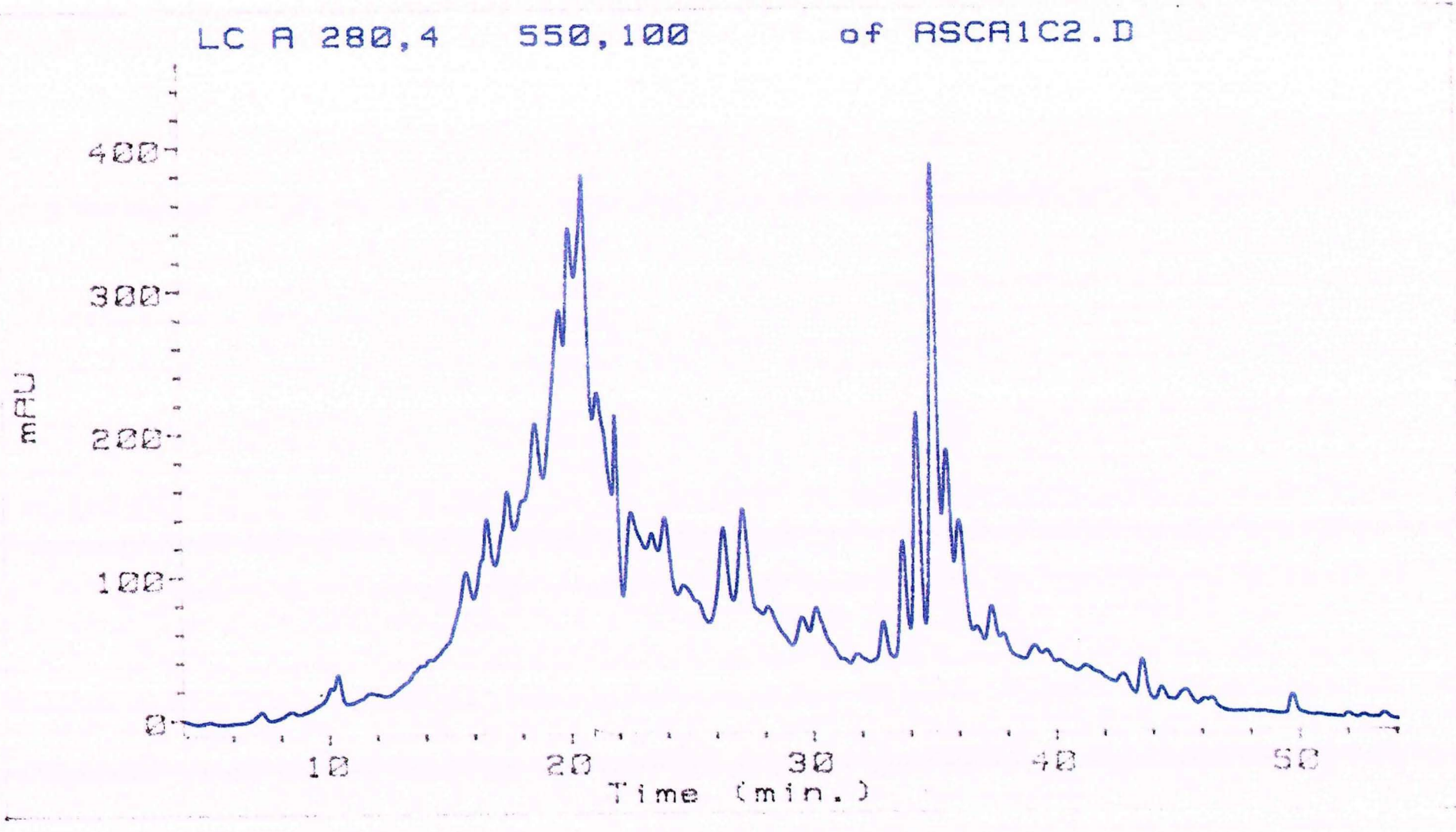
CHROMATOGRAMME DE CV21



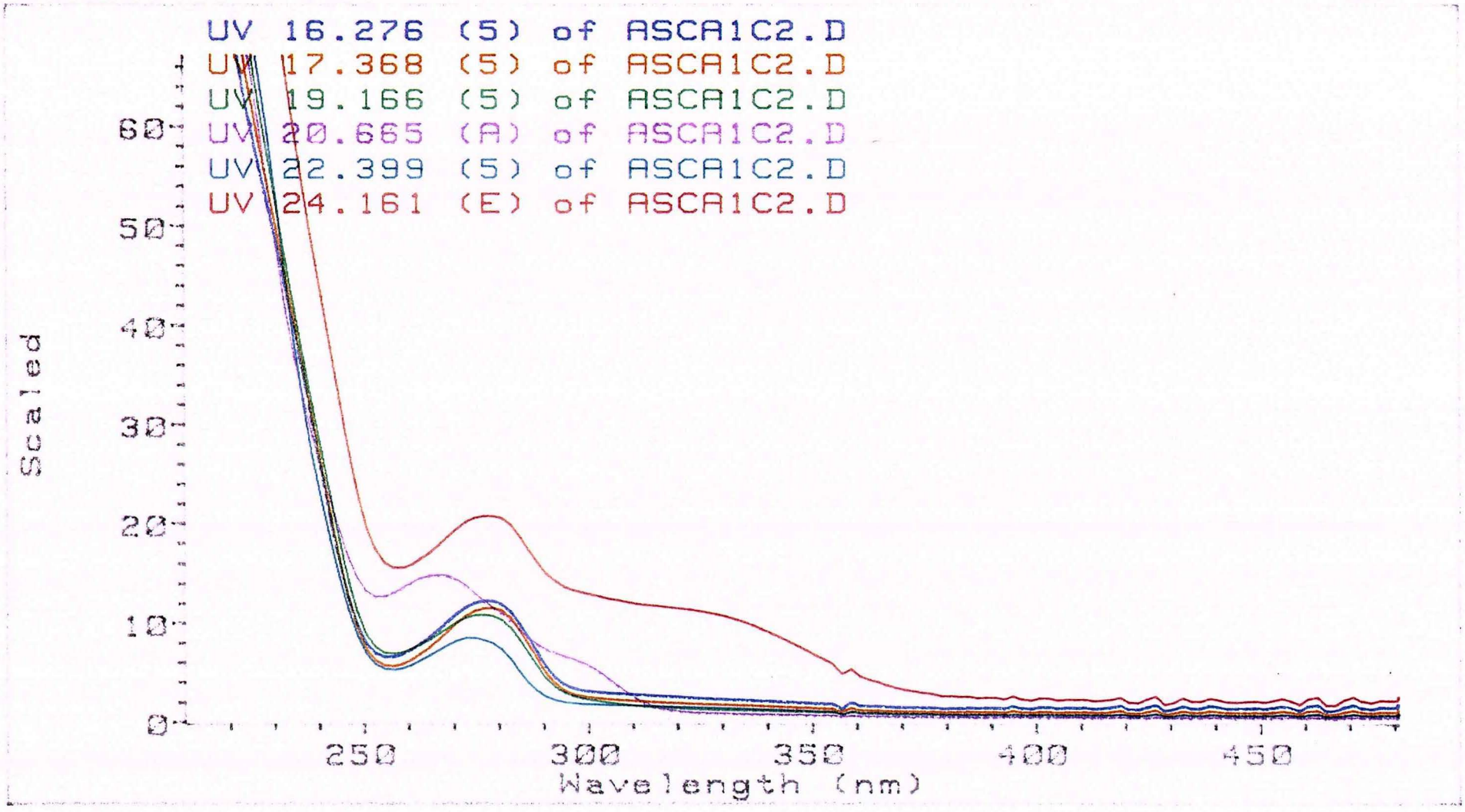
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES