

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DE GHARDAÏA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER**

En : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par : **BEN MESSAOUD Nour El houda & DHIB Chaima**

*Thème :*

**Les techniques modernes d'identification  
et de classification des champignons**

*Soutenu le 14/06/2021, devant le jury composé de :*

M <sup>r</sup> MAHAMEDI Alla Eddine	MAA	Univ-Ghardaïa	Président
M <sup>me</sup> DAFRI Ahlem	MCB	Univ-Ghardaïa	Examineur
M <sup>r</sup> DJELLID Youssef	MAA	Univ-Ghardaïa	Promoteur

*Année universitaire : 2020-2021*



## *Dédicace*

*Avec toute ma gratitude, je dédie cet humble travail de mes études, en exprimant ma profonde gratitude à tous mes proches, particulièrement :*

*A*

*Mon frère exemple Père pour sa patience, ses encouragements, son soutien moral et financier qu'il a consenti depuis ma naissance jusqu'au ce jour*

*A*

*Ma Mère adorée pour tous sa bienfaits, sa tendresse, ses sages conseils dont je toujours bénéficié.*

*A*

*Mon fiancé Hocine La source de grand courage tout le moment de travail et toujours à côté de moi*

*A*

*Mes très chers frères : Mustapha, Abd El Kader, Moussa et Mes très chères sœurs : Manel, Tassenim*

*A toute ma famille, à mes amis surtout mes très chères sœurs : Amel, Safia, Chaïma, Amina, Selma, Samiha, Roufaïda, Ouahiba, Dounia, Hadjer, Arbia, Hiba, Aïcha, Imane, Hayat, zhor et tous mes amis et mes collègues de promotion 2021*

*NOURELHOUDA*





## *Dédicace*

*Je remercie mon « Dieu » le tous puissant de nous avoir guidé pour réaliser ce modeste travail.*

*C'est avec un grand plaisir que je dédie ce mémoire :*

*A mes parents qui sont ma source de lumière et d'inspiration, Mon Père Mustafa en témoignage de ses sacrifices, ma Mère Halima pour ses sacrifices depuis qu'elle m'a mis au monde, et qui N'a pas cessé de m'encourager, de me soutenir dans les moments difficiles*

*A mes chers frères : Sid Ali, Mohammed, Hamza*

*A Mes chères sœurs : Saïda, Amina, Djihad, Fatema, Oum Kaltoume.*

*A tous mes oncles et mes tontes et une spéciale dédie à ma oncle Belkhir qui m'a toujours conseillé et encouragé à faire le mieux.*

*A mes amis : Amina, Selma, Iman, Nour el Houda, Hibataallah, Fatima, Khawla, Bouchra, Aïcha, Iman.*

*A tous mes enseignants et mes collègues de master2*

*BCA 2021*

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*Chaïma*





# Remerciement

*Tous d'abord nous tenons à remercier le bon **Dieu** tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.*

*Nous exprimons nos profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à notre encadrant Monsieur **DJELLID YOUSSEF** pour son encadrement, conseils et sacrifices afin de donner le meilleur et pour son suivi durant la période de préparation de notre mémoire d'afin d'étude.*

*Nos remerciements vont aux membres du jury **Mr. MAHAMEDI Alla Eddine** et **Mme. DAFRI Ahlem** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.*

*Nous adressons nos sincère remerciements à tous les professeurs qui par leurs conseils et leurs efforts durant tous les années passées nous sommes là, vraiment un grand remerciement pour leurs qualité d'enseignement qui nous a été dispensé.*



## Résumé

Les champignons constituent un Règne séparé, à part entière, se caractérisent par une grande diversité biologique, quand même, le nombre d'espèces de champignons identifiées est inférieur par rapport au nombre des espèces qui devraient exister, cela est dû à l'utilisation de méthodes traditionnelles basées sur les caractéristiques morphologiques pour l'identification.

L'apparition des méthodes moléculaires a permis une avancée majeure dans le domaine de la phylogénie de ces organismes.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les techniques modernes utilisées pour discriminer les champignons, compte tenu de leur importance et de leur place dans plusieurs domaines à savoir l'agriculture, la médecine humaine et vétérinaire, la technologie alimentaire, etc.

**Mots clés :** champignons, techniques moléculaires, identification.

## **Abstract**

Fungi constitute a Kingdom in their own right, characterized by a great biodiversity, however, the number of species of fungi identified is lower compared to the number of species that should exist, and this is due to the use of traditional methods based on morphological characteristics for the identification of fungal species. The appearance of molecular methods has enabled a major advance in the field of phylogeny of these organisms.

The aim of this study is to highlight the modern techniques used to classify fungi, given their importance and their place in several fields such as agriculture, human and veterinary medicine, food technology, etc.

**Keywords:** fungi, molecular methods, identification.

## المخلص

تشكل الفطريات مملكة في حد ذاتها ، وتتميز بتنوع بيولوجي كبير ، مع ذلك فإن عدد أنواع الفطريات التي تم تعريفها أقل بكثير من عدد الأنواع الموجودة فعلا ، ويرجع ذلك إلى استخدام الأساليب التقليدية القائمة على الخصائص المورفولوجية لتحديد الأنواع الفطرية. لقد أتاح ظهور التقنيات الجزيئية تحقيق تقدم كبير في مجال دراسة هذه الكائنات الحية تهدف هذه الدراسة إلى إبراز التقنيات الحديثة المستخدمة في تصنيف الفطريات ، لأهميتها ومكانتها في عدة مجالات متعددة كالزراعة ، الطب البشري والبيطري ، تكنولوجيا الغذاء ، إلخ...  
**الكلمات المفتاحية:** الفطريات ، الطرق الجزيئية ، التعريف

## *Table des matières*

Introduction.....	1
CHAPITRE I : Généralités sur les champignons .....	3
1. Définition .....	3
2. Caractères généraux .....	3
3. Morphologie et structure cellulaire.....	3
4. Nutrition .....	5
5. Mode de vie : .....	5
5.1. Les champignons saprotrophes .....	5
5.2. Les champignons symbiontes .....	6
5.3. Les champignons parasites .....	6
6. Conditions physico-chimiques de croissance .....	6
6.1. Température.....	6
6.2. PH .....	6
6.3. Activité d'eau .....	6
6.4. Lumière .....	7
7. Mode de reproduction .....	7
7.1. Reproduction asexuée .....	7
7.2. Reproduction sexuée .....	9
8. Milieux de culture.....	11
8.1. Milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar) .....	11
8.2. Milieu Sabouraud-gélose.....	12
8.3. Malt agar .....	12
9. Taxonomie .....	12
9.1. Classification des Champignons .....	14
10. Pathogénicité des champignons .....	16
10.1. Pathogénicité sur l'homme .....	16
10.2. Pathogénicité sur les plantes .....	17
10.3. Pathogénicité sur les animaux.....	19



Chapitre II : Techniques classiques d'identification des champignons .....	19
1. Identification morphologique .....	19
1.1. Identification macroscopique.....	20
1.2. Identification microscopique .....	22
2. Identification biochimique .....	30
2.1. Les polysaccharides .....	30
2.2. Les lipides insaponifiables .....	30
2.3. Les acides gras.....	31
2.4. Les métabolites secondaires volatils .....	31
2.5. Les métabolites secondaires non volatils .....	32
Chapitre III techniques modernes d'identification des champignons.....	34
1. Les techniques protéomiques.....	34
1.1. Spectrométrie de masse MALDI-TOF (SM de type Matrix Associated Laser Désorption Ionisation—Time Of Flight (MALDI-TOF).....	34
1.2. Désorption Ionisation .....	35
1.3. Spectrométrie à temps de vol.....	35
1.4. Spectre de masse .....	36
1.5. Electrophorèse bidimensionnelle (2D) .....	37
2. Méthodes moléculaires.....	39
2.1. Extraction d'ADN génomique .....	39
2.2. Amplification.....	40
2.2.1.c. Modernisation de la PCR.....	43
2.3. Les techniques de polymorphisme .....	43
2.4. Le séquençage.....	46
2.5. Les gènes et les régions analysés pour la caractérisation d'espèces fongiques .....	50
3. Bio-informatique et traitement des séquences.....	54
Algorithme ClustalW .....	56
3.3. Origine de séquences.....	57
3.4. Construction des arbres phylogénétiques .....	58
Conclusion et perspectives.....	62
Références bibliographiques .....	63

|

## Liste des figures

Figure 1: Thalleunicellulaire.....	4
Figure 2: Thallefilamenteux.....	4
Figure 3: La reproduction asexuée par les spores .....	9
Figure 4: Cycle de vie des champignons .....	10
Figure 5: Un exemple du cycle de vie d'un champignon basidiomycète .....	11
Figure 6: L'espèce fongique <i>Boletus edulis</i> .....	14
Figure 7: Symptômes de l'Alternariose sur feuille et tige de tomate. ....	18
Figure 8: Symptômes de la pourriture grise sur tige et fruit de la tomate.....	18
Figure 9: Symptômes du Bayoud sue le palmier dattier .....	19
Figure 10: Modes de formation des conidies des champignons.....	25
Figure 11: Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux .....	26
Figure 12: Aspect microscopique de quelques champignons sur milieu PDA incliné .....	29
Figure 13: Structure chimique des ubiquinones Q10 (a) et Q10 (H2) (b) .....	32
Figure 14: Structure chimique du $\alpha$ -carotène, $\beta$ -carotène et $\delta$ - carotène .....	33
Figure 15 : Principe d'ionisation par la technique MALDI .....	35
Figure 16: empreintes spectrales brutes obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir de quatre espèces fongiques .....	37
Figure 17: Comparaison des profils 2-DE obtenus avec un extrait protéique de levure, dans un gradient de pH présentant des intervalles de pH différents .....	38
Figure 18: Principe de la PCR .....	42
Figure 19: Fonctionnement de PCR en temps réel avec une sonde TaqMan® .....	43
Figure 20: Amplification et dénaturation de l'ADN .....	48
Figure 21: Ajout d'un ADN amorcé dans les quatre récipients .....	48
Figure 22: Ajout des ddNTPs.....	49
Figure 23: A - Electrophorèse en gel standard. B - Séquençage à l'aide de fluorophores .....	50
Figure 24: Organisation des gènes codant les ARN ribosomiques et des régions intergéniques chez les champignons et présentant un intérêt pour l'identification moléculaire. (ITS : Séquence transcrite interne, IGR : séquence).....	54
Figure 25: Organigramme pour l'identification fongique à l'aide de l'analyse phylogénétique moléculaire .....	59

## *Liste des tableaux*

Table 1: Les principaux radicaux par ordre d'importance décroissante .....	13
Table 2: Classification simplifiée du règne des Fungi présentant les principales classes de champignons avec quelques espèces caractéristiques .....	15
Table 3 : Critères d'identification macroscopique .....	21
Table 4: Principaux groupes des champignons et leurs caractéristiques morphologiques .....	28
Table 5 : Quelques programmes d'alignement multiple .....	56
Table 6: Liste des bases de données organisées pour l'identification des espèces fongiques .....	59

## Liste des Abréviations

<b>%</b> : pourcentage	<b>LSU</b> : the Large Subunit
<b>°C</b> : Degré Celsius	<b>MALDI-TOF</b> : Matrix Associated Laser Desorption Ionization—Time Of Flight
<b>2D</b> : bidimensionnelle	<b>MgCl<sub>2</sub></b> : Magnesium Chloride
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>Min</b> : minute
<b>ADNr</b> : ADN ribosomique	<b>ml</b> : millilitre
<b>AFLP</b> : Amplified Fragment Length	<b>mM</b> : millimètre
<b>ARN</b> :acideribonucléique	<b>NCBI</b> : National Center for Biotechnology Information
<b>ARNm</b> :acideribonucléiquemessager	<b>ng</b> : nanogramme
<b>BLAST</b> : Basic Local Alignment Search Tool	<b>nm</b> : nanomètre
<b>CTAB</b> :cétyltriméthyl ammonium bromure	<b>Pb</b> : pétabit
<b>dATP</b> : Deoxyadenosine triphosphate	<b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction
<b>dCTP</b> : Deoxycytidine triphosphate	<b>PDA</b> : Potato dextrose agar
<b>ddNTPs</b> : dideoxy-Nucleoside triphosphates	<b>pH</b> : potentiel Hydrogène
<b>dGTP</b> : Deoxyguanosine triphosphate	<b>q.s. p</b> : Quantité suffisante pour
<b>dNTPs</b> :désoxyribonucléoside triphosphates	<b>RAPD</b> :RandomAmplifiedPolymorphic DNA
<b>dTTP</b> : Deoxythymidine triphosphate	<b>RFPL</b> : Restriction Fragment LengthPolymorphism
<b>EBI</b> :EuropeanBioinformatics Institute	<b>SDS</b> :dodécylsulfate de sodium
<b>g</b> : gramme	<b>SSR</b> : Simple SequenceRepeat
<b>GAPDH</b> : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	<b>SSU</b> :small subunit
<b>GC</b> : chromatographie en phase gazeuse	<b>T<sub>m</sub></b> : température de demidénaturation
<b>GC-MS</b> : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	<b>U.V</b> : ultra-violet
<b>H</b> : heure	<b>β</b> : béta
<b>IEF</b> :isoélectrofocalisation	<b>δ</b> : Gamma
<b>IGS</b> : Inter Genitic Spacer	<b>μl</b> : microlitre
<b>IPG</b> : immobilized pH gradient	<b>μm</b> :micromètre
<b>ITS</b> : Internal Transcribed Spacers	
<b>KCl</b> : Potassium chloride	

# Introduction



## Introduction

Les champignons constituent un règne à part entière. Ils forment un vaste groupe diversifié, estimé à environ 1 500 000 espèces dont seulement 100 000 (soit 7%) sont décrites. Ce sont des organismes ubiquistes retrouvés dans tous les écosystèmes (Chaboud, 2013).

La classification des espèces appartenant au règne des champignons a connu de nombreuses modifications. A l'heure actuelle, la classification des champignons s'est considérablement simplifiée et le règne fongique est divisé en cinq phyla : Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota définis par le caractère cloisonné ou non du thalle, la présence ou l'absence de gamètes ou de spores mobiles et les caractères morphologiques des organes différenciés de la reproduction sexuée (Chaboud, 2013).

La systématique des champignons est basée principalement sur des critères morphologiques. En pratique, la procédure la plus utilisée est la croissance d'isolats sur un milieu de culture approprié, ce qui permet de reconnaître les traits caractéristiques de ces isolats qui sont génétiquement stables et en général peu influencés par les changements environnementaux. Cependant, dans certains cas, ces critères sont délicats à utiliser et requièrent une expérience particulièrement approfondie (Verscheure, 2002).

Aujourd'hui, les mycologues, scientifiques et cueilleurs de champignons utilisent une classification morphologique, dite systématique, basée sur l'observation de caractères macroscopiques et microscopiques. Mais l'arrivée de nouvelles techniques d'étude basées sur la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN) a apporté une restructuration importante de la classification systématique (Chaboud, 2013).

L'identification génétique des différentes variétés, elles débutent par une étape d'extraction des acides nucléiques suivie d'une amplification de certaines régions particulières de l'ADN ou ARN par PCR, puis la diversité est observée via l'utilisation de techniques d'empreintes moléculaires ou encore via le séquençage. Parmi toutes ces étapes, l'extraction d'ADN est la plus

critique. En effet, L'étude de la biologie moléculaire nécessite l'utilisation d'un ADN de haute qualité et en bonne quantité. Mais La présence des métabolites secondaires chez les plantes peut subir une oxydation rapide, se lier étroitement à l'ADN, puis coprécipiter avec l'ADN, empêchant ainsi son utilisation dans les applications en aval, comme la PCR (Chahdi et Salhi, 2019).

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.) (Ben Slimane, 2016).

Ainsi, l'objectif de ce mémoire est de réaliser une étude comparative des classifications classiques et moléculaires afin de cerner les principales évolutions apportées par les méthodes moléculaires. Dans un premier chapitre, nous étudions la classification des champignons en présentant les différents critères phénotypiques, alors que dans le second, les différentes techniques d'identification classiques sont présentées. Nous terminons par la présentation des techniques d'identification modernes.

# **Chapitre I : Généralités sur les champignons**



## **CHAPITRE I : Généralités sur les champignons**

### **1. Définition**

Les champignons, appelés aussi mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluri cellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macro mycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) (Chabasse *et al*, 2002), mais forment au contraire un groupe très hétérogène dont la caractéristique essentielle commune est la nutrition hétérotrophe par absorption, celle-ci pouvant prendre la forme du saprophytisme, du parasitisme ou de la symbiose (Abdelkader, 2012).

### **2. Caractères généraux**

Les champignons comprennent plus de cent mille (100,000) espèces, mais ils sont associés dans des caractères communs, tels que, ils sont hétérotrophes N'ayant pas de chlorophylle. En plus, la cellule fongique qui comprend un noyau, divers organites : un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des mitochondries, des vacuoles ainsi qu'une enveloppe extérieure appelée la membrane plasmique. Aussi, les champignons sont constitués d'une paroi qui est composée de chitine, et de  $\beta$ 1-3 et  $\beta$ 1-6 Glucane (pas la même structure que la paroi cellulaire des organismes végétaux) (Chollet, 2014).

