

UNIVERSITE DE KISANGANI



FACULTE DES SCIENCES

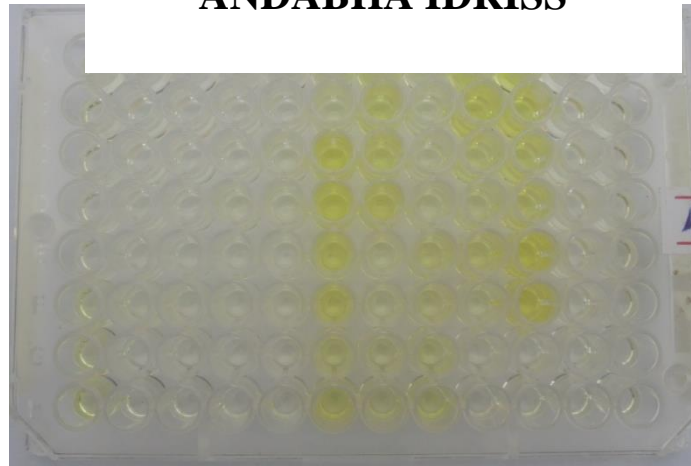
B.P. 2012

Kisangani

**ESSAIS D'ASSAINISSEMENT DE BANANIERS (*MUSA* AAA, AAB ETABB)
INFECTES PAR BANANA BUNCHY TOP VIRUS (BBTV) PAR LA
CULTURE *IN VITRO***

Par

ANDABHA IDRIS



TRAVAIL DE FIN D'ETUDE

Présenté en vue de l'obtention du titre de Licencié en
Sciences

Option : Biologie

Orientation : Sciences Biotechnologiques

Directeur : P.O. DHED'A DJAILO

Encadreurs : Ass. Justine TSHIMBILA

Ass. Jacques TCHATCHAMBE

ANNEE ACADEMIQUE : 2013-2014

DEDICACE

A mon père ALOMA ANDABHA A. R. ;

A ma mère Marie AMBEA ;

A mes frères et sœurs en particulier mon plus jeune frère YUSUPH ANDABHA Junior ;

Je dédie ce travail.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce parcours universitaire, nous rendons grâce à l'Éternel Dieu, pourvoyeur de nos multiples besoins et qui nous a donné la force de parvenir à la fin de ce travail. L'aboutissement de ce parcours universitaire n'est pas le fruit de nos propres efforts, mais l'œuvre de plusieurs bâtisseurs.

Premièrement, le Professeur Benoit Dhed'a Djaïlo qui malgré ses multiples occupations, a accepté de diriger le présent travail. Sa rigueur scientifique et ses conseils ont permis ainsi de contribuer à l'élargissement de nos horizons scientifique. Nous vous remercions pour votre disponibilité et votre continuel souci de bien former.

Nous tenons à remercier spécialement l'Assistante Justine Tshidibi Tshimbila, pour avoir encadré ce travail. Sa porte est restée toujours ouverte pour d'innombrables discussions et conseils qui nous ont permis de parvenir à la fin de ce travail. Nous remercions aussi l'assistant Jacques Tchatchambe pour ses conseils techniques au cours de la culture *in vitro*.

C'est avec une joie immense que nous adressons nos profonds remerciements aux autorités de l'Université de Kisangani en général et de la Faculté des Sciences en particulier pour les efforts et sacrifices consentis pour notre formation scientifique.

L'initiation et la familiarisation aux techniques de la culture *in vitro* et du test TAS ELISA ne nous seraient pas possibles sans la spontanéité et la disponibilité de toute l'équipe du laboratoire de génétique, amélioration des plantes et biotechnologies de la faculté des sciences de l'Université de Kisangani. Nous pensons à, Ir. Junior Lokana Dhed'a, Sabine Yasenge, Modeste Feno, et Mr. Andre Tshitenge pour leur bonne humeur qui a contribué à la bonne ambiance dans le laboratoire.

Nous tenons à remercier du fond de cœur certains amis pour leurs encouragements et soutiens tant matériels, spirituel que moral durant notre parcours estudiantine en particulier, Gael Hamuli, Narcisse Kakisingi, Berce Nsanfuansa, Grace Labama et tous ceux dont les noms si jalousement sont gardés dans notre cœur n'ont pas pu trouver place dans ce modeste répertoire d'âme noble, nous adressons nos gratitudeles les plus sincères.

Nous ne saurons terminer sans remercier les collègues d'auditoire Gabriel Akwakwa, Trésor Onautshu, Martin Asumani, Alain Okito, Mireille Kilima, Bibiche Mufungizi, Mimi Losase, Stéphane Tshomba, Yatuka Gbani, Gabriel Angbanga pour les moments inoubliables d'amitiés, les sacrifices et peines partagés ensembles pendant ces années de dur labeur.

RESUME

La culture *in vitro* de méristème est d'après plusieurs chercheurs considérée comme un moyen d'assainir les plants virosés. Le présent travail d'essais d'assainissement de bananiers par la culture *in vitro* a porté sur trois cultivars de bananier: Bluggoe (*Musa* ABB), Prata (*Musa* AAB), Yangambi Km5 (*Musa* AAA) infectés par Banana Bunchy Top Virus (BBTV).

Avant la culture *in vitro*, le test immuno enzymologique TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich Enzym-Linked Immuno Sorbant Assay) a révélé que la totalité des plants de bananier présentant les niveaux 4 et 5 de symptôme de Banana Bunchy Top Disease (BBTD) étaient positifs au test.

La mise en culture et les trois subcultures successives des méristèmes ont donné un nombre moyen de bourgeons par tube allant de 1,8 à 25,7 bourgeons pour le Bluggoe, 1,5 à 26,8 bourgeons pour Prata et 1,7 à 28,5 bourgeons par tube pour Yangambi Km5. Ces résultats prouvent que la culture *in vitro* permet d'obtenir un grand nombre de plants à un temps réduit.

Après la culture *in vitro*, les plantules de bananiers issus de cette culture sont assainies à un pourcentage de 65,22% pour le cultivar Yangambi Km5 suivi de Bluggoe avec 71,4% et de Prata avec 72,72%. La culture *in vitro* reste donc une technique appropriée pour l'assainissement de bananier virosé et peut permettre l'obtention d'un grand nombre de bananier sans virus.

SUMMARY

The *in vitro* culture of meristeme according to several researchers is regarded as a means of cleansing the seedlings virus diseases. This work of tests of cleansing of banana trees by *in vitro* culture concerned three cultivars of banana tree: Bluggoe (*Musa* ABB), Prata (*Musa* AAB), Yangambi Km5 (*Musa* AAA) infected by Banana Bunchy Top Virus (BBTV).

Before *in vitro* culture, the test immuno enzymologic TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich Enzym-Linked Immuno Sorbing Assay) revealed that the totality of the seedlings of banana tree having levels 4 and 5 of symptom of Banana Bunchy Top Disease (BBTD) were positive with the test.

The setting in culture and three successive subcultures of the meristemes gave a median number of moves by going tube from 1.8 to 25.7 buds for Bluggoe, 1.5 to 26.8 buds for Prata and 1.7 to 28.5 buds per tube for Yangambi Km5. These results prove that *in vitro* culture makes it possible to obtain a large number of seedlings at a reduced time.

After *in vitro* culture, the seedlings of banana trees resulting from this culture are cleansed with a percentage of 65.22% for the cultivar Yangambi Km5 followed by Bluggoe with 71.4% and Prata with 72.72%. The *in vitro* culture thus remains a suitable technique for the cleansing of banana tree virus disease and can allow obtaining a large number of banana trees without virus.

0. INTRODUCTION

0.1. Problématique

Le bananier cultivé (banane et plantains) constitue une source alimentaire pour des millions des personnes dans le monde. Sa culture s'étend sur plus de 120 pays des régions tropicales et subtropicales à travers les cinq continents (Jenny *et al.*, 2002) et constitue non seulement un aliment de base pour plus de 400 millions des personnes dans les pays en développement de l'Amérique du Sud, de Sud-est Asiatique et de l'Afrique, mais aussi une véritable source de revenus (Teycheney *et al.*, 2007).

La production mondiale s'élève à 74 millions de tonnes par an. Environ 25 millions de tonnes (soit 34 % de production mondiale), principalement les bananes plantains sont produits en Afrique (Swennen et Vuylsteke, 2001). Sa culture prédomine sur les basses terres des tropiques humides en République Démocratique du Congo, au Congo Brazzaville, Gabon, au Cameroun, au Nigéria, au Ghana, en Côte d'Ivoire, en Guinée et au Liberia. Plus de 90% des bananes produites en Afrique sont consommées localement (Swennen et Vuylsteke, 2001).

En République Démocratique du Congo (R.D.C) ; la banane plantain constitue une nourriture de base pour la population du Nord-est et du centre du pays. Près de 70% de la production bananière s'y consomment directement par les producteurs locaux, ruraux, 30% restant représente la partie commerciale et l'ensemble de pertes enregistrés dans des conditionnements des produits après sa récolte. (Bakelena et Muyungu, 1996).

Cependant, des lourdes menaces parasitaires pèsent actuellement sur la production de cette culture. Parmi ces menaces, les maladies fongiques, les maladies bactériennes, les nématodes, les maladies virales et les insectes sont signalés dans les zones de culture de la banane (Baudouin *et al.*, 2002) et ont un impact considérable sur la production. A cet effet, il est signalé que les maladies virales occupent la première place dans la chute drastique des rendements de la culture du bananier.

Les maladies virales sont l'une des causes primordiales de la perte de la production de cette culture. Il s'agit des infections généralisées de la plante entière (racines, tige, et feuilles) excepté les méristèmes, incurable aux champs et dont le seul traitement possible à ce niveau serait l'élimination de tous les pieds infectés. L'une des infections virales la plus dévastatrice est le Banana Bunchy Top Virus (BBTV) qui continue son expansion dans le

monde. Cette maladie est causée par le virus de Bunchy Top du bananier (BBTV) qui est la maladie la plus importante et la plus dévastatrice dans de nombreux pays tropicaux. Dans de nombreuses zones, la production et la superficie des bananiers sont réduites de 90-95% (Caruana, 2003).

En R.D.C, la maladie Banana Bunchy Top Disease (BBTD) a été observée pour la première fois à Yangambi (Province Orientale) en 1958. Le BBTD vient d'apparaître dans la Province de Bas Congo et devient de plus en plus sévère. Ainsi, sous financement de Biodiversity International (Ex INIBAP), une enquête a été réalisée en Mars et Avril 2007 pour identifier et déterminer l'incidence de la maladie dans cette province.

Pour répondre à cette préoccupation, l'assainissement par culture *in vitro* de tissus des méristèmes est considéré d'après de nombreuses recherches scientifiques, comme étant l'un des grands moyens qui s'impose à la fois pour éradiquer la pression parasitaire en rendant les plantes plus résistantes, mais aussi pour répondre aux besoins des producteurs et des consommateurs.

La multiplication *in vitro* est basée sur l'isolement de l'explant, la maintenance de la culture dans des conditions contrôlées et le maintien de l'asepsie. Ce mode de culture concernant la culture des tissus, d'organes et des cellules offre plusieurs avantages. Elle permet d'envisager l'extension d'un très grand nombre d'espèce soit 20 000 plants à partir d'un explant par an, ce qui est difficile pour en avoir par le rejetonnage naturel qui donne 8 à 10 plants par an. Elle est aussi associée à la lutte phytosanitaire contre les bactéries, les champignons parasites, les nématodes et les charançons. L'assainissement du matériel virosé est possible par la culture *in vitro* de méristème et son association avec la thermothérapie (Panis *et al.*, 1992).

0.2. Hypothèses

Sachant que les maladies virales (Banana Bunchy Top Disease) sont des infections généralisées de la plante (racines, tige, et feuilles) excepté le méristème apical, nous pensons que:

- l'observation direct nous permettra d'identifier les pieds de bananier malades et d'en déterminer le niveau de sévérité de la maladie grâce l'échelle de contamination de BBTD qui est de 1 à 5;

- le test ELISA permettra de confirmer la présence du virus responsable de la maladie;
- la culture *in vitro* de méristème apical des bananiers infectés par BBTV permettra d'obtenir des plants de bananiers sains et à un taux relativement élevé.

0.3. Objectifs du travail

➤ Objectif général

L'objectif général de ce travail est de contribuer à la recherche des biotechnologies de multiplication en masse de plants sains des bananiers pour BBTD.

➤ Objectifs spécifiques

De manière spécifique, cette étude vise à :

- Identifier les plants de bananier atteints par la maladie du Banana Bunchy Top de niveaux 4 et 5 selon l'échelle de sévérité de la maladie (1 à 5).
- Confirmer la présence de BBTV comme étant agent responsable de la pathologie grâce au test de TAS-ELISA.
- Procéder à l'assainissement par la culture *in vitro* des plants reconnue positif et se rassurer de la séro négativité des plantules obtenues après micro propagation par le test TAS-ELISA.