FLAVANES (échantillon CV21)



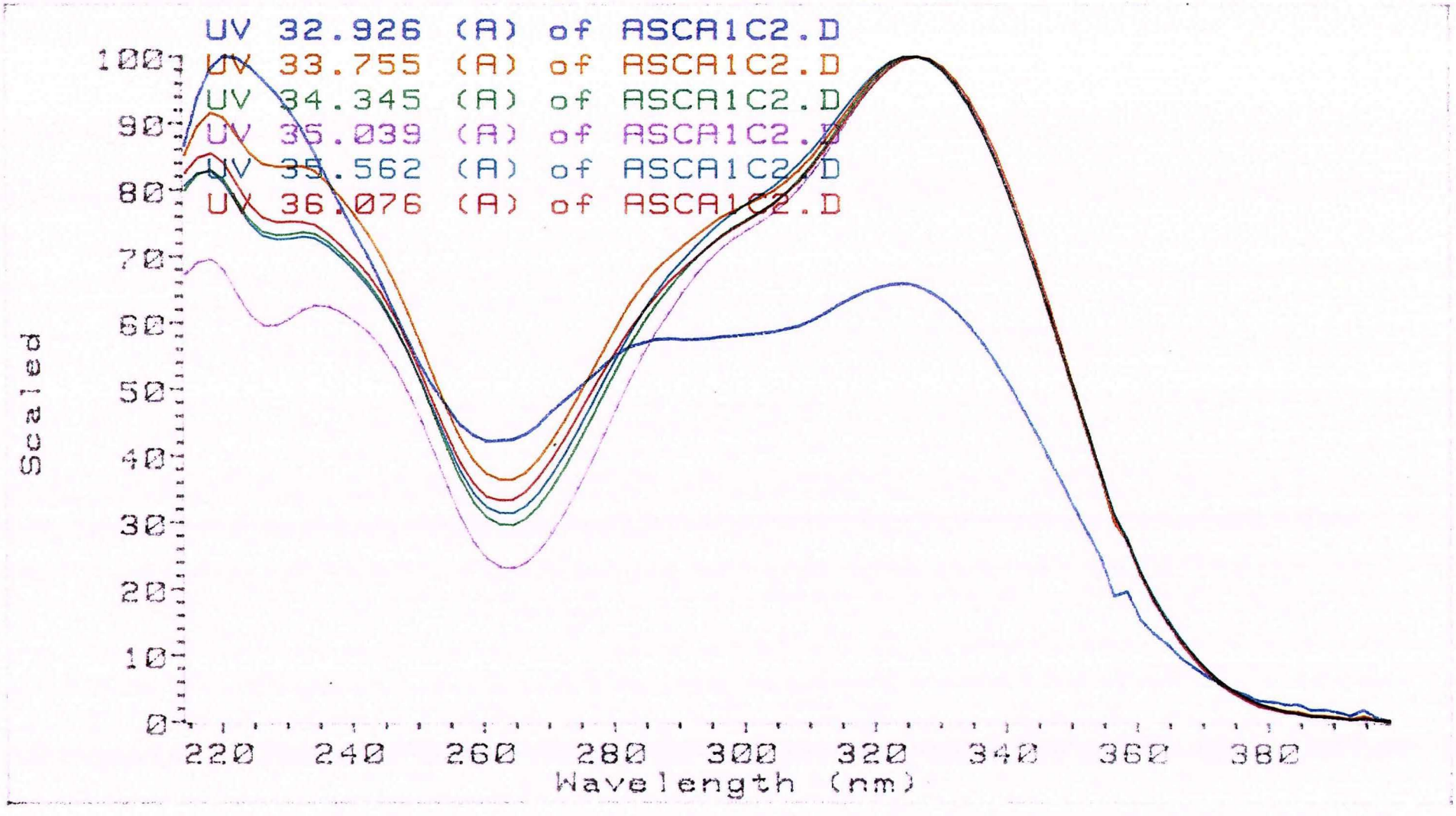
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES DERIVES DE L'ACIDE FERULIQUE
