



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présenté par :

Mme. ABDELHADI Amel

Mlle. BACHIR Yamna

*Thème*

Identification moléculaire des espèces de  
*Fusarium* : choix des gènes et des bases de  
données

Soutenu le :

Jury :

Grade

Président : Dr. TAIBI Khaled

« MCA »

Encadrant : Dr. YEZLI Wassim

« MCA »

Co-encadrant : Dr. KADDAR Bachir

« MCB »

Examineur : Dr. MANSOURI Dou El Kefel

« MCA »

Année universitaire 2020-2021

# Remerciement

*En préambule à ce mémoire on remercie ALLAH miséricordieux qu'il nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.*

*Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre encadrant, Dr. YEZLI Wassim, qui nous a permis de bénéficier de son encadrement et nous a prodigué ces précieux conseils, pour la réalisation de notre travail ; il s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer.*

*Nous remercions Dr. KADDAR Bachir d'avoir accepté de codiriger ce travail.*

*Nous vifs remerciement vont également à Dr. TAIBI Khaled, président du jury ; et Dr. MANSSOURI Dou El Kefel, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail en acceptant de l'examiner et l'enrichir par leurs remarques et suggestions.*

*Nous remercions vivement Mr. SAID Abdelkader, ingénieur de laboratoire au niveau de la Faculté des sciences de la nature et de la vie, pour son aide, son soutien, ces conseils et sa patience.*

*Nous exprimons toute notre reconnaissance et gratitude à tous nos chers enseignants, pour leurs efforts à nous garantir la continuité et l'aboutissement de ce mémoire.*

*Enfin, nous tenons également à remercier toutes personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Dédicace

# 2021

Je dédie ce modeste travail, le fruit de plusieurs années d'études et de sacrifices, A la famille ABDELHADI et BOUKHATEM

A Mon très cher père pour son encouragement, son indulgence et son soutien moral qui m'ont précieusement aidée à arriver à terme de ce travail.

Ma très chère mère pour son amour, son affection, tendresse et ses prières pour avoir la force et la volonté pour terminer ce document.

A tous ceux que j'aime et spécialement A mon mari Houcin

avec qui je partage ma vie ,ses joies et ses peines et qui a été toujours à mes cotés pour la réalisation de ce travail.

A Mon frère Yahia qui m'a toujours soutenu, encouragé et aidé das ma vie

mes cher frères Mohamed et Abdelmoumen Que Dieu vous garde et vous protège.

A mes adorable sœurs Manel ,Jamiss et Rihem.

A mes chères copines Khadidja ,Yaya, Amel, Soumia et Imen

A mes belles sœurs Kheira et Halima

A mon groupe Milano

A tout mes enseignants spécialement Mr TAIBI Khaled et RAHMOUN Bilel

A mon binôme Yamna que Dieu la garde



# *Dédicace*

A l'homme de ma vie , mon exemple eternel , a celui qui m'a donné la vie , PAPA rabu yarahmah

A la lumière de mes jours, la sources de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur , maman que j'adore .

A tous ceux que j'aime

.

A ma sœur Bochra qui m'a toujours soutenu, encouragé et aidé dans ma vie

Mes cher frères Mohamed et Nasro Que Dieu vous garde et vous protège.

.A tout ma famille Bachir spécialement Ma grande mère.

Atout ma famille Benhenna spécialement mon grand père et ma grande mère

A tout mes enseignants

A mon binôme Amel que Dieu la garde et la protège

yamna



## Résumé

*Fusarium* est un champignon du sol très diversifié relativement à la génétique, l'écologie et à la pathogénicité des espèces végétales cultivées d'intérêt économique. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé les séquences de 22 souches de *Fusarium* spp., isolées à partir des tiges et des racines de plantes de tomate, présentant des symptômes de pourriture racinaires. La comparaison a concerné les séquences obtenues en amplifiant le facteur d'élongation de la transduction (TEF-1 $\alpha$ ) ; ainsi que, L'espaceur interne transcrit (ITS). Le logiciel bio-informatique Bioedit a été utilisé pour le raffinement et l'alignement des séquences brutes. Trois bases de données ont été utilisées pour comparer les séquences : NCBI blast, Fusarium-ID et Fusarium-MLST. L'identification a montré que les 22 souches au genre *Fusarium* appartiennent aux espèces : *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti* et *F. redolens*. Les résultats ont montré que le gène TEF-1 $\alpha$  donne des pourcentages de similitude très intéressants, par rapport à la région ITS, ainsi que la base Fusarium-MLST donne plus de détails sur les groupes d'espèces, chose qu'on ne trouve pas pour les autres bases de données utilisées

**Mots clés:** *Fusarium*, TEF-1  $\alpha$ , ITS, NCBI blast, Fusarium-ID, Fusarium-MLST, Bioedit.

## Abstract

*Fusarium* is a soil fungus with great diversity in genetics, ecology, and pathogenicity of cultivated plant species of economic interest. In our study, we used the sequences of 22 strains of *Fusarium* spp., isolated from the stems and roots of tomato plants, showing root rot symptoms. The comparison concerned the sequences obtained by amplifying the Transduction Elongation Factor (TEF-1 $\alpha$ ); as well as, the Internal Transcribed Spacer (ITS). Bioedit bioinformatics software was used for the refinement and alignment of the raw sequences. Three databases were used to compare the sequences: NCBI blast, Fusarium-ID, and Fusarium-MLST. Identification showed that the 22 strains of the genus *Fusarium* belong to the species: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, and *F. redolens*. The results showed that the TEF-1 $\alpha$  gene gives very interesting percentages of similarity, compared to the ITS region, as well as the Fusarium-MLST database gives more details on the groups of species, something that we do not find with the other databases used.

**Keywords:** *Fusarium*, TEF-1  $\alpha$ , ITS, NCBI blast, Fusarium-ID, Fusarium-MLST, Bioedit.

## ملخص

الفيوزاريوم هو فطر متنوع للغاية في التربة يتعلق بعلم الوراثة والبيئة ومسببات الأمراض لأنواع النباتات المزروعة ذات الأهمية الاقتصادية.

كجزء من التعريف الجزيئي ، تتعلق دراستنا بـ 22 سلالة من *fusarium spp* معزولة من سيقان الطماطم. يتم تحديد العزلات من خلال خصائصها الخاصة باستخدام عوامل الاستطالة *tef* و *ITS* من أجل التشكل وتسلسل الأشغال متنوعة بسلسلة من PCR لتحديد الشكل الخاص ، ويتم محاذاة بواسطة برنامج BIOEDIT وتحديدتها في ثلاث قواعد من بيانات NCBI ، *Fusarium-ID* و *MLST* يؤكد هذا التحديد ظهور 22 سلالة من جنس الفيوزاريوم والأنواع *F. solani* و *F. equiseti* و *F. redolens* و 2 من السلالات غير المحددة ، كما يظهر أيضًا قد يكون لها خصائص وراثية مميزة جدًا تعكس أصلها متعدد الألقان.

عند إجراء *BLASTs* ، تم استخراج جميع التسلسلات المرجعية القريبة من سلالاتنا من قواعد بيانات *MLST*. اعتمادًا على معايير جودة المحاذاة ، يتم اختيار التسلسل الأكثر صلة. تحتوي معظم النتائج على نفس المناطق التي تمت دراستها كعيناتنا من *MLST* ، مما يجعل من الممكن تحديد التسلسلات وبالتالي جنس وأنواع سلالة نقية

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION	1

### CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Etude bibliographique.....	4
I.1.Genre <i>Fusarium</i> .....	4
I.2.Classification taxonomique du genre <i>Fusarium</i> .....	4
I.3.Aspects morphologiques .....	5
I.4.Importance économique .....	5
I.5.Cycle biologique de <i>Fusarium</i> .....	6
I.6.Effet de la climatique sur les développements des <i>Fusarium</i> .....	7
I.6.1.Effet de la composition du sol sur les développements des <i>Fusarium</i> .....	8
I.6.2.Effet du pH sur les développements des <i>Fusarium</i> .....	8
I.6.3.Effet de la salinité sur le développement du <i>Fusarium</i> .....	8
I.7.Pathogénicité des <i>Fusarium</i> .....	
I.7.Pathogénicité envers végétaux.....	9

### CHAPITRE II : MATÉRIEL & MÉTHODES

II. Matériel et méthodes.....	11
II.1. Objectif du travail.....	11

II.2. Date et lieu de travail.....	11
II.3.Matériel et produits utilisés.....	11
II.3.1 .Matériel végétal.....	11
II.3.2Milieux de culture .....	12
II.3.3.Autres matériel.....	12
II.4. Protocole expérimental.....	13
II.4.1.Isolement à partir des fragments des tiges .....	15
II.4.2.Purification.....	15
II.4.2.1.Repiquage successif.....	15
II.4.2.2.Culture monospore.....	16
II.4.3.Identification des <i>Fusarium</i> .....	19
II.4.3.1.Identification macroscopique.....	19
II.4.3.2.Identification microscopique.....	19
II.4.3.2.1.Technique du drapeau.....	19
II.4.4.Identification et caractérisation moléculaire .....	20
II.4.4.1.Séquence d'ADN utilisées dans l'identification et caractérisation moléculaire.....	20
II.4.4.2 Amorces utilisées pour l'amplification et le raffinement des séquences .....	20
II.4.5.Alignement des séquences .....	21
II.4.5.1.Les étapes d'alignement .....	22

### CHAPITRE III : RÉSULTATS & DISCUSSION

III. Résultats et discussion .....	25
------------------------------------	----



III.1. Isolement des échantillons .....	25
III.2. Culture monospore.....	25
III.3. Identification des isolats.....	27
III.3.1. Identification macroscopique.....	27
III.3.2. Identification microscopique .....	27
III.3.3. Identification et caractérisation moléculaire .....	28
III.3.3.1. Gène ITS.....	30
III.4. Arbre phylogénique du gène TEF-1 $\alpha$ .....	33
III.5. Discussion générale.....	34
Conclusion.....	38
Références bibliographiques.....	40
Annexes.....	44

## Liste des Tableaux

<b>Tableau n° 01 :</b>	Classification du <i>Fusarium</i> .....	4
<b>Tableau n° 02 :</b>	Appareillage, verrerie et produits utilisés.....	12
<b>Tableau n° 03 :</b>	Représente les résultats obtenus après isolement, repiquage et la culture monospore	26
<b>Tableau n° 04 :</b>	Identification moléculaire des souches <i>Fusarium</i> spp. comparées avec les bases de données NCBI-Blast, <i>Fusarium</i> MLST et Fusarium-ID.	28

## Liste des Figures

<b>Figure n° 01 :</b>	Cycle général de maladie flétrissement vasculaire causée par <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> chez la tomate	7
<b>Figure n° 02 :</b>	Echantillonnages des tiges des tomates.....	11
<b>Figure n° 03 :</b>	Isolement à partir d'une tige de plante tomate sur milieu PDA	15
<b>Figure n° 04 :</b>	Dilution décimale de la charge sporale .....	17
<b>Figure n° 05 :</b>	Schéma démonstratif des étapes de la purification du champignon par culture monospore	18
<b>Figure n° 06 :</b>	Schématisation de la technique du drapeau utilisée pour l'observation d'une empreinte fongique.	20
<b>Figure n° 07 :</b>	Interface du logiciel Bioedit version 7.2.5 (12/11/2013).....	21
<b>Figure n° 08 :</b>	un exemple de séquence affiné par BIOEDIT .....	23
<b>Figure n° 09 :</b>	Résultat de l'isolement du champignon à partir d'une tige de tomate .	25
<b>Figure n° 10 :</b>	Observations microscopiques du mycélium et des différentes conidies produites par les espèces de <i>Fusarium</i> .....	27
<b>Figure n° 11 :</b>	Arbre phylogénétique présenté par logiciel BIOEDIT.....	33
<b>Figure n° 12 :</b>	Préparation de milieu PDA.....	44
<b>Figure n° 13 :</b>	Schéma de la région ITS (Andrien 2013).....	46
<b>Figure n° 14 :</b>	Schéma de la région TEF-& chez <i>Fusarium</i> , avec l'emplacement des amorces.....	46

## Liste des abréviations

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique.

**ADNr:** Acide Désoxyribonucléique ribosomique.

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**F. :** *Fusarium*.