0.4. Intérêt du travail

L'intérêt de ce travail réside dans le fait que la mise au point des techniques de multiplication en masse des plants sains va contribuer à l'amélioration de la production de bananier en quantité et en qualité permettant ainsi d'améliorer la sécurité alimentaire.

0.5. Subdivision du travail

Ce mémoire est reparti en trois chapitres hormis l'introduction et la conclusion. Le premier chapitre donne des considérations générales sur le bananier et sur la maladie du Banana Bunchy Top Virus ; le deuxième concerne le matériel et méthodes utilisés au cours de ce travail ; et enfin le troisième porte sur les résultats et discussion de ces derniers.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE BANANIER ET LA MALADIE DU BANANA BUNCHY TOP VIRUS

1.1. Le bananier

1.1.1. Origine

Le bananier est originaire des jungles tropicales chaudes et humides du Sud-est asiatique. Dans cette région du monde, on trouve les espèces sauvage *Musa acuminata* (génomme de type A) et *Musa balbisiana* (génomme de type B) (Swennen et Vuylsteke, 2001). A partir de cette région, les bananier se sont rependus à l'Est en Amérique du Sud mais surtout à l'Ouest à Madagascar/Zanzibar à travers les migrations indo-malaysiennes. Les bananier ont aussi été rependus par les Arabes et les Portugais le long de la côte Est de l'Afrique d'où ils ont traversé les pays de l'Afrique central jusqu'en Afrique de l'Ouest (Dhed'a *et al.*, 2011).

Quant à son histoire, les plus anciennes références au bananier datent de 500 ans avant Jésus-Christ. Une légende indienne affirme que la banane est le fruit qu'Eve a tendu à Adam. Cela explique son appellation de «fruit paradis». Par ailleurs, cette croyance est à l'origine du nom «*Paradisiaca*» donné à la banane plantain (Haicou *ret al.*, 1998).

Selon Lassoudière (2010), Linné a peut-être attribué à la banane le nom de *Musa* en l'honneur d'Antonius Musa (63-14 ans av. J.-C.), médecin de l'empereur romain Octave-Auguste qu'il avait guéri d'une «obstruction du foie». Deux autres origines sont aussi évoquées, l'une à partir du prophète Musa (environ 1200 ans av. J.-C.), né en Egypte et ayant suivi l'exode du peuple d'Israël de la Palestine; l'autre à partir du nom de la grande ville commerciale d'Arabie méridionale, Muza, au centre des relations Egypte-Arabie-Inde correspondant à la cité actuelle de Moka (Lassoudière, 2010).

La reconstitution historique du processus de domestication de la banane a été clarifiée par une recherche pluridisciplinaire originale. Les analyses génétiques ont permis d'identifier les ancêtres sauvages et les cultivars modernes, mais aussi d'élucider plusieurs étapes clés de la domestication du bananier. L'archéologie et la linguistique ont apporté la lumière sur les rôles historiques des peuples dans le mouvement et la culture de bananes en provenance de la Nouvelle-Guinée jusqu'en Afrique de l'Ouest au cours de l'Holocène (Perrier *et al.*,

2011). L'existence de nombreux cultivars de bananiers d'altitude en Afrique de l'Est et de plantains laisse supposer qu'ils sont cultivés depuis très longtemps en Afrique (Nyabyenda, 2006).

1.1.2. Description et classification

Le bananier est une plante herbacée vivace. Elle est herbacée car elle ne comporte pas de croissance secondaire, c'est à dire après que les fruits sont parvenus à maturité, les parties aériennes fanent et s'affaissent. Elle est vivace parce que de nouveaux plants émis à la base du plant mature viennent remplacer les parties aériennes qui meurent. En effet, le bananier est dans son état d'équilibre à partir de la formation des bourgeons latéraux assurant la pérennité de la plante (Dhed'a *et al.*, 2011).

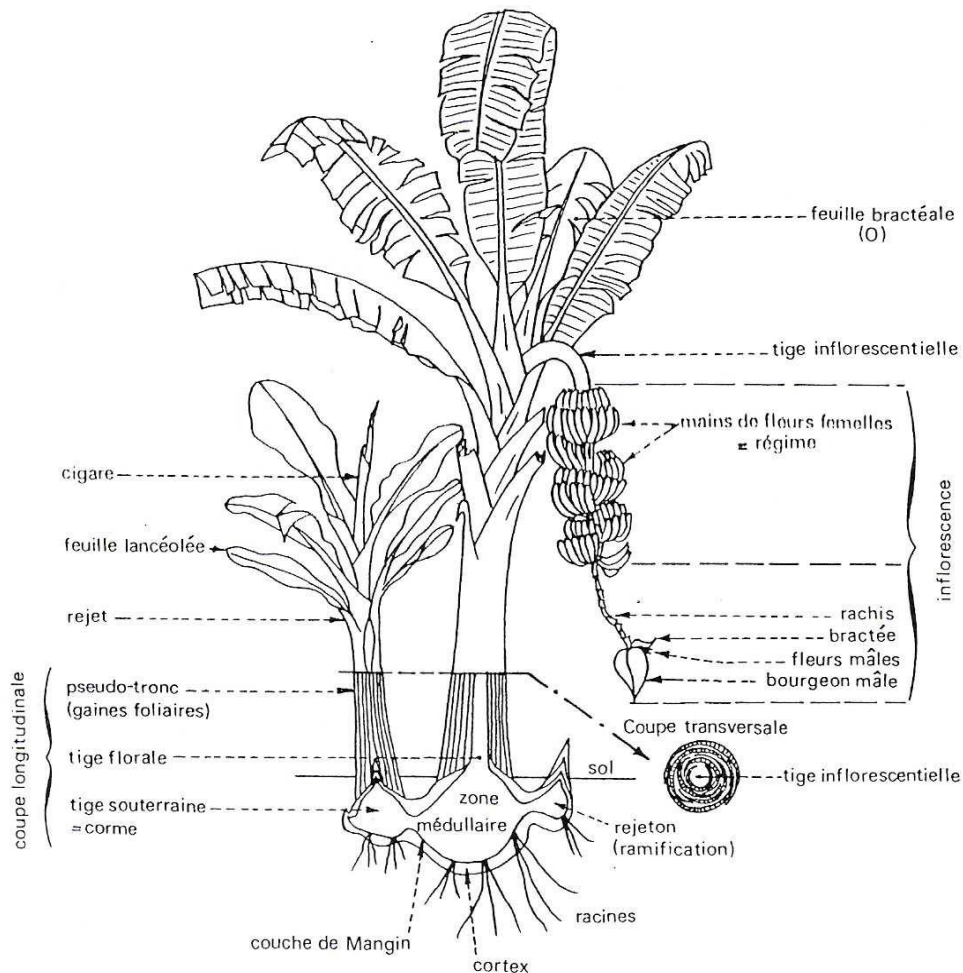


Figure 1: Description du bananier (CHAMPION, 1963).

A maturité, le plant de bananier ou pied-mère se compose:

- d'une souche ou bulbe portant des racines et émettant des rejets,
- des feuilles dont les gaines, enroulées les unes dans les autres forment le faux tronc (pseudotrunc),
- et d'un régime de fruits.

Les bananiers et bananiers plantains sont des monocotylédones géantes appartenant à l'ordre des Scitaminales ou Zingibérales et à la famille *Musaceae*. Cette famille comporte trois genres: *Musella*, *Ensete* et *Musa* présentant une forte variabilité (Lassoudière 2007).

L'ordre de Scitaminales renferme 6 familles (Dhed'a *et al.*, 2011):

- Famille des *Strelitziaceae* avec les genres *Strelitzia*, *Heliconia* et *Ravenala*,
- Famille des *Lowiaceae* avec le genre *Orchidantha*,
- Famille des *Zingiberaceae* avec les genres *Zingiber* et *Hedichium*,
- Famille des *Maranthaceae* avec le genre *Marantha*,
- Famille des *Cannaceae* avec le genre *Canna*,
- Famille de *Musaceae* avec les genres *Musa* et *Ensete*.

La majorité des bananes comestibles proviennent des espèces *Musa acuminata* et du croisement *M. acuminata* x *M. balbisiana*. Par ailleurs, il existe différentes espèces du genre *Musa*: *Musa flaviflora*, *Musa itinerans*, *Musa basjoo*, *Musa sikkimensis*, *Musa cheesmani*, *Musa schizocarpa*, *Musa balbisiana*, et *Musa acuminata* qui contient au moins 5 sous-espèces (Dhed'a *et al.*, 2011).

1.1.3. Distribution et diversité génétique

Le genre *Musa* compte plus de 1000 variétés de bananes parmi lesquelles les cultivars les plus importants sont les bananes de type dessert (AAA pour la plupart) et les bananes à cuire (AAA, AAB et ABB). Les variétés AA sont majoritairement rencontrées en Asie du Sud-est. Quelques variétés AB ont été répertoriées en Afrique de l'Est et en Inde. Les variétés triploïdes AAA (bananes dessert et à cuire), AAB (plantains et bananes à cuire) et ABB (bananes à cuire) sont largement distribuées dans le monde, notamment en Amérique latine et centrale, aux Caraïbes, en Asie du Sud et du Sud-est et en Afrique (Joncs, 2000 ; Lassoudière, 2007).

Dans le District de la Tshopo, le Faux corne Libanga likale est le plus représentatif de tous les cultivars dans les fermes (70,41%), suivi du French Litete (7,75%) et du Vrai corne Lokusu (2,1%). Pour les bananes dessert, le cultivar Gros Michel est le plus représentatif (3,65%), suivi de Yangambi Km5 (3,55%). Les autres cultivars représentent chacun moins de 2% (Dhed'a *et al.*, 2009).

La variabilité génétique du bananier a fait l'objet de plusieurs études au cours desquelles les marqueurs moléculaires tels que les polymorphismes de longueur de séquences simples répétées (SSRLP) (Tenkouano *et al.*, 1999), les polymorphismes de longueur des fragments d'amplification (AFLP) (Ude *et al.*, 2002a; Ude *et al.*, 2002b) ainsi que les polymorphismes de longueur de fragments de restriction (RFLP) (Ude *et al.*, 2002a). Ces études ont montré une grande diversité entre les sections du genre *Musa* et entre les différentes variétés d'une même section. Elles ont également permis de mettre en évidence quelques variétés pouvant être considérées comme des sources potentielles exploitables dans l'amélioration génétique du bananier en vue d'une meilleure production (Ude *et al.*, 2002a).

Plus récemment, le génome de 523 mégabases du génotype double haploïde de *Musa acuminata* a été décrit. La séquence désormais disponible permet d'accéder à l'ensemble des gènes de cette plante (plus de 36.000) et à leur position le long de ses onze chromosomes. Cette connaissance facilitera considérablement l'identification des gènes responsables de caractères tels que la résistance aux maladies et la qualité des fruits. Elle fournira au final une aide essentielle à l'amélioration des variétés de bananiers à partir des nombreuses ressources génétiques disponibles dans le monde (D'Hont *et al.*, 2012).

De nouvelles variétés de bananiers, notamment de bananes à cuire, ont été créées pour faire face à la pression parasitaire et pour satisfaire la demande des consommateurs. Cependant, des progrès restent à faire sur les qualités culinaires et gustatives en comparaison avec les variétés traditionnelles. Le besoin en nouvelles variétés concerne aussi bien la banane dessert que la banane à cuire, qu'elles soient destinées à l'exportation, à l'autoconsommation ou aux marchés nationaux (Abadie *et al.*, 2003 ; Lassoudière, 2007).

1.1.4. Importance socio-économique de bananier

Les bananes et bananes plantains font partie des principaux aliments de base dans les pays producteurs et constituent une source considérable d'emploi et de revenus à travers les marchés locaux et internationaux (Frison et Sharrock, 1999). Le bananier constitue le quatrième produit agricole en termes de production mondiale après le riz, le blé et le maïs. Il occupe le premier rang de la production fruitière, avec un peu plus de 145 millions de tonnes produites en 2011 à l'échelle mondiale (Ganry *et al.*, 2012).

Tableau 1. Répartition mondiale de la production bananière en 2011 (FAOSTAT, 2012).

Continent	Pays	Banane	Banane plantain
Afrique	Cameroun	1.376.000	3.400.000
	RCA	162.799	109.265
	Côte d'Ivoire	317.727	1.559.210
	RDC	408.900	1.552.060
	Ghana	60.000	3.619.830
	Kenya	1.197.990	31.000
	Rwanda	44	3.036.270
	Uganda	522.945	10.547.400
	Angola	2.646.070	-
	Burundi	1.848.730	-
Amérique	Costa Rica	1.937.120	90.000
	Guadeloupe	58.00	7.620
	Guatemala	2.680.390	188.755
	Panama	340.342	97.432
	Peru	-	1.967.920
	Venezuela	415.693	488.878
	Brésil	7.329.470	-
Asie	Chine	10.705.740	-
	Inde	29.667.000	-
	Thaïlande	2.036.430	-
	Viet Nam	1.523.430	-
	Philippines	9.165.040	-
Europe	Italie	351	-
	Portugal	30.181	-
	Espagne	346.500	-
	Turquie	206.501	-

La valeur culturelle des bananes est considérable dans plusieurs régions. Dans la légende hindoue en Inde, la banane était considérée comme le fruit interdit du jardin d'Eden. Elle est le symbole de la fertilité et de la prospérité dans des nombreuses communautés d'Asie du sud, et est fréquemment exposée dans les cérémonies nuptiales (Frison et Sharrock, 1999 ; Kagy, 1999).