(échantillon CV21)



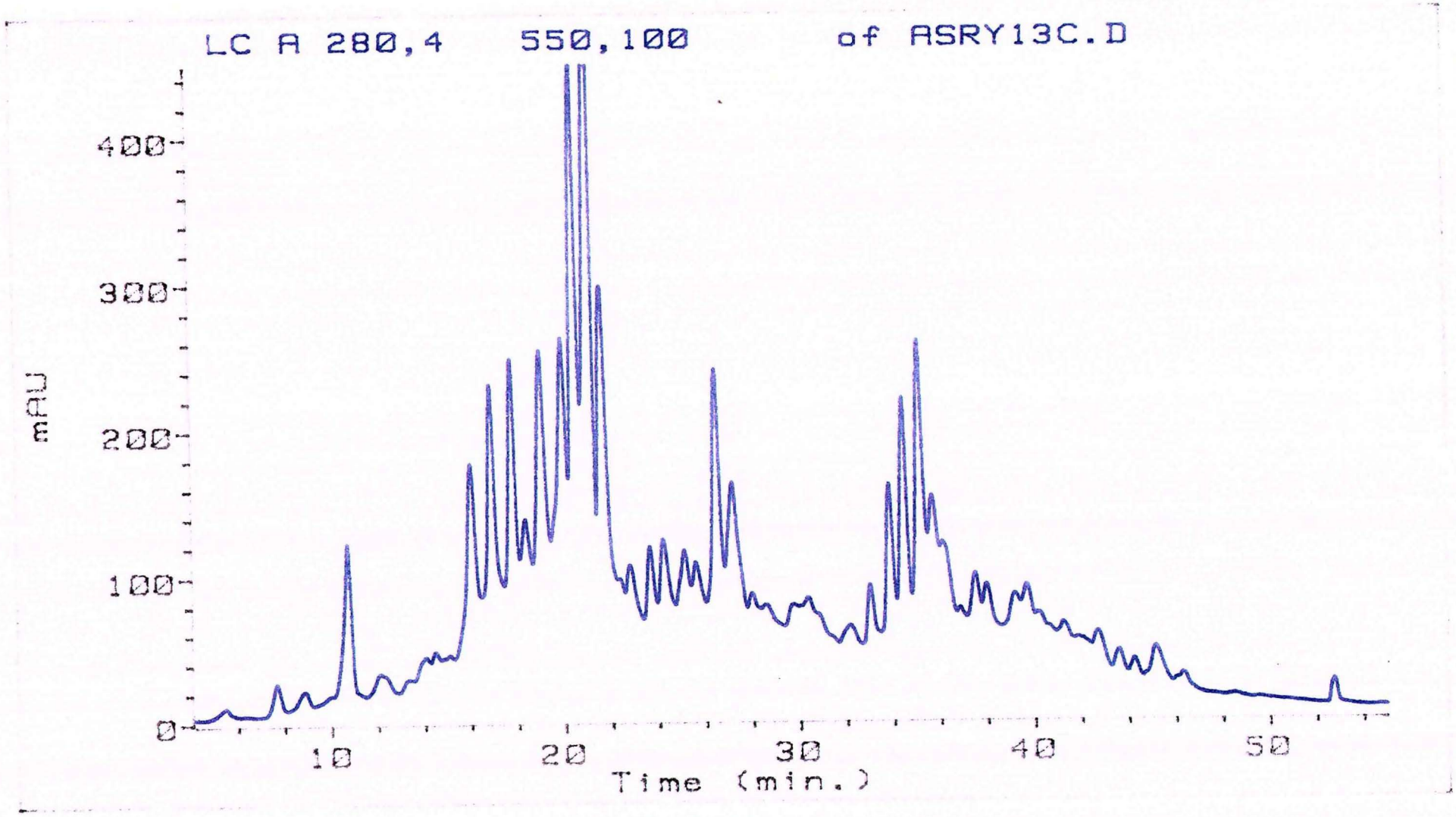
CHROMATOGRAMME DE CA1



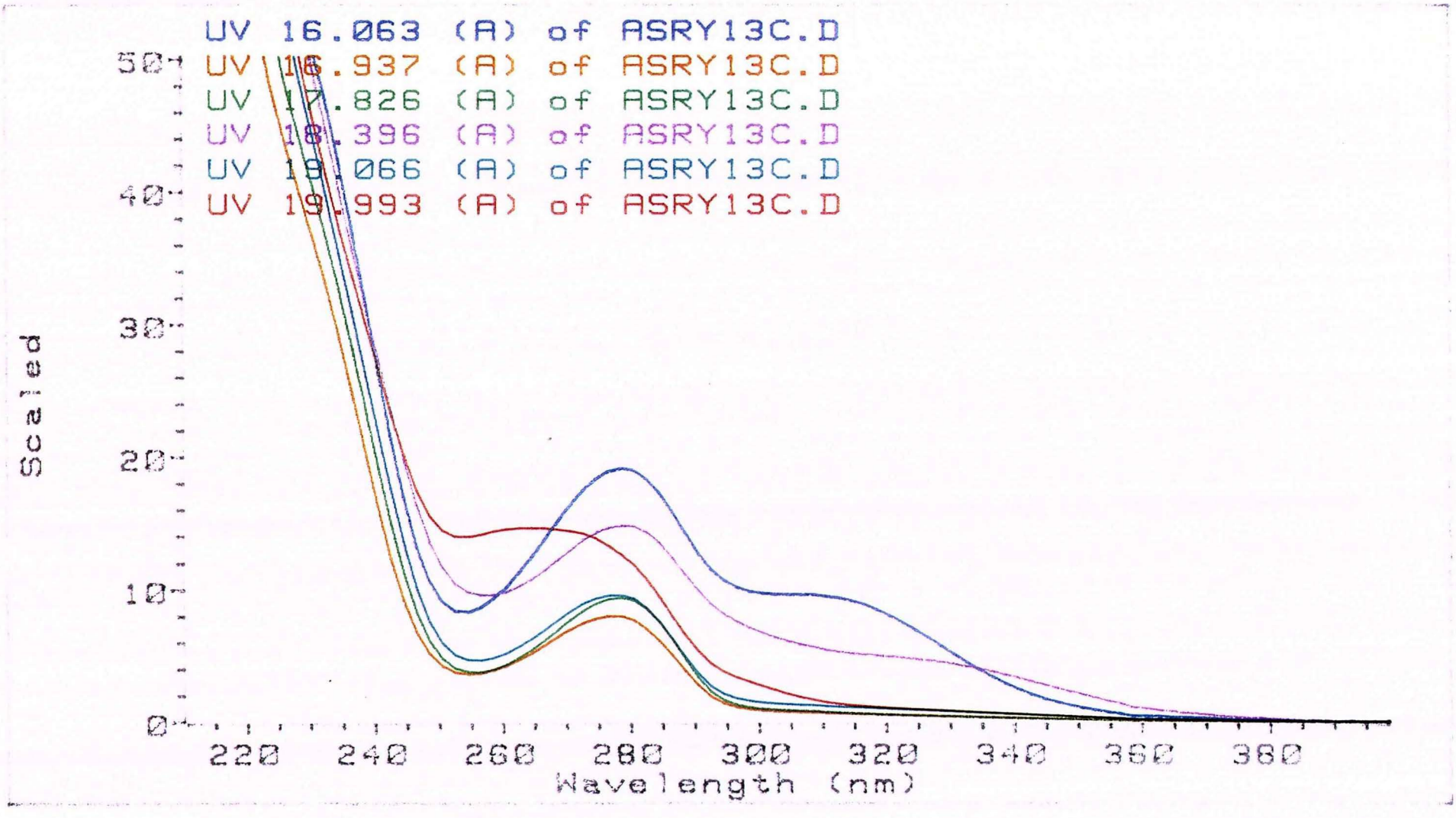