**ITS:** Internal Transcribed Spacer.

**pb :** paire de base

**PCR :** Polymerase Chain Reaction

**PDA:** Potato Dextrose Agar.

**spp. :** espèces.

**TEF :** Translation Elongation Factor

**NCBI BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**MLST :** Multilocus Sequence Typing



# ***INTRODUCTION***

L'étude d'un organisme pathogène implique de maîtriser son identification. De plus, dans un souci d'exactitude, il faut pouvoir vérifier l'identité du champignon utilisé tout au long des expériences. L'identification correcte d'un pathogène est également un élément clé dans le suivi des épidémies sur le terrain.

Les champignons comportent des agents phytopathogènes très importants, tant par leur

Présence dans le sol ou l'air, que par leur résistance et leur production de métabolites

Secondaires, capables de dégrader les parois cellulaires de la plante. Les infections fongiques

Sont particulièrement plus graves lors des périodes humides et chaudes, autrement dit, les

Facteurs qui favorisent une croissance optimale de la plante, favorisent à leur tour la

Prolifération des agents fongiques, vu que les facteurs favorisant la croissance de l'hôte et du

Pathogène, tel que la température et l'humidité sont généralement les mêmes (Richard, 2012).

Parmi les principaux agents des maladies fongiques sont : fusarium

La taxonomie des espèces de *Fusarium* a été une question controversée, les espèces de *Fusarium* sont parmi les plus importants agents pathogènes des plantes dans le monde, et de nombreuses espèces de *Fusarium* produisent des mycotoxines qui provoquent des maladies animales et humaines. Le genre *Fusarium* a été introduit par Link en 1809. "Die Fusarien", publié par Wollenweber et Reinking en 1935, décrit 65 espèces, 55 variétés et 22 formes de *Fusarium*. En 1945, Snyder et Hansen ont réduit le nombre d'espèces de *Fusarium* à neuf. Dans les années 1990, l'application du concept d'espèce phylogénique basé sur le séquençage de l'ADN a permis d'introduire de nouvelles espèces de *Fusarium* qui ne peuvent être distinguées morphologiquement. En 2006, Leslie et Summerell ont intégré les concepts d'espèces morphologiques, biologiques et phylogéniques et ont publié "The *Fusarium* Laboratory Manual", qui fournit des détails sur l'identification de 70 espèces de *Fusarium*. Bien que des recherches considérables aient été menées sur le *Fusarium* au cours des 200 dernières années, les maladies dues au *Fusarium* continuent de figurer parmi les maladies végétales les plus importantes. Les champignons *Fusarium* sont les plus répandus dans les régions céréalières du monde et produisent une diversité de mycotoxines, dont la zéaralénone, la fumonisine, la moniliformine et les trichothécènes, qui provoquent divers troubles, dont le cancer, chez les animaux et les humains (Babadost, 2018).

Les développements rapides des techniques de biologie moléculaire durant les deux dernières décennies, se sont accompagnés de la génération croissante d'informations. Le traitement de ces informations a pu être réalisé grâce aux progrès de l'informatique, en particulier des outils logiciels. Les gains de temps engendrés par des outils puissants sont considérables : par exemple, l'assemblage d'un millier de séquences peut être réalisé en quelques secondes (Didier, 2004).

L'alignement des séquences est une manière de représenter deux ou plusieurs séquences de macromolécules biologiques (ADN, ARN ou protéines) les unes sous les autres, de manière à en faire ressortir les régions homologues ou similaires. L'objectif de l'alignement est de disposer les composants (nucléotides ou acides aminés) pour identifier les zones de concordance. Dans cette étude, les alignements sont réalisés par le programmes informatique Bioedit 7.2.5 nous avons comparé les performances en termes d'identification de gènes couramment utilisés pour l'identification (ITS et TEF-1 $\alpha$ ), ainsi que nous avons comparé dans les bases de données NCBI-BLAST, Fusarium-ID et Fusarium MLST.

Quelle est la meilleure cible Moléculaire et la Meilleure base de données pour l'identification des espèces de fusarium ?





**Chapitre I :**

**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Etude bibliographique

### I.1. Genre *Fusarium*

Appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée n'a pas été observée. Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septé et la production de conidies hyalines généralement unicellulaires sur des conidiophores libres ; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (**Lepoivre, 2003**). De plus, *Fusarium* produit des macroconidies composées de 2 à plusieurs cellules. Leur forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue est un des critères d'identification des représentants du genre ; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (**Seifert, 2001**). La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante parmi les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (**Thrane, 2001**)

### I.2. Classification taxonomique du genre *Fusarium*

Selon **Debourgogne (2013)**, la nouvelle classification taxonomique du genre *Fusarium* basée sur la phylogénie moléculaire est la suivante :

**Tableau 01 : classification du *Fusarium* (CHEVALIER, 2019)**

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Sordariomycetes
Sous classe	Hypocreomycetidae
Ordre	Hypocreales
Famille	Nectriaceae
Genre	<i>Fusarium</i>

### I.3. Aspects Morphologiques

Les champignons du genre *Fusarium* appartiennent aux hyalo-hyphomycètes et présentent un mycélium septé et incolore. En culture, les colonies présentent souvent des nuances roses, jaunes, rouges ou violettes (**Booth, 1985 ; Alves-Santos, 1999; Katan et Ortoneda., 2003**).

Les cellules conidiogènes se forment sur des hyphes aériens ou sur des conidiophores courts et densément branchés. Les conidies sont de trois types : macroconidies, microconidies et blastoconidies.

Les macroconidies falciformes, avec plusieurs septa transverses, une extrémité apicale crochue et une base pédicellée sont produites en basipétale (croissance à partir de la base) par les monophialides ou les sporodochia (agrégats de conidiophores) et sont accumulées en masse.

Les microconidies sont ellipsoïdes, ovoïdes, subsphériques, pyriformes, claviformes ou allantoïdiennes, généralement unicellulaires et présentent une base arrondie ou tronquée. Elles sont produites en séries basipétales sur des mono ou polyphialides et accumulées en petites têtes ou en chaînes. Les blastoconidies sont produites séparément sur des cellules polyblastiques et présentent de 0 à 3 septa.

Des chlamydospores, souvent présentes, sont hyalines ou pâles, intercalaires ou terminales et possèdent une paroi épaisse (**De Hoog , 2011**).

### I.4. Importance économique

Genre *Fusarium* est économiquement très important et regroupe de nombreuses espèces phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes. Ce nombre de plantes-hôtes varie selon les espèces de *Fusarium*.

L'importance économique de la fusariose de l'épi de l'orge (FHB) est attribuée aux pertes de rendements considérables et à l'altération des grains par les mycotoxines et les rendent impropre à la consommation. Très peu d'investigations ont été conduites en Algérie, surtout dans la région des hautes plaines Sétifiennes sur la maladie, en vue d'identifier les espèces, d'évaluer leurs fréquences et sévérités, de détecter leurs potentiels toxigènes, et leurs répartitions géographiques.

De plus, de comprendre le développement épidémiologique de la maladie par la relation entre la fusariose de l'épi de l'orge (FHB) et certains facteurs liés à l'itinéraire technique adopté par les céréaliers notamment la variété, le travail du sol et la rotation adoptée. Les espèces du genre *Fusarium* sont des pathogènes responsables des pertes économiquement importantes chez la majorité des cultures.

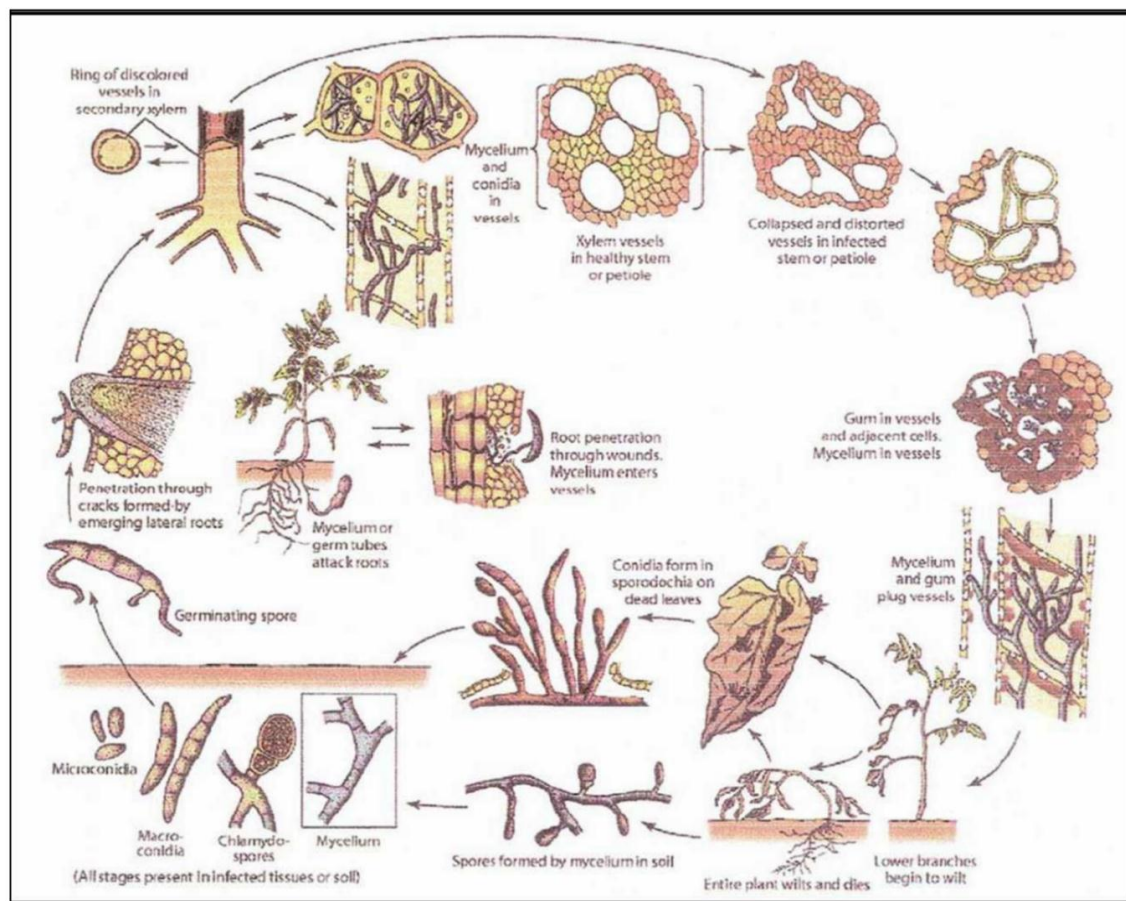
Ces agents pathogènes peuvent causer la fonte de semis, la pourriture des racines et du collet (**Hammia Guenouni, 2019**).

### **I.5. Cycle biologique de *Fusarium***

Les espèces du *Fusarium* ne sont pas des parasites obligatoires, en absence de la plante hôte, ils mènent une vie de saprophyte sur des débris végétaux et des matières organiques. Les isollements effectués indiquent qu'un gramme de sol renferme près de 100.000 propagules (Smith, 1965) et les *F. oxysporum* représentent 40-70% de la population fusarienne totale.

Ces champignons persistent dans le sol principalement sous forme de spores de résistance (chlamydospores) en état de dormance (**Booth, 1971**). En contact de l'hôte et une fois les conditions favorables, les chlamydospores germent et les jeunes filaments pénètrent au niveau des racines.

Après pénétration dans la cellule épidermique, le mycélium se ramifie, colonisent ainsi toutes les cellules avoisinantes. Les hyphes mycéliens progressent à l'intérieur des cellules puis colonisent le cortex, arrivé au niveau du cylindre central, le parasite s'installe dans les vaisseaux du xylème d'où il se propagera dans la tige par l'intermédiaire des microconidies aisément véhiculées par la sève dans toutes les parties de la plante. A la surface des feuilles, se forment des organes fructifères appelés sporodochies qui produisent des macroconidies qui vont à leur tour contaminer d'autres plantes lorsqu'elles sont transportées par le vent, par l'eau ou bien par l'intermédiaire des insectes (**El Mahdjoub, 1972**)



**Figure n°1:** cycle général de maladie flétrissement vasculaire causée par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* chez la tomate (Agrios 2005).