1.1.5. Valeurs nutritionnelles

Le bananier est avant tout une plante alimentaire cultivée pour ses fruits consommables frais (bananes desserts) ou cuits (plantains) qui constituent un aliment riche et relativement complet. Il a été suggéré que l'homme peut tout à fait bien vivre avec une alimentation de bananes et du lait. En outre, la banane est aisément digestible et constitue souvent la première nourriture solide donnée aux enfants dans les tropiques (Schoofs, 1997).

Les bananes et bananes plantains sont une source riche en sucre : 22% de la portion comestible dans la banane dessert et 31% dans le plantain. Ils sont riches en minéraux comme le potassium, calcium et phosphore, vitamine C (banane) et vitamine A (plantain). De tous les fruits connus, la banane contient le plus de protéines. Elle contient en plus du magnésium, du sodium, du sélénium. Elle ne contient pas de chlorure de sodium, c'est pourquoi on la trouve dans tous les régimes sans sel (Krishnamoorthy, 2002). En outre, elle ne contient pas de cholestérol.

Le tableau 1.2 ci-dessous donne les valeurs nutritionnelles de bananes et banana plantains pour 100 grammes.

Tableau 2. Valeurs nutritionnelles des bananes et bananes plantains pour 100 g (Sharrock et Lusty, 2000).

Substance	Banane	Banane Plantain
Eau (g)	74.26	65.28
Energie alimentaire (g)	92	122
Protéines (g)	1.03	1.3
Graisse (g)	0.48	0.37
Hydrate de carbone (g)	23.43	31.89
Calcium (mg)	6	3
Fer (mg)	0.31	0.6
Potassium (mg)	396	499
Sodium (mg)	10	4
Vitamine C (mg)	9.1	18.4
Thiamine (mg)	0.045	0.052
Riboflavine (mg)	0.1	0.054
Niacine (mg)	0.54	0.686
Vitamine A (UI)	81	1127
Acides gras saturés (g)	0.185	0.143
Acides gras monoinsaturés (g)	0.041	0.032
Acides gras polyinsaturés (g)	0.089	0.069

1.1.6. Ecologie et besoins nutritionnels

Le bananier est une plante tropicale héliophile. La température moyenne pour son bon développement doit se situer entre 25 et 30°C. Une température plus élevée produit des brûlures au feuillage. Le bananier ne supporte pas le froid à l'exception de quelques variétés (bananier de Canaries) pour lesquels une température de 12°C n'est pas fatale mais constitue la limite inférieure (Vandenput, 1981). Pour une croissance des racines, la température optimale nocturne et journalière du sol doit être respectivement de 26 et 33 °C. Par contre, en culture hydroponique, la croissance et le développement des plants des bananiers sont meilleurs dans la solution de 20 à 30 °C (Swennen *et al.*, 1987).

Le bananier supporte des fortes insulations si l'approvisionnement hydrique est suffisant. La nébulosité ralentit la végétation et augmente la taille des rejets. Le manque de lumière agit donc sur la hauteur des plants et peut faire «filer» les rejets (Lassoudière, 2007).

Le bananier préfère des conditions neutres à modérément acides, cependant il peut se développer dans une gamme de pH assez large, de 4,5 à 8,5 (Delvaux, 1995). Un sol léger, profond et peu caillouteux de type sablo-limoneux ou argilo-limoneux convient parfaitement à sa croissance (Tezenas Du Montcel, 1985).

En milieu tropical, le bananier se développe sur des sols profonds, bien drainés, avec une teneur en matière organique élevée (Swennen et Vuylsteke 2001). La richesse du sol en humus est aussi un facteur déterminant dans la production bananière. C'est pourquoi les sols forestiers lui conviennent le plus (Lassoudière, 2012).

1.1.7. Bananier en RDC et dans la région de Kisangani

En République Démocratique du Congo, le bananier et le bananier plantain, comparativement à d'autres cultures occupent la deuxième place dans la production nationale après le manioc selon les statistiques nationales avec une production annuelle de 1.960.960 tonnes en 2011 (FAOSTAT, 2012), les bananiers et les bananiers plantains en particulier représentent les cultures alimentaires parmi les plus importantes en RDC. Dans la région de Kisangani, en région forestière Nord-est de la cuvette centrale congolaise, les bananiers plantains constituent aussi la deuxième culture après le manioc et jouent de ce fait un rôle très important dans la sécurité alimentaire et le revenu de la population (Dhed'a *et al.*, 2009). La Province orientale est la première en termes de production avec environ 31,1%, malheureusement, toute sa production est consommée localement.

1.1.8. Principaux problème phytosanitaire du bananier

Les principales maladies qui handicapent la production de la culture du bananier sont :

1.1.8.1. Les maladies d'origine virale

- Banana Bunchy Top Virus (BBTV);
- Banana Streak Virus (BSV) ;
- Cucumber Mosaique Virus (CMV) ;

Cependant le Banana Bunchy Top Disease est considéré comme la plus importante maladie causée par un rétrovirus transmis par un aphide (*Pentalonia nigronervosa*) (Raemaekers, 2001).

1.1.8.2. Les maladies fongiques

- La cercosporiose ;
- Les raies (Sigatoka noir) : causée par *Mycosphaerella finjiensis* et Sigatoka jaune : *Mycosphaerella musicola* ;
- Fusarium (Maladie de Panama) : causée par *Fusarium oxysporum*, *F. cubense* (Raemaekers, 2001).

1.1.8.3. Les maladies bactériennes

Parmi les maladies bactériennes les plus importantes sont :

- La maladie de Moko causée par *Pseudomonas solanacearum* ;
- le flétrissement bactérien (BXW) causée par *Xanthomonas campestris* est la maladie la plus dévastatrice récemment découverte à l'Est de l'Afrique (Uganda, Rwanda, Burundi, Kenya, Tanzanie) (Raemaekers, 2001).

1.1.8.4. Les ravageurs

Les ravageurs les plus importants du bananier sont les charançons noir *Cosmopolites sordidus* et les Nématodes *Radopholus similis* (Gold, 2000). La charançon du bananier creuse dans les tissus du bulbe des petites cavités et y dépose ses œufs. A peine éclos, la larve s'enfonce dans le rhizome et y progressent en creusant des galeries plus ou moins circulaires. Les plants attaqués montrent un flétrissement généralisé de l'appareil végétatif (Sebagenza, 1986).

1.2. La maladie de Banana Bunchy Top Disease (BBTD)

1.2.1. Historique et distribution géographique

Le BBTV a été décrit pour la première fois aux Iles Fidji en 1889-1890, il aurait été introduit vers 1886 par l'importation des rejets en provenance de Tanna (nouvelles hybrides). Le commerce basé sur les échanges des rejets a joué un rôle primordial dans la dissémination du virus tout d'abord aux Iles avoisinantes, provoquant l'abandon de la culture Cavendish, cultivars trop sensible au BBTV, puis en 1923 vers Ceylan, Australie et l'Inde.

L'entrée en Afrique serait plus tardive vers 1958, en RDC toujours par l'introduction des rejets contaminés offerts en cadeau. La propagation vers les autres pays a suivi la logique d'échange des rejets. Aujourd'hui encore le dernier pays à être contaminé en 2000 ; la nouvelle Calédonie, l'a été par l'introduction des rejets en provenance de l'île Wallis (Caruana, 2003).

La maladie (BBTD) est très répandue en Asie du Sud-est, les Philippines, Taiwan, la plus part des îles du Pacifique du Sud et certaines parties de l'Inde et l'Afrique (Hill, 1983). En Afrique la maladie reste confinée dans certaines régions du Gabon, du Congo Brazzaville, de la R.D.C, du Burundi, du Rwanda, et de l'Égypte (Swennen et Vulysteke, 2001).

1.2.2. Description

La maladie du Bunchy Top de bananier (BBTD) est l'une des graves maladies car la plante contaminée ne produit pas des fruits. Elle est causée par au moins un virus contenant de l'ADN simple brin. Il semble aussi qu'un virus ARN double brin de type lutéovirus soit également impliqué. Le virus n'est pas transmissible mécaniquement. Son vecteur est le puceron *Pentalonia nigronervosa*. Il s'attaque à tous les types de bananier (Mirkoet *al.*, 1997).

Le symptôme typique de la maladie de Bunchy Top de bananier est très précis, clairement identifiable de ceux causés par les autres virus des bananiers et a été décrit en détails par Magee (1936). Les plants peuvent être infectés à tous les stades de croissance, et il existe quelques différences initiales entre les symptômes développés par un plant infecté par puceron et ceux d'un plant issu de matériel infecté.

Sur les plants infectés par pucerons, les symptômes apparaissent habituellement sur la seconde feuille émergente après l'inoculation et consistent à quelques tirets ou pointillés vert-foncés sur les nervures secondaires de la partie inférieure du limbe. Les stries forment des crosses dès qu'elles entrent en contact avec la nervure principale et sont plus faciles à distinguer en observant la feuille en contrejour. Le symptôme « *pointillé* » peut également être observé sur le pétiole. Les feuilles suivantes peuvent manifester des traits blanchâtres le long des nervures secondaires lorsqu'elles sont encore enroulées. Ces traits deviennent vert foncé lorsque la feuille se déploie.

Les feuilles suivantes sont plus petites en longueur et largeur de limbe, et souvent ont des bordures chlorotiques et enroulées. Elles deviennent cassantes et dures et ont une tenue plus érigée que la normale donnant au plant un aspect de touffe à l'extrémité « bunchy top » en forme de rosette, avec un nanisme prononcé. Sur les plants infectés très tardivement dans le cycle de culture, le seul symptôme présent peut être quelques stries vert-foncé à l'extrémité de la bractée florale (Thomas *et al.*, 1999).

Les rejets d'une souche infectée montrent des sévères symptômes sur la première feuille émise et ont un nanisme important. Les feuilles sont en forme de rosette, petites avec des chloroses marginales qui tendent à devenir nécrotiques.

Les stries vert-foncées sont habituellement évidentes sur les feuilles (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Les stries peuvent aussi évoluer et devenir importantes au niveau du pseudo tronc.

1.2.3. Epidémiologie

Le BBTD est disséminé par deux modes : les pucerons et les matériels de plantations infectées. Le puceron *Pentalonia nigronervosa* est la seule espèce et même le seul puceron vecteur de BBTD. L'acquisition de virus par le puceron est d'au moins quelques heures sur la plante infectée (Ngama, 2010). Cette période est suivie d'une période de latence, durant laquelle le virus circule à travers le corps du puceron jusqu'aux glandes salivaires. Durant cette période le puceron est infecté ; mais incapable de transmettre le virus. Elle dure plusieurs heures à un jour. Le puceron devient ensuite infectieux, capable de transmettre le virus pour le reste de sa vie (jusqu'à six semaines). Le puceron de la forme ailée seul peut disséminer le virus en migrant de plante infectée vers une nouvelle plante (Allen, 1987).

Lorsqu'une souche est infectée, tous les rejets et le plant mère seront infectés même si l'infection n'est pas initialement présentée dans toutes les parties de la souche (Hafner, 1995).

1.2.4. Impact économique de la maladie

L'impact sur le rendement est dépendant de la date d'infection. Les plants infectés où les symptômes se manifestent en début de cycle de culture ne produisent pas de régime, tandis que les plants infectés où les symptômes se manifestent tardivement ont une production réduite. Par la suite tous les plants ne produiront aucune récolte (Caruana, 2003).

1.2.5. Lutte contre le BBTD

1.2.5.1. Lutte prophylactique

On doit éviter tout déplacement de matériel contaminé d'une zone infectée vers une zone saine. Tout plant visiblement infecté doit être détruit. On doit éviter les tailles drastiques et les excès d'engrais riches en azote qui favorisent la prolifération des pousses tendres et succulentes et choisir des engrais en libération lente et à teneur modérée en azote. On peut aussi intercaler quelques plantes pièges dans le champ pour attirer et capturer les pucerons ou planter les végétaux contenant les huiles répulsives (ail, citronnelle) aux pieds des bananier (Völket *al.*, 1990).

1.2.5.2. Lutte chimique

Le meilleur moyen de tuer les pucerons est de les empoisonner par leur mode d'alimentation (Hill, 1983). Les pulvérisations foliaires à base de chloropyrifos et acephate ont été efficaces dans la réduction des populations de pucerons. L'application de ces produits se fait avant la récolte (Hata *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'utilisation de pré-lavage dans un détergent doux est aussi appliqué à l'ouverture des bractées dans les cultures de bananier sous serre suivie d'un trempage pendant 5 minutes dans un savon insecticide pyrethroïde (Hansen, 1992).