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES FLAVANES (échantillon CA1)



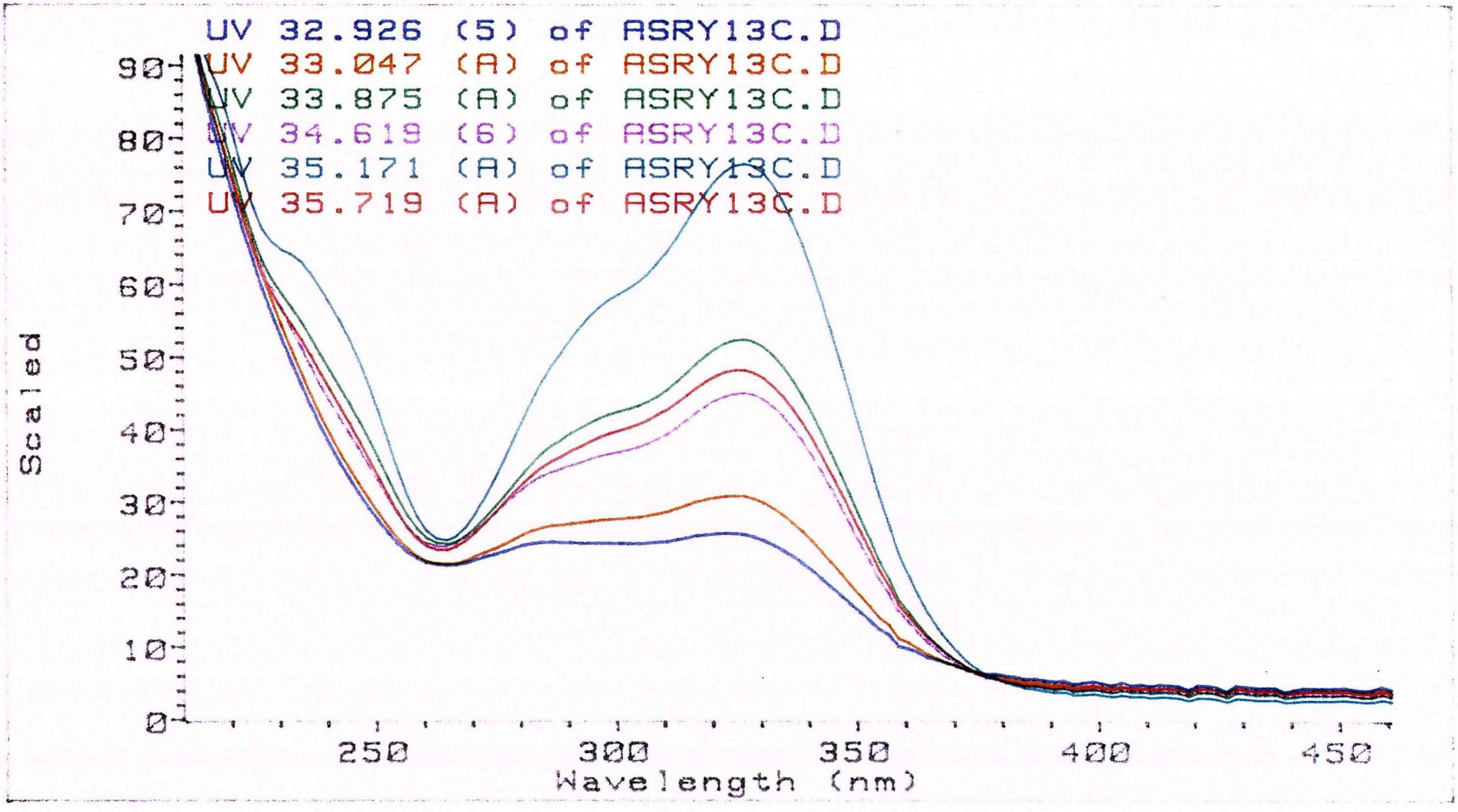
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES DERIVES DE L'ACIDE FERULIQUE
(échantillon CA1)



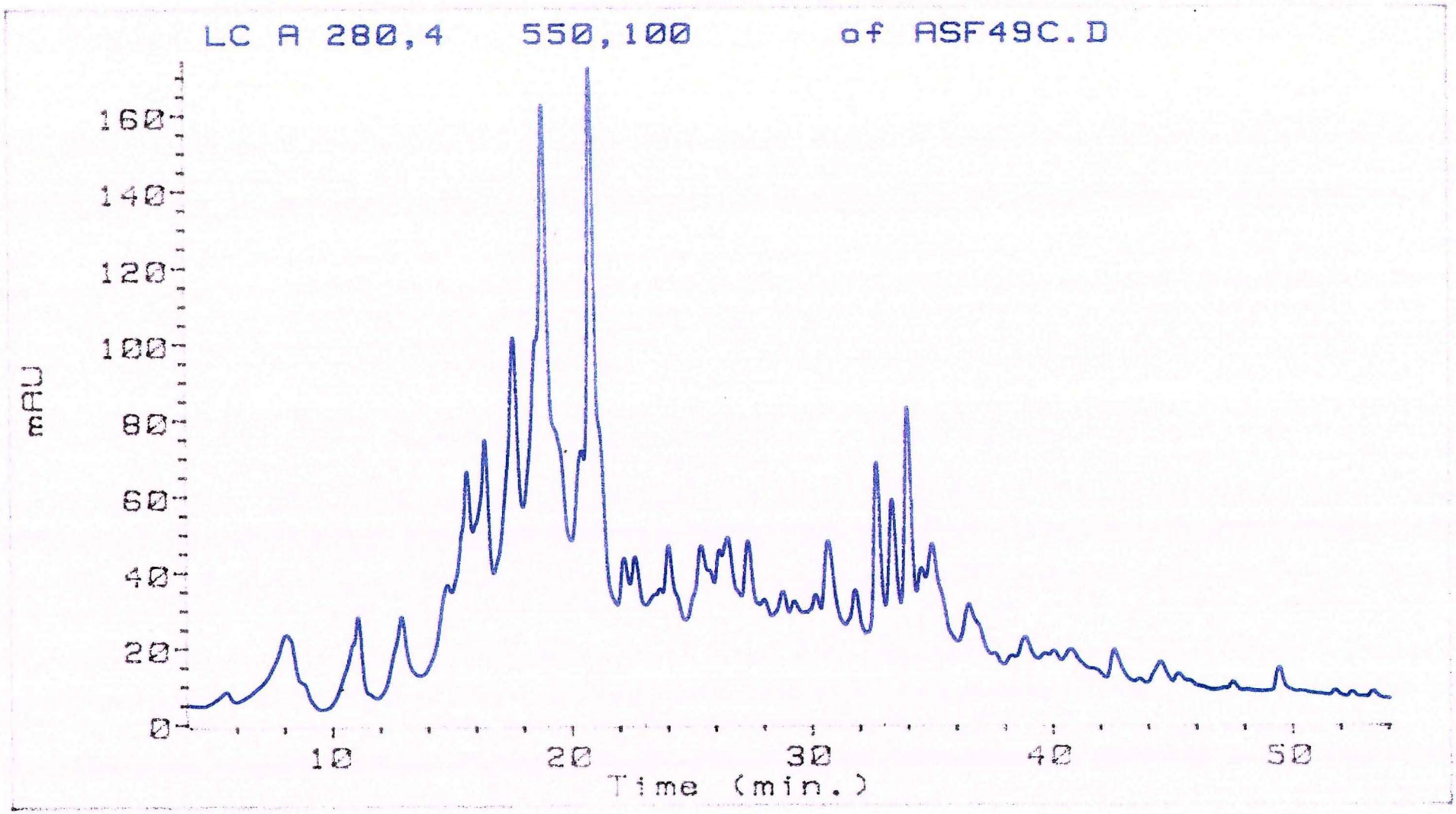
CHROMATOGRAMME DE RY13



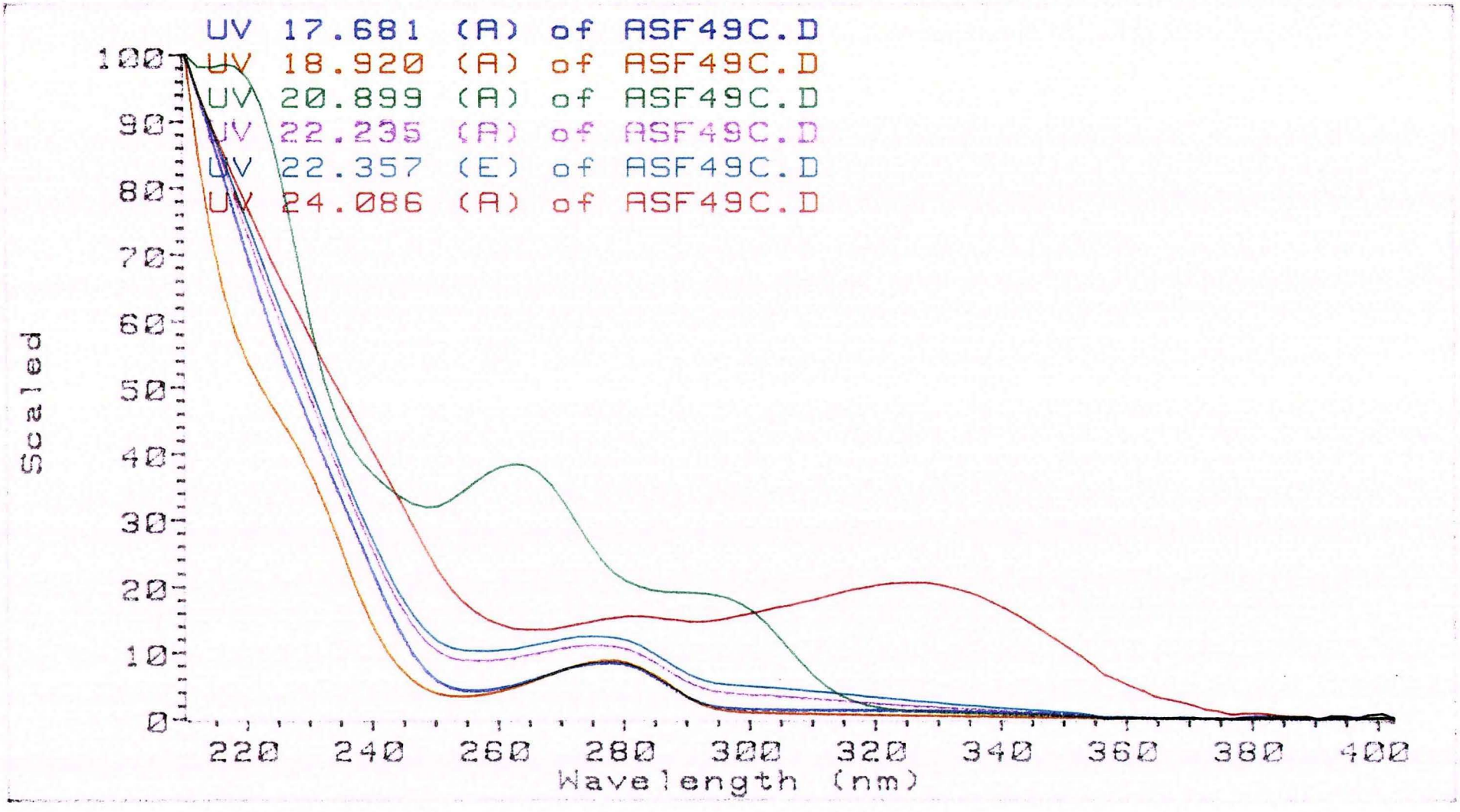