## I.6. Effets de la climatique sur le développement des *Fusarium*

Les facteurs climatiques, en particulier l'humidité et la température, jouent un rôle primordial dans le développement des *Fusarium* en conditionnant la germination et l'infection de ceux-ci (Siou, 2013).

Selon (Bérubé et al. 2009), le climat est le facteur le plus déterminant dans le développement des *Fusarium*. Ces auteurs ont identifié la pluie et l'humidité relative de l'air comme deux variables climatiques favorisant l'expansion de la fusariose de l'épi du blé et de l'orge.

La température influence le développement des *Fusarium*, et constitue de manière générale un paramètre essentiel du développement des champignons phytopathogènes (Bernard, 2012).

Elle influence fortement la plupart des processus métaboliques des organismes vivants, et affecte presque tous les aspects de leur croissance et de leur développement. Il a été notamment montré qu'elle influence fortement la production de spores chez les *Fusarium* (Doohan et al., 2003).

### **I.6.1. Effets de la composition du sol sur le développement des *Fusarium***

Les activités biologiques et les propriétés physico-chimiques du sol présentent une forte interdépendance (Boudoudou et al., 2009). En effet, les études ont montré que les éléments chimiques favorisent ou inhibent la croissance, la germination et la sporulation des *Fusarium* (Nyiransengiyumva, 2007).

Les sols argileux à forte capacité d'échange cationique et riche en éléments nutritifs favorisent l'installation et le développement des *Fusarium* et les sols ayant un pourcentage élevé en sable et une sodicité supérieure à 30% présentent une faible charge fongique (Boudoudou et al., 2009). Les sols pauvres en matières organiques ont une faible capacité d'accueil des *Fusarium* (Mahdi, 2011).

La fertilisation organique conduit à l'augmentation de la teneur en carbone organique dans le sol (Mohamed, 2006), ce qui favorise le développement des microorganismes antagonistes aux *Fusarium* (Alabouvette et al., 2009).

### **I.6.2 .Effets du pH sur le développement des *Fusarium***

Le pH du sol affecte également le développement des *Fusarium*, car la croissance mycélienne et la germination des conidies sont restreintes à une certaine gamme pour chaque espèce. Cette gamme de pH peut être large ou restreinte en fonction des espèces.(Beyer et al., 2004) .

### **I.6.3.Effets de la salinité sur le développement des *Fusarium***

La salinité du sol et de l'air constitue l'un des éléments de l'environnement qui conditionnent la survie, le développement et le degré d'infection des champignons phytopathogènes (Regragui, 2005).

## I.7. Pathogénicité des *Fusarium*

Les espèces du *Fusarium* touchent aussi bien le règne végétal que le règne animal. Les effets sont divers selon l'espèce affectée et peuvent être directs ou indirects.

## I.8. Pathogénicité pour les végétaux

Dès 1930, les *Fusarium* ont été associés à des toxicoses sur des grains humides dans les fermes. Aujourd'hui, 81 des 101 plantes présentant une importance économique sont associées à une maladie à *Fusarium*. *F. graminearum* et *F. oxysporum* sont respectivement classés 4 et 5ème du point de vue des champignons pathogènes pour les plantes en raison de leur prédominance et de leur potentiel mycotoxinogène. Les trois premiers champignons du classement, réalisés par un consortium de pathologistes en association avec le journal « Molecular Plant Pathology », sont :

1. *Magnaporthe oryzae*,
2. *Botrytis cinerea*,
3. *Puccinia* spp. (Dean et al. 2012).

Les infections à *Fusarium* sont communément nommées par le terme générique « fusarioses ». Cette maladie des céréales dites « à petits grains » est présente partout dans le monde. Elle engendre des pertes économiques très importantes. Ainsi, en 2011, il est estimé qu'elle a entraîné une perte de 2,7 milliards de dollars dans les états du centre et du nord des USA (Sophie, 2015).

## **Chapitre II**

# **MATÉRIEL & METHODES**



## II. Matériel et Méthodes

Dans notre travail, nous avons choisi la culture de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), et les logiciels BIOEDIT et MEGA –X

### II.1. Objectif du travail

Notre principal objectif est la comparaison de deux gènes et trois bases de données utilisés pour l'identification moléculaire des espèces de *Fusarium*. Nous avons aussi réalisé un isolement et une identification classique des isolats obtenus à partir des plantes de tomates prélevées de 4 régions différentes (Oran, Mostaganem, Skikda et Guelma).

### II.2. Date et lieu de travail

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire B de microbiologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, université Ibn Khaldoun, Tiaret, durant la période du 13 avril 2021 jusqu'au 25 Mai 2021

### II.3. Matériel et produits utilisés

Le matériel utilisé pour réaliser cette étude est composé de verreries, des appareils il comprend aussi un ensemble de réactifs et produits pharmaceutiques.

#### II.3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal de notre étude est 4 échantillons (tiges de tomate) de 4 régions différents (Oran, Mostaganem, Skikda et Guelma)



Figure n° 02 : Échantillonnages des tiges des tomates.

### II.3.2. Milieux de culture

Les milieux de culture qui ont été utilisés pour l'isolement, la purification des champignons sont respectivement : PDA, AGAR 2% (Annexe 1).

### II.3.3. Autre matériel

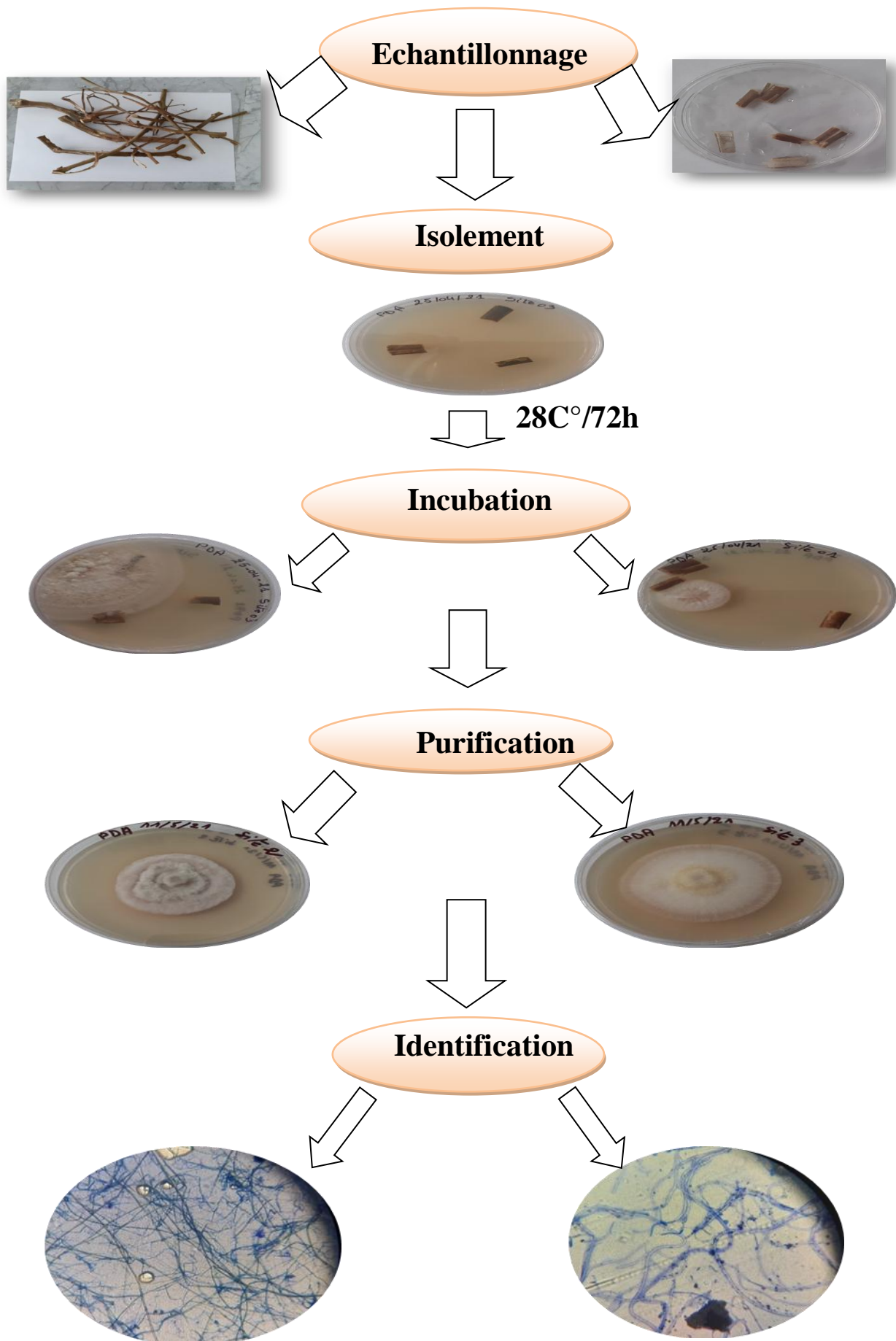
Les appareillages utilisés dans ce travail sont :

**Tableau n° 02 : Appareillage, verrerie et produits utilisés.**

Verreries	Appareillages	Produits	Autres
Bécher	-Balance magnétique « <b>KERN EW</b> »	Eau distillée stérile	Boîtes de Pétri
Pipette pasteur		-Bleu de méthylène	-Bec Bunsen
Tubes à essais	-Agitateur	-Antibiotique	- Anse de platine
lames	« <b>IKA RCT BASIC</b> »	(Céphazoline)	-Pince de platine
-Flacons	-Autoclave « <b>WOLF</b> »	-Eau de javel	-Portoir de tube à essais
	-Vortex « <b>VIBROFIX ELECTRONIQUE VF1</b>		-Pissettes
	-Incubateur de 28°C		-Tubes sec
	« <b>BINDER</b> »		-Sureinges
	-Incubateur de 37°C		
	« <b>MEMMERT</b> »		
	-Lame de Malassez		
	-Microscope optique		
	« <b>OPTIKA B350</b> »		
	- -Balance de précision		
	« <b>KERN ALS 120-4N</b> »		

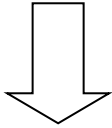
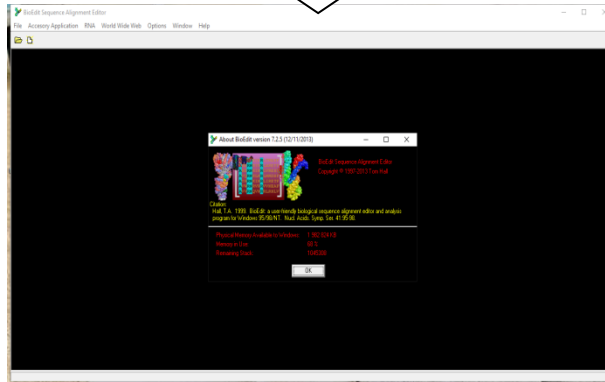
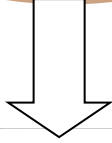
## II.4. Protocole expérimental

## PARTIE 01

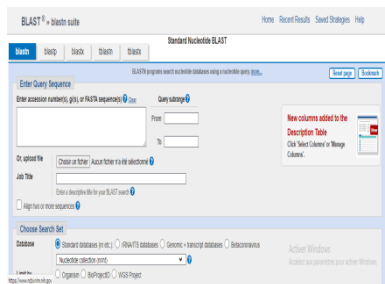
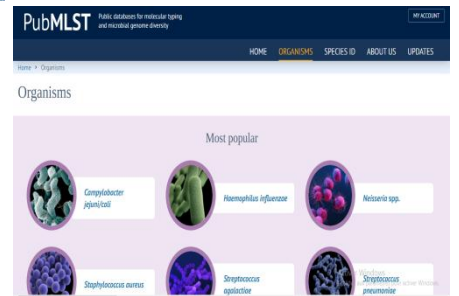
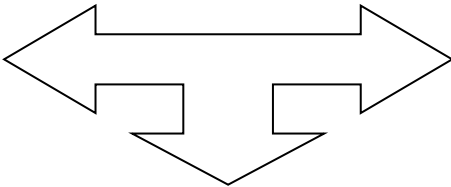
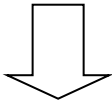


# PARTIE 02

## Alignement



## Les souches



### II.4.1. Isolement à partir des fragments des tiges

Il existe plusieurs techniques d'isolement à partir de la plante selon la taille du matériel végétal (tiges)

La technique d'isolement utilisée est celle décrite par (Davet et Rouxel 1997) avec quelques modifications. Nous avons d'abord découpé longitudinalement le matériel végétal (racines, tiges et feuilles) en petits fragments d'environ 2 cm, que nous avons ensuite rincé à l'eau distillée, puis désinfecté avec l'hypochlorite de sodium (eau de javel) 5% pendant trois minutes, pour une désinfection superficielle et afin d'éliminer les saprophytes.