1.2.5.3. Lutte culturale

Cette lutte consiste à arracher, détruire et remplacer régulièrement les plantes atteintes. L'immersion de fleurs et de feuillage à l'eau chaude à 49°C pendant 10 minutes tue les pucerons (Hansen *et al.*, 1992).

1.2.5.4. Lutte biologique

La lutte consiste à réaliser un lâcher inondation d'insectes parasitoïdes qui vont pondre des œufs dans une colonie de pucerons ou à proximité. Ces œufs vont se développer au dépens du puceron et les tuer (Valerie *et al.*, 2000). Padmalatha *et al.*, (1998) ont révélé le potentiel prédateur des *Coccinellidae aphidophagus* sur *Pentalonia nigronervosa* alors que Waterhouse (1987) proposait l'utilisation de *Lysiphlebius testaceipes*, un des redoutables

parasites de cet aphide de bananier. Par ailleurs, l'utilisation d'*Ephedrus cerasicola* semble être aussi prometteuse (Stary *et al.*, 1990).

1.2.5.5. Protection intégrée en culture des bananiers

La protection intégrée en culture des bananiers est la combinaison optimum de toutes les méthodes de la lutte dans l'objectif de sécuriser et optimiser la protection des bananier et de limiter l'impact d'usage des pesticides sur l'environnement et les hommes (Regnaut R. *et al.*, 2005).

1.2.6. L'organisme nuisible

1.2.6.1. Identification biologique

L'agent pathogène du BBTD est un virus appelé Banana Bunchy Top (BBTV) ou Virus du Bunchy Top de Bananiers. Il appartient à la famille de Nanoviridées et au genre Babuvirus.

Selon Harding (1991), les observations microscopiques du virus du Bunchy Top du bananier montrent des particules virales isométriques de 18 à 20 nm de diamètre et un génome composé d'au moins 6 molécules monocaténares d'ADN simple brin d'environ 1Kb faisant de ce virus l'un des plus petits. Sur base de l'analyse des séquences génomiques, deux groupes géographiques ont été décrits. Le groupe pacifique sud regroupant l'Australie, le Burundi, l'Égypte, Fidji, l'Inde, Tenga et Samoa occidentale se distingue du groupe Asie qui comprend les Philippines, Taiwan et Vietnam (Karan *et al.*, 1994).

1.2.6.2. Description de l'organisme pathogène

Le BBTV, comme tout virus, est un parasite obligatoire et effectue son cycle de multiplication dans la plante hôte qui est le bananier. Il est préférentiellement localisé dans les tissus du phloème où il induit une désorganisation à l'origine du symptôme de traits discontinus vert foncé. Il colonise cette dernière qui est une monocotylédone, progressivement, depuis son point de pénétration. Ainsi tous les rejets issus du pied principal ou pied mère sont infestés (Caruana., 2003).

1.2.7. Dissémination et dispersion du BBTV dans la plante et dans la plantation

Les rejets produits à partir d'une souche infectée en général développent des symptômes avant d'atteindre leur maturité. Le BBTV est limité aux tissus du phloème des plants infectés. Les cellules entourant les phloèmes contiennent un nombre normal de chloroplaste donnant lieu aux macroscopiques symptômes de stries vert-foncé. Il se réplique durant une courte période au point d'inoculation des pucerons, il descend ensuite dans le pseudo tronc vers le méristème basal, et finalement vers le bulbe, les racines et les feuilles nouvellement formées (Ngama, 2010).

Le Plant De Bananier Nouvellement infecté ne devient réservoir qu'à partir du moment où une nouvelle feuille présentant les symptômes est émise. Cela correspond au temps du virus dans la plante (Hafner *et al.*, 1995).

La dissémination sur une longue distance est faite par l'homme qui utilise des rejets provenant de plantations infectées. La dissémination sur une courte distance à partir de foyers d'infection est faite par les pucerons (Ngama, 2010).

Les études actuelles de suivi d'infection dans les plantations commerciales ont montré que la distance moyenne de démarrage d'un deuxième foyer d'infection dû aux pucerons était seulement de 15,5 à 17,2 mètres à partir de la zone d'origine. Deux à trois nouvelles infections se situent à l'intérieur des 20 premiers mètres à partir de la source le plus proche et 99% sont dans les 86 mètres. La probabilité qu'un puceron vole à plus de 100m est d'environ 0,003 (Allen *et al.*, 1987).

Dans le cas d'une nouvelle plantation adjacente à une plantation infectée, la probabilité de contamination par le BBTV de la nouvelle plantation dans les douze premiers mois est de 88% (Allen *et al.*, 1977).

1.2.8. Période de latence de la maladie

En moyenne, la période de latence de la maladie pour une plante nouvellement infecté ou l'intervalle de temps nécessaire pour être infectieuse, est équivalent au temps mis pour l'émergence de 3,7 nouvelles feuilles. Cela traduit le temps utile avant qu'un puceron ne puisse acquérir le virus à partir de cette plante et initier de nouvelles infections ailleurs. Des inspections à des rythmes correspondant au temps mis pour la production de 4

nouvelles feuilles maximiseront les chances de trouver de nouvelles infections et de les éradiquer avant que la transmission ne soit effectuée (Allen *et al.*, 1987).

1.2.9. Répartition mondiale du BBTV

Le tableau 1.3. Ci-dessous établi par Canuara en 2003 donne la répartition mondiale de BBTV.

Tableau 3. Répartition mondiale du BBTV

AFRIQUE	ASIE	OCEANIE
Burundi	Bangladesh	Australie
République Centre Afrique	Chine	Fiji
Congo	Hong Kong	Guam
Egypte	Indonésie	Kiribati
Gabon	Inde	Iles wallis
Malawi	sri	Nouvelle Calédonie
Rwanda	Japon (Ogasewere)	Tonga
R.D.Congo	Kampuchéa	Tuvalu
	Laos	American samsa
	Malaisie	Hawaï
	Myanmar	Samoa occidentale
	Pakistan	
	Philippines	
	Taiwan	
	Vietnam	

Source : Caruana, 2003.

1.2.9.1. Distribution en RDC

La distribution de BBTD en RDC est donnée dans la figure 2 ci-dessous.

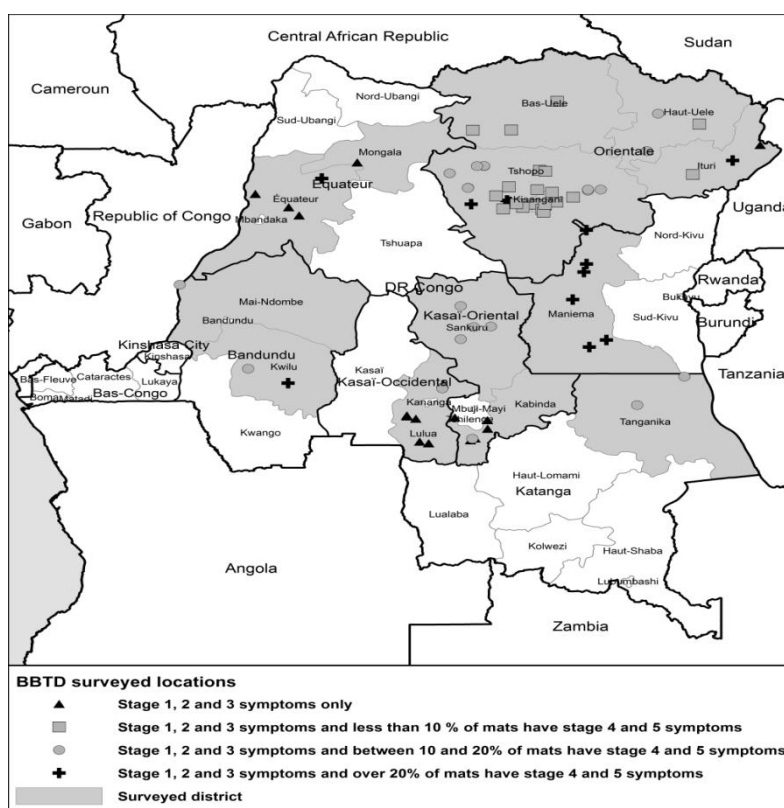


Figure 2 : Carte de la distribution de BBTD dans le bassin du Congo en RDC (Ngama *et al.* Sous presse dans JAAR).

1.2.10. Insecte vecteur de BBTD.

1.2.10.1. Taxinomie et description

Les pucerons font partie de l'ordre des homoptères et de la famille des amphididae. Il existe 4.700 espèces décrites de pucerons dans le monde au sein de 600 genres. *Pentalonia nigronervosa* est la seule espèce d'insecte vecteur du BBTV et même le seul puceron vecteur. La forme ailée de *Pentalonia nigronervosa* mesure entre 1,6 et 1,8 mm. Son abdomen est de couleur brune. Les caractères les plus usuels pour sa reconnaissance sont les antennes légèrement plus longues que le corps et les ailes bordées de veines brunes. Enfin, les cornicules sont relativement longues, cylindriques et légèrement enflées à l'extrémité (Mau *et al.*, 2000).

1.2.10.2. Distribution géographique

Ce puceron *Pentalonia nigronervosa*, probablement originaire du Sud-est asiatique est présent dans la plupart des pays de la zone. Il est aujourd'hui pantropical, puisqu'il est présent sous pratiquement tous les tropiques (Hill, 1983).

1.2.10.3. Biologie du *Pentalonia nigronervosa*

Les pucerons se localisent généralement en colonies situées entre la gaine de la plus récente feuille jusqu'à la nervure centrale. Les alatae ou formes ailées, apparaissent après 7 à 10 générations d'aptères (sans ailes). D'une manière générale, les ailes apparaissent quand les effectifs à l'intérieur des colonies augmentent fortement, ou lorsque la qualité alimentaire du végétale se détériore (vieillesse ou jaunissement). Les ailés migrent jusqu'à 20 m sans l'aide du vent vers de nouvelles plantes. A l'aide du vent, ces distances de l'ordre de plusieurs kilomètres (Volk et al., 1990).

En termes épidémiologiques, seule la forme ailée des pucerons est un vecteur important et même le seul, qui, migrant vers une nouvelle plante, sera responsable d'une nouvelle infection. La forme la plus commune non ailée, sédentaire ne peut jouer le rôle de vecteur entre différents plants. Les fourmis récoltent le miellat que les pucerons produisent en grande quantité. Elles les accompagnent toujours et seraient responsables d'une certaine protection contre les prédateurs et parasites (Caruana., 2003).



Figure 3 : images de la forme aptère de *Pentalonia nigronervosa*



Figure 4 : Images de la forme ailée de *Pentalonia nigronervosa*

Les mâles ne sont pas connus chez cette espèce à reproduction parthénogénétique (sans fécondation) et vivipare (la femelle donnant directement naissance à des petits vivants). Chaque puceron produit en moyenne deux petits par jour. Le cycle de la nymphe à l'adulte

est réalisé entre 9 et 16 jours. L'espérance de vie d'un adulte est de 8 à 26 jours. La reproduction débute un jour après la maturité. Chaque femelle peut produire une progéniture moyenne de 14 petits (Mau *et al.*, 2000). Aux températures de 24 - 28°C, cet insecte se reproduit à raison de 25 à 30 générations par an (Völket *et al.*, 1990).

1.2.10.4. Plantes hôtes

Elles sont principalement le bananier (*Musa spp.*) mais ce puceron peut aussi être hébergé par les *Colocasia* (taro), *Alpinia*, *Heliconia*, *Costus*, *Zingiber*, *Palisota spp.* et la tomate (Hill, 1983). Il n'y a aucune évidence que ces plantes constituent également un réservoir pour le BBTV. Les cultivars Cavendish sont parmi les plus sévèrement affectés. Gros Michel et quelques cultivars de banane à cuire sont plus difficiles à infecter et les épidémies progressent plus lentement, mais tous les cultivars restent sensibles et connaissent des pertes significatives (Caruana, 2003).

1.2.11. Dégâts.

Les dégâts directs dus à son mode d'alimentation (pique et succion) sont peu importants mais c'est en tant que vecteur du BBTV que ce puceron est dangereux. Les pucerons adultes ne transmettent pas le virus à leur descendance. Chaque jeune puceron doit donc se nourrir sur une plante infectée pour acquérir des particules virales (Thomas et Dietzgen, 1991). Ce virus infecte tous les cultivars de bananier. Les cultivars Cavendish sont parmi les plus sévèrement affectés, il retarde leur croissance et occasionne des chutes de la production (Su *et al.*, 2003).

Une durée d'alimentation du puceron d'au moins quelques heures sur une plante infectée est nécessaire pour acquérir efficacement le virus. Cette période est suivie d'une période de latence, durant laquelle le virus circule à travers le corps du puceron jusqu'aux glandes salivaires. Durant cette période, le puceron est infecté mais non capable de transmettre le virus (Ngama, 2010).

Cette période dure de plusieurs heures à un jour. Le puceron devient ensuite infectieux et est capable de transmettre le virus pour le reste de sa vie jusqu'à six semaines (Caruana, 2003).