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES FLAVANES (échantillon RY13)



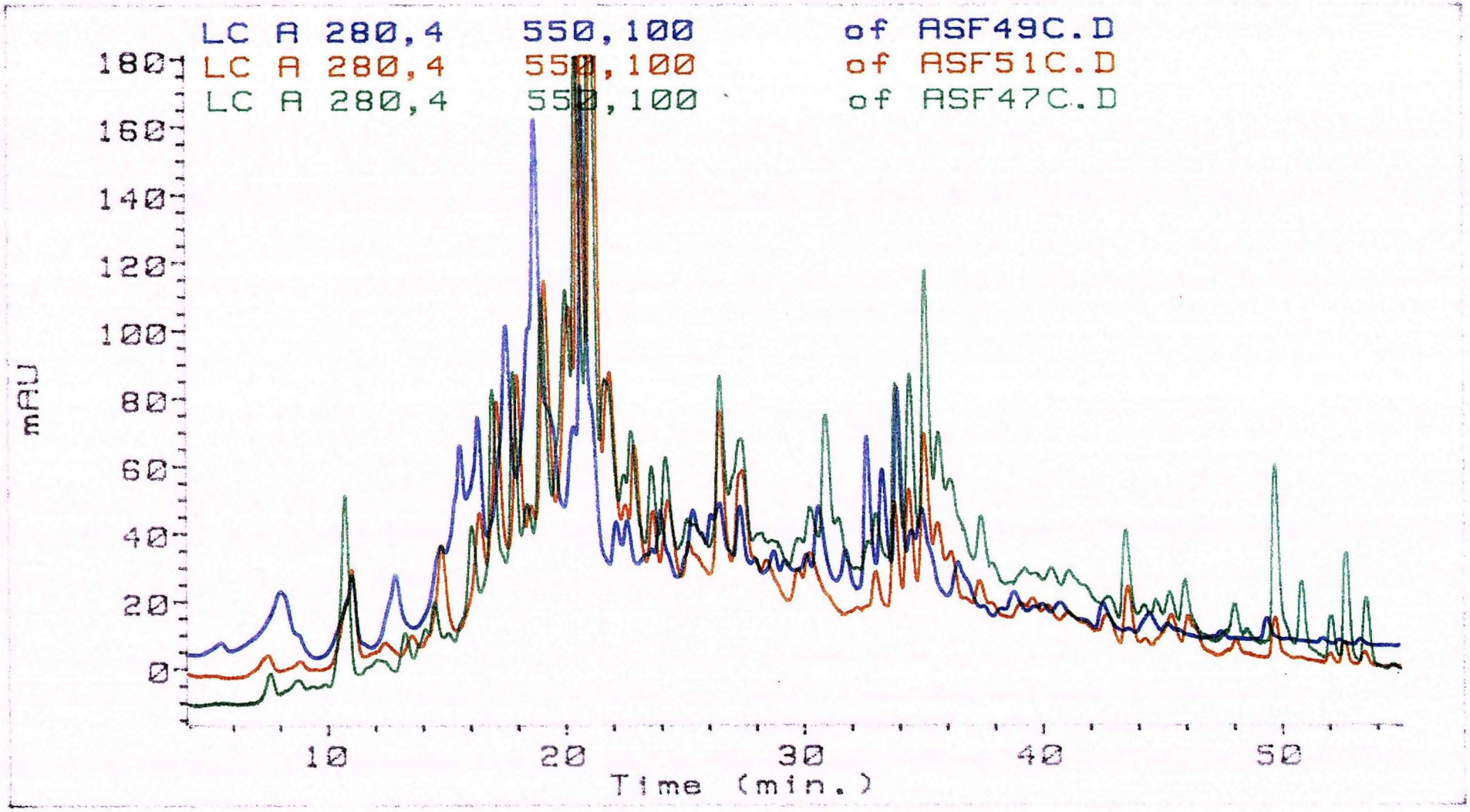