Les fragments ont été rincés trois fois avec de l'eau distillée stérilisée pour éliminer les traces de l'hypochlorite de sodium. Après rinçage, 2 à 3 fragments ont été placés sur le milieu PDA (Annexe n° 1) + ATB (cefazoline) pour minimiser la contamination, ces dernières sont incubées à 28°C pendant une semaine.

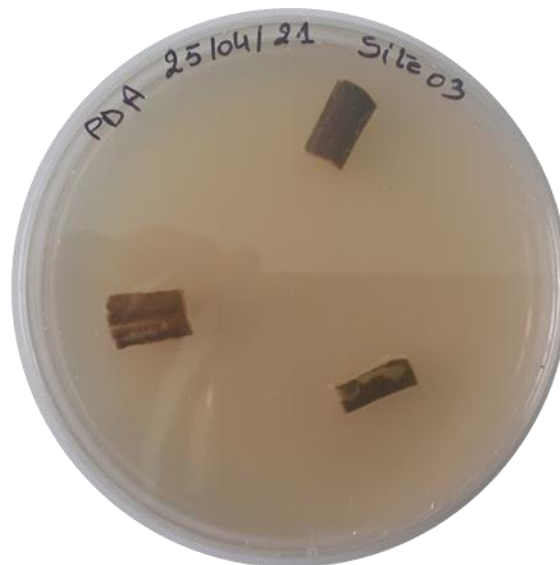


Figure n°03 : Isolement à partir d'une tige de plante tomate sur milieu PDA.

### II.4.2. Purification

#### II.4.2.1. Repiquage successif

Après une semaine d'incubation, des filaments mycéliens apparaissent autour des petits fragments des tiges. A partir de là, nous procédons alors à la recherche du *Fusarium*.

Après une identification primaire, nous effectuons des repiquages successifs dans de nouvelles boîte de Pétri contenant du milieu PDA + ATB (cefazoline) pour obtenir des cultures plus ou moins pures.

Néanmoins, les cultures obtenues risquent d'être contaminées par des bactéries et par des champignons qui sont parfois invisibles et afin d'éviter ce risque, le procédé le plus simple et le plus sûr reste celui de la culture monospore (**Rapilly, 1968 ; Zerrouk, 1994**).

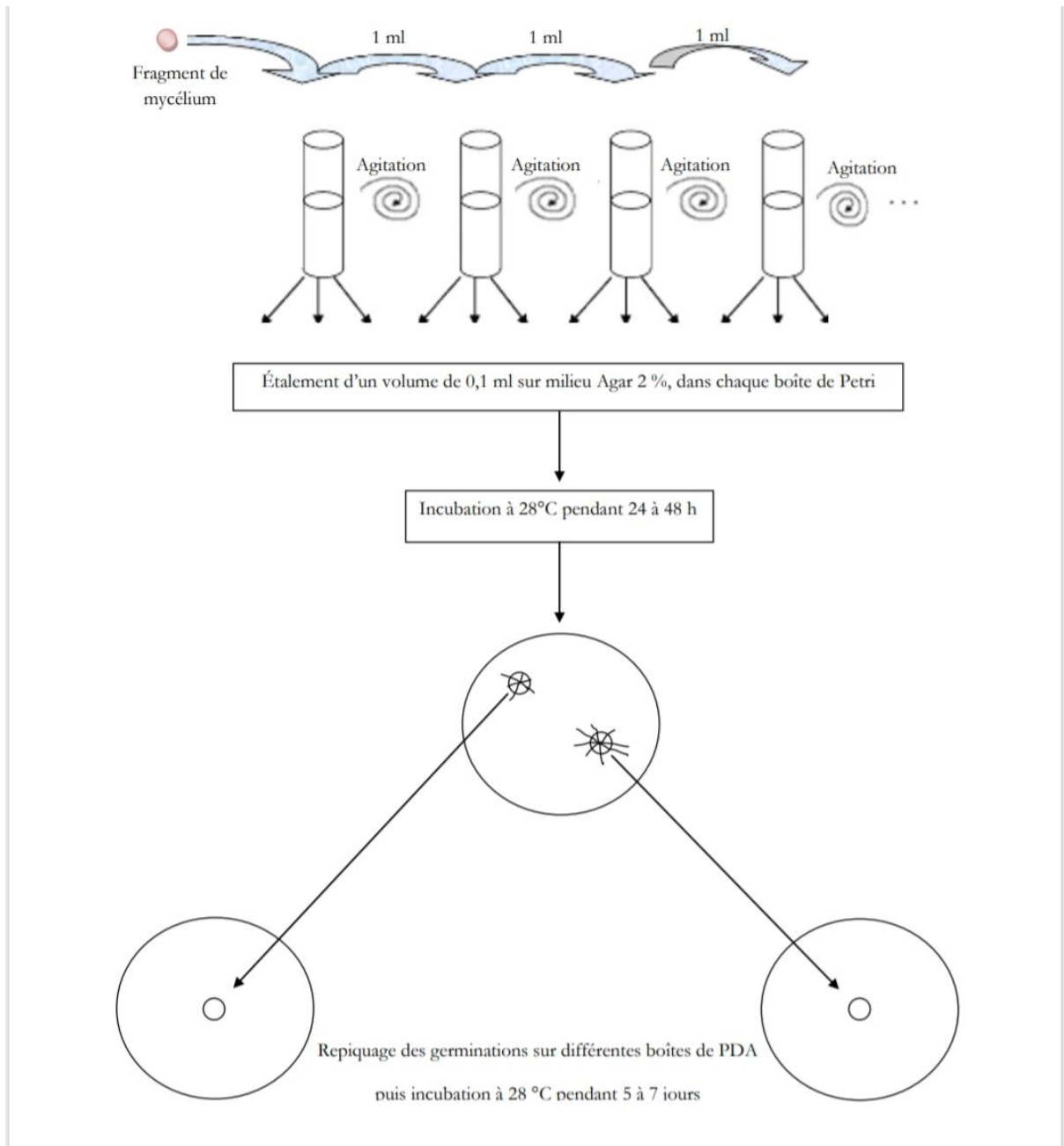
#### **II.4.2.2. Culture monospore**

La technique de la culture monospore (voir figure7) permet d'obtenir une culture pure à partir des spores fongiques par étalement dans un premier temps, repiquer la souche à monospore dans une boîte contenant du milieu PDA et la laisser se développer sur la totalité de la surface de la boîte pendant 5 à 6 jours.

- Prélever un explant à partir de la périphérie de la boîte et l'introduire dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile, après agitation, on obtient une suspension.
- On effectue des dilutions au dixième à partir de la suspension sporale.
- On prélève 1 ml de la suspension sporale que l'on introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile puis on agite.
- On répète l'opération autant de fois jusqu'à la dilution voulue.
- A partir des deux dernières dilutions ( $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ), on prélève 1 ml que l'on étale à l'aide de billes stériles sur milieu malt triton.
- Après 24h d'incubation à 28°C, à l'aide d'une loupe binoculaire, on procède au repérage et à la délimitation des spores en germination.
- On prélève 3 à 4 conidies que l'on dépose dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA (**Blancard, 1988**)



**Figure n°04:** Dilution décimale de la charge sporale.



**Figure n° 05** : Schéma démonstratif des étapes de la purification du champignon par culture monospore.



### II.4.3. Identification des *Fusariums*

La purification des isolats nous a permis par la suite de réaliser une identification morphologique, en se basant sur les caractères macroscopiques et microscopiques.

#### II.4.3.1. Identification macroscopique

Pour procéder à l'identification macroscopique des champignons purifiés, nous avons utilisé la méthode décrite par (Booth, 1984 et Nelson et al., 1981) avec quelques modifications. Cette identification est basée sur des observations à l'œil nu. Nous avons noté les caractères culturels notamment : la pigmentation de la face et de l'envers des colonies, la vitesse de croissance, le contour des colonies et l'aspect du mycélium en prenant en considération le morphotype.

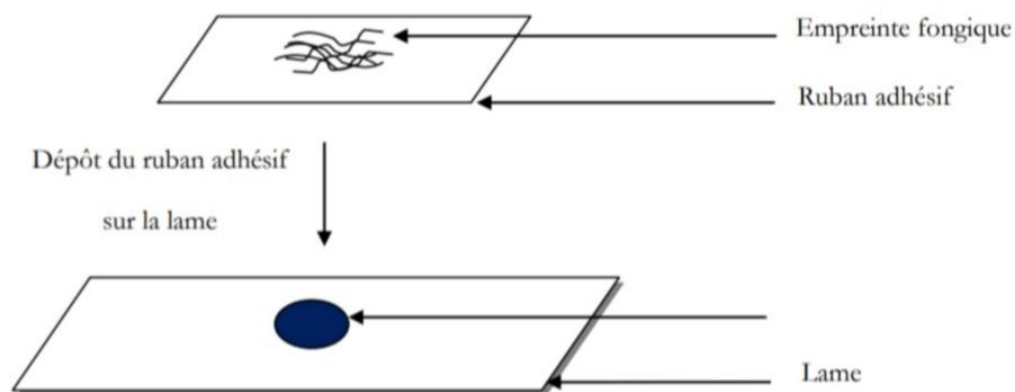
#### II.4.3.2. Identification microscopique

Les caractères microscopiques ont été identifiés par technique du drapeau :

##### **Technique du drapeau :**

Pour une bonne observation des caractères microscopiques des champignons, nous avons utilisé la technique du drapeau (Figure n °8) décrite par (Guezlane-Tebibel et al. 2011) qui permet d'examiner directement une culture mycélienne sur une lame et qui pourra être conservée par la suite.

Cette technique consiste à prélever une empreinte sur le bord de la colonie fongique, par un fragment de ruban adhésif. Nous avons recollé ce dernier sur une lame, sur laquelle nous avons préalablement déposé une goutte de bleu de coton. Par la suite, on est passé directement à l'observation par microscope optique au grossissement 400.



**Figure n° 06** : Schématisation de la technique du drapeau utilisée pour l'observation d'une empreinte fongique.

## II.4.4. Identification et caractérisation moléculaire

### II.4.4.1. Séquence d'ADN utilisées dans l'identification et caractérisation moléculaire

Les séquences d'ADN utilisées dans ce travail résultent de l'amplification du gène TEF-1 $\alpha$  et de la région ITS de 22 souches de *Fusarium* spp., par les auteurs **Yezli et al., 2019** et **Zebboudj et al., 2020**.

### II.4.4.2. Amorces utilisés pour l'amplification et le raffinement des séquences

L'utilisation des amorces EF-1 et EF-2 permet d'amplifier une région génomique d'intérêt phylogénétique, qui est le gène du facteur d'élongation de la transduction-1 $\alpha$ , avec un poids moléculaire d'environ 700 pb pour le genre *Fusarium*.

Les amorces EF-1 et EF-2 (**O'Donnell et al., 1998**), dont les séquences sont les suivantes :

EF1 (5' – ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC – 3') (20 bases et 47.5% GC).

EF2 (5' – GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT – 3') (21 bases et 45.2% GC).