Les champignons peuvent vivre sous deux formes : sous la forme de colonies de cellules isolées, appelées les levures, ou sous la forme de mycélium (un réseau de filaments ramifiés). Leurs modes de reproduction s'accomplissent en libérant des spores, produites soit par méiose (de manière sexuée), ou alors par mitose (de manière asexuée) (Chollet, 2014).

### **3. Morphologie et structure cellulaire**

L'organisation cellulaire de base des champignons est le thalle qui constitue l'appareil végétatif. Celui-ci se caractérise par une grande variété de structure, qui va d'une forme unicellulaire (levure)

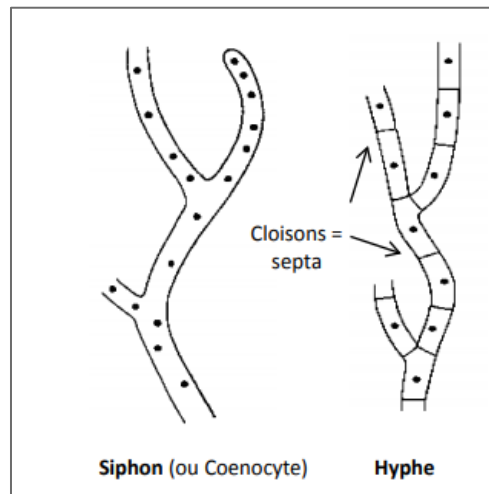
possédant un seul noyau par cellule, au plus souvent, une forme filamenteuse, constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium (Boukhedenna et Merouane, 2014).

Les figures 1 et 2 présentent le type de thalle qui trouve dans l'organisation cellulaire des champignons : unicellulaire et filamenteux.



**Figure 1:** Thalle unicellulaire (Boukhedenna et Merouane, 2014)



**Figure 2:** Thalle filamenteux (Morin-Sardin, 2016)

#### 4. Nutrition

Pour leur croissance, les champignons nécessitent des substances nutritives avec lesquelles ils sont en contact direct dans l'environnement. Les éléments nutritifs qui sont de petites molécules, telles que les sucres simples et les acides aminés en solution dans le film d'eau entourant les hyphes, peuvent être directement absorbés par le champignon. Par contre, les substances nutritives formées de gros polymères insolubles, tels que la cellulose, l'amidon et les protéines, doivent d'abord être dégradées avant d'être utilisées.

Cette digestion est réalisée par des enzymes extracellulaires qui contrôlent les réactions d'hydrolyse qui dissocient les grosses molécules en composants plus simples. La dégradation complète des gros polymères en molécules simples solubles est un processus où différentes enzymes extracellulaires sont impliquées. Une fois la molécule simple est absorbée dans la cellule, elle passe sous l'action des enzymes intracellulaires (Nasraoui, 2015).

#### 5. Mode de vie :

Les champignons sont des organismes hétérotrophes et leur nutrition dépende de la présence de matières organiques. Il existe quatre modes de vie permettent aux champignons de garantir leurs besoins nutritionnels : saprophytisme, symbiose commensalisme et parasitisme (Sahbi et Maref, 2018).

La quasi-totalité des mycètes vivent aux dépens de la matière organique en décomposition, ce sont des agents de recyclage de la matière minérale dans la nature, connus sous la nomination de « Saprophytes » (Hamani et Boudaoud, 2018).

##### 5.1. Les champignons saprotrophes

(Ou saprophytes) sont les principaux acteurs de la décomposition de la matière organique en milieu naturel. Ce sont des acteurs essentiels dans le fonctionnement et l'équilibre des écosystèmes. La plupart des espèces de champignons cultivées dans le monde appartient à ce groupe (Ndong et *al*, 2011).

## 5.2. Les champignons symbiontes

Ils Bénéficient de l'association qu'ils forment avec un autre organisme, ex : Les lichens, résultats de l'association d'un champignon et d'une algue verte (Ndong et *al.* 2011).

## 5.3. Les champignons parasites

Dans des conditions particulières, beaucoup de micromycète parasitent des organismes végétaux ou animaux ou même d'autres mycètes (c'est le cas de l'espèce *Penicillium rugulosum* qui infecte la tête d'*Aspergillus niger*, en formant dessus, des phialides regroupés en pénicilles et le conduit finalement à la mort) (Hamani et Boudaoud, 2018), ils comptent de nombreuses espèces pathogènes responsables de dégâts importants pour l'agriculture, la foresterie, l'élevage et la santé humaine (Ndong et *al.*, 2011).

## 6. Conditions physico-chimiques de croissance

### 6.1. Température

La plupart des champignons sont psychrotrophes et mésophiles avec des optima de croissance de 25 °C à 35 °C. Les espèces thermo tolérantes poussent jusqu'à 50 °C (*Aspergillus fumigatus*). La température limite de développement est de 60 °C à 62 °C. Les psychro-tolérants sont par exemple *Fusarium nivale*, *Thamnidiumelegans*(Bendjoudi et Dehimi, 2020).

### 6.2. PH

La grande majorité des champignons sont capables de croître dans une zone de pH comprise entre 4,5 et 7,5. Leur pH optimum de croissance est compris entre 5,5 et 7,5 s'il existe des champignons acidophiles ou acido-tolérants.

### 6.3. Activité d'eau

Une activité d'eau égale à 0,65 correspond à la limite de la disponibilité en eau pour les champignons qui représentent le groupe de microorganismes regroupant les espèces les plus xérophiles. Dans de nombreux cas la xérophile s'accompagne d'une osmo-tolérance.

#### **6.4. Lumière**

Les radiations du spectre visible n'ont en générale pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. Beaucoup de champignon n'exigent pas de lumière pour sporuler (Bendjoudi et Dehimi, 2020).

### **7. Mode de reproduction**

La reproduction est la formation de nouveaux individus ayant toutes les caractéristiques typiques de l'espèce parentale. Les champignons se reproduisent principalement par l'intermédiaire des spores qui sont des structures uni- ou multicellulaires avec diverses formes et tailles, capables de reproduire l'espèce parentale après germination. Les spores peuvent se former à travers une voie asexuée (ressemblant à des bourgeons qui se forment sur des branches de plantes) ou à travers une voie sexuée après fécondation (Nasraoui ,2015).

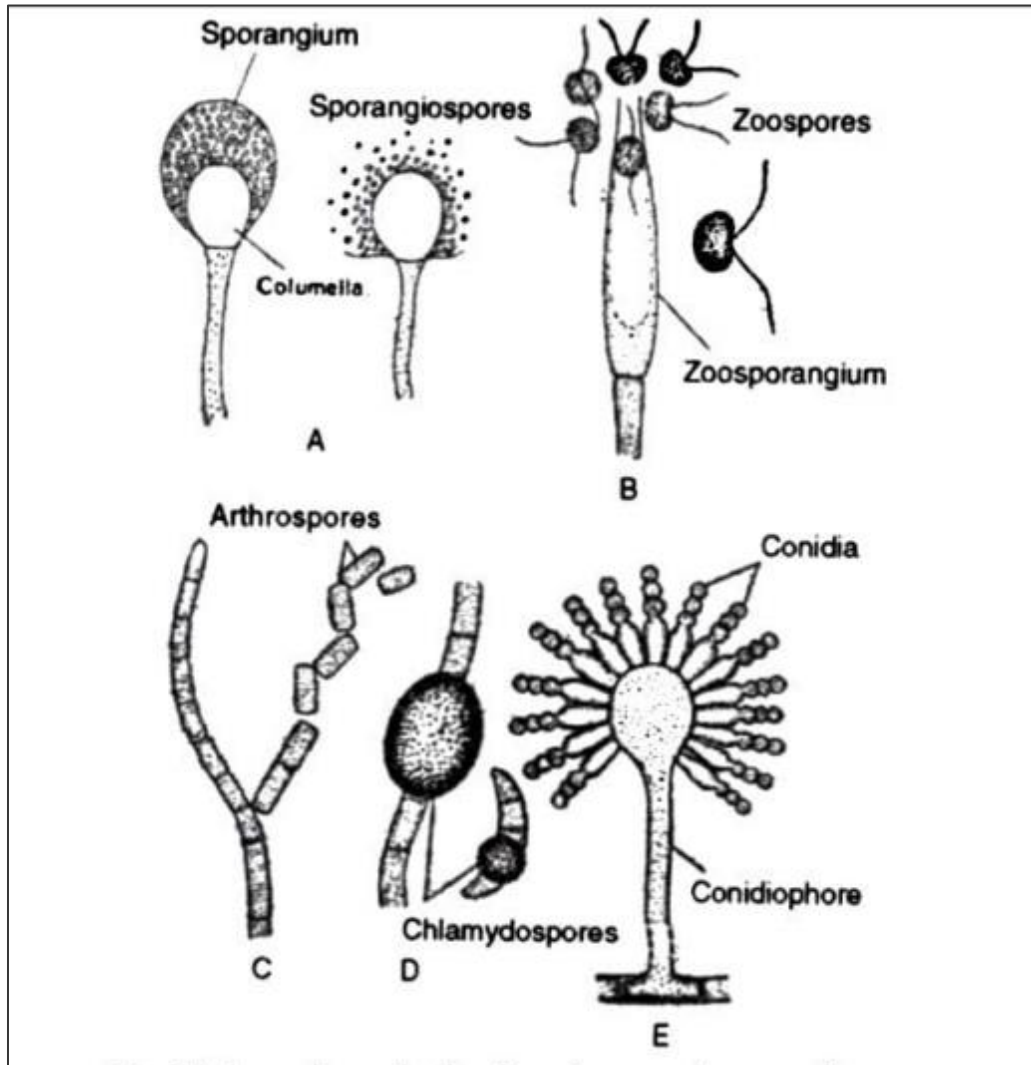
Les champignons se reproduisent à la fois asexuellement et sexuellement. Dans certains champignons, la reproduction se fait par des méthodes asexuées seulement (Dube, 2013).

#### **7.1. Reproduction asexuée**

Les champignons présentent les méthodes suivantes de reproduction asexuée fragmentation (Un fragment détaché de l'hyphe) bourgeonnement (est fréquent chez les levures), fission (se produit seulement dans les "levures de fission' par ex. *Schizosaccharomyces*) et spores. Les spores sont la méthode de reproduction asexuée la plus courante chez les champignons.

Les spores asexuées sont de deux principaux types : les sporangiospores et les conidies. Les sporangiospores sont formés au sein d'une structure en forme de sac, appelée sporangium (pl. sporangia), qui est portée sur une structure hyphale indifférenciée ou spécialisée, appelée sporangiophore

Les conidies sont formées extérieurement sur des hyphes ou plus communément sur des conidiophores différenciés morphologiquement. Les sporangiophores et les conidiophores sont parfois ramifiés (Dube, 2013).



**Figure 3:** La reproduction asexuée par les spores (Dube, 2013).

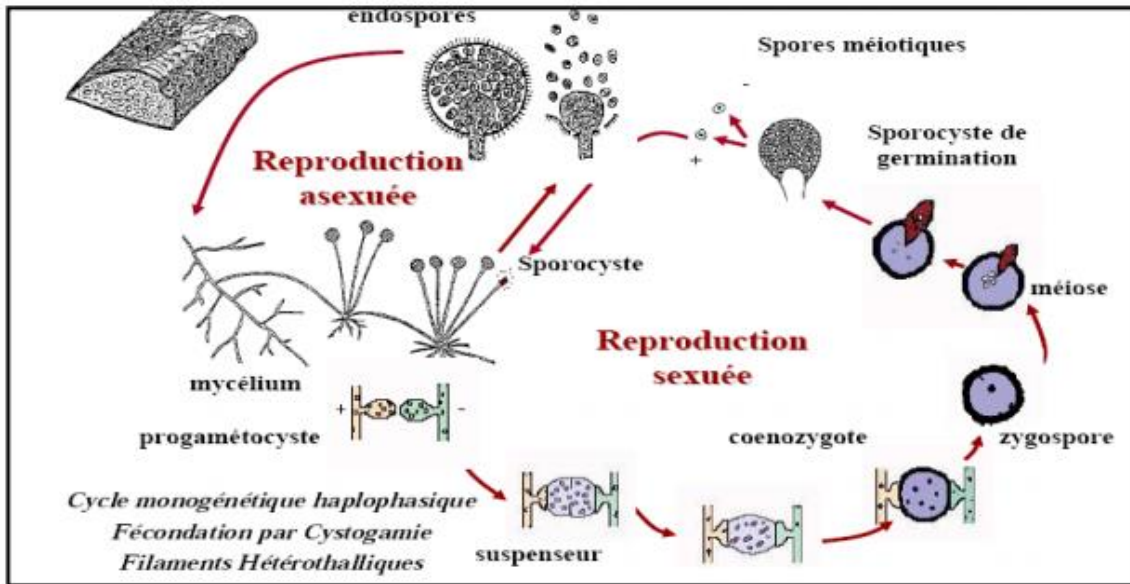
A. sporangiospores ; B. zoospores ; C. arthrospores ; D. chlamydozoospores ; E. conidia

## 7.2. Reproduction sexuée

Le processus de la reproduction sexuée consiste en trois phases distinctes : la plasmogamie qui est l'union de deux protoplastes mettant les noyaux près l'un de l'autre à l'intérieur de la même cellule. Ensuite en deuxième phase, la caryogamie qui est l'union des deux noyaux rassemblés ensemble par la plasmogamie. Tôt ou tard, la fusion nucléaire a lieu et est suivie par

la méiose, qui de nouveau réduit le nombre de chromosomes à un stade haploïde et constitue la troisième phase de la reproduction sexuée (figure 5).

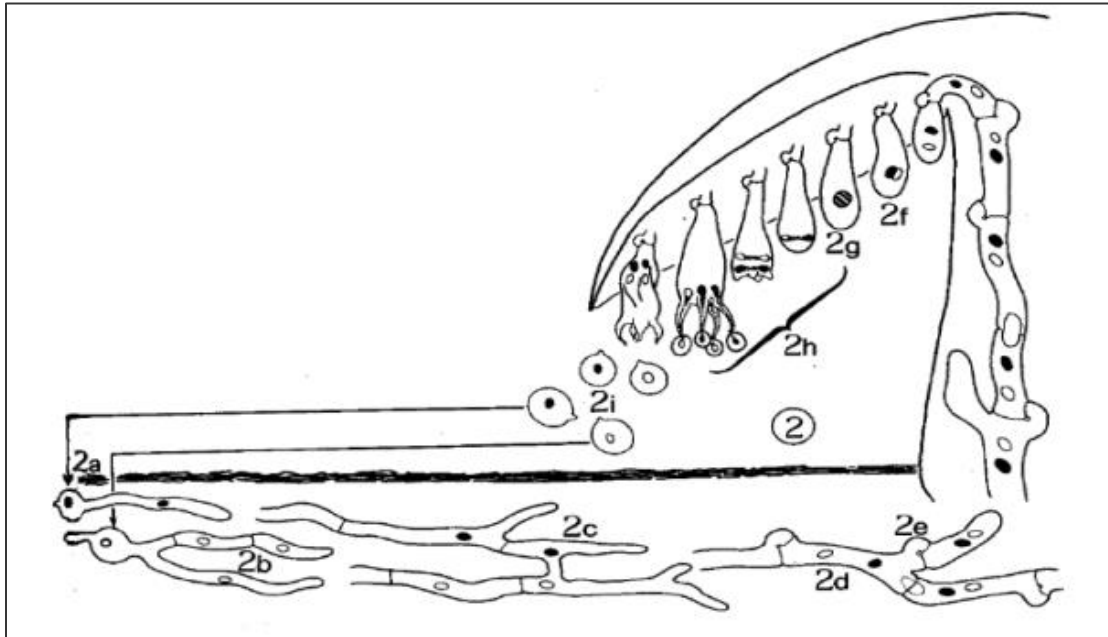
Cette reproduction sexuée aboutit à la production de spores spécialisées ayant des noms particuliers tels que zygospores, ascospores, basidiospores et oospores (Nasraoui, 2015).



**Figure 4:** Cycle de vie des champignons (Boukhedenna et Merouane, 2014).

La figure 6 présente une explication d'un exemple du cycle de vie d'un champignon basidiomycète qui commence par ; 2a : germination d'une basidiospore qui produit le mycélium primaire dont chaque cellule renferme un seul noyau à  $n$  chromosomes ; 2b : Le développement et colonisation du substrat par le mycélium primaire ; 2c : la reproduction peut avoir lieu. Deux cas sont possibles: reproduction asexuée par croissance mycélienne ; reproduction sexuée: deux thalles de polarité complémentaire s'associent par plasmogamie (fusion des cytoplasmes) 2d : La Formation d'un thalle dicaryotique ; 2e: présence possible de boucles de conjugaison (ou anses d'anastomose) permettant l'obtention d'un thalle dicaryotique ; 2f à 2g : le thalle dicaryotique produit un sporophore (ou carpophore: organe reproducteur) sur lequel se développent les cellules fertiles, appelée basides ; 2h : Caryogamie donnant des noyaux à  $2n$  chromosomes, suivie d'une méiose conduisant à quatre basidiospores haploïdes ; 2i : Germination des basidiospores qui donneront des mycéliums homocaryotiques).