1.2.12. Situation de BBTV en R.D.Congo

En R.D. Congo, la maladie (BBTD) a été observée pour la première fois à Yangambi (province orientale) en 1958. Le BBTD vient d'apparaître dans la province du Bas Congo et devient de plus en plus sévère. Ainsi, sous financement de Bioversity International (ex. INIBAP) une enquête a été réalisée en mars et avril 2007 pour identifier et déterminer l'incidence de la maladie dans cette province (Ngama, 2010).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude d'essais d'assainissement de bananier infecté par BBTV par la culture *in vitro* était constitué des plants de bananiers appartenant aux cultivars suivants : Bluggoe (*Musa* ABB), Prata (*Musa* AAB) et Yangambi km5 (*Musa* AAA).

2.2. Méthodes

Les échantillons pour ce travail ont été récoltés dans la ville de Kisangani et ses environs. L'échantillonnage pour le TAS-ELISA s'est fait sur les premières feuilles après le cigare des plantes qui ont présenté les symptômes de BBTD d'une sévérité de niveau 4 et 5. Seuls les bulbes des plantes qui ont révélées une séropositivité au BBTV ont été prélevés et mis en culture *in vitro* dans le laboratoire de génétique, amélioration des plantes et biotechnologies de la faculté des sciences de l'Université de Kisangani pour un éventuel assainissement. Les plants de bananier issus de cette culture sont testés par le TAS-ELISA pour s'imprégner de leur état sanitaire.

2.2.1. Observation visuelle des symptômes

Une observation visuelle a permis l'identification des niveaux 4 et 5 de sévérité de BBTD tel que décrit par Ngama, 2010 sur les plants de bananier malade grâce aux symptômes suivants :

- Niveau 0 : sans symptômes,
- Niveau 1 : strie sur les feuilles,
- Niveau 2 : Stries foncées jusqu'au pseudo-tronc,
- Niveau 3 : décoloration de feuilles avec taille normale,
- Niveau 4 : taille réduite de feuilles décolorées,
- Niveau 5 : aspect touffu au sommet « Bunchy Top »

Ce sont ces deux derniers niveaux de la maladie (figure 5 et 6) qui ont fait l'objet de cette étude.



Figure 5 : Taille réduite de feuilles décolorées



Figure 6: Aspect touffu

2.2.2. Test Immuno enzymologique TAS-ELISA

2.2.2.1. Principe

Le test TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwish Enzym-Linked Immuno sorbant Assay) est une méthode Immunochimique qui fait réagir successivement trois anticorps pour détecter un antigène spécifique.

Il comprend les étapes suivantes :

2.2.2.2. Fixation de l'antigène spécifique

a. Première étape : Coating

Pour le Coating, ajouter dans le tube Falcon 50 μ l d'anticorps de capture dans 1 ml de tampon de carbonate de coating et 9 ml d'eau distillé pour faire une solution finale de 10 ml. Remplir la solution dans les puits de la plaque ELISA à l'aide d'une micropipette en raison de 100 μ l par puits, incuber la plaque pendant deux heures à une température ambiante. Après l'incubation, on procède à 3 à 4 lavages avec 150 μ l de PBST par puits avant de commencer la nouvelle étape.

b. Deuxième étape : Echantillonnage et fixation d'antigène spécifique

Le but de cette étape est d'extraire le virus de BBTV à partir de feuille de bananier. Le prélèvement se fait sur la première déployée après le cigare, ensuite le peser et le placer dans un sachet de broyage contenant le GEB suivant le rapport poids volume (1 :10).

Les surnageant obtenus après le broyage sont ensuite déposés dans chaque puits de la plaque ELISA en doublant à raison de 100 µl pour chaque puits suivi d'un' incubation à la température ambiante pendant deux heures. Laver 7 fois les puits de la plaque avec 150 µl de PBST avant de passer à l'étape suivante.

c. Dépôt des anticorps conjugués A et B

Cette étape consiste à diluer l'anticorps monoclonal (1 :200) et l'anticorps couplé à la phosphatase alcaline (1 :200) + le tampon ECI (O, 33g) dans 10 ml d'eau distillée, puis homogénéiser. Déposer ensuite 100 µl dans chaque puits de la plaque, couvrir avec de papier aluminium puis incuber dans une chambre humide pendant 2 à 4 heures à une température ambiante (37°C). vider ensuite le contenu de la plaque et procéder à 3-7 lavages par 150 µl de PBST par puits.

Après chaque lavage, taper fermement la plaque sur des papiers absorbant pour retirer toute bull d'air des puits.

d. Dépôt du substrat PNPP

Il consiste à dissoudre deux tablettes de PNPP (1 mg/ml) dans le tampon PNP (2 ml concentré 5X dans 8 ml d'eau distillée. A l'aide de micropipette à canaux multiple, déposer 100 µl de la solution dans chaque puits de la plaque, suivi d'une incubation de deux heures à la température ambiante.

Le substrat vire en jaune lorsqu'il est exposé à la lumière est donne le faux positif. Pour éviter cela, préparer le substrat juste avant son utilisation, dans un tube Falcon recouvert de papier aluminium.

2.2.2.3. Lecture visuelle de la plaque ELISA

Après incubation de la dernière étape pendant deux heures, la lecture visuelle se base sur la coloration des puits de la plaque ELISA. Les puits avec la solution contenant le virus présente une couleur plus au moins intense ou jaune et cela indique un résultat positif, tandis que les puits sans virus restent blancs sans aucune coloration et cela montre que le résultat est négatif.

Le test est valide si les puits dans lequel vous avez déposé vos contrôles positifs (échantillons témoins positifs) sont positifs et les contrôles négatifs restent blancs donc négatifs.

2.2.2.4. Lecture de la densité optique

Selon la loi de Beer Lambert (Henkel, 1978), l'absorption d'une solution est proportionnelle à la concentration de virus en solution à condition de se placer à une longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux (405 nm pour le BBTV).

L'absorbance (densité optique : DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre qui est muni d'un filtre à 405 nm (pour le PNPP).

Un échantillon est positif lorsque l'absorbance mesurée est supérieur à celui du témoin négatif ou si $y = Y_{mt} \times 2$ (y = valeur du seuil, Y_{mt} = DO moyenne des témoins négatifs, 2 = déviation standard). Un échantillon est négatif lorsque l'absorbance mesurée est inférieur ou égale à celui du témoin ou de la valeur de seuil y .

2.2.3. La culture *in vitro*

La mise en évidence de tissu méristématique de bananier et sa mise en croissance au laboratoire sur un milieu de culture déterminé, dans des conditions aseptiques bien contrôlées à l'abri de toute contamination est une des techniques de culture *in vitro* qui permet d'obtenir un grand nombre de vitro plants dans un délais recors.

2.2.3.1. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé dans cette étude est celui de Murashige et Skoog (1962) dont la composition de base est donnée dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4: Composition du milieu de base (milieu de Murashige et Skoog) pour la culture *in vitro* du bananier.

Composés chimiques		Concentration en	
		mg/l	Mm/l
Macroéléments	NH ₄ NO ₃	1.650	20.650
	KNO ₃	1.900	18.810
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2.990
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1.500
	KH ₂ PO ₄	400	2.970
Microéléments	H ₃ BO ₃	6,18	100
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	100
	MnSO ₄ .H ₂ O	8,60	30
	KI	0,83	5
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24	1
	CoCl ₂ .5H ₂ O	0,024	0,1
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,1
Fer	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	100
	Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,22	100
Antioxydant	Ac. Ascorbique	10,00	56,78
Vitamines	Glycine	2	-
	Thiamine	0,5	-
	Ac. nicotinique	0,5	-
	Pyridoxine	0,4	-
Régulateurs de croissance	AIA	0,17	1
	BAP		
	- Prolifération - Régénération	2,25 0,23	10 1
Source de carbone	Saccharose	30.000	87.642
Gélifiant	Agar	5.000	-
	ou gelrite	2.000	-

Aux pH inférieurs à 4,5, on connaît des problèmes de solidification du milieu. Pour éviter ce problème, le pH doit être maintenu à 5,8. Le dosage du pH se fait après homogénéisation de la solution en l'ajustant avec quelques gouttes de chlorure de sodium ou d'acide chloridrique. Après la préparation de milieu, ce dernier est coulé dans des tubes et stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes.

2.2.3.2. Initiation de culture du méristème

La méthode de mise en culture de l'explant est celle décrite par BANERJEE et LANGHE (1985), BANERJEE et *al* (1986), et VUYLSTEKE (1989). Cette technique comprend différentes étapes ci-dessous :

A l'aide d'un couteau ou une machette, on procède à l'élimination de tous les tissus non méristématiques moins aptes à subir les manipulations qu'exige la culture *in vitro*. Le prélèvement doit alors se faire au cœur du bulbe plus précisément à son sommet. L'apex est extrait dans la partie centrale du bulbe et renferme à son sein une infinité de cellules qui répondent aux conditions exigées par la culture *in vitro*.

a) Désinfection de l'explant

Après l'obtention de la partie à multiplier, toutes les étapes restantes se réaliseront dans une atmosphère stérile et de haute asepsie, sur la table à flux laminaire.

Une désinfection totale de l'apex est réalisée afin de débarrasser ce dernier de tout organisme nuisible à sa culture. La désinfection se fera en étapes successives suivantes : laver soigneusement l'échantillon à l'eau courant ; le plonger dans l'éthanol à 70% pendant 15 secondes ; puis son immersion dans la solution d'hypo chlorite de calcium à 30% ou encore dans de l'eau de javel à 80% pendant 20 minutes ; et enfin rincer l'échantillon dans l'eau distillée stérile à 3 reprises.

b) Mise en culture de l'apex méristématique

Sur la table à flux laminaire, dans le diamètre de stérilité de la flamme d'une lampe à alcool. On enlève une à une les jeunes feuilles, puis les ébauches foliaires de l'apex méristématique à l'aide d'un scalpel à lames interchangeable et d'une pince stériles, pour obtenir le matériel végétal à cultiver *in vitro*. Placer en suite les échantillons dans un tube à essai contenant le milieu de culture stérile.



Figure 7 : Mise en culture de l'apex méristématique.

Fermer le tube avec un capuchon et le contour par le papier paraffine en laissant un dispositif pour la pénétration de l'air nécessaire à la respiration de la plante.

2.2.3.3. Subcultures, régénération des organes et sevrage

Après une moyenne de 14 jours, on observe de nombreux bourgeons différenciés sous l'effet de BAP. Ces bourgeons sont repiqués en tubes pour une nouvelle prolifération.



Figure 8 : Aspects de bourgeons en prolifération

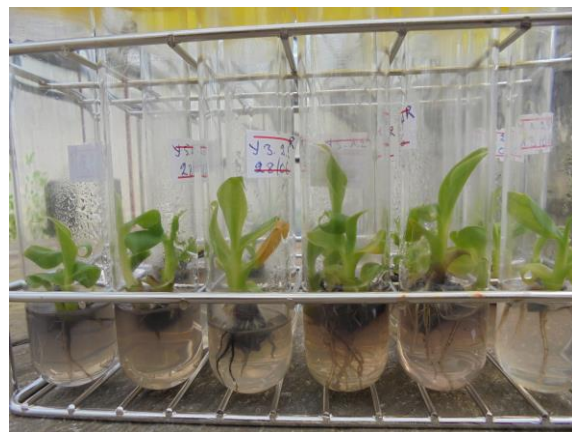


Figure 9 : Aspects de bourgeons en régénération

Après une série de trois subcultures et la régénération des organes (racines et feuilles) des plants, les plantules enracinées sont transférées dans des pots de terre tout en maintenant une forte hygrométrie (figure 10).



Figure 10 : Sevrage des vitro plants

2.2.4. Les analyses des résultats

Le programme Excel permettra d'analyser les résultats obtenus au cours de la culture *in vitro*. Le test Anova évaluera la différence d'évolution des nombres des bourgeons entre trois cultivars de bananier qui ont fait l'objet de cette étude et le test Tukey servira à vérifier si la différence entre ces variétés de bananier pris deux à deux est significative.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Le troisième chapitre de ce travail présente essentiellement les résultats et les discussions de test immuno-enzymologique TAS ELISA avant et après culture *in vitro* des échantillons de trois cultivars de bananier Bluggoe (*Musa* ABB), Prata (*Musa* AAB) et Yangambi Km5 (*Musa* AAA) qui ont fait l'objet de cette étude. Ce chapitre donne aussi l'évolution de nombre de bourgeons pour chaque cultivar au cours de trois subcultures.

3.1. Etat sérologique des cultivars de bananiers avant la culture *in vitro*

L'état sérologique des échantillons de chaque variété est donné dans le tableau 5 ci-dessous. Ces échantillons présentaient les niveaux 4 et 5 de symptôme de la maladie de BBTD.

Tableau 5. Etat sérologique des cultivars de bananiers avant la culture *in vitro*

Cultivars	Génotypes	Nombre d'échantillons	Résultats TAS ELISA	
			Positifs	Négatifs
Bluggoe	ABB	10	10	0
Prata	AAB	10	10	0
Yangambi Km5	AAA	10	10	0

Les résultats contenus dans le tableau 5 ci-dessus montrent que tous les échantillons de bananier présentant le niveau 4 et 5 de la maladie ont été positifs à 100% au test de TAS ELISA pour toutes les variétés.