L'identification moléculaire des cultures fongiques basée sur la région ribosomique conservée de l'espaceur interne transcrit (ITS). Les régions ITS entre les petits ADNr

nucléaire 18S et les grands ADNr nucléaire 28S, y compris ADNr 5,8S, ont été amplifiées en utilisant les paires d'amorces universelles ITS1 et ITS4 (White et al., 1990), dont les séquences sont les suivantes :

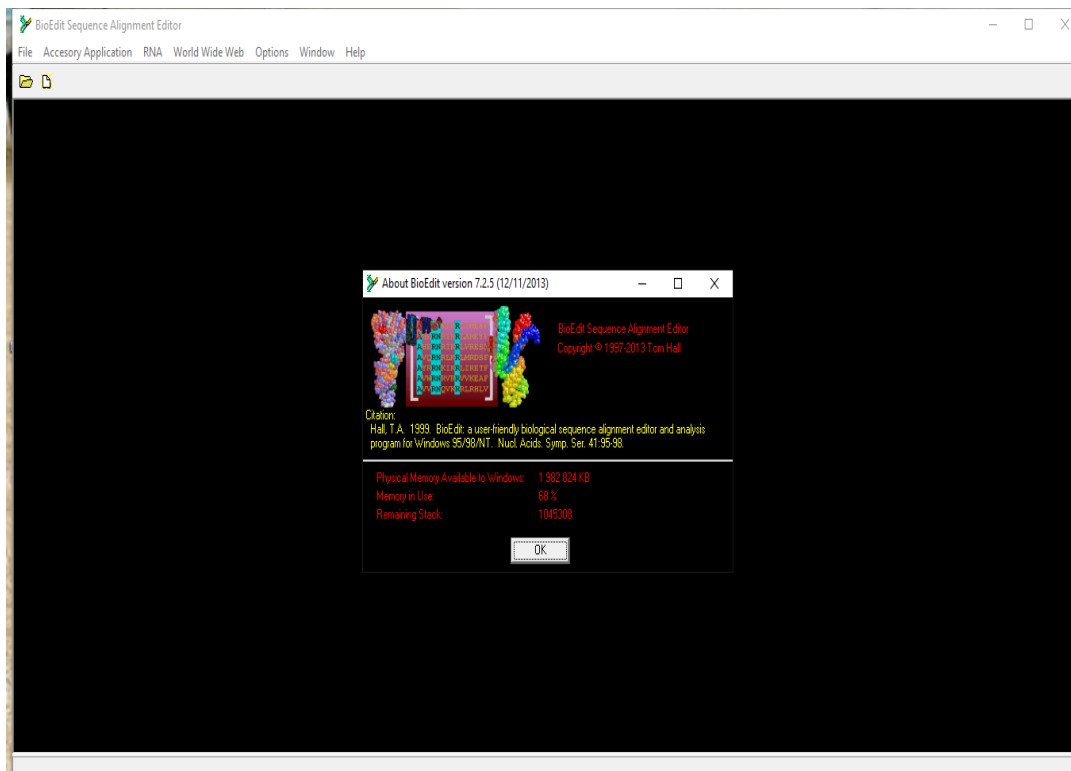
ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (Forward).

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Reverse).

Le logiciel BioEdit® a été utilisé pour l'affinement des séquences, qui ont été comparées avec les bases de données : NCBI Blast® et Fusarium-ID et Fusarium-MLST (Juin 2021).

#### II.4.5. Alignement des séquences

En bio-informatique, l'alignement de séquences (ou alignement séquentiel) est une manière de représenter deux ou plusieurs séquences de macromolécules biologiques (ADN, ARN ou protéines) les unes sous les autres, de manière à en faire ressortir les régions homologues ou similaires. Notre l'alignement on le fait à l'aide de logiciel BIOEDIT version 7.2.5 (12/11/2013)



**Figure n° 07:** Interface du logiciel Bioedit version 7.2.5 (12/11/2013)

### II.4.5.1. Etapes d'alignement

Bioedit est l'un des programmes les plus couramment utilisés dans les études de biologie moléculaire. Il a été initialement développé en tant qu'éditeur d'alignement de séquences biologiques écrit pour windows uniquement.

La première étape c'est d'obtenir la portion désirée d'ADN. On ouvre les fichiers ab1 Forward et on reverse de notre séquence, on trouve la fenêtre avec les ondes du chromatogramme de la séquence. Si nous avons une séquence nette, on doit voir des pics clairs et sans ambiguïté représentant A, T, C et G. Utilise la barre de défilement sur la gauche pour ajuster la hauteur des vagues si on a du mal à les voir. On défile par la suite vers la droite jusqu'à la fin des ondes du chromatogramme (environ 410 paires de bases). La séquence générée au-delà de ce point est de l'ADN indésirable. On note où se trouve le point final de notre séquence. Puis on trouve la fenêtre avec la séquence Forward au format fasta (juste des lettres, pas d'ondes de chromatogramme)

- a) On change le mode de « Sélectionner/glisser » à « Modifier » dans le menu déroulant dans le coin supérieur gauche.
- b) On met en surbrillance tout ce qui se trouve au-delà du point final de la séquence souhaitée et supprime-le.

\*\*Vous pouvez cliquer et faire glisser manuellement pour tout sélectionner, ou : je. Cliquez sur le point final souhaité et. Allez à "sélectionner pour terminer" sous la fonction "Modifier" dans la barre d'outils supérieure.

Mettre en avant et inverser des séquences ensemble

Ensuite, on sélectionne le nom du fichier de formulaire Reverse fasta sur le côté gauche et on appuie sur Shift+Ctrl+R pour générer un brin de complément inverse. Maintenant, les séquences directe et inverse s'exécutent dans la même direction et ont (principalement) les mêmes nucléotides.

- Double-cliquer sur le nom du fichier à gauche de la séquence pour ouvrir une nouvelle fenêtre d'édition.
- Mettre en surbrillance et copier toute la séquence (Ctrl+C)
- Accélérer à la fenêtre Fasta de la séquence avant. Sélectionnez "nouvelle séquence" sous la fonction "Séquence" dans la barre d'outils supérieure.
- a. Coller la séquence inversée dans la nouvelle fenêtre (Ctrl+V)
- b. Renommer cette nouvelle séquence « R » dans le champ « Nom ».
- c. Sélectionner « ADN » pour « Type de séquence » pour obtenir les couleurs de nucléotides appropriées.

On sélectionne « Appliquer et fermer ». Maintenant, les deux séquences devraient apparaître dans notre fenêtre Forward.

La deuxième étape c'est modification de l'alignement, dans le champ « Application accessoire » dans la barre d'outils supérieure, on sélectionne « Alignement multiple ClustalW ». Ce programme fera correspondre nos deux brins. clique sur « Exécuter ClustalW » et « OK » lorsque les fenêtres du programme s'affichent. Après, o, passe la souris sur les icônes colorées représentant les différents modes d'affichage. On

sélectionne « ombrer les identités et les similitudes ». Cela permet de voir plus facilement quelles parties de vos séquences avant et arrière correspondent. Ensuite, on commence à éditer les incohérences à partir de la fin de la séquence. On reporte aux chromatogrammes pour voir quelle onde nucléotidique est la plus importante ou la plus fiable pour chaque ambiguïté. (Cela peut être délicat si notre échantillon est contaminé.)

- a) Dans notre fenêtre de chromatogramme de la séquence inversée, on sélectionne « Complément inversé » sous la fonction « Affichage » dans la barre d'outils supérieure. Cela nous permet de voir les vagues pour le complément inverse. (Les premières centaines seront de l'ADN indésirable qui se trouvait à la fin de la séquence.)
- b) Pour localiser les régions en question dans la fenêtre du chromatogramme, copiez/collez une petite partie de la séquence alignée dans la requête de recherche. (Ctrl+F)
- c) On garde une trace de la séquence que nous regardons lorsque nous vérifions les paires de bases !

Après, on supprime les 10 premières paires de bases du début de votre séquence (là où les amorces se sont hybridées), lorsque nous avons terminé, double-clique sur le nom du fichier pour la rangée supérieure ou inférieure (elles sont identiques) pour ouvrir une fenêtre d'édition distincte. Finalement, on copie et on colle cette nouvelle séquence dans Microsoft Word et enregistre-la pour l'utiliser pour BLAST.

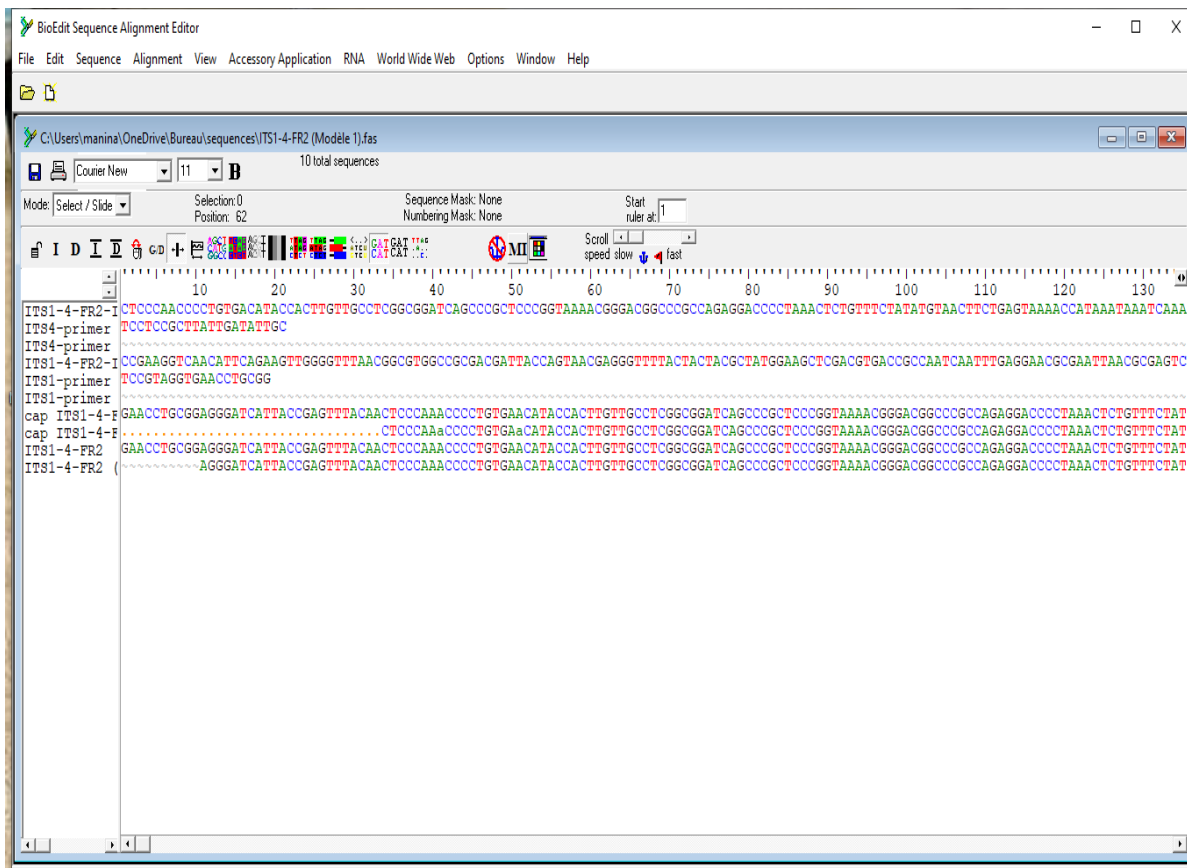


Figure n° 08 : un exemple de séquence affiner par BIOEDIT

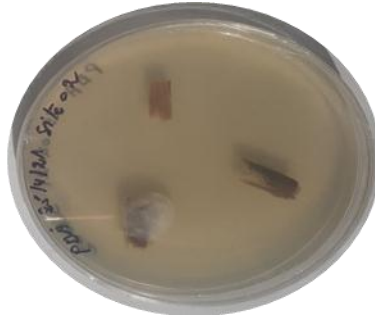
*Chapitre III*

**RÉSULTATS & DISCUSSION**

### III. Résultats et discussions

#### III.1. Isolement des échantillons

Les résultats obtenus de l'isolement après 72 heures d'incubation, où nous avons remarqué des germinations mycéliennes des fragments de plantes déposés sur le milieu PDA, comme indiqué sur la Figure. Les isolats obtenus ont été purifiés par la culture monospore






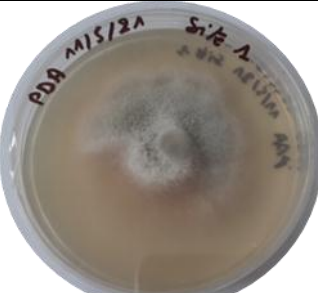








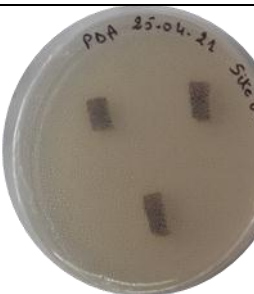


**Figure n° 09** : Résultat de l'isolement du champignon à partir d'une tige de tomate.

#### III.2. Culture monospore

Après 24h d'incubation à 28°C, on procède au repérage et à la délimitation des spores en germination. On prélève 3 à 4 conidies que l'on dépose dans une boîte de Pétri contenant du milieu PDA.