**Figure 5:** Un exemple du cycle de vie d'un champignon basidiomycète (Lachichi, 2014).

## 8. Milieux de culture

De très nombreux milieux sont utilisables pour la culture des champignons, certains sont très spécifiques d'un groupe d'espèces d'autres permettent la culture de très nombreuses espèces qui présente un problème d'adaptabilité des souches sur les milieux de culture, puisque, certaines souches ont des préférences pour tel ou tel autre milieu spécifique

### 8.1. Milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar)

Composition :

Pomme de terre 200 g ; Glucose 20 g ; Agar 20 g et Eau distillée compléter jusqu'à 1000 ml

(Boukhnissa et *al*, 2011) (Labioud et Chaibras, 2015)

## 8.2. Milieu Sabouraud-gélose

Il s'agit d'un milieu couramment utilisé pour la numération et la culture des champignons.

Composition :

Glucose 30g ; Peptone 10g ; Gélose 20g et Eau q.s.p 1000ml

(Boukhnissa et *al*, 2011)

## 8.3. Malt agar

Composition par un litre

Extrait de Malt 30g ; Agar 15g Eau distillée 1000ml et PH  $5.5 \pm 0.2$  à 250°C.

(Labioud et Chaibras, 2015)

## 9. Taxonomie

Le monde des champignons est reconnu. Par le fait de caractère propre comme un monde vivant à part. un règne à part parmi les règnes vivants. Un règne qui est ni végétale, ni animal. Mais fongique. La connaissance de la diversité fongique se construit par l'observation, la taxonomie, la nomenclature, la classification et l'identification. La classification est le classement des espèces dans un système hiérarchique de ressemblance morphologique et biologique. L'espèce y est classée dans un genre et en reçoit le nom. L'épithète d'espèce jointe au nom de genre forme le binôme. Nom qui désigne l'espèce (Kiffer et Morelet, 1997).

Le règne fongique présente différents taxons au vu du seul radical terminant un nom de savoir quelle est sa place dans l'échelle des rangs hiérarchiques. Il existe toute une hiérarchie de taxons dont l'énumération par ordre d'importance décroissante peut s'écrire : Division (= Embranchement) → Sub-division (= Sous-embranchement) → Classe Sous-classe → Ordre

→Sous-ordre →Famille →Sous-famille →Tribu →Genre →Sous-genre →Section →Sous-section →espèce →sous-espèce →variété →forme (Rapior et Fons, 2006).

**Table 1:** Les principaux radicaux par ordre d'importance décroissante (Rapior et Fons, 2006).

<b>Taxon</b>	<b>Terminaison</b>
Division ou Embranchement	MYCOTA
Sub-divisionou Sous-embranchement	MYCOTINA
Classe	MYCETES
Sous-classe	MYCETIDEAE
Ordre	ALES
Sous-ordre	INEAE
Famille	ACEAE
Sous-famille	OIDEAE

-Exemple du Cèpe de Bordeaux, Sa classification hiérarchique donne :

Règne : *Fungi*

Division : *Basidiomycota*

Subdivision : *Agaricomycotina*

Classe : *Agaricomycetes*

Sous-classe : *Agaricomycetidae*

Ordre : *Boletales*

Sous-ordre : *Boletineae*

Famille : *Boletaceae*

Sous-famille : *Boletoideae*

Genre : *Boletus*

Section : *Edules*

Espèce : *Boletus edulis*Bulliard: Fr



**Figure 6:** L'espèce fongique *Boletus edulis* (Lachichi ,2014)

### 9.1. Classification des Champignons

La classification des champignons s'est d'abord fondée sur les caractéristiques morphologiques du thalle et les organes de reproduction sexuée (Abdelkader, 2012).

A la fin des années 1990, en se basant sur des études et des techniques notamment moléculaires, le règne des *Fungi* a été lui-même divisé en deux grands groupes : le groupe des vrais champignons formé du règne des Fungi et le groupe des pseudo-champignons formé de ceux qui étaient auparavant appelés « champignons inférieurs » (Nasraoui, 2008).

Les « vrais » champignons ou Eumycètes représentent un règne à part entière dans le monde du vivant, qui a depuis longtemps fasciné et intéressé les chercheurs. Leur diversité globale dans la biosphère est estimée à près d'un million et demi d'espèces, alors que seules 74 000 à 120 000 espèces sont connues (Jobard-Portas, 2010).

Ils comprennent selon l'aspect du thalle les levures (thalle unicellulaire) et les champignons à thalle filamenteux. Non septé chez les Siphomyètes (thalle coenocytique des champignons inférieurs), ou septé chez les Septomyoetes (thalle cloisonné des champignons supérieurs), Les champignons sont également classés selon le mode de reproduction sexuée (aptitude à la méiose). Suivant l'aspect du thalle et le type de spore on distingue : les zygomycètes (hyphes

coenocytiques et zygospores), les Ascomycetes (levures hyphes septés et ascospores) ou les Basidiomycetes (levures hyphes septés et basidiospores). Les termes Deuteromyetes et *Fungi imperfecti*, qui désignaient es champignons dont la reproduction sexuée n'était pas connue, n'ont plus cours à l'heure actuelle même lorsque la forme sexuée n'a pas été vue ces champignons sont classés parmi les Ascomycetes ou les Basidiomycètes car il existe d'autres moyens que la mise en évidence des asques pour le prouver (ultrastructure du septum, modalité de bourgeonnement pour une levure...) (Ripert, 2013).

**Table 2:** Classification simplifiée du règne des Fungi présentant les principales classes de champignons avec quelques espèces caractéristiques.(Ripert, 2013)

<i>Fungi imperfecti</i>	Deuteromycotina	Blastomycètes(thalle levuriforme, blastospores)  Hyphomycètes (hyphes septes spores produites directement sur les hyphes)  Coelomycètes (hyphes septés spores produites dans des cavités de type pycnide ou acervule)
<i>Fungi perfecti</i>	Zygomycotina (Zygomycètes : hyphes coenocytiques zygospores)	Mucorales : <i>Mucor, Rhizopus, Absidia</i> Entomophthorales: <i>Entomophthora coronata, ; Basidiobolus haptosporus</i>
	Ascomycotina (Ascomycètes : hyphes septés , ascospores)	Taphrinomycètes : <i>Taphrina neoformans</i> (Cloque du pêcher) Saccharomycetes : <i>Saccharomyces, Candida, Torula</i> Euascomycetes : Tubérales : <i>Tuber melanosporum</i> (Trutfe) Léotiales : <i>Sclerotinia fuckeliana</i> (Botrytis de la vigne)

<i>Fungi perfecti</i>	Basidiomycotina (Basidiomycètes :hyphes septés, basidiospores)	Uredinales : <i>Puccinia graminis</i> Ustilaginales: <i>Ustilago tritici</i> Trémellales: <i>Cryptococus syn.</i> Polyporales : <i>Fistulina hepatica</i> (Langue de beeut) Clavariales : <i>Clavaria pistillaris</i>
	Chytridiomycotina (Chytridiomycètes) : thalle réduit, limité à des zoosporocystes contenant des spores uniflagellées	Chytridiales : <i>Rhinosporidium seeberi</i>

## 10. Pathogénicité des champignons

### 10.1. Pathogénicité sur l'homme

Certains champignons filamenteux représentent une source de contamination avec un risque élevé pour la santé humaine. On distingue donc deux types de contamination chez l'homme : alimentaire et infectieuse (Lecellier ,2013). Trois types de mycoses humaines sont fréquentes et universelles : les dermatophytoses, les candidoses cutanéomuqueuses et les mycoses dues aux moisissures (Bouchair et Doukhane ,2017).

#### 10.1. a. Candidoses disséminés

Les levures du genre *Candida* sont au premier rang des infections fongiques en pathologie humaine. C'est bien sûr l'espèce *Candida albicans*, levures saprophytes de la peau et de tube digestif humain, peuvent se disséminer dans l'organisme en cas de la présence des lésions cutanées ou muqueuses.

### **10.1. b. Aspergilloses invasives**

L'Aspergillose invasive correspond à l'inhalation de spores ce qui est à l'origine d'une multiplication puis une dissémination de ces germes dans tout le corps. La contamination par les aspergillus est surtout aérienne et le genre responsable : *Aspergillus* (Bouchair et Doukhane, 2017).

### **10.2. Pathogénicité sur les plantes**

Les toxines sont très vénéneuses aux plantes hôtes et causent partiellement ou totalement les symptômes des maladies. Elles sont actives en très faibles concentrations et sont mobiles à l'intérieur de la plante et peuvent ainsi agir à une certaine distance du site d'infection (Nasraoui, 2015).

#### **10.2. a. Alternariose**

Les agents causaux *Alternariaspp.* De cette maladie sont ubiquistes et peuvent atteindre toutes les parties de la plante, feuille, tige, collets, fruits et même les graines *Alternariaspp.* Peuvent se manifester à différents stades de développement de la culture (plantule et plante adulte) (Ferrag et Guerioune, 2018).

#### **10.2.b. Moisissure grise**

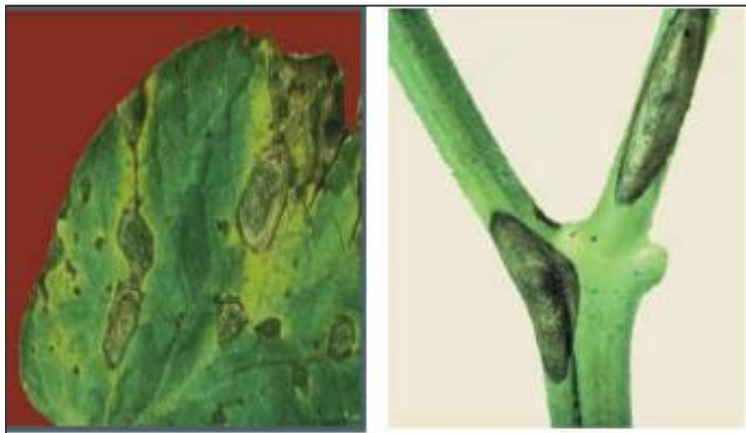
Cette maladie a comme agent causal *Botrytis cinerea*. Qui est responsable de la pourriture grise (Ferrag et Guerioune, 2018).

#### **10.2. c. Le Bayoud: *Fusarium oxysporium* f.sp .*albedinis* (FOA)**

Le Bayoud est la maladie la plus grave du palmier dattier. Cette maladie est apparue au Maroc vers 1870. Où elle a entraîné la mort de plus de 12 millions de palmiers. La maladie s'est

introduite en Algérie par les oasis frontières (Béni Ounif) en 1898 et Bechar en 1900 depuis son apparition cette maladie a causé la destruction de plus de 3 millions des palmiers dans le sud-ouest Algérien.

Le premier symptôme externe de la maladie s'observe sur une palme de la couronne moyenne ; cette palme prend un aspect plombé et se dessèche selon un processus très particulier. En effet, les folioles ou les épines situées d'un côté de cette palme se dessèchent progressivement du bas vers le sommet, et se replient vers le rachis. Ce dessèchement gagne ensuite les folioles du côté opposé, progressant cette fois de haut en bas, et toute la palme finit par se dessécher complètement et prend une couleur blanchâtre (Benbada et Malik, 2019).



**Figure 7:** Symptômes de l'Alternariose sur feuille et tige de tomate (Ferrag et Guerioune, 2018).



**Figure 8:** Symptômes de la pourriture grise sur tige et fruit de la tomate (Ferrag et Guerioune, 2018).





**Figure 9:** Symptômes du Bayoud sur le palmier dattier (Benbada et Malik, 2019).

(a -Début de la maladie ; b- stade final de la maladie)

### 10.3. Pathogénicité sur les animaux

Les champignons causent aussi des maladies chez les animaux. Par exemple, au Royaume-Uni, plus de 100.000 dindons sont morts de nourriture contaminée par *Aspergillus flavus* en 1960. La coccidioidomycose est également une maladie fongique causée par des espèces de *Coccidioides* qui causent des infections respiratoires, dermatologiques, musculosquelettiques, neurologiques et ophtalmologiques. En outre, *Coccidioides immitis* et *Coccidioides posadasii* champignons trouvés en Californie, Amérique centrale et du Sud ont causé le cas de Coccidioidomycosis sur de nombreux chevaux (Sevindik, 2018).

# **Chapitre II : Techniques classiques d'identification des champignons**



## Chapitre II : Techniques classiques d'identification des champignons

### 1. Identification morphologique :

L'identification des champignons filamenteux repose sur des critères culturels, température de croissance et vitesse de pousse, mais surtout sur des critères morphologiques associant l'aspect macroscopique des cultures et la morphologie microscopique (Tikour, 2018).

Pour les levures, se surajoutent aux critères culturels (température et vitesse de pousse), des critères physiologiques : l'étude de l'assimilation des sucres comme sources de carbone et d'énergie (Tikour, 2018).

Les colonies, développées à la suite de la croissance plus ou moins rapide du mycélium (appréciée à 25 °C), sont caractérisées par un mycélium pigmenté ou non, aérien ou ras. L'observation de la pigmentation est réalisée au niveau du mycélium aérien et sur le mycélium situé au contact direct avec la gélose (cette dernière observation s'effectue en retournant la boîte). De plus, les spores parfois groupées en sporodochies (fructifications dans laquelle la masse conidienne est supportée par un stroma couvert de courts conidiophores), peuvent donner à la colonie un aspect « gras » (Bernard, 1988).

L'identification des champignons selon Botton et al. (1985) distingue les caractères culturels et morphologiques tels que :

- **Caractères culturels** : la vitesse de la croissance apicale ; la texture, la marge, l'épaisseur et la couleur de la colonie ; la pigmentation de l'agar, la production d'exsudat et l'odeur des colonies.

- **Caractères morphologiques** :

Du mycélium : absence ou présence de cloisons, couleur, dimensions, ornementation des parois, mode de ramification, différenciation des thallospores.

Des organes différenciés et de leur contenu : forme, couleur, dimensions, texture des parois et ornementsations.

En règle générale, ces observations sont faites à partir des cultures réalisées sur Malt Extrait Agar (MEA) à 30 °C. Des clés d'identification des champignons sont établies par différents groupes de chercheurs afin de classer les nouvelles souches (Cordova et Jesus, 1998).

### **Principales caractéristiques des champignons microscopiques**

Les champignons sont des thallophytes, car leur appareil végétatif ou thalle ne comporte pas de système conducteur différencié l'appareil végétatif des champignons (thalle) est généralement constitué par un mycélium formé de filaments tubulaires cylindriques ramifiés, à croissance linéaire apicale, dont le diamètre très variable selon les espèces de 1 à 2 $\mu$ m jusqu'à plus de 50 $\mu$ m. L'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Le mycélium est dit (septé) lorsque des cloisons transversales s'y forment régulièrement, les cloisons sont incomplètes du moins dans les parties actives du mycélium ou elles sont percées d'un pore central les éléments constitutifs du mycélium cloisonne sont appelées hyphes. Ceux du mycélium non cloisonné sont nommés ; siphons.

L'unité cellulaire de la base du thalle est appelée hyphe, c'est une cellule tubulaire emprisonnée dans une paroi rigide de chitine (Benbada et Malik, 2019).

## **1.1. Identification macroscopique**

### ***1.1.1. Critères d'identification macroscopique***

#### **a) L'aspect des colonies :**

Représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

**b) Le relief des colonies :**

Il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peuvent être variable (molle, friable, élastique ou dure).

**c) La taille des colonies :**

Les colonies peuvent être petites (*Cladosporium*) ou colonies étendues, envahissantes.

**d) La couleur des colonies**

Est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*) (Tikour, 2018).

**Table 3 : Critères d'identification macroscopique**

Critères	Exemples
La vitesse de croissance	Nombre de jours pour obtenir une culture (1, 2, une semaine, deux à trois semaines). La date d'ensemencement doit donc être mentionnée sur le tube.
L'aspect de la colonie en surface et la forme de la colonie	Type bactérienne ou filamenteuse, duvet, acumination centrale, vermiculé, poudreuse, plissée, granuleuse, centre déprimé, centre en cratère, cérébriforme, en coupole, astéroïdes, étoilée
La couleur de la colonie au recto	Blanc, jaune, rouille, chamois ± clair, gris verdâtre, beige, violet, cirreuse, ocre, jaune, rosée...
L'aspect de la colonie au verso (en revers)	Noter la couleur du revers ...

## 1.2. Identification microscopique

### A. Champignons filamenteux

L'identification a été réalisée par observation microscopique des lames préparées. Un petit morceau de papier adhésif transparent est accroché sur la pointe d'une pince. Sa face adhésive est déposée sur la surface de la colonie fongique en culture en boîte de Pétri. Ce contact permet de prélever du mycélium et des spores. La face adhésive du papier est ensuite appliquée sur une lame. Pour augmenter le contraste, une goutte de colorant du rouge Congo a été déposée sur la lame juste avant d'y accoler le papier adhésif. Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pynides) est aussi un élément important de diagnose (Tikour, 2018).