3.2. Nombre des bourgeons obtenus par subculture de Bluggoe (*Musa ABB*)

Le nombre des bourgeons obtenus par culture *in vitro* des bulbes de Bluggoe est donné dans la figure 11 ci-dessous. Les données détaillantes de cette figure sont consignées en annexe dans le tableau 7.

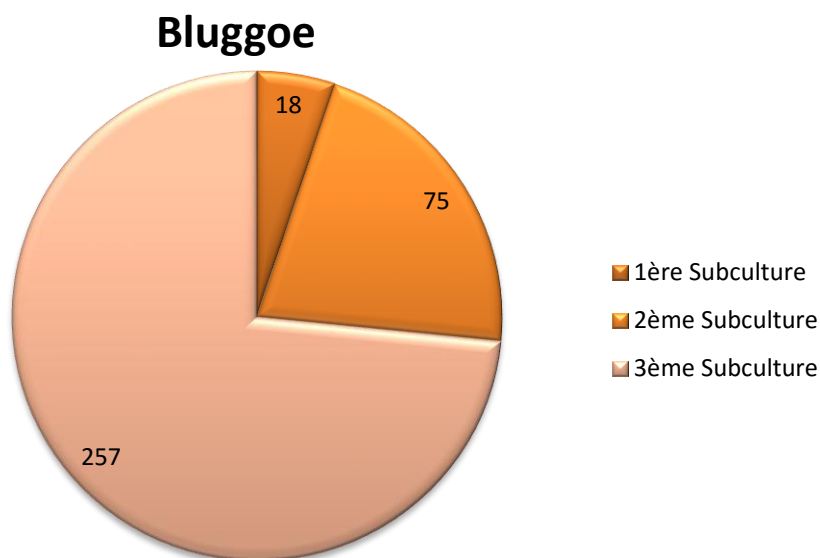


Figure 11 : Nombre des bourgeons obtenus par subculture des bulbes de Bluggoe.

Il ressort de cette figure 11 que sur les 10 échantillons mis en culture, le nombre des bourgeons obtenus est de 18 après la première subculture, de 75 après la deuxième subculture et de 257 bourgeons après la troisième subculture. Les moyennes obtenus par subculture étant respectivement de 1,8 ; 7,5 et 25,7 bourgeons par tube.

Bola M. (2013) dans son étude sur l'essai d'assainissement de plants de bananier (Libanga likale, Litete) virosés par le BBTv par la culture *in vitro* a trouvé une moyenne au cours des trois première subcultures respectives de 7,2 ; 8,8 ; 4bourgeons par tube pour Libanga likale et 5,2 ; 5,8 ; 5,8bourgeons par tube pour Litete. La différence entre ces deux travaux pourrait être due aux cultivars utilisés ne sont pas les mêmes.

3.3. Nombre des bourgeons obtenus par subculture de Prata (*Musa AAB*)

La figure 12 ci-dessous résume le nombre des bourgeons obtenus par culture *in vitro* au cours de chaque subculture des bulbes de Prata.

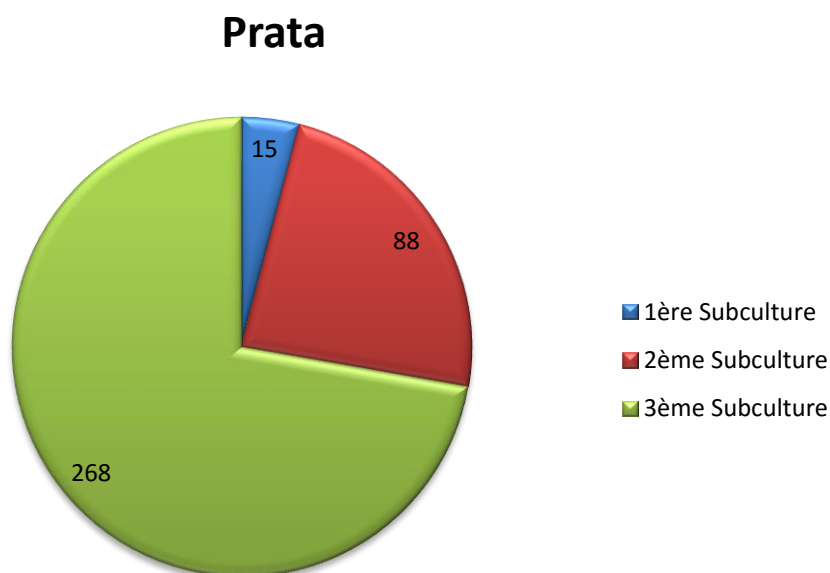


Figure 12 : Nombre des bourgeons obtenus par subculture des bulbes de Prata.

Il ressort de cette figure 12 et du tableau 8 en annexe qu'au cours de la première subculture le nombre des bourgeons obtenus est de 15 sur 10 bulbes de Prata mis en culture, ce nombre a augmenté à 88 bourgeons au cours de la deuxième subculture et de 268 bourgeons au cours de la troisième subculture. Avec une moyenne respective par subculture de 1,5 ; 8,8 ; 26,8 bourgeons par tubes.

Komoy L. (2009), dans son étude sur la caractérisation morphologique et taux de multiplication *in vitro* de trois cultivars de bananier (*Musa AAB*) a trouvé qu'au cours de la première subculture prata avait une moyenne de 2 bourgeons par tube, à la deuxième subculture une moyenne de 4 bourgeons par tube et à la troisième subculture une moyenne de 8 bourgeons par tubes, ce qui montrent que le nombre total des bourgeons varie selon nombre de subculture.

3.4. Nombre des bourgeons obtenus par subculture de Yangambi Km5 (*Musa AAA*)

Le nombre des bourgeons obtenus par culture *in vitro* au cours des différentes subcultures des bulbes de Bluggoe est donné dans la figure 13 ci-dessous.

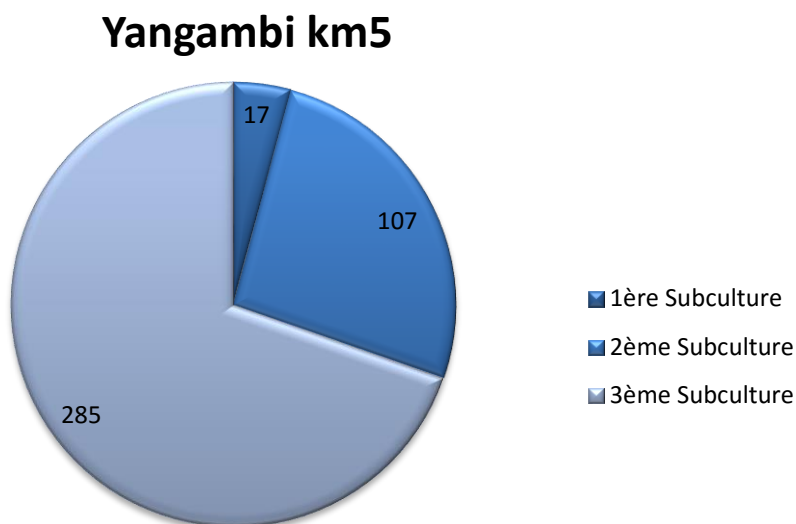


Figure 13 : Nombre des bourgeons obtenus par subculture des bulbes de Yangambi Km5.

Cette figure 13 et le tableau 9 en annexe nous montrent que la première subculture de 10 bulbes de Yangambi Km5 a donné un nombre de 17 bourgeons. Ce nombre monte à 107 bourgeons au cours de la deuxième subculture et de 285 bourgeons à la troisième subculture avec respectivement une moyenne de 1,7 ; 10,7 ; 28,5 Bourgeons par tubes.

Les travaux antérieurs au cours d'une étude de l'effet de la micro décapitation sur la prolifération *in vitro* des bourgeons chez les trois cultivars de bananiers plantains à Kisangani par Adheka (2007), ont montré qu'après la mise en culture de sujets sains de 3 cultivars, que la moyenne de bourgeons induits au total était de 42,0 pour le cultivar Libanga noir ; 42,7 pour le cultivar Bosakaraka et de 38,8 chez le Tala lola.

D'autres études révèlent que le taux moyen de prolifération en utilisant un milieu de prolifération contenant 10 μ M de BAP peut varier entre 1,4 et 21,4. Cette moyenne peut augmenter considérablement jusqu'à 30 sur un milieu 10 fois plus enrichi en BAP.

(Dhed'a, 1992). Les moyennes obtenues dans ce travail se situent donc dans cette fourchette étant données que le milieu de culture utilisé était 10 fois plus enrichi en BAP

3.5. Evolution des cultivars en fonction de différentes subcultures

La figure 14 ci-dessous donne l'évolution de nombre des bourgeons pour chaque cultivar au cours de trois subcultures successives.

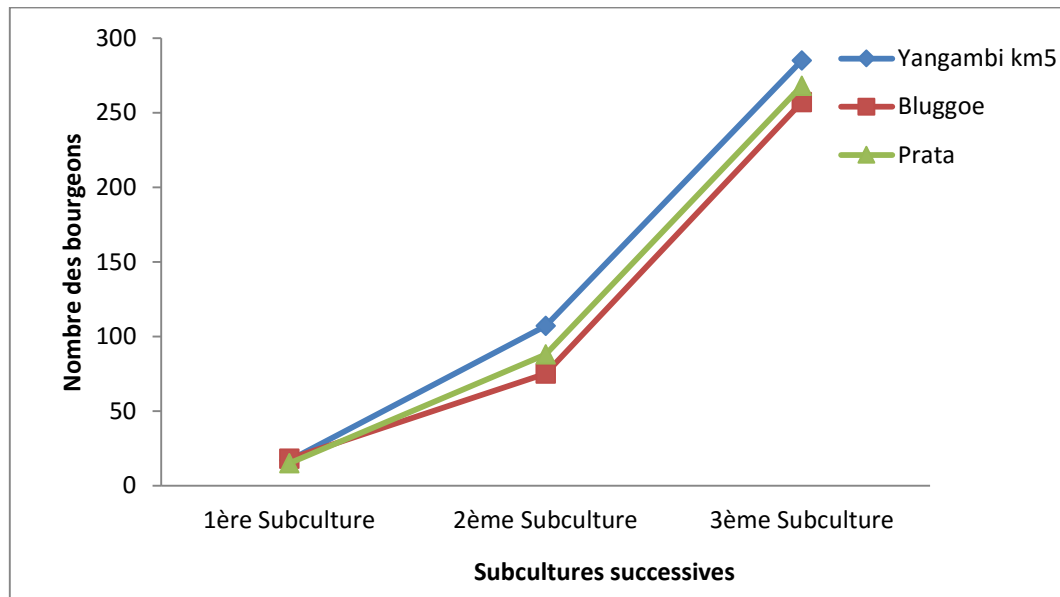


Figure 14 : Evolution des cultivars en fonction de différentes subcultures.

Il ressort de cette figure 14 que le nombre de bourgeon augmente en fonction du nombre de subculture, avec en tête Yangambi Km5 suivi de Prata et de Bluggoe. Nous pensons que cette différence dans l'évolution de nombre des bourgeons au cours des différentes subcultures est due à l'aptitude de chaque cultivar à proliférer.

Nos résultats corrobore celui de Komoy L. (2009), dans son étude sur la caractérisation morphologique et taux de multiplication *in vitro* de trois cultivars de bananier (*Musa AAB*) a montré que le nombre total des bourgeons varie selon nombre de subculture et de type de cultivar.

3.6. Proportion des bourgeons obtenus et taux des contaminations après trois subcultures

La proportion des bourgeons obtenus et le taux de contaminations après trois subcultures sont présentés dans la figure 15 ci-dessous.

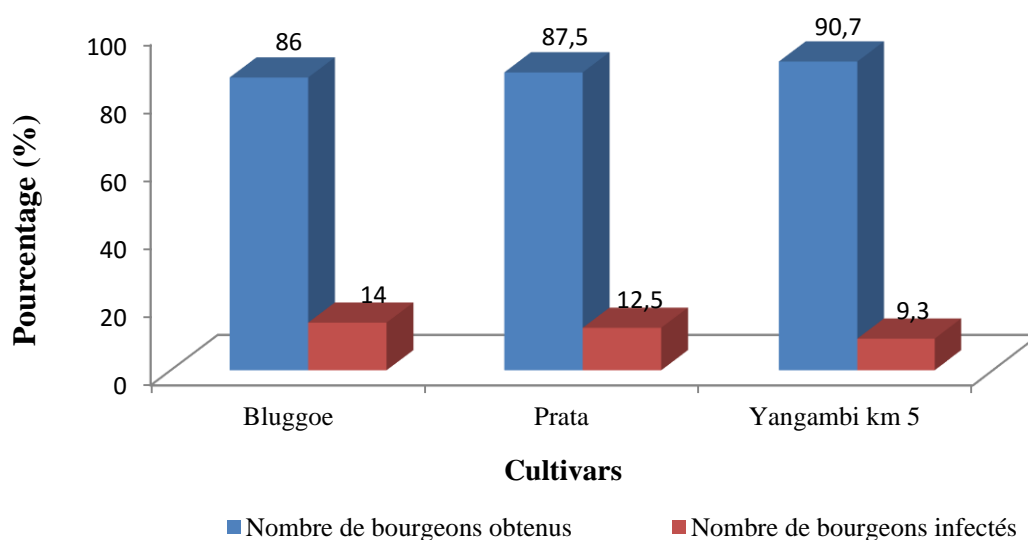


Figure 15 : Proportion des bourgeons obtenus et taux des contaminations après trois subcultures.