Après incubation, des cultures pures sont obtenues (voir fig.20), dans le cas contraire une culture monospore est réalisée à partir des cultures obtenues

**Tableau n°03** : représente les résultats obtenus après isolement, repiquage et la culture monospore

	24h	72h	Quelques jours	repiquages
<b>site 1</b>				
<b>site 2</b>				
<b>site 3</b>				
<b>site 4</b>				



### III.3. Identification des isolats

Après la culture monospore on a réalisée identification des isolats de *Fusarium*, selon la méthode classique qui repose sur les critères morphologiques (macroscopiques et microscopiques), ainsi qu'avec une méthode moléculaire en séquençant la région ITS et TEF-1 $\alpha$  de l'ADNr

#### III.3.1. Identification macroscopique

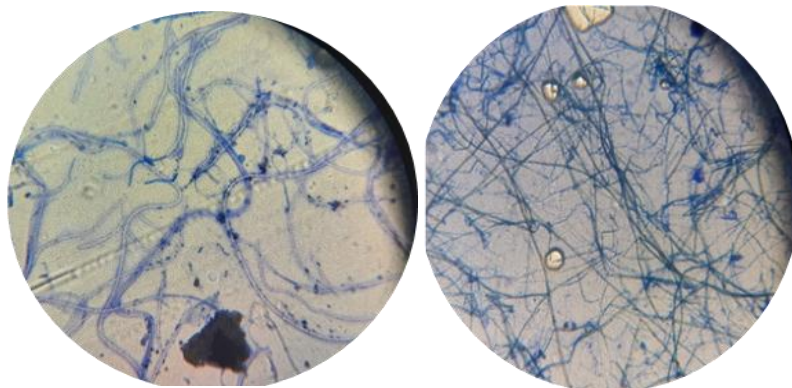
L'observation macroscopique sur le milieu PDA, nous a permis de sélectionner vingt-deux (22) souches appartenant au genre *Fusarium*. Cette identification macroscopique, nous a permis de mettre en évidence quatre (4) morphotypes différents, qui sont : le morphotype duveteux, cotonneux, rhizomorphe et ras muqueux. Nous avons observé une pigmentation variable, qui varie entre mauve, beige, blanchâtre, violette et rosâtre.

#### III.3.2. Identification microscopique

L'observation microscopique révèle que nous souches produisent les trois types de spores :

- 1- Les microconidies sont unicellulaires ou bicellulaires, globuleuses ou arrondies, elles sont formées sur des phialides courtes, perpendiculaires aux filaments.
- 2- Les macroconidies sont pourvues de 2 à 3 cloisons, leur taille varie considérablement.
- 3- Les chlamydospores sont présentes en position terminales ou intercalaire.

Ces spores sont produites en quantité différente selon la morphotype des souches



**Figure n° 10 :** Observations microscopiques du mycélium et des différentes conidies produites par les espèces de *Fusarium*.

### III.3.3. Identification et caractérisation moléculaire

**Tableau 4.** Identification moléculaire des souches *Fusarium* spp. Comparées avec les bases de données NCBI et *Fusarium* MLST database et Fusarium-ID (Consultées en Juin 2021).

Code	Genre et espèce selon NCBI	Longueur de la séquence (pb)	Similitude (NCBI)	Souche de référence (NCBI)	Genre et espèce selon <i>Fusarium</i> MLST database	Similitude ( <i>Fusarium</i> MLST database)	Souche de référence ( <i>Fusarium</i> MLST database)	Genre et espèce selon <i>Fusarium</i> ID	Similitude ( <i>Fusarium</i> ID)	Souche de référence ( <i>Fusarium</i> ID)
WY01	<i>Fusarium oxysporum</i>	704 pb	100 %	MK503786.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99 ,85%	NRRL 13817	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,84%	NRRL38608
WY02	<i>Fusarium falciforme</i>	691pb	99,7 %	MK.752502.1	<i>Fusarium Solani</i>	99,40%	NRRL28559	<i>Fusarium solani</i>	99,7 %	NRRL32720
WY03	<i>Fusarium oxysporum</i>	673 pb	99,55 %	MK968952.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,84%	NRRL38552	<i>Fusarium oxysporum</i>	99 ,55 %	NRRL38608
WY04	<i>Fusarium equiseti</i>	673 pb	99 ,55 %	MT305062.1	<i>Fusarium equiseti</i>	98,81%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	99,25 %	NRRL25795
WY05	<i>Fusarium redolens</i>	687 pb	100 %	MG973095.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	87,18%	NRRL13817	<i>Fusarium redolens</i>	99,84 %	NRRL
WY06	<i>Fusarium redolens</i>	687pb	99,56%	MG973095.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	86 ,78%	NRRL26374	<i>Fusarium redolens</i>	99,39 %	MT563396.1
WY07	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	813 pb	97;84 %	MM503783.1		//%	NRRL	<i>Fusarium solani</i>	96,59%	NRRL22387
WY08	<i>Fusarium equiseti</i>	669 pb	100 %	MG017431.1	<i>Fusarium equiseti</i>	99,70%	NRRL45997	<i>Fusarium incarnatum-equiset</i>	99,69%	NRRL45997
WY09	<i>Fusarium oxysporum</i>	698pb	99,85 %	MG826864.1	<i>Fusarium equiseti</i>	99,85%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	99,85 %	NRRL25797

WY10	<i>Fusarium falciforme</i>	691pb	99,71 %	MK752502.1	<i>Fusarium solani</i>	99,40%	NRRL28559	<i>Fusarium solani</i>	99,7%	NRRL32720
WY11	<i>Fusarium equiseti strain</i>	669 pb	100 %	MK361175.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	100 %	NRRL25795
WY12	<i>Fusarium Solani</i>	691 pb	100 %	MG973094.1	<i>Fusarium solani</i>	99,85%	NRRL32928	<i>Fusarium solani</i>	99,85 %	NRRL32720
WY13	<i>Fusarium Redolens</i>	687 pb	100 %	MG073095.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	99,40%	NRRL13817	<i>Fusarium redolens</i>	99,84 %	NRRL26969
WY14	<i>Fusarium falciforme</i>	696 pb	100 %	MK752502.1	<i>Fusarium solani</i>	100%	NRRL28559	<i>Fusarium solani</i>	100 %	NRRL32720
WY15	<i>Fusarium equiseti</i>	671 pb	100 %	MG017436.1	<i>Fusarium equiseti</i>	99,55%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	99,55%	NRRL25795
WY16	<i>Fusarium equiseti</i>	671 pb	100 %	MG017436.1	<i>Fusarium equiseti</i>	99,55%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	99,55%	NRRL25795
WY17	<i>Fusarium equiseti</i>	674 pb	100 %	MG017436.1	<i>Fusarium equiseti</i>	99,55%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	99,55%	NRRL25795
WY18	<i>Fusarium oxysporum</i>	671 pb	100 %	MK414774.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	NRRL36356	<i>Fusarium oxysporum</i>	100 %	NRRL38608
WY19	<i>Fusarium equiseti</i>	669pb	100 %	MK361175.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>		
WY20	<i>Fusarium equiseti</i>	667 pb	99,70%	GU250566.1	<i>Fusarium equiseti</i>	95,36%	NRRL25795	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>		
WY21	<i>Fusarium equiseti</i>	677 pb	98,82 %	MT0177438.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	97,92%	NRRL25795	<i>Fusarium equiseti species</i>		
WY22	<i>Fusarium oxysporum</i>	670 pb	100 %	MK461973.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100%	NRRL36425	<i>Fusarium oxysporum</i>		

### III.3.3.1. Le gène ITS

Le séquençage de l'ADN a donné des séquences d'environ 500 pb, qui ont été raffinées et alignées, en utilisant le logiciel « BIOEDIT » et comparées avec la base de données NCBI Blast, *Fusarium-ID* et *Fusarium-MLST*. La comparaison des séquences de la région ITS a confirmé l'appartenance des 22 souches, au genre *Fusarium* et aux espèces suivantes

La base de données NCBI : *F. equiseti* (ou *Fusarium incranatum-equiseti* complexe d'espèces) (10), *F. oxysporum* (4), *F. solani* (2) et *F. redolens* (ou le téléomorphe *Gibberella fujikuroi*) (2), et 3 souches *Fusarium sp.* non identifiées (WY10, WY12)(WY14)(WY18) présentées sur le Tableau 3

La base de données *Fusarium-MLST* : *F. equiseti* (ou *Fusarium incranatum-equiseti* complexe d'espèces) (10), *F. oxysporum* (1), *F. solani* (5) et *F. redolens* (ou le téléomorphe *Gibberella fujikuroi*) (6)

La base de données *Fusarium-ID* nous n'a pas permis d'identifier les souches par la région ITS.

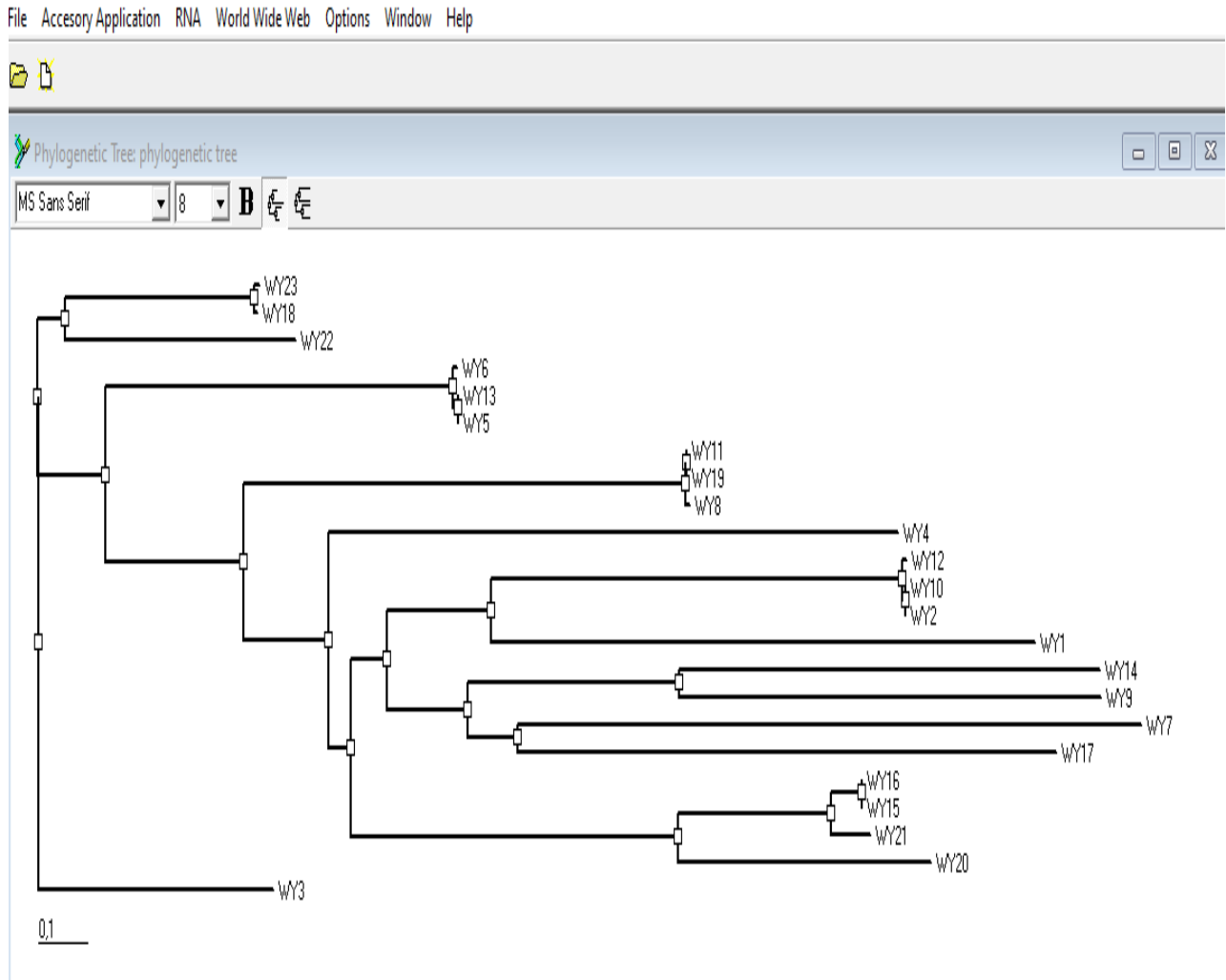
**Tableau 5 :** Identification moléculaire des souches *Fusarium* spp. Comparées avec les bases de données NCBI et *Fusarium* MLST database et *Fusarium*-ID (Consultées en Juin 2021).