### B. Levures

Après ensemencement sur milieu de Sabouraud-Chloramphénicol à 27 °C, apparaissent en 24h à 48h des colonies de levures. L'identification microscopique a été reposée sur : un examen direct : une colonie est prélevée et déposer sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant « rouge Congo ». Cet examen permet de noter la forme, la taille, et le mode de reproduction asexuée (bourgeonnement ou scissiparité) des levures (Tikour, 2018).

#### 1.2.1. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Tikour, 2018).

**a. Le thalle**

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

**Le thalle siphonné**, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15  $\mu\text{m}$ ), non cloisonné est caractéristique des Zygomycètes.

**Le thalle septé ou cloisonné**, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 $\mu\text{m}$ ) et régulier divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes (Labioud et Chaibras, 2015).

**b. Les spores**

Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes

-Les spores endogènes (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les Mucorales, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.

-Les spores exogènes (conidies), retrouvées chez les Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène). L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Labioud et Chaibras, 2015).

**c. Aspect des spores**

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores :

- les amérospores : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*).
- les didymospores : spores bicellulaires (*Trichothecium*).
- les phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*).



-les dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*).

-les scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*) (Labioud et Chaibras, 2015).

#### **d. Modes de formation des conidies**

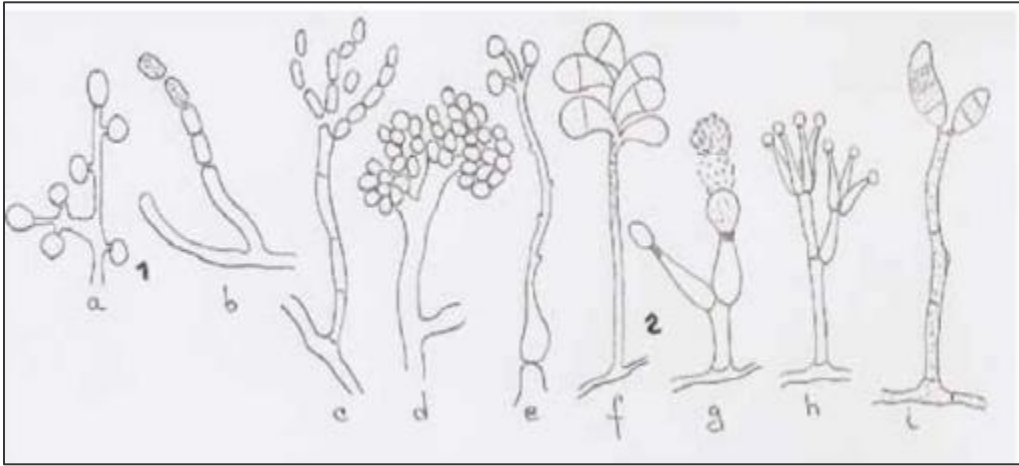
##### **1. Le mode thallique**

La formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales : le type thallique solitaire (ex: *Chrysosporium*) et le type thallicearthrique (ex: *Geotrichum*) (Labioud et Chaibras, 2015).

##### **2. Le mode blastique**

Les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère (Labioud et Chaibras, 2015).

On en distingue plusieurs variantes : le type blastique acropète (ex: *Cladosporium*, *Alternaria*), le type blastiquesynchrone (ex: *Botrytis*) et le type blastiquesympodial (ex: *Beauveria*) (Labioud et Chaibras, 2015).



**Figure 10:** Modes de formation des conidies des champignons (Labiod et Chaibras, 2015).

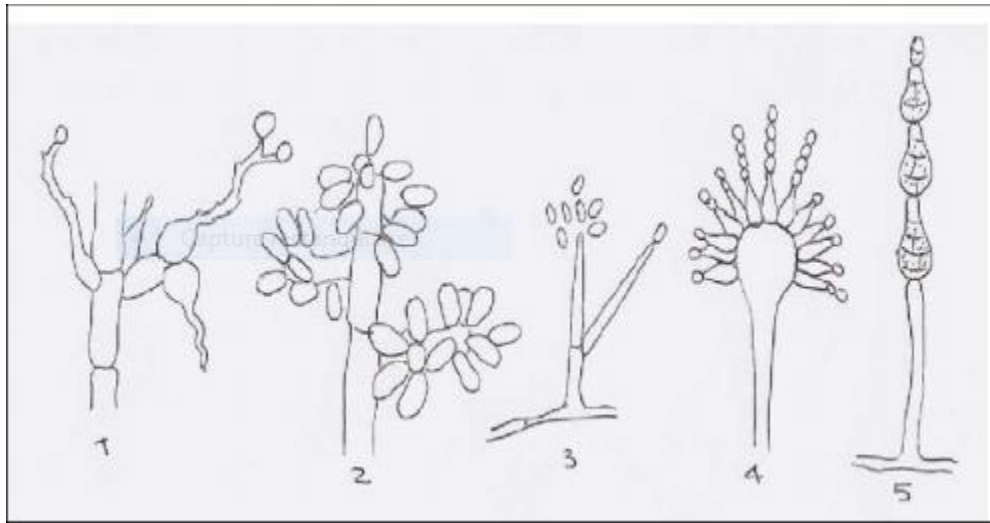
1. Formation thallique : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthritique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : régressif (*Trichothecium*), g : annelidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).

-Le type blastique régressif, ex : *Trichothecium*.

-Le type blastiquepercurrent (*annelidique*), ex : *Scopulariopsis*.

-Le type blastiquephialidique, ex : *Aspergillus*, *Penicillium*.

- Le type blastiqueporique, ex : *Alternaria*, *Curvularia*.



**Figure 11:** Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux (Labioud et Chaibras, 2015)

Grappes (*Beauveria*), 2. Masses (*Botrytis*), 3. Têtes (*Acremonium*), 4. Chaînes basipètes (*Aspergillus*), 5. Chaînes acropètes (*Alternaria*)

#### e. Mode d'implantation des cellules conidiogènes

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces (Labioud et Chaibras, 2015).

Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (ex : *Aureobasidium*). Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être :

Directement insérées sur les filaments végétatifs (ex : *Acremonium*, *Fusarium*)

Bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :

a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex : *Aspergillus*)

b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex : *Penicillium*)

c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex : *Verticillium*) ; bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés :

Conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corèmie (ex : *Graphium*).

Conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex : *Myrothecium*).

#### **f. Présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée**

Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules :

##### **1. Les pycnides**

Sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée des conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (Phoma).

##### **2. Les acervules**

Sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. A l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies.

Sur les milieux de culture seules les pycnides sont visibles, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal (Labiod et Chaibras, 2015).

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types :

##### **Les apothécies :**

L'ascocarpe est ouverte, en forme de coupe, portant les asques en surface.

**Les cléistothèques :**

L'ascocarpe est arrondie et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques ; il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (ex : *Emericella*).

**Les périthèces :**

L'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitunique) ou à deux membranes (bitunique) et contenant chacun 8 ascospores (*Chaetomium*).

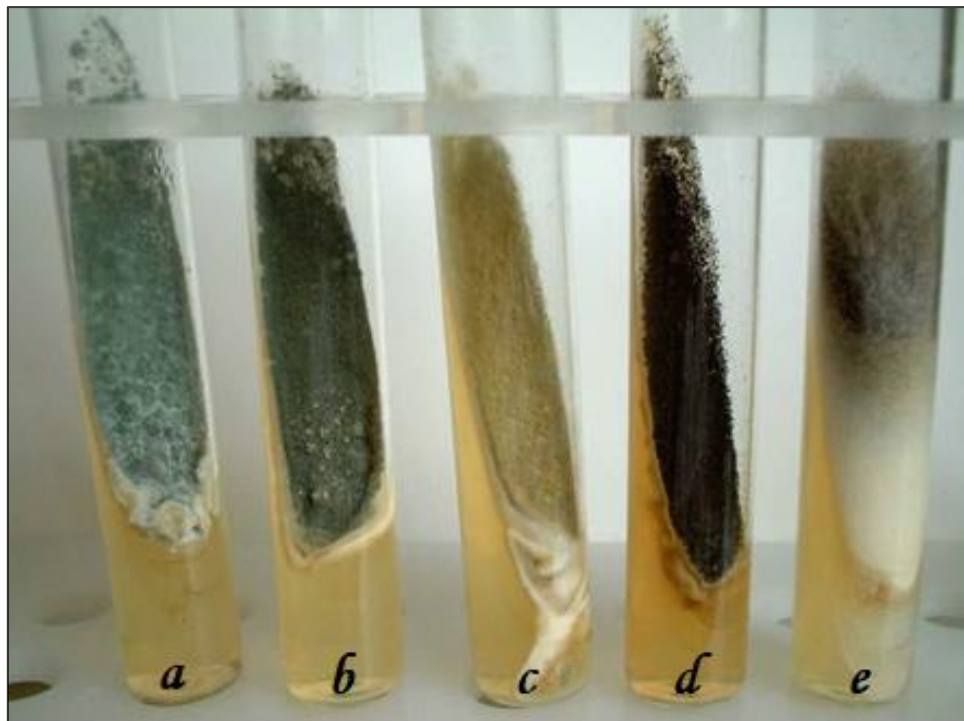
**g. Présence des chlamydozspores**

Les chlamydozspores sont des éléments de résistance qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydozspores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*) (Labioud et Chaibras, 2015).

**Table 4:** Principaux groupes des champignons et leurs caractéristiques morphologiques (Benbada et Malik, 2019).

Classes	Morphologie	Forme Végétative	Reproduction Sexuelle	Reproduction Asexuelle
Oomycètes	Thalle à Mycélium	Mycélium Non Cloisonné	Les Sporocystes Produisent-les Zoospores ou Conidies	Oospores
Zygomycètes	Filamenteux	Mycélium Non Cloisonné	Par fusion Des Gamétocystes	Plus souvent par sporocystospores ou parfois par conidies exogènes.

Ascomycètes	Filamenteux	Mycélium Non Cloisonné	Formation des Ascospores Par les Asques	Production des Conidies
Basidiomycètes	Thalle à Mycélium ou Unicellulaire (Levure)	Mycélium Non Cloisonné	Formation Des Basidiospores Sur des Basides	Des spores épaisses, Solides
Hyxomycètes	Filamenteux	Forme de Plasmode	Zoospores	Zygotés
Archi mycètes	Filamenteux	Des cellules Et Ramifications Différente	Zoospores	Différentes



**Figure 12:** Aspect microscopique de quelques champignons sur milieu PDA incliné

a : *Penicillium* ; b : *Aspergillus fumigatus* ; c : *Aspergillus flavus* ; d : *Aspergillus niger* ; e : *Rhizopus*

## 2. Identification biochimique

À côté des méthodes moléculaires, les méthodes biochimiques peuvent fournir des résultats complémentaires à la description morphologique et/ou à la biologie moléculaire (Verscheure et *al*, 2002). Il y a une variété de méthodes biochimiques qui vont des tests simples à base d'agar aux méthodes chromatographiques et électrophorétiques plus sophistiquées (Guarro et *al*, 1999).

Ces techniques permettent l'analyse qualitative et quantitative d'un ou plusieurs métabolites ou composés, principalement les polysaccharides, les lipides insaponifiables, les acides gras, les métabolites secondaires volatils et non volatils (Verscheure et *al*, 2002).

### 2.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides constituent 80 à 90 % de la membrane cellulaire des champignons et leurs différences de composition chimique et structurale indiquent que chaque genre possède ses propres caractéristiques polysaccharidiques (Verscheure et *al*, 2002).

### 2.2. Les lipides insaponifiables

#### 2.2.a. Les ubiquinones

Les ubiquinones font partie des lipides terpéniques et sont des constituants des membranes mitochondriales des eucaryotes. Ils jouent un rôle essentiel dans le métabolisme, par exemple, ubiquinones (coenzyme Q). Telles différences dans la structure de l'ubiquinone sont d'excellents indicateurs dans la classification des genres et sous-taxons génériques chez les bactéries et les levures. Bien que moins courant, ces techniques sont également utilisées dans la taxonomie des noires levures et champignons filamenteux (Guarro et *al*, 1999).

#### 2.2.b. Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des composés importants de la bicouche lipidique de la membrane. Les champignons possèdent des stérols méthylés en C24 tels que l'ergostérol, un stéroïde commun à tous les champignons, des stérols éthylés et parfois des stérols désalkylés en C24.

Grandmougin-Ferjani *et al.* (1999) ont étudié par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) la distribution en stérols de 16 espèces de champignons mycorrhiziens appartenant à l'ordre des Glomales. Ils ont constaté que le nombre de stérols variait de 5 à 15 en fonction de l'espèce, que le stérol majoritaire était le 24-éthylcholestérol, tandis que l'ergostérol n'était pas détecté. Ces analyses ont montré un profil en stérols très similaire pour les espèces étudiées et ont révélé que les Glomales étaient un ordre primitif des Zygomycètes (Verscheure *et al.*, 2002).

### 2.2.c. Les caroténoïdes

La dernière classe de lipides envisagée en chimio taxonomie est celle des caroténoïdes car 60 % des champignons étudiés en contiennent. Par exemple, les espèces des Zygomycètes (ordre des Mucorales) possèdent du b carotène comme pigment majoritaire tandis que les espèces de Chytriales et Blastocladales biosynthétisent l'a-carotène et que certaines espèces de Chytridiomycetes contiennent le  $\delta$  - carotène (Verscheure *et al.*, 2002).

### 2.3. Les acides gras

En effet, plusieurs espèces présentaient la même composition mais des concentrations relatives différentes ; l'acide palmitique (16 :0), l'acide oléique (18 :1) et l'acide linoléique (18 :2) ont été détectés pour toutes les espèces tandis que la quantité en acides gras insaturés variait entre 68,5 % et 78,5 % (Verscheure *et al.*, 2002).

Les analyses des acides gras sont de plus en plus utilisées pour différencier les champignons ; Chromatographie en phase gazeuse par pyrolyse, La spectrométrie de masse par pyrolyse, la chromatographie en phase gazeuse et les systèmes biphasiques de polymère aqueux de séparation font partie des nombreuses méthodes utilisées pour déterminer ces composés (Guarro *et al.*, 1999).

### 2.4. Les métabolites secondaires volatils

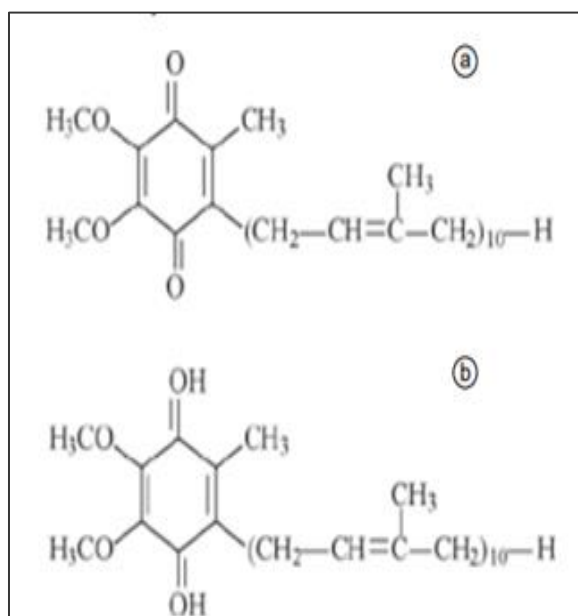
Les champignons synthétisent un grand nombre de métabolites secondaires et, parmi eux, des molécules volatiles responsables de leur odeur caractéristique. Le développement des techniques



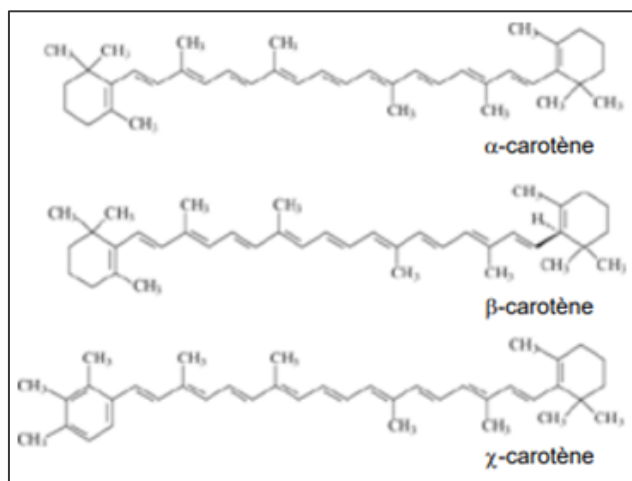
analytiques telles que la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS a facilité l'identification des composés volatils (Verscheure et *al*, 2002).