De cette figure 15, il ressort que sur 100% des échantillons mis en culture après trois subcultures, 90,7% sont non contaminés pour Yangambi Km5 suivie de 87,5% pour Prata et 86% pour Bluggoe. Les taux de contamination étant faible respectivement 9,3%, 12,5% et 14%, ceci prouve que les différentes techniques de culture *in vitro* ainsi que les règles d'asepsie ont été respectées.

Komoy L. (2009) dans son étude sur la caractérisation morphologique et taux de multiplication *in vitro* de trois cultivars de bananier (*Musa AAB*) a trouvé un taux de reprise sans contamination de 59,4% chez le cultivar Kamaramasenge à la première subculture et à la deuxième et troisième subculture, il est successivement de 80% et 66%. A la première subculture, le cultivar Prata présente un taux de reprise de 52,6%. A la deuxième et troisième subculture elle est successivement de 60% et 33,3% ; pour ce qui est de cultivar Figue pomme, le taux de reprise est de 50% à la première subculture et 100% à la deuxième et troisième subculture. Cette différence pourrait être due à la

manipulation mais aussi à la capacité d'adaptation pour chaque variété au condition du milieu auquel il se trouve.

3.7. Test Anova

L'évaluation de la différence d'évolution des nombres des bourgeons entre trois cultivars de bananier qui ont fait l'objet de cette étude par le Test Anova montre que cette différence n'est pas significative car le $p\text{-value} = 0.4555$ ce qui est supérieur à 0.05.

3.8. Test Tukey (Post-Anova)

Le Test Tukey nous a permis de vérifier si la différence entre ces variétés de bananier pris deux à deux est significative. Les résultats obtenus au cours de ce test se présentent de la manière suivante :

Prata-Bluggoe : $p\text{-value} = 0.8962071 > 0.05$, la différence n'est pas significative.

Yangambikm5-Bluggoe: $p\text{-value} = 0.4319712 > 0.05$, la différence n'est pas significative.

Yangambikm5-Prata: $p\text{-value} = 0.7010265 > 0.05$, la différence n'est pas significative.

3.9. Test de TAS ELISA sur les plants obtenus après culture *in vitro*.

L'état sérologique des plants obtenus après culture *in vitro* de différents cultivars des bananiers qui ont fait l'objet de cette étude est donné dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Etat sérologique de différents cultivars des bananiers plantains par le TAS ELISA après la prolifération et régénération.

Cultivars	Plants testés	Plants positifs	Plants négatifs	Taux d'assainissement (%)
Bluggoe	7	2	5	71,43
Prata	11	3	8	72,72
Yangambi Km5	23	8	15	65.22

La lecture du tableau 6, révèle que la culture *in vitro* des plants de bananier virosés a assaini ces derniers à un taux allant de 65,22 % pour le cultivar Yangambi Km 5 suivi de Bluggoe avec 71,43% et de Prata avec 72,72% d'assainissement.

L'étude de Bola M. sur l'essai d'assainissement de plants de bananier (Libanga likale, Litete) virosés par le BBTV par la culture *in vitro* montre qu'après culture *in vitro* (prolifération des bourgeons méristématiques et régénération) des plants de bananier virosés, sur le 100% d'échantillons analysés, 75% de cultivar Litetese et 66,7% de Libanga likale sont révélés indemnes du virus. Par contre le 25% de cultivar Litete et 33,3% de cultivar Libanga likale ont montré la persistance du virus en se révélant toujours positifs au TAS ELISA.

L'assainissement en 1952 par MOREL et MARTIN qui, en prélevant des pointes méristématiques de dalhias virosés dans le but de reproduire des dalhias génétiquement semblables aux parents, mais exempts de virus, ont réussi de la sorte à éliminer la mosaïque du dalhias et le spottedwilt virus. Et par la suite en utilisant toujours la culture du méristème, WANG et HU en 1980, signalent l'élimination des virus dans plus de 70 plantes viroses connues chez plus de 40 espèces différentes (Dhed'a, 2011).

CONCLUSION ET SUGGESTION

L'objectif de cette étude est d'essayer d'assainir les bananiers infectés par l'un des virus les plus dévastateurs de cette culture et qui est à la base de la chute de sa production. Cet assainissement a utilisé la technique de culture *in vitro* du méristème apical de bananier dans des conditions contrôlées sur un milieu de base de Murashige et Skoog.

Pour ce faire, nous avons récolté les échantillons des bananiers précisément les cultivars suivants: Bluggoe (*Musa* ABB), Prata (*Musa* AAB), Yangambi Km5 (*Musa* AAA). Ces échantillons ont été récoltés dans la ville de Kisangani et ses environs sur les plantes présentant les symptômes du niveau quatre (taille réduite de feuilles décolorées) et du niveau cinq (aspect touffu au sommet Bunchy Top) de la maladie grâce à l'échelle de cotation de BBTD. Les plantes dont les échantillons étaient positifs au test ELISA ont été récoltées et mis en culture. Les plantes qui en ont sortis de cette culture ont été testées encore une fois pour confirmer leurs assainissements. L'évolution de nombre des bourgeons au cours de trois subcultures a été suivie pour chaque bulbe.

Les résultats obtenus ont montré que :

Avant la culture *in vitro*, le test immuno enzymologique TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich Enzym-Linked Immuno Sorbant Assay) a révélé que la totalité des plants de bananier présentant les niveaux 4 et 5 de symptôme de Banana Bunchy Top Disease (BBTD) étaient positifs au test.

La mise en culture et les trois subcultures successives des méristèmes ont donné un nombre moyen de bougeons par tube allant de 1,8 à 25,7 bourgeons pour le Bluggoe, 1,5 à 26,8 bourgeons pour Prata et 1,7 à 28,5 bourgeons par tube pour Yangambi Km5.

Après la culture *in vitro*, les plantules de bananiers issus de cette culture sont assainies à un pourcentage de 65,22% pour le cultivar Yangambi Km5 suivi de Bluggoe avec 71,4% et de Prata avec 72,72%. La culture *in vitro* reste donc une technique appropriée pour l'assainissement de bananier virosé et peut permettre l'obtention d'un grand nombre de bananier sans virus.

Au regard de ces résultats, nous nous sommes permis d'affirmer que les objectifs poursuivis dans cette étude sont atteints, car les Hypothèses viennent d'être vérifiées. Mais plusieurs questions restent encore sans réponses.

Par conséquent, nous suggérons de poursuivre les recherches en faisant le TAS-ELISA sur les plants de bananier obtenus au cours des différentes subcultures pour voir si le taux d'assainissement change au cours des différentes subcultures et en étudiant les plants produits par embryogenèse somatique.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- ABADIE, C., ZAPATER, M.F., PIGNOLET, L., CARLIER, J., MOURICHON, X.
2008. Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella*
spp., responsible for Sigatoka leaf spot disease. *Fruits* 63, 319-323.
- ALLEN R. N. and BARNIER., 1977. The spread of bunchy top disease between banana
plantations in the Tweed river district during. In NSW department of agriculture
Biology branch plant disease survey. Pp 27 - 28.
- ALLEN. R. N., 1987. Further studies on epidemiological factors influencing control of
Banana bunchy top disease and evaluation of control measures by computer
simulation. *Australian journal of agricultural research* 38: 373 - 382.
- BAKELENA, K., et MANKANGIDILA, K., 1996. La production bananière au Zaïre,
Infomusa, vol 5, N° 2. pp. 20-22.
- BOLA M., 2013. Essai d'assainissement de bananier plantain du groupe génomique AAB
(Cultivars du type faux corne : Libangalikale et du type frensh : Litete) infecté par le
Banana bunchy top virus (BBTV) par la culture *in vitro*. Mémoire inédit, UNIKIS,
50p.
- CHAMPION, J., 1963. Le bananier. Editions G.P Maisonneuve et Larousse Paris. 262p.
- CARUANA M. L., 2003. Analyse du risque phytosanitaire (ARP). Bananiers. Banana
Bunchy Top babuvivus. CIRAD. P31.
- D'HONT, A., DENOEUDE, F., AURY, J-M., BAURENS, F-C., CARREL, F.,
GARSMEUR, O., NOEL, B., BOCS, S., DROCS, G., ROUARD, M., DA SILVA,
C., JABBARI, K., CARDI, C., POULAIN, J., SOUQUET, M., LABADIE, K.,
JOURDA, C., LEJELLE, J., RODIER-GOUD, M., ALBERT, A., BERNARD, M.,
CORREA, M., AYYAMPALAYAM, S., R. MCKAIN, M., LEEBENS-MACK, J.,
BURGESS, D., FREELING, M., MBEGUIE- A- MBEGUIE, D., CHABANNES,
M., WICKER, T., PANAUD, O., BARBOSA, J., EVA HRIBOVA, E., HELSOP-
HARRISON, P., HABAS, R., RIVALLAN, R., FRANCOIS, P., POIRON, C.,
KILIAN, A., BURTHIA, D., JENNY, C., BAKRY, F., BRWON, S., GUIGNON,
V., KEMA, G., DITA, M., WAALWIJK, C., JOSEPH, S., DIEVART, A.,
JAILLON, O., LECLERCQ, J., ARGOUT, X., LYONS, E., ALMEIDA, A.,

JERIDI, M., DOLEZEL, J., ROUX, N., RITERUCCI, A-M., WEISSENBACH, J., RUIZ, M., GLASZMANN, J-C., QUETIER, F., YAHIAOUI, N., and WINCKER, P., 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and evolution of monocotyledonous plants, *Nature*.488, 213-217.

DHED'A, D., MOANGO, M. et SWENNEN, R., 2011. La culture des bananiers et bananiers plantains en République Démocratique du Congo, Support didactique, Saint Paul, Kinshasa, 85.

DHED'A, D., SWENNEN, R., MOANGO, M. et BLOME, G., 2009. Enquête diagnostique sur la culture des bananiers et bananiers plantains dans les zones périphériques de la ville de Kisangani et quelques villages du district de la Tshopo (RDC), Rapport N° ZRDC2008MP056, Fac.Sc., UNIKIS, 101p.

DELVAUX B. 1995. Soils. In. S. Gowen, eds., *Bananas and Plantains*, publ. Chapman and Hall, London. p. 230-257.

FAOSTAT., 2012. Food and agriculture Organization of the United Nations.

http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#DOWNLOAD

FRISON, E and SHARROCK, S. 1999. The economic, social and nutritional importance of bananas in the world. In C. Picq, E. Fouré and E. Frison (eds): *Bananas and food security. Proceedings of an International Symposium held in Douala, Cameroon, 10-14. November 1998*. INIBAP, Montpellier, France. pp. 21-35. *Fruits* 43: 67-72.

GANRY, J., FOURE, E., De Lapeyre de Bellaire, L. and Lescot, T., 2012. An integrated approach to control the Black leaf streak disease (BLS) of bananas, while reducing fungicide use and environmental impact. In Dhanasekaran, D. Thajuddin, N. Panneerselvam, A. *Fungicides for plant and Animal Diseases*, pp. 193-226.

JENNY C., CORREELF., TOMEKPE K., PERRIER X., and TEZENAS DU MONTCEL H., 2002. *Banana in: Hannon et al: Genetic diversity of tropical plants; sciences publishers Inc.*

ONAUTSHU O, 2013. Caractérisation des populations de *Mycosphaerella fijiensis* et épidémiologie de la cercosporiose noire du bananier dans la région de Kisangani (RDC). Université catholique de Louvain, 309p.