Code	Genre et espèce selon NCBI	Longueur de la séquence (pb)	Similitude (NCBI)	Souche de référence (NCBI)	Genre et espèce selon <i>Fusarium</i> MLST database	Similitude ( <i>Fusarium</i> MLST database)	Souche de référence ( <i>Fusarium</i> MLST database)	Genre et espèce selon <i>fusarium</i> ID	Similitude de ( <i>fusarium</i> ID)	Souche de référence ( <i>fusarium</i> ID)
WY01	<i>Fusarium oxysporum</i>	505pb	100 %	MT530243.1	<i>Gibberella fujikuroi</i>	100 %	NRRL22902	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	87 %	NRRL5883
WY02	<i>Fusarium oxysporum</i>	505pb	100 %	MT560381.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100 %	NRRL43679	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	86,75 %	NRRL5883
WY03	<i>Fusarium equiseti</i>	507 pb	100%	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium graminearum</i>	99,35 %	NRRL5883
WY04	<i>Fusarium equiseti</i>	506 pb	100 %	MK990133.1	<i>Fusarium equiseti</i>	99,80 %	NRRL45995	<i>Fusarium graminearum</i>	99,56 %	NRRL5883
WY05	<i>Fusarium equiseti</i>	506 pb	100%	MT626672.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium graminearum</i>	99,35 %	NRRL5883
WY06	<i>Fusarium oxysporum</i>	505pb	100%	MT530243.1	<i>Gibberella fujikuroi</i>	100 %	NRRL22902	<i>Fusarium graminearum</i>	95,39 %	NRRL5883
WY07	<i>Fusarium equiseti</i>	507 pb	100%	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium graminearum</i>	99,35 %	NRRL5883
WY08	<i>Fusarium equiseti</i>	507 pb	100 %	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium graminearum</i>	99,35 %	NRRL5883
WY09	<i>Fusarium equiseti</i>	507pb	100 %	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium graminearum</i>	99,35%	NRRL5883
WY10	<i>Fusarium falciforme</i>	529pb	100 %	MT251175.1	<i>Fusarium solani</i>	100%	NRRL46692	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	100 %	MT560375.1

WY11	<i>Fusarium redolens</i>	520 pb	100 %	MT563396.1	<i>Gibberella fujikuroi</i>	98,26 %	NRRL13308	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	85,37 %	MT529726.1
WY12	<i>Fusarium falciforme</i>	529 pb	100 %	MT251175.1	<i>Fusarium solani</i>	100 %	NRRL46692	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	89,43 %	MT563396.1
WY13	<i>Fusarium equiseti</i>	507 pb	100 %	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	86,34 %	MK643440.1
WY14	<i>Fusarium falciforme</i>	529 pb	100 %	MT251175.1	<i>Fusarium solani</i>	100 %	NRRL46692	<i>Fusarium equiseti</i>	89,43 %	MT560375.1
WY15	<i>Fusarium equiseti</i>	507 pb	100 %	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100	NRRL45997	<i>Fusarium equiseti</i>	86,34 %	MT560375.1
WY16	<i>Fusarium equiseti</i>	506 pb	100 %	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100%	NRRL45997	<i>Fusarium equiseti</i>	86,34 %	MT560375.1
WY17	<i>Fusarium redolens</i>	520 pb	100 %	MT563306.1	<i>Gibberella fujikuroi</i>	98,26 %	NRRL13308	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	96,04 %	MK249867.1
WY18	<i>Uncultured ascomycota</i>	522 pb	97,89 %	HM162312.1	<i>Fusarium solani</i>	92,25 %	NRRL46692	<i>Fusarium equiseti</i>	90,47 %	MT635296.1
WY19	<i>Fusarium equiseti</i>	520pb	99,81 %	MT560375.1	<i>Fusarium equiseti</i>	100 %	NRRL45997	<i>Fusarium equiseti</i>	86,34 %	MK990133.1
WY20	<i>Fusarium oxysporum</i>	505 pb	100%	.MT530243.1	<i>Gibberella fujikuroi</i>	100 %	NRRL22902	<i>Fusarium equiseti</i>	87 %	MT560375.1
WY21	<i>Fusarium solani</i>	574 pb	99,82 %	KY617066.1	<i>Fusarium solani</i>	100 %	NRRL43536	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	89,43 %	MT560381.1
WY22	<i>Fusarium solani</i>	505 pb	99,82 %	KY617066.1	<i>Gibberella fujikuroi</i>	100 %	NRRL22902	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	87 %	MT530243.1

### III.4. Arbre phylogénétique du gène TEF-1 $\alpha$

L'arbre phylogénétique représentée en Figure n° 14 montre que les souches appartenant au même genre, ainsi qu'à la même espèce, et aussi, à la même forme spéciale, peuvent avoir des caractéristiques génétiques très distinctes reflétant leur origine polyphylétique.



**Figure n°11** : Arbre phylogénétique présenté par logiciel BIOEDIT.

### III.5. Discussion générale

Notre recherche s'inscrit dans le cadre d'identification de *Fusarium* spp., et la comparaison des résultats obtenus par le séquençage du gène TEF-1 $\alpha$  et la région ITS ; ainsi que, les bases de données NCBI-Blast, *Fusarium*-ID et *Fusarium*-MLST, pour faire une optimisation de leur utilisation.

L'étude morphologique de nos souches fait apparaître quatre (04) morphotypes différents, dont l'aspect cotonneux, ras-muqueux, duveteux et rhizomorphique. En ce qui concerne la morphologie du thalle et la pigmentation, les résultats obtenus relèvent une nette variabilité entre toutes les souches de *Fusarium* spp. Les variations portent sur des caractères cultureux (aspect du mycélium aérien et la pigmentation du thalle) ; et des organes fructifères (phialides, pionnotes et sporodochies).

D'après **Messiaen et Cassini (1968)** la variabilité du mycélium est un phénomène commun chez les formes spéciales de *F. oxysporum*. La pigmentation constitue un critère d'identification de certaines espèces, et elle ne permet pas de distinguer les formes spéciales de *F. oxysporum*. Cette diversité morphologique du genre *Fusarium* a été déjà décrite dans les travaux de **(Henni, 1998)** sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolée du nord d'Oran et par **(Ouinten, 1996)** sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

L'étude microscopique des souches a démontré que le mycélium est cloisonné avec l'apparition de trois sortes de conidies : les microconidies, les macroconidies et les chlamydospores. Ces résultats sont concordent avec ceux trouvés par **(Henni, 1998 ; Armstrong et Armstrong, 1981 ; Nelson et al., 1983 ; Leslie & Summerell 2006)**.

La recherche de similarité dans les régions ITS et TEF-1 $\alpha$  du génome a été réalisée en utilisant le logiciel BLAST dans la banque de gènes NCBI et *Fusarium*-ID et *Fusarium*-MLST. Nous avons utilisé logiciel d'alignement BIOEDIT, afin de raffiner les séquences avant de les soumettre à nouveau à les bases des données.

Après avoir reçu nos séquences, nous n'avons sélectionné que des séquences interprétables (sans contamination) pour effectuer la comparaison avec celles des banques de données.



L'identité d'une séquence fongique est obtenue après une recherche d'homologie dans les banques de données. Nos séquences sont alignées avec celles qui sont connues et présentes dans les banques de données.

Les recherches effectuées par BLAST (Basic Local Alignment and SearchTool) fournissent la liste des résultats probables correspondant à notre séquence, avec les valeurs de similarités des séquences.

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées dans les banques internationales.

Le séquençage de l'ADN a donné des séquences d'environ 700 pb qui ont été raffinées en utilisant le logiciel BioEdit® et comparées avec les bases de données : NCBI et Fusarium-ID. La comparaison des séquences de la région TEF-1 $\alpha$  décrite par ( **O'Donnell et al,1998**) a confirmé l'appartenance des 22 souches au genre *Fusarium* et aux espèces :

- La base de donnée NCBI: *F. oxysporum* (5), *F. redolens* (3), *F. solani* (1), *F. equiseti* (9) et 3 souches *Fusarium* sp. non identifiée.
- La base de données Fusarium-ID : *F. oxysporum* (4), *F. redolens* (3), *F. solani* (5), *F. equiseti* (10).
- La base de donnée Fusarium-MLST : *F.oxysporum* (8), *F. solani* (4), *F. equiseti* (9) et une souche *Fusarium* sp. non identifiée (WY07). Ce qui signifie qu'il s'agit d'une nouvelle espèce. En plus d'une souche *Purpureocillium lilacinum*.

Dans l'étude de la phylogénétiques de *Fusarium*, des régions génomiques conservées d'un ou de plusieurs gènes sont utilisées dans différents types d'analyses.

(**Selon Taylor et al , 2000**), la méthode la plus efficace pour identifier les champignons est basée sur le concept d'espèce phylogénétique, par analyse phylogénétique des caractéristiques variables des acides nucléiques. Cependant,( **Leslie et Summerell ,2006**) ont rapporté, que bien que des séquences d'ADN sont les caractéristiques les plus fréquemment utilisées pour l'identification et la délimitation des espèces phylogénétiques, d'autres marqueurs suffisamment informatifs, y compris les caractéristiques morphologiques, peuvent être utilisés pour délimiter les espèces phylogénétiques.

L'arbre phylogénétique montre que les souches appartenant au même genre, ainsi qu'à la même espèce, et aussi, à la même forme spéciale, peuvent avoir des caractéristiques génétiques très distinctes reflétant leur origine polyphylétique.

Ces analyses phylogénétiques ont montré que nos souches appartenant au même genre, ainsi qu'à la même espèce et aussi à la même forme spéciale peuvent avoir des caractéristiques génétiques très distinctes reflétant leur origine polyphylétique. Ces résultats sont confirmés par les études sur l'origine des formes spéciales de *F. oxysporum* réalisées par (O'Donnell et al. 2015 ; Silva et al., 2014 ; Irzykowska et Kosiada, 2001 ; O'Donnell et al., 2009 ; Alves-Santos et al., 2002 ; Baayen et al., 2000 ; O'Donnell et al., 1998).

Le séquençage de l'ADN a donné des séquences d'environ 500 pb, qui ont été raffinées et alignées, en utilisant le logiciel « BIOEDIT » et comparées avec la base de données NCBI Blast, *Fusarium-ID* et *Fusarium MLST*. La comparaison des séquences de la région ITS a confirmé l'appartenance des 22 souches, au genre *Fusarium* et aux espèces suivantes :

- La base de donnée NCBI : *F. equiseti* (ou *Fusarium incranatum-equiseti* complexe d'espèces) (10), *F. oxysporum* (4), *F. solani* (2) et *F. redolens* (ou le téléomorphe *Gibberella fujikuroi*) (2), et 3 souches *Fusarium* sp. non identifiées (WY10) (WY12)(WY14)(WY18) présentées sur le Tableau 10
- La base de donnée *Fusarium MLST*: *F. equiseti* (ou *Fusarium incranatum-equiseti* complexe d'espèces) (10), *F. oxysporum* (1), *F. solani* (5) et *F. redolens* (ou le téléomorphe *Gibberella fujikuroi*) (6)
- La base de donnée *Fusarium-ID* n'identifie pas le gène ITS.

L'arbre phylogénétique, montre que les souches appartenant au même genre *Fusarium* ; ainsi qu'à la même espèce, peuvent avoir des caractéristiques génétiques très distinctes, reflétant leur origine polyphylétique,

Ces résultats sont confirmés par les études sur l'origine des formes spéciales de *F. oxysporum* réalisées par (Alves-Santos et al. 2002 , Baayen et al. 2000 , Irzykowska & Kosiada 2011 , O'Donnell et al. 1998, 2009, 2015 et Silva et al. 2014).