### 2.5. Les métabolites secondaires non volatils

Les métabolites secondaires non volatils peuvent être utiles à la caractérisation d'espèces et à la détermination des relations phylogénétiques car ils peuvent servir de signaux chimiques entre les organismes ou les espèces. Les métabolites secondaires non volatils ont été largement utilisés pour la taxonomie de quelques genres de champignons filamenteux (Verscheure et *al*, 2002).



**Figure 13:** Structure chimique des ubiquinones Q10 (a) et Q10 (H2) (b) (Verscheure et *al*, 2002)



**Figure 14:** Structure chimique du  $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -carotène et  $\delta$ - carotène (Verscheure et *al*, 2002).

# Chapitre III : Techniques modernes d'identification des champignons



## Chapitre III techniques modernes d'identification des champignons

### 1. Les techniques protéomiques

La protéomique implique les applications des technologies pour l'identification et la quantification des protéines globales présentent le contenu d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme (Aslam et *al*, 2016).

Les études analytiques, identifiant et caractérisant la structure et la fonction des protéines, font intervenir des techniques très variées mais dont leur combinaison apparaît de plus en plus indispensable (Aubry et *al*, 2000).

L'identification des protéines fait donc appel à la protéomique descriptive et plus particulièrement à la protéomique qualitative en se concentrant sur les protéines constamment exprimées et très abondantes telles que les protéines ribosomiques. Un certain nombre de méthodes ont été décrites notamment l'analyse du protéome par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Delahaye, 2018), et l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) (Desoubeaux et Chandener, 2014).

#### 1.1. Spectrométrie de masse MALDI-TOF (SM de type Matrix Associated Laser Désorption Ionisation—Time Of Flight (MALDI-TOF))

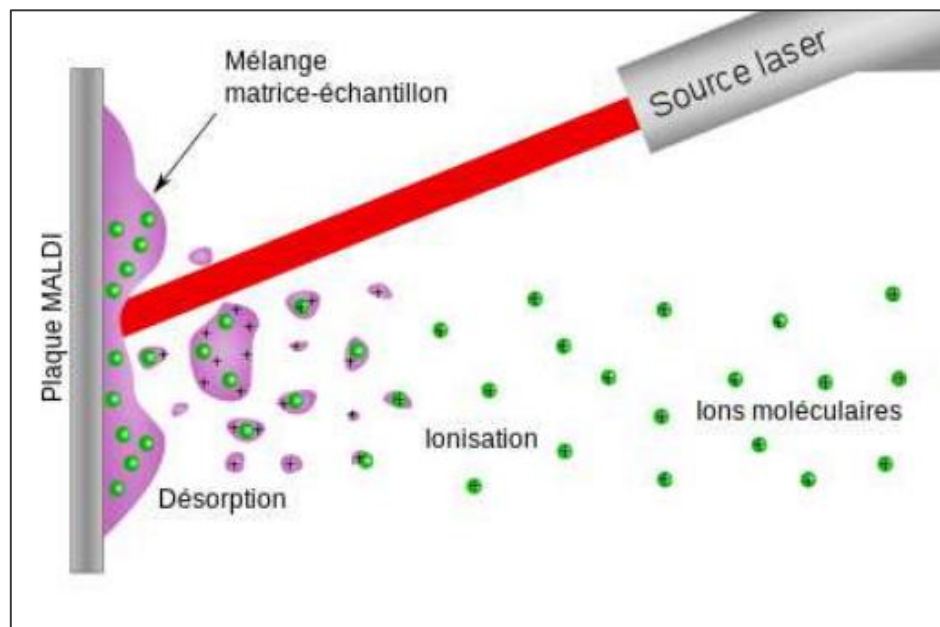
##### 1. Principe

La spectrométrie de masse est une technologie consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge. Le spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (Time Of Flight, TOF). Cette technique permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader.

L'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans la discrimination d'espèces fongiques, dont celles du genre *Penicillium*, n'a été exploré que dans les années 2000. Dans une étude réalisée en 2005, Chen et Chen ont rapporté la capacité à discriminer six espèces de *Penicillium* sur la base de leur empreinte protéique (Delahaye, 2018).

### 1.2. Désorption Ionisation

Un laser UV (ultra-violet), de 337 nm de longueur d'onde, est pulsé en direction de la cible. La matrice, ayant une grande réactivité pour l'absorption de la lumière UV absorbe l'énergie du laser protégeant ainsi les molécules protéiniques de la dégradation. L'énergie du laser produit deux phénomènes : (1) la désorption c'est-à-dire la vaporisation de la matrice libérant les protéines, (2) le transfert des protons de la matrice à l'analyte qui s'ionise. L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet). Les protéines ont des groupements accepteurs de protons et sont ionisées positivement (Delahaye, 2018).



**Figure 15 :** Principe d'ionisation par la technique MALDI (Delahaye, 2018)

### 1.3. Spectrométrie à temps de vol

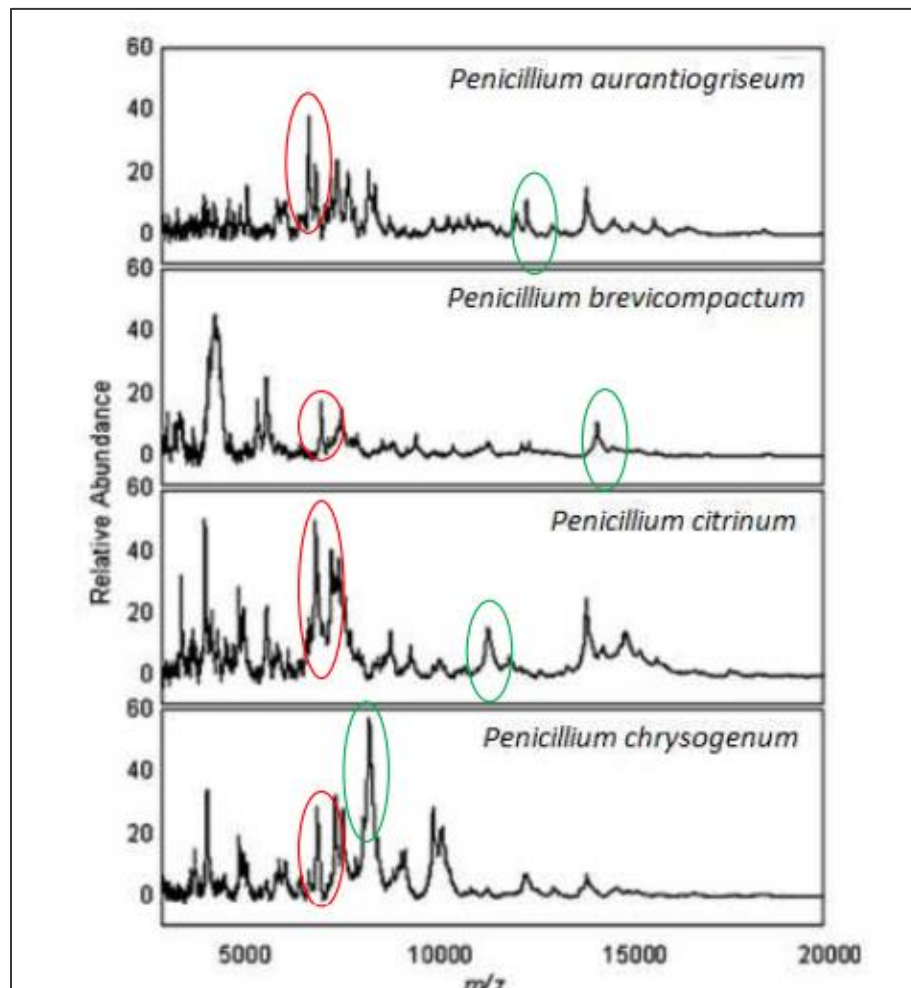
La spectrométrie à temps de vol est une technique éparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La séparation se fait entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à

analyser. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression. Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions à atteindre le détecteur.

Le détecteur traduit l'impact des ions en signal ; ces informations enregistrées sont ensuite envoyées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre (Delahaye, 2018).

#### **1.4. Spectre de masse**

Les données enregistrées sont, tout d'abord, calculées afin de transposer les résultats dans un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal et l'axe des abscisses indique le rapport  $m/z$ . Un exemple classique de spectre obtenu en spectrométrie de masse MALDI-TOF est présenté ci-dessous (Delahaye, 2018).



**Figure 16:** empreintes spectrales brutes obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir de quatre espèces fongiques (Delahaye, 2018).

(Pics entourés en rouge à l'ensemble de ces quatre spectres communs illustrant le partage d'une, et parfois de plusieurs, protéine(s) commune(s). Ces protéines, présentes quelle que soit l'espèce, sont donc spécifiques du genre du champignon ; pics entourés en vert spécifiques à chaque spectre permettant de différencier les espèces)

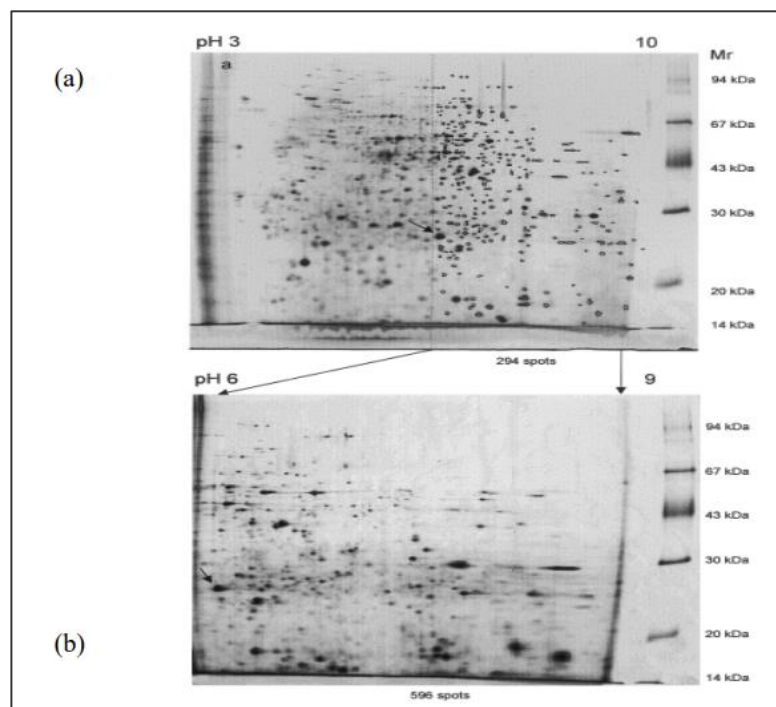
### 1.5.Électrophorèse bidimensionnelle (2D)

L'électrophorèse-2D est apparue prometteuse, bien que plutôt confidentielle. Elle est, en théorie, capable de caractériser l'ensemble des protéines d'un mélange, après les avoir séparées sur gel en fonction de leur charge et de leur masse



En mycologie, quelques travaux ont été entrepris pour l'identification des composés fongiques en culture *in vitro*, mais l'électrophorèse-2D se voulait surtout intéressante pour l'analyse *ex vivo* des liquides biologiques afin d'en améliorer la compréhension physiopathologique et, en conséquence, le diagnostic des infections fongiques (Desoubeaux et Chandener, 2014).

Cette méthode permet, à l'issue de deux migrations électrophorétiques successives, de visualiser un grand nombre de protéines de façon simultanée. Dans la première dimension, les protéines migrent dans un gradient de pH selon leur point isoélectrique. Cette étape, appelée isoélectrofocalisation (IEF), est suivie d'une seconde migration, généralement menée dans une direction perpendiculaire à la première, où les protéines sont séparées selon leurs poids moléculaires (Aubry et *al*, 2000).



**Figure 17:** Comparaison des profils 2-DE obtenus avec un extrait protéique de levure, dans un gradient de pH présentant des intervalles de pH différents (Aubry et *al*, 2000).

## 2. Méthodes moléculaires

### 2.1.Extraction d'ADN génomique

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans les études de biologie moléculaire.

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus ; l'ADN extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Plusieurs protocoles d'extraction et de purification ont été mis au point afin d'avoir un ADN de qualité et de rendement supérieurs.

Les différents protocoles suivent presque le même principe :

1. Lyse des cellules.
2. Elimination des protéines, des métabolites secondaires et des autres acides nucléiques (ARN).
3. Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Diverses techniques d'isolement d'ADN ont été élaborées. Outre les méthodes classiques, des méthodes d'extraction commercialisées sous forme de kits (Chahdi Et Salhi, 2019).

#### 2.1.1. Méthode d'extraction au CTAB

Élaboré pour la première fois par Murray et Thompson en 1980. Le protocole du test au cetyltriméthyl ammonium bromure (CTAB) a été publié ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues (Chahdi et Salhi, 2019).

La méthode convient pour l'extraction et la purification d'ADN des végétaux et d'aliments tirés des végétaux et convient particulièrement pour la suppression des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc sa qualité (Chahdi et Salhi, 2019).

### 2.1.2. Méthode d'extraction par SDS

Cette méthode a été adaptée à partir de Dellaporta (1983). Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent ionique utilisé en biochimie et biologie moléculaire, SDS a été utilisé comme un détergent dénaturant (Chahdi et Salhi, 2019).

### 2.1.3. Les kits d'extraction d'ADN

Un kit d'extraction permettant de réaliser l'extraction d'ADN de façon rapide ; il s'agit d'une solution commerciale proposée par un fabricant pour simplifier l'usage d'outil de biologie moléculaire ; ce qui permet de traiter un grand nombre d'échantillons, tout en préservant la qualité de l'ADN (Chahdi et Salhi, 2019).

## 2.2. Amplification

### 2.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

#### 2.2.1.a. Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique mise au point en 1985 par Kary Mullis et ses collaborateurs. Elle permet d'amplifier *in vitro* une séquence spécifique d'un acide nucléique et d'obtenir une quantité importante de cette séquence, afin de la détecter et de la manipuler. Elle permet donc d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Dans un laps de temps (deux heures pour une séquence de 1000 pb), environ un million de copies de la séquence souhaitée peuvent être obtenues (Monier et Cécillon, 2015).

La quantité d'amplifiât obtenue est généralement suffisante pour une utilisation ultérieure. Le principe et les conditions expérimentales de la PCR sont simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplification d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques orientées en sens inverse (Forward/ Reverse). Les amorces définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Au cours de la PCR, les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes, si

bien que l'amplification obtenue est exponentielle et non linéaire (Monier, J.M et Cécillon, S, 2015).

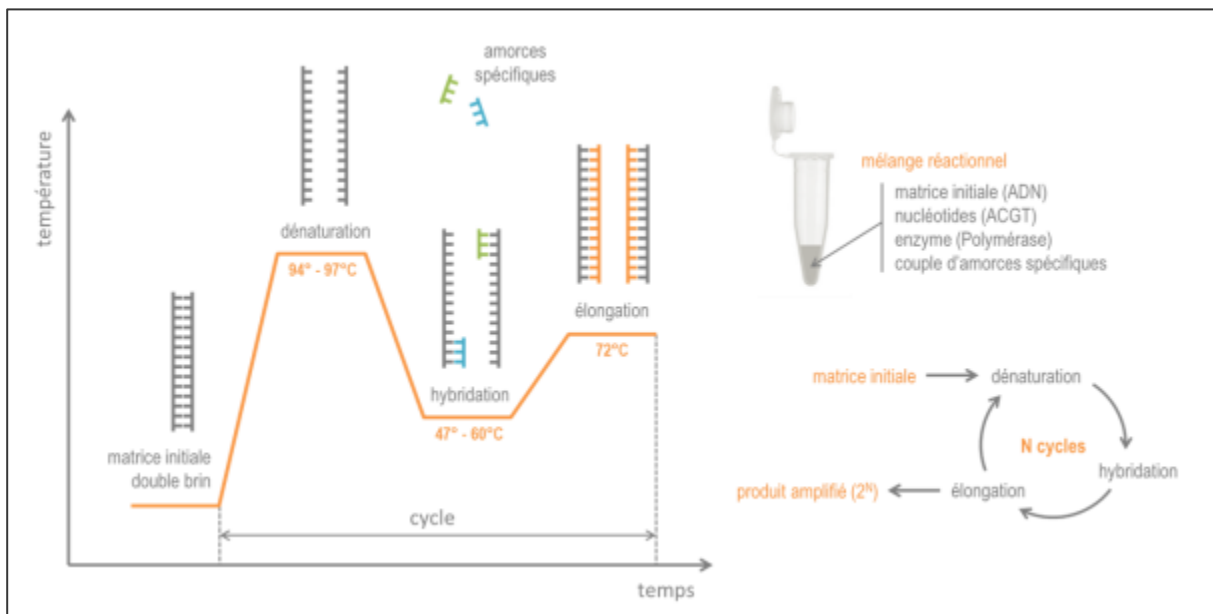
La PCR a connu un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase thermostable, (isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*) qui résiste aux températures élevées de dénaturation de l'ADN matrice, ce qui permet une automatisation de la technique (Monier et Cécillon, 2015).