SPECTRES CARACTERISTIQUES DES DERIVES DE L'ACIDE FERULIQUE
(échantillon RY13)



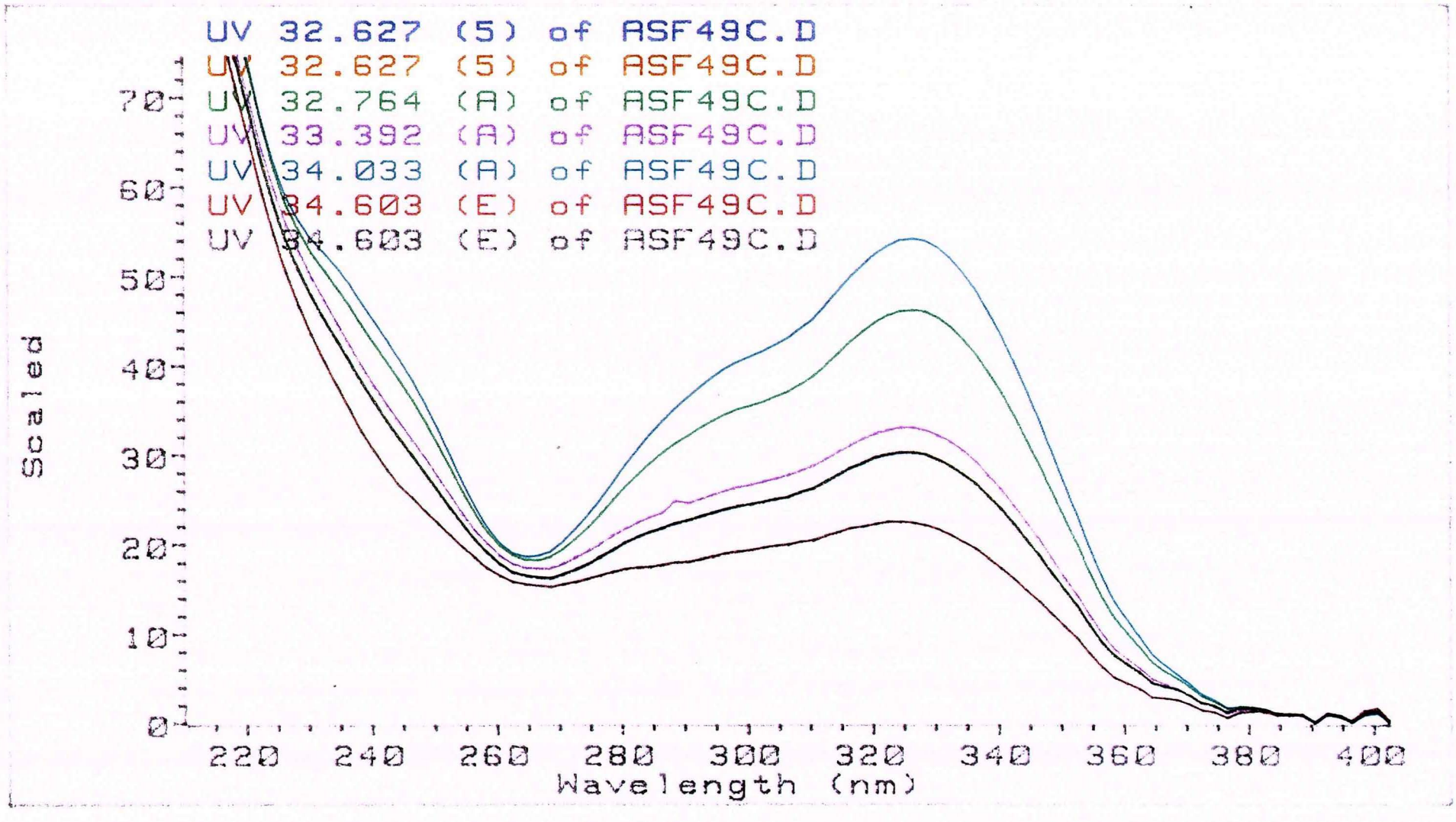
CHROMATOGRAMME DE F49



SPECTRES CARACTERISTIQUES DES FLAVANES (échantillon F49)



CHROMATOGRAMMES SUPERPOSES DE F47, F49, F51.



SPECTRES CARACTERISTIQUES DES DERIVES DE L'ACIDE FERULIQUE
(échantillon F49)