- KAGY V. 1999. Importance alimentaire, socio-économique et culturelle de la banana dans la société Kanak Nouvelle-Calédonie. In C. Picq, E. Fouré et E.A. Frison, eds. Bananas and foodsecurity/ Les productions bananières : un enjeu économique majeur pour la sécurité alimentaire. Proceeding of an international Symposium held in Douala, Cameroon. INIBAP, Montpellier. pp 437-443.
- KOMOY L., 2009. Caractérisation morphologique et taux de multiplication *in vitro* de trois cultivars de bananier (*Musa AAB*) à Kisangani. Mémoire inédit, UNIKIS, 77p.
- KRISHNAMOORTHY, V., 2002. Amélioration du bananier (*Musa spp*) pour la resistance à la maladie de Sigatoka et aux nématodes, Thèse inédite, departement of fruit Crops Horticultural college and Researchinstitute, Tamil Nadu Agriculture University, Inde, 156p.
- MINABONGI M., 2012. Evaluation de l'incidence et sévérité de Banana bunchy top disease (BBTD) dans la région de basse altitude du bassin du Congo. Cas du territoire de Bongandanga, District de la Mongala en R.D.Congo. Mémoire inédit IFA/Ybi, 51p.
- NYABYENDA. P. 2006. Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique. Cultures industrielle et exploitation, cultures fruitières, cultures maraîchères. Les presses Agronomiques de Gembox. 238p.
- TEZENAS DE MONTCEL, H., 1985. Le bananier plantain. Le technicien d'agriculture tropical. Maisonneuve et Larose. 143p.
- SHARROCK, S. and LUSTY, C., 2000. Nutritive value of banana In Inibap annual report 1999. INIBAP: Montpellier, France. pp. 28-31.
- SWENNEN R. et VUYLSTEKE D., 2001. Bananier. In: RAEMARKERS, H.R (éd.). Agriculture en afrique tropicale. DGCI, Bruxelles, 611-636.
- SCHOOFS. 1997. The origin of embryogenic cell in *Musa*. Doctoratproefs-chrift, Nr 330 an de Faculteit Landbawkundige in toegepaste biologische wetenschappen van de K.U. Leuven.

- TEYCHENEY P.Y, LOCKHART B.E.L., ACINA I. and CANDRESSE T., 2007. Detection of Banana mild manioc virus and Banana virus x by polyvalent degenerated oligonucleotide PT-PCP (PDO-RP-PCP). *Journal of biological Methods*. 142:41-49.
- VADENPUT, 1981. Les principales cultures en Afrique Centrale. Presse de l'imprimerie Lesafre, B7500, Belgique.
- VANGU G.H., 2007. Développer une stratégie du secteur Banane et Banane plantain pour améliorer la sécurité alimentaire et les revenus agricoles. Atelier organisé par Biodiversity et INERA, Kinshasa 12 juin 2007.
- BAUDOIN J. P. ; DEMOL J. ; LOUANT B. P. ; MARECHAL R. ; MERGEAI G. ; et OTOUL E., 2002. Amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Les presses agronomiques de Gembloux. 252p.
- HAÏCOUR, R., TRANG, V.B., DHED'A, D., ASSANI, A. et CÔTE, F.X. 1998. La sécurité alimentaire : perspectives d'amélioration des bananiers par voie biotechnologique. *Cahiers Agricultures*; 7: 468-75.
- VOLK W, STECHMANN D.H. et STARY P, 1990. Suitability of five species of the banana aphid *Pentalonia nigronervosa* Coq (Homoptera, Aphididae) in the south Pacific.
- THOMAS J.E, et DIETZGEN R.G. 1991. Purification, characterisation and serological detection of virus with banana bunchy top disease in Australia. *Journal of General virology*, 72: 217-224.
- THOMAS J.E. ISKARA - CARANA M.L 1999 M.L. Bunchy top; in JONES D.R (ed) : Disease of banana, Abaca and Ensete. London, CABI, Tropical Pest Management 36 -3): 249-257.
- VALERIE K, MILLE C, MADEMBA - SY, 2000. Le puceron du bananier *Pentalonia nigronervosa* Coquerel, l'insecte vecteur de la maladie virale du Bunchy top institut agronomique néo - Calédonie, 3 :249-257.
- MAGEE C.P.J. , 1936, Bunchy top disease of banana . Rehabilitation of banana industry in new south wales. *Journal of Australia institute of Agricultural Science* II PP13-16

- MAU RFL, KESSING J.L.M, TEMBRICK and HARA A.H.,
2000.*Pentalonianigronervosa* University of Hawaii.30
- MIRKO K. HARDING M.R, DALE J.L. 1997 Banana bunchy virus DNA. Queenshand,
Australie. P1-7.
- PADMALATHA C. RANJISINGH A.J.A. 1998 Tropical Ecology (IND), 39 (2),
P239-242.
- GOLD C., 2000. Parasites et ravageurs des Musa réseau international pour l'amélioration
de la banane et de banane plantain, Parc scientifique. Agropolis II, Montpellier -
France.
- HAFNER G. J., HARDING R. M., DALE J. L., 1995.Movement and transmission
of banana bunchy top virus DNA component one in banana.Journal of General
virology.76: 2279 - 2285.
- HANSEN J. D., HARA A. H. and TENBRINK V. L., 1992. Insecticidal dips
fordisinfesting commercial tropical cut flowers and foliage. Trop.Pest. Manag. 38:
245 - 249.
- HARDING R. M., BURNS T. M., DALES J. L., 1991. Virus like particles associatedwith
banana bunchy top disease contain small single - stranded DNA. Journal of general
virology. 72: 225 - 230.
- HATA T. Y. and HARA. A. H., 1992. Evolutions of insecticides against pests of redginger
in Hawaii.Trop. Pest Management.38 : 234 - 236.
- HILL D. S., 1983.Agricultural insects and pests of the tropics and their control.Cambridge
university press.2nd Edition, 203p.
- RAMAEKERS, H. R., 2001. Agriculture en Afrique tropicale DDCI, rues des petits
cornes, 15, Karmelieteustrant 15, B 1000 Bruxelles. pp 611-636.
- REGNAULT-ROGER., 2005. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculteur et
l'environnement. Lavoisiées, Paris
- VAN REGENT MORTEL M.H.V. FAUQUET C.M.BISHO D.H.L., CARSTENS E.B,
ESTES M.K., LEMON S.M. MANILOFF J.MAYO M.A. Mc GEOCH

- D.J.PRINGLE C.R. WICKNER R.B. 2000: Virus Taxonomy : San Diego. San Francisco, New York, Boston, London, Sydney and Tokyo, Academic Press.
- SEBAGENZA, B., 1986. Le comportement de Bananier (AAA) à cuire "NYAMUNGU" à Yangambi, Mémoire inédit IFA/Ybi.
- STARY P., STECHMANN D.H, 1990. Ephedruscerasicolastary (Hym.,Aphididae), a new bio central agent of the banana aphid, *Pentalonianigronervosacoq* (Honnology, 109 (5): 457-462.4 pp
- SU H.J., TSAO, WU and HUNG, 2003. Biological and molecular characterization of taenset banana bunchy top virus.
- NGAMA B. F., 2010. Etude de diagnostique de banana bunchy top disease (BBTD) dans la région forestière du bassin du Congo en district de la Tshopo dans la province Orientale en RDC, D.E.S, IFA/Ybi. 78p.
- LASSOUDIÈRE, A., 2007. Le bananier et sa culture. Edition Quae. 384p.
- LASSOUDIÈRE, A., 2010. L'histoire du bananier. Edition Quae. 351 p.
- LASSOUDIÈRE, A., 2012. Le bananier : Un siècle d'innovations techniques. Edition Quae. 352p.
- PANIS, B., DHED'A, D., DESMET, K., CAMMUE, and SWENNEN, R., 1993. Cell suspension from somatic tissue in *Musa* application and protects. In ganry, J. (eds) breeding banana and plantain for resistance to diseases and pests GIRAD, MONTPELLIER, France. pp 318-325.
- PERRIER, X., DE LANGHE, E., DONOHUE, M., LENTFER, C., VRYDAGHS, L., BAKRYA, F., CARREEL, F., HYPPOLYTE, I., HORRY, J.P., JENNY, C., LEBOT, V., RISTERUCCI A. M., TOMEKP, K., DOUTRELEPONT, H., BALL, T., MANWARING, J., DE MARET, P., and DENHAM, T., Multidisciplinary perceptive on banana (*Musa* spp.) domestication. National Museum of Natural history and Smithsonian Tropical Research Institute, Panama City.PNAS Early Edition, 8p.

- UDE, G., PILLAY, M., MWAKANMA, D. and TEKOUANO, A. 2002a. Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* Using AFLP markers. *Theorappl Genet*, 104: 1239-1245.
- UDE, G., PILLAY, M., MWAKANMA, D. and TEKOUANO, A. 2002b. Genetic diversity in *Musa acuminata* colla and *Musa balbisiana* colla and some of their naturel hybrids using AFLP Markers. *Theorappl Genet*, 104: 1239-1245.
- WANDJA K., 2011. Etude de l'incidence de Banana bunchy top disease (BBTD) sur les bananiers en jardin de case dans la ville de Kisangani et evaluation immuno enzymologique de l'infection par TAS ELISA. Memoire inédit, UNIKIS, 51p.

ANNEXE I

Tableau 7 : Nombre des bourgeons obtenus pour chaque bulbe de Bluggoe

N°	1ère Subculture	2ème subculture	3ème Subculture	Total
1	2	14	24	40
2	2	4	15	21
3	1	6	30	37
4	2	4	23	29
5	2	11	35	48
6	2	9	32	43
7	1	6	20	27
8	2	8	28	38
9	2	8	20	30
10	2	5	30	37
Total général	18	75	257	350
Moyenne	1,8	7,5	25,7	35

Tableau 8 : Nombre des bourgeons obtenus pour chaque bulbe de Prata

N°	1ère Subculture	2ème subculture	3ème Subculture	Total
1	2	11	34	47
2	2	6	37	45
3	2	14	15	31
4	2	16	26	44
5	2	7	16	25
6	1	6	20	27
7	1	6	33	40
8	1	5	14	20
9	1	7	30	38
10	1	10	43	54
Total général	15	88	268	371
Moyenne	1,5	8,8	26,8	37,1

Tableau 9 : Nombre des bourgeons obtenus pour chaque bulbe de Yangambi km5

N°	1ère Subculture	2ème subculture	3ème Subculture	Total
1	2	12	36	50
2	1	12	40	53
3	2	10	28	40
4	1	12	22	35
5	1	14	44	59
6	2	14	32	48
7	2	10	23	35
8	2	8	24	34
9	2	4	11	17
10	2	11	25	38
Total général	17	107	285	409
Moyenne	1,7	10,7	28,5	40,9

ANNEXE II

1. ANOVA TUBES NON CONTAMINEES

Df	Sum	SqMean	Sq	F value	Pr(>F)	
cultivar	2	178.87		89.433	0.8098	0.4555
Residuals	27	2981.80		110.437		

2. POST ANOVA TUBES NON CONTAMINEES

	diff	lwr	upr	p adj
Prata-Blugoe	2.1	-9.552579	13.75258	0.8962071
Yangambikm5-Blugoe	5.9	-5.752579	17.55258	0.4319712
Yangambikm5-Prata	3.8	-7.852579	15.45258	0.7010265

TABLE DES MATIERES

0. INTRODUCTION	1
0.1. Problématique.....	6
0.2. Hypothèses.....	7
0.3. Objectifs du travail	8
0.4. Intérêt du travail	8
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE BANANIER ET LA MALADIE DU BANANA BUNCHY TOP VIRUS ...	9
1.1. Le bananier.....	9
1.1.1. Origine	9
1.1.2. Description et classification	10
1.1.3. Distribution et diversité génétique	11
1.1.4. Importance socio-économique de bananier	13
1.1.5. Valeurs nutritionnelles	14
1.1.6. Ecologie et besoins nutritionnels	15
1.1.7. Bananier en RDC et dans la région de Kisangani.....	16
1.1.8. Principaux problème phytosanitaire du bananier.....	16
1.2. La maladie de Banana Bunchy Top Disease (BBTD)	17
1.2.1. Historique et distribution géographique.....	17
1.2.2. Description	18
1.2.3. Epidémiologie.....	19
1.2.4. Impact économique de la maladie	19
1.2.5. Lutte contre le BBTD	20
1.2.6. L'organisme nuisible.....	21
1.2.7. Dissémination et dispersion du BBTV dans la plante et dans la plantation.....	22
1.2.8. Période de latence de la maladie	22
1.2.9. Répartition mondiale du BBTV	23
1.2.10. Insecte vecteur de BBTD.	24
1.2.11. Dégâts.....	26
1.2.12. Situation de BBTV en R.D.Congo	27
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	28
2.1. Matériel végétal	28
2.2. Méthodes	28

2.2.1. Observation visuelle des symptômes.....	28
2.2.2. Test Immuno enzymologique TAS-ELISA.....	29
2.2.3. La culture <i>in vitro</i>	31
2.2.4. Les analyses des résultats	35
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS	36
3.1. Etat sérologique des cultivars de bananiers avant la culture <i>in vitro</i>	36
3.2. Nombre des bourgeons obtenus par subculture de Bluggoe (<i>Musa</i> ABB)	37
3.3. Nombre des bourgeons obtenus par subculture de Prata (<i>Musa</i> AAB).....	38
3.4. Nombre des bourgeons obtenus par subculture de Yangambi Km5 (<i>Musa</i> AAA)	39
3.5. Evolution des cultivars en fonction de différentes subcultures.....	40
3.6. Proportion des bourgeons obtenus et taux des contaminations après trois subcultures....	41
3.7. Test Anova.....	42
3.8. Test Tukey (Post-Anova).....	42
3.9. Test de TAS ELISA sur les plants obtenus après culture <i>in vitro</i>	42
CONCLUSION ET SUGGESTION	44
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....	46
ANNEXE I	53
ANNEXE II	54