### 2.2.1.b. Etapes

- Dénaturation de l'ADN matrice double brin Pour débiter la réaction, l'ADN est dénaturé en le chauffant à 95 °C environ 30 secondes, afin de séparer les deux brins. Cette dénaturation de l'ADN matrice doit être complète, en effet, une dénaturation partielle (temps de dénaturation inférieur à 30 secondes ou température inférieure à 95 °C) entraînerait le "self-priming". Dans certains cas, afin d'éviter ce phénomène, un pré dénaturation de l'ADN matrice est réalisée en le chauffant à 95 °C environ 10 minutes (Monier et Cécillon, 2015).
- Hybridation des amorces avec l'ADN matrice en abaissant la température de 4°C en dessous des  $T_m$  (température de demi-dénaturation) des deux amorces, ces dernières vont pouvoir s'hybrider avec les séquences complémentaires présentes sur les fragments d'ADN dénaturé. La concentration des amorces étant beaucoup plus élevée que celle des brins d'ADN, chaque brin d'ADN s'hybridera avec l'amorce qui lui est complémentaire. Ainsi le brin orienté 3'→5', s'hybridera avec l'amorce directe orientée 5'→3' et le brin orienté 5'→3' s'hybridera avec l'amorce reverse orientée 5'→3' (Monier et Cécillon, 2015).
- Elongation à 72 °C, comme toutes les ADN polymérases, la Taq polymérase ne peut initier la polymérisation des désoxyribonucléotides qu'à partir d'un ADN matrice apparié avec une amorce possédant une extrémité 3'OH libre. La Taq polymérase lie le brin matrice de 3' vers 5' et elle synthétise le nouveau brin de 5' vers 3' qui se prolonge d'autant qu'il existe un brin complémentaire pour servir de modèle. La répétition des cycles, de la dénaturation à l'élongation, permet de doubler le nombre de fragments amplifiés à chaque cycle ( $2^n$  copies théoriques pour n

cycles). Généralement, le nombre de cycles effectués au cours d'une PCR est de 40. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur PTC 200 (MJ Research Inc.). Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ l et contient 10 à 30 ng d'ADN (1 à 5  $\mu$ l) ; 4  $\mu$ M de chaque amorce ; 200  $\mu$ M de chaque dNTP ; 1 unité de Taq polymérase ; 50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, triton X-100 0.1% (v/v). Pour chaque PCR, 40 cycles ont été réalisés comportant une étape de dénaturation (95°C, 1 min), une étape de fixation de l'amorce sur sa séquence cible ( $T_m$  de l'amorce la plus faible - 2°C, 1 min) et une étape d'élongation (72°C, 30 s à 3 min suivant la taille du fragment à amplifier). Le temps d'élongation est d'environ 1 minute par 1000 pb (Monier, J.M et Cécillon, S, 2015).

Le principe de la PCR est illustré dans la figure suivante :



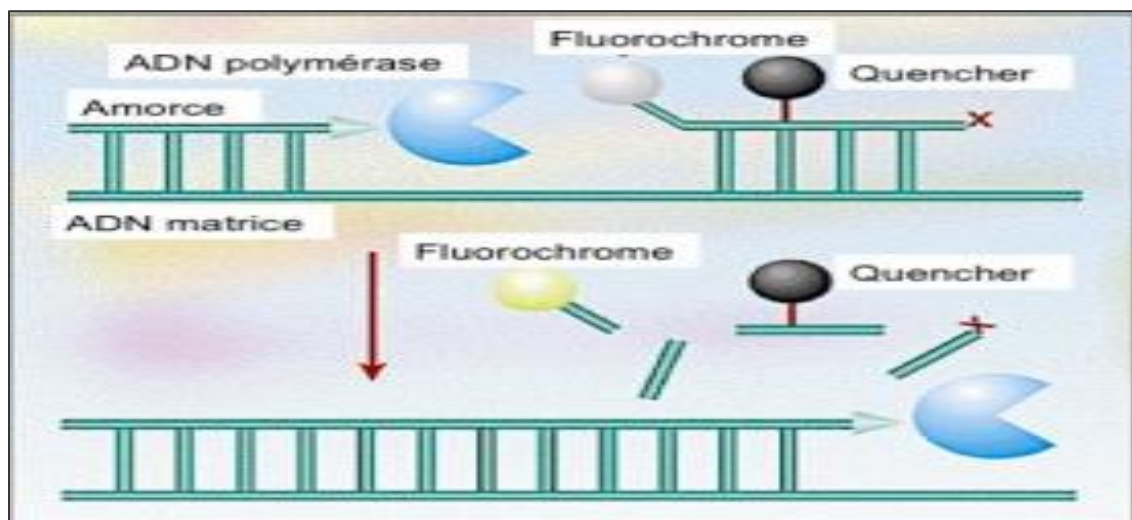
**Figure 18:** Principe de la PCR (Monier, J.M et Cécillon, S, 2015).

### 2.2.1.c. Modernisation de la PCR

#### - PCR en temps réel

L'invention de la PCR en temps réel, ou qPCR, a grandement facilité l'identification de champignons phytopathogènes. Lorsqu'on la compare à la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel ne nécessite pas la confirmation du résultat par la migration des produits amplifiés sur le gel d'agarose. Elle est donc la méthode plus rapide et moins laborieuse que la PCR conventionnelle. De plus, une fois qu'on a ajouté tous les réactifs dans le tube (ou dans un puits si on utilise une plaque à 96 puits), ce dernier ne sera pas ouvert jusqu'à l'obtention d'une courbe de résultat. Le risque de contamination croisée est donc moins grand (Ozaki, 2017).

Le fonctionnement de la PCR à temps réel est montré dans la figure suivante :



**Figure 19:** Fonctionnement de PCR en temps réel avec une sonde TaqMan® (Ozaki, 2017).

### 2.3. Les techniques de polymorphisme

Une large gamme de méthodes rentre sous la coupole des techniques basées sur l'étude de l'ADN. Parmi les plus utilisées, on peut citer la RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), l'AFLP (Amplified

Fragment Length) et les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat). Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients :

### **2.3.1 La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Le polymorphisme de taille des fragments de restriction implique une digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction, ceci génère plusieurs fragments. Les bandes sont alors identifiées individuellement grâce à une hybridation avec une sonde appropriée. C'est un outil important dans l'identification de la diversité inter et intra-spécifique. Lors de l'étude d'un fragment d'ADN ou d'un gène particulier, la digestion enzymatique peut être précédée d'une PCR, nous parlons alors de la PCR-RFPL. Cette dernière approche est largement exploitée pour l'étude de plusieurs espèces fongiques ; lorsqu'elle est suivie d'un séquençage des fragments générés, elle est très utile pour les investigations afférentes à la variabilité entre souches, l'évolution des populations et celle des espèces. Dans cette optique, les régions ITS (Internal Transcribed Spacers) sont largement utilisées pour la comparaison entre les espèces fongiques, ce sont en effet les régions les plus séquencées chez les champignons actuellement. De même, les IGS (Inter Genetic Spacer), sont plus recommandées pour l'étude de la diversité intra-spécifique car ces séquences possèdent la variabilité la plus importante observée au niveau de l'ADN ribosomique. Enfin, il est à noter que la PCR-RFLP peut générer d'excellents marqueurs co-dominants de grande stabilité et reproductibilité, idéal aussi bien pour les organismes haploïdes que diploïdes (Hamida Benslimane, 2016).

### **2.3.2 La RAPD (Random Amplified Polymorphic)**

Elle consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de courte taille (10 pb). L'analyse via cette méthode révèle deux types de variation génétique ; celle de la longueur du fragment qui sépare deux sites d'hybridation de l'amorce, et la variation dans la séquence du site d'hybridation. Cette technique est reconnue pour être simple, rapide et ne nécessite pas de connaissance préalable de la séquence. Son inconvénient majeur réside dans le fait qu'elle manque de reproductibilité car elle est très sensible à la concentration en ADN et aux conditions d'amplification (Hamida Benslimane, 2016).

Elle a été utilisée afin d'évaluer le niveau de la diversité génétique entre les souches de plusieurs champignons phytopathogènes. Elle a également été l'outil d'identification et de discrimination entre les pathotypes d'autres espèces. De même qu'elle a été largement employée pour la discrimination entre isolats de provenances diverses. Elle permet aussi la mise en évidence de certains marqueurs. Enfin, elle est recommandée pour le développement d'empreinte génétique utilisé comme marqueur épidémiologique (Hamida Benslimane, 2016).

### 2.3.3 L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic)

Elle est fondée sur l'amplification sélective des fragments de restriction. Elle comporte trois étapes :

L'ADN génomique est clivé par deux enzymes de restriction, puis des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont ajoutés aux extrémités des fragments.

L'amplification sélective des fragments de restriction : une première amplification, dite pré-amplification est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction, la deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de 1 à trois nucléotides ; ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine.

L'analyse des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette technique est puissante, stable et rapide, elle ne nécessite aucune connaissance préalable de séquences du génome étudié. Toutefois, elle nécessite une très bonne qualité de l'ADN et un niveau de technicité important.

La technique AFLP s'est révélée être un outil très précieux dans les études des structures génétiques des champignons et leur diversité. Sa grande sensibilité génère plus d'information sur la variabilité que toute autre technique moléculaire. Son application a été rapportée à titre d'exemple, sur *Septoria*, *Leptosphaeria*, *Fusarium* et *Pyrenophora tritici-repentis* (Hamida Benslimane, 2016).



### 2.3.4 Les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)

Les microsatellites sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétranucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présente un taux de polymorphisme élevé. Ce dernier est dû à la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. Par voie de conséquence, la technique SSR repose sur l'amplification de ces motifs et la détection de la différence entre le nombre de répétition chez les individus différents. Ceci est possible après le développement d'amorces complémentaires des régions flanquant le microsatellite. Cette méthode présente l'avantage d'être reproductible et nécessite peu d'ADN, mais elle est longue et coûteuse (Hamida Benslimane, 2016).

Elle a été, à l'origine, utilisée pour évaluer la diversité chez les végétaux et les animaux puis utilisée actuellement pour l'étude des champignons. Cependant, les microsatellites des espèces fongiques semblent exhiber un polymorphisme moins important que celui des autres organismes. Ainsi, la technique SSR a été employée dans plusieurs travaux traitant de diversité moléculaire d'espèces fongiques. A titre d'exemple, chez *Phaeosphaerianodorum*, l'utilisation de cette méthode sur une collection de 693 isolats provenant de champs de blé des cinq continents a montré l'existence d'une très grande diversité chez cette espèce mais un faible niveau de diversité entre les groupes provenant de continents différents. De même qu'il a été possible de démontrer que la similitude génétique observée entre les populations était due au taux de migration qui a permis de réduire la différenciation des populations. L'amplification des microsatellites des ADN d'une collection d'*Ascochyta fabae* a permis de classer les isolats en plusieurs groupes, mais aucune corrélation avec l'origine géographique n'a été retrouvée (Hamida Benslimane, 2016).

### 2.4. Le séquençage

La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux êtres vivants pour survivre et se reproduire. La détermination de cette séquence est utile pour les recherches visant à savoir comment vivent les organismes que pour des sujets appliqués. En médecine, elle peut être

utilisée pour identifier, diagnostiquer et potentiellement trouver des traitements à des maladies génétiques. En biologie, l'étude des séquences d'ADN est devenue un outil important pour la classification des espèces.

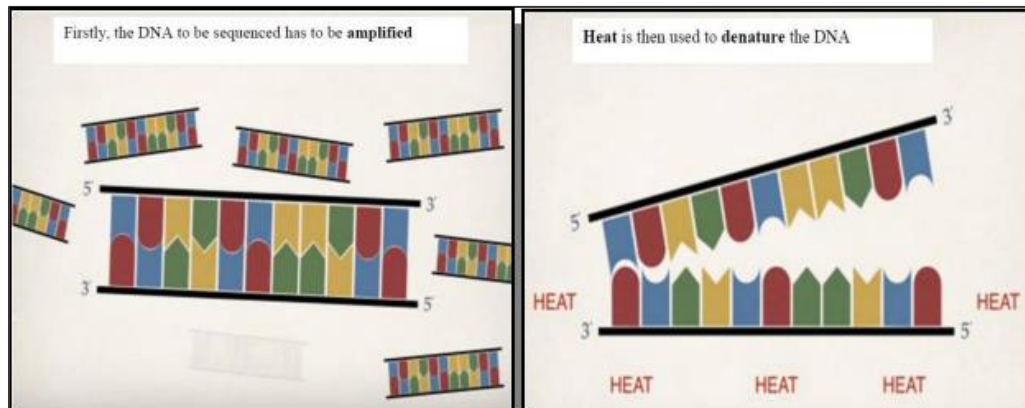
Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un gène ou d'un fragment de gène . La technique de séquençage la plus utilisée est celle inventée par Sanger en 1977 ; elle repose sur la synthèse d'un brin d'ADN par une ADN polymérase.

### **2.4.1. Technique de Sanger**

Le séquençage génétique de Sanger est un moyen de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN. Ce séquençage a permis aux scientifiques de séquencer une vaste gamme d'organismes, il était la méthode de choix avant la découverte des séquenceurs de nouvelle génération. Cette méthode part de l'idée que, en copiant des brins d'ADN et en surveillant quels nucléotides sont ajoutés, un par un, on trouve la séquence de nucléotides.

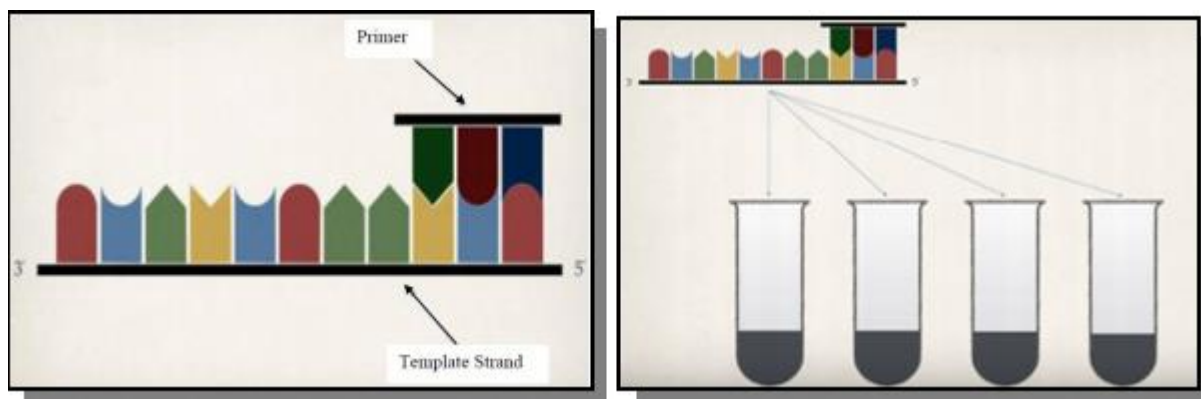
#### **2.4.1.a. Principe**

- 1.** Amplification de l'ADN à séquencer →Obtention d'un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Puis, Dénaturation de l'ADN par la chaleur (AGHROUCH N, 2018).



**Figure 20:** Amplification et dénaturation de l'ADN (AGHROUCH N, 2018).

2. Un ADN amorcé est dispersé entre quatre récipients de réaction.

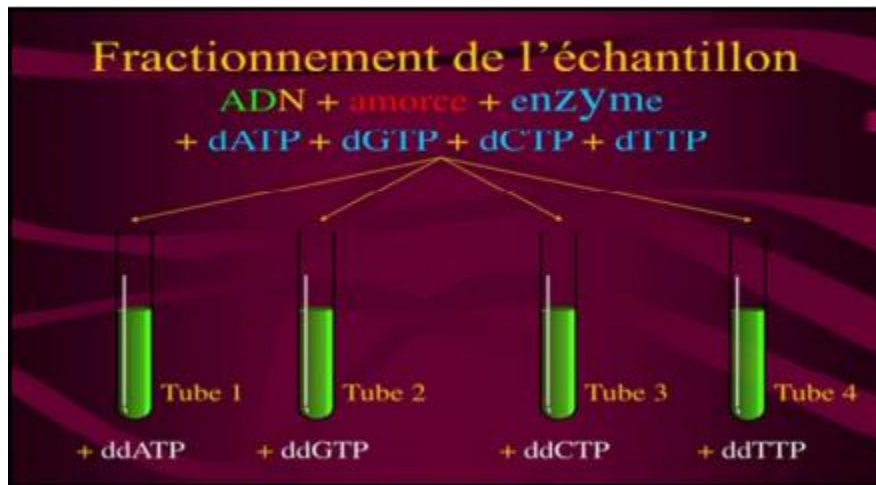


**Figure 21:** Ajout d'un ADN amorcé dans les quatre récipients (Aghrouch, 2018).

3. L'ajout de l'ADN polymérase à tous les quatre récipients suivis par les quatre dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) marqués par des fluorophores qui dégagent une lumière colorée lors de l'incorporation d'un nucléotide ; la couleur émise indique la base incorporée.

4. Un seul type de ddNTPs est ajouté à chaque récipient de réaction. Ces didésoxyribonucléotides une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, empêchent la poursuite de l'élongation, car ils n'ont pas de groupe hydroxyle au niveau du carbone.