Lors de la réalisation des BLAST, toutes les séquences de référence proches de nos souches ont été extraites des banques de données *Fusarium MLST*. En fonction des critères de qualité de l'alignement le choix de la séquence la plus pertinente est réalisé majoritairement des

résultats qui ont les mêmes régions étudiées comme notre échantillon issu du Fusarium MLST, permettant d'identifier les séquences et donc le genre et l'espèce de la souche pure.



***CONCLUSION***

Notre recherche s'inscrit dans le cadre de l'identification des *Fusarium* spp. Et de la comparaison dans des données de nucléotides différentes (NCBI, Fusarium-ID et Fusarium-MLST). L'étude morphologique de nos souches fait apparaître quatre (04) morphotypes différents, dont l'aspect cotonneux, ras-muqueux, duveteux et rhizomorphique. En ce qui concerne la morphologie du thalle et la pigmentation, les résultats obtenus relèvent une nette variabilité entre toutes les souches de *Fusarium* spp. Les variations portent sur des caractères cultureux (aspect du mycélium aérien et la pigmentation du thalle) ; et des organes fructifères (phialides, pionnotes et sporodochies). Ce travail montre que les souches de *Fusarium* utilisées dans cette étude peuvent avoir des caractéristiques génétiques très évidentes, reflétant leur origine polyphylétique. La recherche morphologique a révélé quatre types morphologiques, dont le type coton, le type duveteux, le type ras-mucus et le type racine. L'identification moléculaire de la région ITS de l'ADNc a confirmé que nos 22 souches appartiennent au genre *Fusarium* et *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani* et *F. equiseti*. L'identification moléculaire par le gène TEF-1 $\alpha$  a confirmé l'appartenance de nos souches au genre *Fusarium* et aux espèces : *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani*, *F. equiseti* et une souche *Fusarium* sp. Non identifiée

L'identification moléculaire de la région ITS de l'ADNc a confirmé l'appartenance de nos 22 souches au genre *Fusarium* et aux espèces, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani* et *F. equiseti*.

Selon les normes de qualité La séquence la plus pertinente a été sélectionnée pour la comparaison, et la plupart des résultats ont été étudiés dans la même zone que notre échantillon de *Fusarium* MLST.

# ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

1. Agrios, G. N. 2005. Plant diseases caused by fungi. Plant pathology.
2. Alabouvette C, Olivain Q, Migheli C, Steinberg C. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *NewPhytologist*,p. 529-544
3. Alves-Santos FM, Benito EP, Elsave AP, Díaz-Mínguez JM. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol*,p.3335-3340

4. Benoît Thomas a,c , Nelly Contet Audonneau a , Machouart Mariea,b , Anne Debourgogne .2019.Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice, p.58
5. Bernard F. 2012. Le développement des champignons pathogènes foliaires répond à la température, mais à quelle température? Thèse de Doctorat en Agronomie. AgroParisTech, p. 145
6. Bérubé ME, Vanasse A, Rioux S, Bourgeois G, Bourget N, Tremblay G, Dion Y. 2009. Effet du glyphosate et du travail du sol sur l'incidence de la fusariose de l'épi chez le blé et l'orge,p.495
7. Beyer M, Roding S, Ludewig A, Verreet JA. 2004. Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors. J. Phytopathol.,p.92–97
8. Blancard, D. 1997.les maladies de la tomate . Edition INRA, 212p.
9. Booth C. 1985.The genus *Fusarium*. Ed. Commonwealth Mycological Institute,p. 237
10. Booth, C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. In The applied mycology of *Fusarium*. Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College, London, September 1982, p. 1-13
11. Booth,C.1971.The gens *fusarium* Kew,UK:Commonwealth Mycological Institute,p.237
12. Boudoudou H, Hassikou R, Ouazzani Touhami A, Badoc A, Douria A. 2009. Paramètres physicochimiques et flore fongique des sols de rizières marocaines. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,p. 17-44
13. Correlle,J.C,Puballa,J.E,Scheneider ,R.w.1986.Identification of *fusarium oxysporum* f sp.opii on the basis of colony size ,virulence and vegetative compatibility .Phytopatology,p.396-400
14. Davet, P., & Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Editions Quae.
15. Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals,p.755-768
16. Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G., & Alabouvette, C. 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. FEMS Microbiology Ecology, 36(1), p.61

17. El Mahjoub M, Bouzidi A, Jouhri A, Hamrouni A, El Beji. 1979. Influence de la Salinité des eaux d'irrigation sur la sensibilité du tournesol au *Macrophomina phaseoli* (Maubl) Ashby. *Anu. Phytopathol*, p.61-67
18. Guezlane-Tebibel, N., Kahlouche, B., & Athmani-Guemouri, S. 2011. *Microbiologie (Travaux pratiques)*. 4<sup>ème</sup> édition corrigée, OPU. Algérie.
19. Guennouni Haddi ; Hammia Imane .2018/2019. Détermination des mycotxines de fusarium : Caractérisation et réduction de la toxicité ,p .8
20. Hamini, N. 2011. Diversité génétique des populations de *Fusarium* pathogène de la tomate sur le pourtour méditerranéen
21. Kerry O'Donnell , Todd J. Ward , Vincent A. R. G. Robert , Pedro W. Crous , David M. Geiser , Seogchan Kang .2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions, p.587-595
22. Lepoivre P, Busogoro JP, Etame JJ, El Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Riveros AS, Salle G, Strosse H and Swennen R. 2003. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. In: Jacome et al.: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, San José, Costa Rica, 20-23 may, p. 151-159
23. Mahdi N. 2011. Essai de lutte biologique contre la fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*).
24. Mohamed L. 2006. Influence de la qualité des composts et de leurs extraits sur la protection des plante contre les maladies fongiques, p.161
25. Nyiransen giyumva C. 2007. Effet de différents éléments minéraux sur la croissance et le développement du champignon *Helminthosporium solani*, agent responsable de la gale argentée de la pomme de terre.
26. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), p.2044- 2049
27. Rappilly, F. 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Annales des Epiphyties* volume 19. Edition INRA, Paris, p. 25-35-39
28. Regragui A. 2005. Contribution à l'étude de l'influence de la salinité sur le couple tomate-*Verticillium*: conséquences physiologiques et impact sur la bioprotection des tomates contre la



29. Seifert K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts, p.15- 28
30. Siou D. 2013. Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien, p.198
31. Thrane U. 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites, p. 29-49
32. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J.1990. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In PCR Protocols. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
33. Yezli Wassim. 2017. Biodiversité et écologie de *Fusarium*, p.60-63.
34. Yezli W., Hamini-Kadar N., Zebboudj N., Blondin L., Tharreau D., Kihal M. 2019. First report of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium equiseti* in Algeria. *J. Plant Pathol.* 101: 1249.
35. Zebboudj-Yezli Nebia. 2020. Contribution à la lutte biologique vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* agent de la pourriture racinaire de la tomate .p49
36. Zebboudj, N., Yezli, W., Hamini-Kadar, N., & Kihal, M. Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium* species responsible for tomato crown and root rots. *Environmental and Experimental Biology* 18: 7–13. <http://doi.org/10.22364/eeb.18.02>.



# ***ANNEXES***

## Annexe n° 01

Préparation d'un milieu gélosé de dextrose et d'extrait de pomme de terre (PAD). Pour que les champignons se développent, il faut que les milieux contiennent suffisamment de substances nutritives (par exemple des saccharides), et un agent solidifiant (agar ou gélatine). Dans un milieu acide l'agar solidifie mal s'il a été stérilisé, aussi il convient de stériliser les extraits et l'eau avant d'ajouter l'agar.

1 - PDA. milieu gélosé de dextrose et d'extrait de pomme de terre

Ingrédients: 200 g de pomme de terre en morceaux, 20 g de poudre d'agar, 20 g de dextrose ou de sucre de canne blanc ordinaire, 1 litre d'eau distillée.

Laver, peser et couper les pommes de terre en petits morceaux. Les faire bouillir pendant environ 15 à 20 minutes jusqu'à ce qu'elles ramollissent. Retirer les pommes de terre et ajouter de l'eau au bouillon pour obtenir exactement 1 litre. Ajouter la dextrose et l'agar en veillant à l'exactitude des quantités, faute de quoi le mélange deviendrait trop mou ou trop dur. Mélanger de temps en temps et chauffer doucement jusqu'à ce que l'agar ait fondu. L'agar ne doit pas être chaud quand on le verse dans les tubes ou les bouteilles, sinon il forme des grumeaux. Remplir les tubes avec 10 ml de liquide, puis fermer à l'aide d'un bouchon de coton



**Figure n°12:** Préparation de milieu PDA

## Annexe n° 02

### Composition des solutions tampons

- **Tampon de lyse** : Tampon de lyse est un solution tampon utilisé dans le but de casser des cellules ouvertes pour une utilisation dans biologie moléculaire expériences qui analysent les labiles macromolécules des cellules

50mM Tris-HCl pH 7.5 ; 50mM EDTA ; 3%SDS.

- **Tampon TE** : Tampon TE est une solution tampon dans biologie moléculaire, en particulier dans les procédures impliquant ADN, ADNc ou ARN. "TE" est dérivé de ses composants: Tris, un tampon de pH commun, et EDTA, une molécule qui chélate cations aimer  $Mg^{2+}$ . Le but du tampon TE est de solubiliser l'ADN ou l'ARN, tout en le protégeant de la dégradation

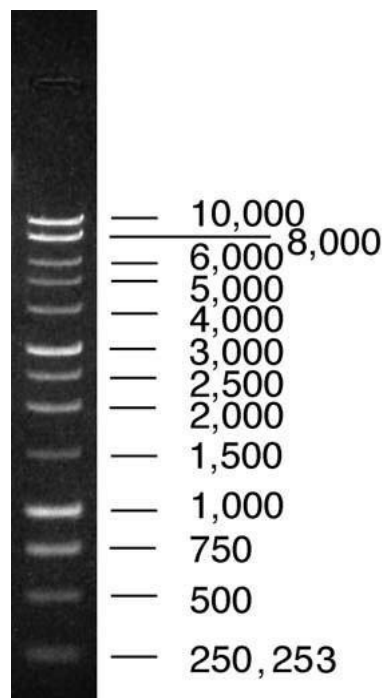
10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA.

- **Tampon TAE** : Tampon TAE (pour Tris, Acétate, EDTA) est une solution tampon de migration utilisée en électrophorèse sur gel d'agarose des acides nucléiques. Il est composé de Tris, d'acide acétique et d'EDTA, généralement au pH 8,0

40mM Tris-HCl pH 7.9 ; 4mM Acétate de sodium ; 1mM EDTA.

**gel d'agarose 1 %** Agarose 2,5 g

**Marqueur de poids moléculaire** 1kb DNA Ladder (Promega, USA)



## Annexe n° 3

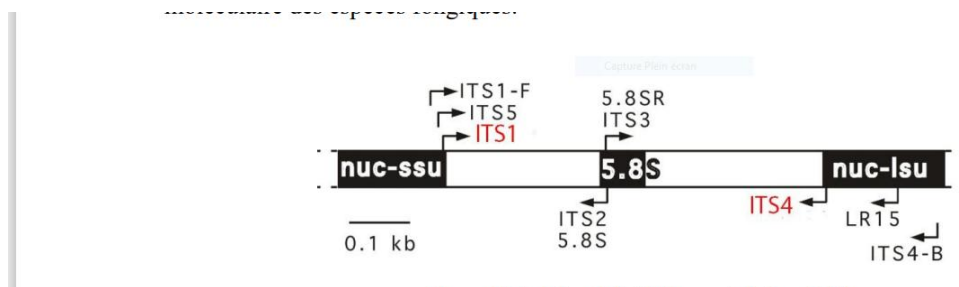
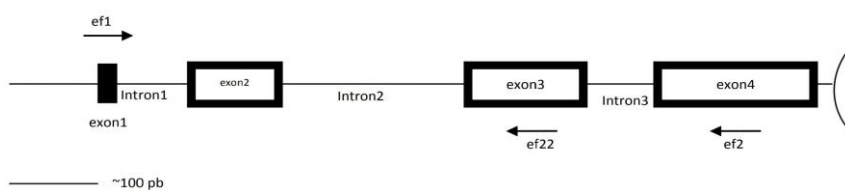


Figure n°13 : région ITS (Andrien 2013)

Figure n°14 : Schéma de la région TEF- $\beta$  chez *Fusarium*, avec l'emplacement des amorces