Attention : les ddntps sont ajoutés à faible quantité pour inhiber la synthèse d'une façon aléatoire.



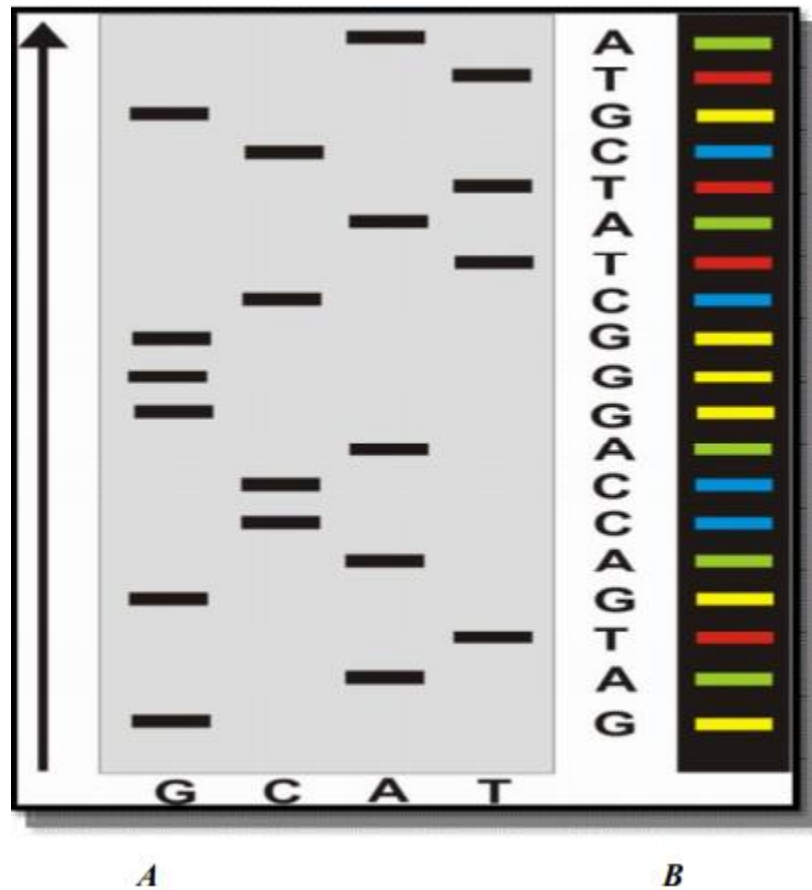
**Figure 22:** Ajout des ddNTPs (AGHROUCH N, 2018).

5. On obtient un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes qui se terminent tous au niveau d'une des bases dans la séquence.

6. On sépare ensuite les fragments synthétisés par électrophorèse en gel (les ADN sont des anions, ils vont donc vers le pôle +), en fonction de leur longueur (les plus petits vont plus vite).

7. On lit ensuite les taches successives identifiées par leur couleur ce qui révèle la séquence des fragments synthétisés. Pour la lecture, on commence par le bas et on regarde les bandes (tirets noirs) afin de déterminer la séquence du fragment d'ADN.

L'innovation du marquage par les fluorophores a rendu possible le séquençage de beaucoup plus de brins d'ADN (Aghrouch, 2018).



**Figure 23:** A - Electrophorèse en gel standard. B - Séquençage à l'aide de fluorophores. (Aghrouh, 2018).

## 2.5. Les gènes et les régions analysés pour la caractérisation d'espèces fongiques

### a) Les gènes ITS :

L'ADN ribosomique (ADNr ou rDNA) est la région la plus souvent ciblée pour les études de caractérisation et d'identification moléculaires des champignons. C'est un gène qu'on retrouve chez tous les êtres vivants, puisqu'il entre dans les mécanismes de traduction des ARNm en protéines (Beaulieu, 2007).

Les principaux avantages à utiliser cette région sont, premièrement qu'elle est bien caractérisée et documentée. Deuxièmement, chez les eucaryotes, les gènes de l'ADNr sont présents en plusieurs copies répétées en tandem dans un ou plusieurs chromosomes, ce qui facilite l'amplification. Troisièmement, le gène de l'ADNr possède des locus évoluant à des taux différents. Chaque copie est simplement composée de trois unités transcrites en ARN ribosomique, une petite sous-unité 18S, une grande sous-unité 28S et une très petite sous-unité 5.8S, et deux régions non transcrites et plus variables ITS1 et ITS2 qui séparent les trois gènes. Étant donné que les gènes des sous-unités ribosomiques sont plus conservés, ils sont ciblés pour la fabrication d'amorces spécifiques à cette région. De plus, les amorces les ciblant sont généralement universelles, c'est-à-dire qu'elles peuvent être utilisées pour plus d'une espèce (Beaulieu, 2007).

Tandis que les régions ITS (Internal Transcribed Spacer) sont habituellement assez variables, c'est dans ces régions qu'on y trouve des marqueurs permettant de distinguer les espèces. Par contre, dans certains cas, les régions ITS ne sont pas suffisamment variables pour permettre de distinguer les espèces (Beaulieu, 2007).

Plusieurs souches de champignons ont déjà été détectées par PCR à l'aide des amorces et des sondes d'hybridation qui ciblent la région ITS de ces microorganismes ; le contenu en guanine et en cytosine dans la région ITS1 est moins élevé que celui de la région ITS2. Une séquence riche en guanine et en cytosine est normalement difficile à amplifier. Donc généralement la région ITS1 est amplifiée plus facilement que la région ITS2. De plus, chez les champignons, les animaux et les plantes, les paires d'amorces universelles amplifiant la région ITS1 sont plus efficaces. Celles-ci incluent la paire ITS1/ITS2 (Ozaki, 2017).

### **b) Le gène de l'actine**

Code pour une protéine qui entre dans la structure du cytosquelette des cellules des champignons. Ce gène est en copie unique dans le génome de la majorité des champignons (Beaulieu, 2007).

**c) Le gène de la  $\beta$ -tubuline**

Fait partie de la famille de gènes des tubulines. Il code pour la fabrication d'une protéine essentielle au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire des eucaryotes, lors de la mitose. Ce gène peut être présent en quelques copies dans le génome (Beaulieu, 2007).

**d) Le gène du facteur d'élongation (TEF)**

Code pour une protéine qui contrôle le taux et la fidélité de la synthèse protéique. Il est généralement présent en une copie dans le génome des champignons (Beaulieu, 2007).

Ce gène a été ciblé pour le développement de marqueurs par PCR-RFLP chez *Ophiostomopiliferum* et plusieurs espèces de *Ceratocystis*. Ils sont aussi utilisés pour des études de phylogénie et de systématique chez les ophiostomatoïdes. Étant donné qu'ils sont plus variables que l'ADNr, ils offrent de l'information additionnelle pour la distinction des espèces très proches (Beaulieu, 2007).

**e) Le gène de l'histone H3**

Code pour l'une des quatre protéines histones de cœur. Ces dernières jouent un rôle important dans l'organisation de l'ADN eucaryotique et aussi dans la régulation génique par les modifications post-traductionnelles des queues d'histones. Parmi ces histones de cœur, le gène codant pour H3 sert à construire un arbre phylogénétique des espèces qui sont fortement apparentées. En effet, chez les protistes et les champignons, la séquence peptidique de H3 montre une grande divergence interspécifique comparativement aux organismes supérieurs. De même, on constate souvent une grande variation nucléotidique dans ce gène qui est suffisante pour pouvoir différencier plusieurs espèces fongiques (Ozaki, 2017).

**f) LSU (the Large Subunit)**

La région LSU « the Large Subunit » en particulier a commencé à gagner du terrain. En effet, cet outil accélère les analyses et donne accès à un outil d'annotation des données de séquences (Brown et al, 2014). Elle contient deux régions hypervariables, désignées D1 et D2, qui sont flanqué de régions de séquences relativement conservées dans la plupart des champignons. Cet arrangement permet d'aligner les séquences des gènes LSU pour Analyse phylogénétique (Liu et al, 2012).

Historiquement, la région D1/D2 a été utilisée, avec ou sans la séquence ITS correspondante, pour identifier les espèces de levure (Liu et al, 2012). Ces domaines divergents, ou régions d'expansion, peuvent présenter une grande variation de séquence et de longueur entre les espèces (Porter et Golding, 2012).

**g) SSU (small subunit)**

Les variations de séquence SSU ont été utilisées pour classer une culture de champignon au-dessus du niveau du genre et il a bien fait son travail taxonomique à des niveaux élevés (Porter et Golding, 2012), les gènes de l'ARNr SSU ont été amplifiés à l'aide d'amorces qui chevauchent les amorces universelles NS1 et NS8 (Schwarzott, et Schübler, 2001).

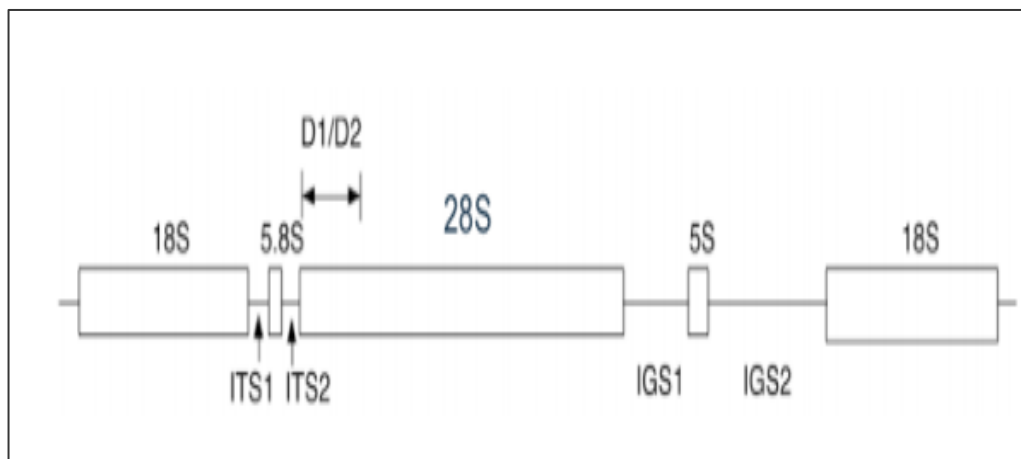
L'identification taxonomique qui basée sur ces séquences est plus problématique, car elle étant généralement limitée au niveau du genre ou de la famille. Cela est principalement dû au manque relatif de variation au sein des gènes d'ARNr 18S entre des espèces fongiques étroitement apparentées en raison de la période d'évolution relativement courte des champignons du royaume par rapport aux bactéries (Anderson et Cairney, 2004).



### h) GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase)

La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ou *gpd*) est un gène codant pour une enzyme jouant un rôle dans le processus de glycolyse (Alhawatemalaet AlTawaha, 2019)et de la néoglucogénèse. Il y a plusieurs raisons pour lesquelles ce gène a été sélectionné. Premièrement, la GAPDH est une enzyme cruciale dans la glycolyse. Le gène est connu comme un gène domestique - un gène qui est exprimé de manière constitutive et est nécessaire à la survie des cellules (Explorer, 2009).

Le glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ou *gpd*) qui a été une cible pour l'amplification à l'aide des amorces *gpd1* et *gpd2* (Alhawatemala et Al Tawaha, 2019).



**Figure 24:** Organisation des gènes codant les ARN ribosomiques et des régions intergéniques chez les champignons et présentant un intérêt pour l'identification moléculaire. (ITS : Séquence transcrite interne, IGR : séquence) (Arnaud Carlotti, 2014).

### 3. Bio-informatique et traitement des séquences

Avec les nouvelles techniques de séquençage de l'ADN, la détermination de la séquence génomique complète d'un organisme ou même de plusieurs individus d'une même espèce est devenue rapide et peu coûteuse. Les conséquences de cette possibilité sont très profondes sur

l'ensemble de la biologie, mais sont particulièrement fortes sur la bio-informatique (Deleage et Gouy, 2015).

Les données de séquence de l'ADN ribosomique et des régions des gènes codant pour les protéines ont été utilisées pour déduire les relations phylogénétiques entre différentes espèces notamment l'espèce fongique (Al-Nadabi et *al*, 2018).

### **3.1. L'alignement des séquences**

En bio-informatique « l'alignement des séquences » est une méthode utilisée généralement pour analyser des brins d'ADN, d'ARN ou de protéines afin de déterminer les similitudes entre les brins qui peuvent illustrer l'importance des relations fonctionnelles, structurelles ou évolutives entre les séquences (Disegha et Akani, 2019). La comparaison d'une séquence avec une banque de séquences est le traitement informatique le plus commun effectué par les biologistes (Deleage et Gouy, 2015).

### **3.2. Méthodes d'alignement des séquences**

#### **3.2.1. L'alignement par paires**

Cette méthode est effectuée lorsque deux séquences sont utilisées pour réaliser l'alignement à l'aide des outils appropriés. Dans cette méthode d'alignement, l'une des séquences est inscrite sur l'autre de sorte que les chaînes d'éléments qui se chevauchent sont alors observées et notées. BLAST, mega ... etc. sont des applications utilisées pour l'alignement par paires (Disegha et Akani, 2019).

#### **Le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Est un algorithme de recherche de similitudes locales (Deleage et Gouy, 2015), peut être utilisé dans l'alignement de séquences pour rechercher des régions de similarité entre les séquences en comparant des protéines ou des séquences nucléotidiques à l'aide de bases de données, puis calcule la signification statistique des correspondances qui se produisent (Disegha et Akani, 2019).

### 3.2.2. L'alignement multiple

En général, le biologiste dispose d'un grand nombre de séquences (plusieurs centaines) et a besoin d'un alignement multiple des séquences appartenant à la même famille afin d'identifier les résidus essentiels qui ont été préservés au cours de l'évolution (Deleage et Gouy, 2015).

Il est fonctionné de la même manière que l'alignement par paires, mais il utilise plus de deux séquences, c'est-à-dire qu'il utilise trois séquences ou plus. Il peut parfois être présenté sous la forme d'un arbre. MUSCLE, T-coffee, ClustalW, etc. sont des logiciels utilisés dans l'alignement de séquences multiples comprennent (Disegha et Akani, 2019).

#### Algorithme ClustalW

ClustalW est un programme de réalisation d'alignement multiple disponible en ligne mais non téléchargeable. À partir d'un ensemble de séquences (taxons), l'algorithme mesure les meilleures identités (score de l'alignement). Il fait ressortir la meilleure paire de séquences ayant le meilleur score d'alignement, puis passe à la troisième séquence qui présente le meilleur score d'alignement par rapport à la paire déjà alignée. L'algorithme continue toutes les comparaisons pour finir avec la dernière séquence à inclure dans l'alignement multiple. Ainsi, les séquences les plus identiques sont alignées en premier puis l'alignement progresse vers les séquences les plus distantes ou les plus divergentes (Saib et Habibatni, 2014).

**Table 5 :** Quelques programmes d'alignement multiple (Deleage et Gouy, 2015).

	Rapidité	Séquences proches	Séquences éloignées	Qualité
Multalin	++	+++	+	++
Clustal W	+	++	++	+++
Muscle	+++	+++	+	+++

MAFFT	++	++	+	+++
T-Coffee	+	+	+++	+++
DIALIGN	+	+	+++	+

---

### 3.3. Origine de séquences

#### 3.3.1. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Le NCBI est une collection de nombreuses bases de données qui ont pertinentes pour la biotechnologie et la biomédecine. Ces bases de données constituent également une source importante d'algorithmes et de processus bio-informatiques. Deux exemples de bases de données sont GenBank pour les séquences d'ADN et PubMed - une base de données pour la littérature biomédicale. D'autres sont la base de données NCBI Epigenomics, tous disponibles en ligne (Disegha et Akani, 2019).

#### 3.3.2. MYCOBANK

Une base de données en ligne, MycoBank (<http://www.Mycobank.org>), est lancée avec pour mission de documenter les nouveautés de la nomenclature mycologique et leurs descriptions et illustrations associées. MycoBank fournira (le cas échéant) des liens vers d'autres bases de données contenant, par exemple, des cultures vivantes, des données ADN, des spécimens de référence ...etc. (Crous et *al*, 2004).

#### 3.3.3. The European Bioinformatics Institute (EBI)

Il fournit toutes sortes de données moléculaires, ainsi que des bases de données, des logiciels et des outils bio-informatiques, sans frais. Il contient toutes sortes d'informations sur les sciences de la vie et aide à la recherche fondamentale et avancée (Mukhopadhyay et *al*, 2018).

### 3.4. Construction des arbres phylogénétiques

La phylogénie est une discipline émergente. Elle permet d'étudier les espèces afin de les classer en fonction de leurs ressemblances phénotypiques (phylogénie phénétique) ou en fonction de leurs séquences géniques (phylogénie moléculaire) Les relations de parenté sont généralement représentées sous forme d'un arbre phylogénétique ou dendrogramme.

L'objectif de la phylogénie est d'aboutir à une représentation statistique (arbre) qui permet aux systématiciens de bien visualiser les relations phénotypiques et/ou génotypiques entre les différents taxons analysés, en se basant sur des théories de construction d'arbres bien établies. Dans le cas de comparaison des séquences ADN (séquences codantes ou non), les mutations par substitution ou par insertion/délétion fournissent beaucoup d'informations sur l'évolution des séquences comparées.

La construction de la phylogénie est basée sur deux grands types de données :

1. Les données liées aux caractères phénotypiques : comprennent les caractères observables (différents états : morphologiques, biochimiques et physiologiques)
2. Les données moléculaires : telles que les séquences nucléotidiques

(Saib et Habibatni, 2014).

#### 3.4.1. Outils logiciels

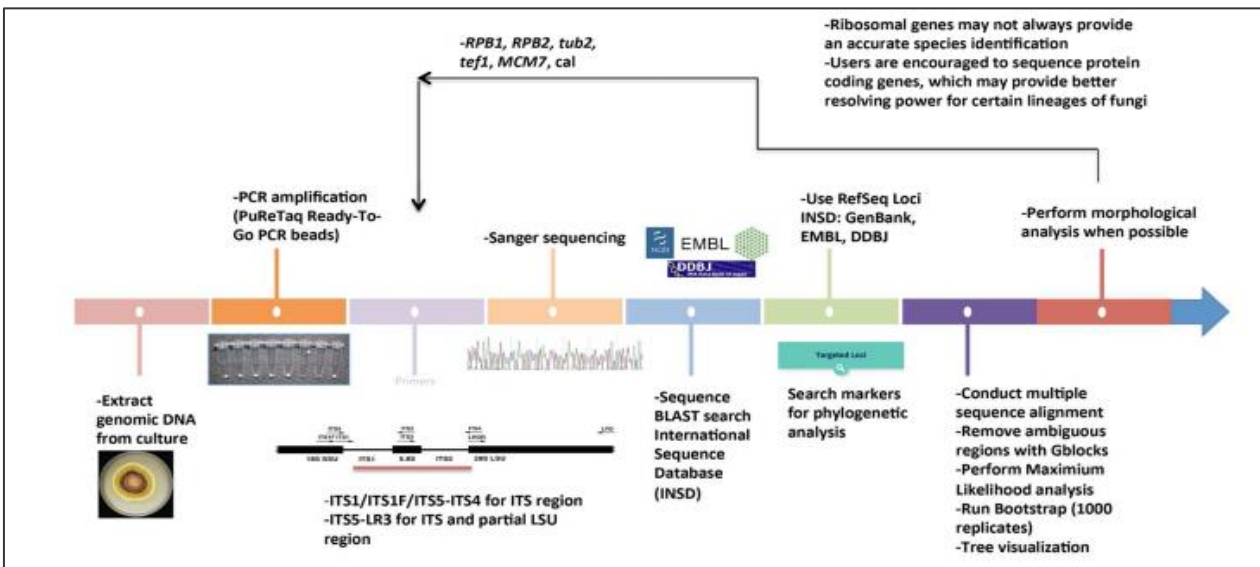
##### MEGA

Le programme MEGA a été utilisé pour construire les arbres phylogénétiques entre les différents taxons. C'est un logiciel libre de droits et téléchargeable à partir de plusieurs

sources Internet disponibles sur différents moteurs de recherches (Google, Yahoo, AltaVista, ...) (Saib et Habibatni, 2014).

**PHYLIP**

Le logiciel PHYLIP est un ensemble de programmes qui implémentent tous les algorithmes présentés ici ainsi que de nombreuses autres opérations. C'est le plus ancien programme de phylogénie publiquement accessible (Deleage et Gouy, 2015).



**Figure 25:** Organigramme pour l'identification fongique à l'aide de l'analyse phylogénétique moléculaire (Raja et al, 2017).

**Table 6:** Liste des bases de données organisées pour l'identification des espèces fongiques (Raja et al, 2017).

name of the database	URL	Region utilized
Barcode of Life Database, BOLD	<a href="http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine">http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine</a>	ITS
CBS-KNAW	<a href="http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioLoMICSSequences.aspx">http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioLoMICSSequences.aspx</a>	ITS
FUSARIUM-ID	<a href="http://isolate.fusariumdb.org">http://isolate.fusariumdb.org</a>	ITS, tef1, RPB1, RPB2, tub2

<b>Fungal Barcoding</b>	<a href="http://www.fungalbarcoding.org">http://www.fungalbarcoding.org</a>	ITS
<b>Fungal MLST database Q-Bank</b>	<a href="http://www.q-bank.eu/Fungi/">http://www.q-bank.eu/Fungi/</a>	partial actin, tub2, RPB1. RPB2, tef1 among others
<b>ISHAM, The International Society for Human and Animal Mycology</b>	<a href="http://its.mycologylab.org">http://its.mycologylab.org</a>	ITS
<b>Naive Bayesian Classifier</b>	<a href="http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp">http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp</a>	28S, ITS
<b>RefSeq Target Loci (RTL)</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/</a>	ITS, 18S, 28S
<b>International Subcommision on Hypocrea and Trichoderma (ISHT) TrichoKey and TrichoBLAST (Trichoderma)</b>	<a href="http://www.isth.info/tools/blast/">http://www.isth.info/tools/blast/</a>	ITS and tef1, RPB2
<b>UNITE, User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database</b>	<a href="https://unite.ut.ee/">https://unite.ut.ee/</a>	ITS

## Conclusion et perspectives





## Conclusion et perspectives

Ce travail a permis de mettre en exergue les méthodes de l'identification des champignons, en raison de leur importance, primordiale dans les applications fondamentales (écologie, taxonomie) et appliquées (génomique, bio prospection) de la recherche scientifique.

Les mycologues ont traditionnellement utilisé la morphologie (caractères phénotypiques), comme seul moyen d'identifier les espèces fongiques, et même aujourd'hui, il est encore adopté comme un moyen d'identification des espèces au sein de la communauté mycologique.

Certaines méthodes d'identification des champignons se sont appuyées sur des méthodes de routine conventionnelles par l'examen direct des spécimens, des pratiques culturelles et des méthodes biochimiques, mais avec certaines limites, comme l'obtention de résultats peu fiables. Les techniques d'analyse séquentielle sont utiles pour surmonter certaines de ces limites dans l'identification des champignons et par conséquent, la possibilité d'utiliser des outils en ligne pour faciliter les processus menant à l'identification, à la caractérisation, à l'analyse phylogénétique et à la prévision d'éléments pour les progrès futurs, tout en gardant à l'esprit le défi du coût dans l'utilisation de cette technologie.

Les techniques de biologie moléculaire se sont largement développées et démocratisées. Elles se positionnent donc comme l'outil privilégié dans l'identification grâce notamment à leur fiabilité et leur robustesse. A l'heure actuelle, seule l'utilisation complémentaire de différentes approches peut permettre d'obtenir le maximum d'informations convergentes qui pourraient fiabiliser les résultats d'identification.

# Références bibliographiques



**-A-**

**Abdelkader, F. (2012).** Etude comparative de l'infection des sols par quelques champignons pathogènes en conditions de semis direct et de travail conventionnel. Mémoire Pour obtenir le diplôme de Magister. Université de Sétif 1-Ferhat Abbas, Sétif.

**Aghrouch N. (2018).** Séquençage De L'adn. Thèse De Doctorat En Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat.

**Alhawatema, M., & Al Tawaha, A. A. A. R. (2019).** Application of Using DNA Barcoding Genes in Identification of Fungi Species, a Review. Bioscience Research, 16, 1763-1775.

**Al-Nadabi, H. H., Maharachchikumbura, S. S. N., Agrama, H., Al-Azri, M., Nasehi, A., Al-Sadi, A. M.(2018).** Molecular characterization and pathogenicity of *Alternaria* species on wheat and date palms in Oman. European journal of plant pathology, 152(3), 577-588.

**Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2004).** Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environmental microbiology, 6(8), 769-779.

**Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., Rasool, M. H.(2016).**Proteomics: technologies and their applications. Journal of chromatographic science, 55(2), 182-196.

**Aubry, M. A., Aussagues, Y., Berge, A., Brunel, L., Cabeau, J., Chevalier, S., Chicanne, G., Dubreuil, B., Friry, C., Morello, E., Samson, A., Trincherro, N., Zelazny, E. (2000).**La protéomique : ses techniques d'études analytiques et quantitatives et ses applications.

**-B-**

**Beaulieu M. (2007).** Caractérisation moléculaire des champignons ophiostomatoïdes associés à quatre espèces de scolytes de l'écorce colonisant l'épinette blanche au québec et phylogénie multigenique d'une nouvelle espèce de *Leptographium*. Mémoire, Université Laval.

**Benbada A Et Malik A. (2019).** Isolement Et Identification De La Flore Fongique Associée Au Déperissement Du Palmier Dattier Dans La Région De Ghardaïa. Mémoire De Fin D'études, Université De Ghardaïa.

**Bendjoudi, R., Dehimi, H. (2020).** Etude des méthodes d'isolement et d'identification de quelques champignons de stockage des céréales. MEMOIRE : MASTER ACADEMIQUE. Université MOHAMED BOUDIAF, M'SILA.

**Benslimane H. (2016).** Les Méthodes Moléculaires Pour La Caractérisation Des Champignons Phytopathogènes, Ecole Nationale Supérieure D'agronomie. Alger.

**Bouchair, R., Doukhane, B. (2017).** Etude de sensibilité de quelques souches des dermatophytes à 10 molécules des auronnes synthétiques et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme : Master 2 en Biologie. Université de Jijel.

**Boukhedenna, N., Merouane, I. (2014).** Production de la pénicilline V et G in vitro par *Penicillium chrysogenum*. Mémoire présenté en vue de l'obtention de diplôme de Master en Microbiologie. Université de Constantine 1, Constantine.

**Boukhnessa, S., Brakhli, H., Gouarir, K., Tiaiba, D. (2011).** Effet de quelques milieux de culture sur la croissance de deux isolats de *Ascochyta blight*. (DES). Université de M'sila, M'sila.

**Brown, S. P., Rigdon-Huss, A. R., Jumpponen, A. (2014).** Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. Retrieved from <http://krex.ksu.edu> 2014.

-C-

**Carlotti, A. (2014).** Identification des moisissures. *La Vague*, 42, 10-12.

**Ch 19 5 6 Fungi- Revised.ppt - 19.5 Diversity of Fungi...School Manhattan College, Course Title BIO 114, Uploaded By logainekholief, Pages 37**

**Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation, (25).

**Chaboud A. (2013).** Impact De l'approche moléculaire sur la classification des Agaricomycetidae. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Joseph Fourier.

**CHAHDI A et SALHI H. (2019).** Comparaison de trois techniques d'extraction d'ADN appliquées à l'étude de la vigne cultivée. Mémoire de fin d'étude, Université Mohamed Khider, Biskra.

**Chollet, L. (2014).** Identification des dermatophytes en cultures sur la base de leurs critères macroscopiques et microscopiques. Mémoire de Maitrise en médecine. Université de Lausanne.

**CORDOVA L et JESUS A. (1998).** Isolement, Identification Et Physiologie Des Champignons Thermophiles En Vue De La Production De Lipases Par Fermentation En Milieu Solide. Centre De Montpellier, Montpellier.

**Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V., Stegehuis, G. (2004).** MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50(1), 19-22.

**-D-**

**Delahaye, T. (2018).** Champignons filamenteux contaminant l'environnement industriel pharmaceutique: intérêts et limites des méthodes d'identification actuelles (Doctoral dissertation).

**Deleage, G., Gouy, M. (2015).** Bioinformatique-2e Edition : Cours Et Applications. Dunod.

**Desoubeaux, G., Chandener, J. (2014).** Apport de la protéomique en mycologie médicale en 2014 : pour qui ? Pour quoi? [Contribution of proteomics in medical mycology in 2014: For who? For what?]. *Journal de mycologiemedicale*, 25(1), 95-98.

**Disegha, G. C., Akani, N. P.** Bioinformatic Method for Fungi Identification.

**Dube, H. C. (2013).** An introduction to fungi. Scientific Publishers.

**-F-**

**Ferrag, H., Guerioune, A. (2018).** Isolement et identification des champignons transmis par les semences de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) et essai in vitro de lutte biologique contre les souches phytopathogène. Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Master. Université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi.

**-G-**

**Guarro, J., Gené, J., Stchigel, A. M. (1999).** Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 12(3), 454-500.

**-H-**

**Hamani, M., Boudaoud, D. (2018).** Effet antifongique des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles et des noyaux de *Persea americana* . MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER. Université AKLI MOHAND OULHADJ, BOUIRA.

**-J-**

**Jobard-Portas, M. (2010).** Diversité phylogénétique et fonctionnelle des Eumycètes dans les écosystèmes pélagiques (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).

**-K-**

**Kdada, H. (2012).** Étude comparative des performances de sept milieux de culture proposés pour l'identification des dermatophytes ; Thèse de doctorat.

**Kiffer, E., Morelet, M. (1997).** Les deutéromycètes: Classification et clés d'identification générique. Editions Quae.

**-L-**

**Labioud, F., Chaibras, S. (2015).** Isolement, identification et activité antibactérienne des moisissures d'un sol forestier à Constantine. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Université des Frères Mentouri, Constantine.

**Lachichi, A. (2014).** Contribution à l'étude de la biodiversité des champignons supérieurs dans les subéraies de Hafir et Zariéffet Tlemcen. MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER. Université ABOU BEKR BELKAID, Tlemcen.

**Lecellier, A. (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Mémoire Présentée pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE. Université de Reims.

**Liu, K. L., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., Eichorst, S. A., & Xie, G. (2012).** Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. Applied and environmental microbiology, 78(5), 1523.

**-M-**

**Monier, J.M Et Cécillon , S. (2015).** Les Outils De Biologie Moléculaire Et Leur Utilisation Dans Le Domaine De La Gestion Des Sites Pollués.

**Morin-Sardin, S. (2016).** Etudes physiologiques et moléculaires de l'adaptation des Mucor aux matrices fromagères (Doctoral dissertation, Brest).

**Mukhopadhyay, C. S., Choudhary, R. K., Iquebal, M. A. (2018).** Basic Applied Bioinformatics. John Wiley & Sons.

**-N-**

**Nasraoui, B. (2008).** Principales maladies fongiques des céréales et des légumineuses en Tunisie. Kef : Centre de Publication Universitaire.

**Nasraoui, B. (2015).** Les Champignons et Pseudo-Champignons Pathogènes des Plantes Cultivées : Biologie, Nouvelle Systématique, Interaction Pathologique. Éditions universitaires européennes.

**Ndong, H. E., Degreef, J., De Kesel, A. (2011).** Champignons comestibles des forêts denses d'Afrique centrale. Taxonomie et identification. ABC Taxa, 10.

**-O-**

**Ozaki K. (2017).** Développement Et Mise A Niveau Des Méthodes De(Chollet, 2014). (Chollet, 2014). Détection Des Champignons Pathogènes Des Tissus Ligneux De La Vigne. Mémoire Présenté Pour L'obtention Du Grade De Maître Es Sciences, Université Du Québec.

**-p-**

**Porter, T. M., & Golding, G. B. (2012).** Factors that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: classification method, primer choice, and error. PloS one, 7(4), e35749.

**-R-**

**Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., Oberlies, N. H. (2017).** Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. Journal of natural products, 80(3), 756-770.

**Rapior, S., Fons, F. (2006).** La classification des champignons. In Annales de la Société d'Horticulture et d'Histoire Naturelle de l'Hérault (Vol. 146, No. 4, pp. 81-86).

**Ripert, C. (2013).** Mycologie médicale. Lavoisier.

**-S-**

**Sahbi, I., Maref, R. (2018).** Contribution à l'isolement et l'identification des champignons filamenteux à partir de deux sols salin et agricole. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de MASTER. Université LARBI BEN M'HIDI, Oum el bouaghi.



**Saib, R.H., Habibatni, I. (2014).** Analyses bioinformatique et phylogénétique des gènes nod et nif de rhizobium sp. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Université de Constantine1, Constantine.

**Sevindik, M. (2018).** Effects Of Fungi On Animals. J Morphol Anat, 2(1).

**Schwarzott, D., & Schüßler, A. (2001).** A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. Mycorrhiza, 10(4), 203-207.

**Sonnenberg, R., Nolte, A. W., & Tautz, D. (2007).** An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. Frontiers in zoology, 4(1), 1-12.

**-T-**

**Tikour S. (2018).** Biodiversité Fongique De La Moule *MytilusGalloprovincialis* (Lamarck, 1819) Elevée Dans Deux Fermes Conchylicoles De l'Ouest Algérien Kristel Et Stidia. Mémoire De Fin D'études, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

**-V-**

**Verscheure, M., Lognay, G., & Marlier, M. (2002).** Revue Bibliographique : Les Méthodes Chimiques D'identification Et De Classification Des Champignons. *Base*, 6 (3), 131-142.

**Site web :**

<http://www.techmicrobio.eu/index.php/38-microbio/mycologie-generale/108-mycologielaboratoire> (Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie) (consulté à 20,04,2021 / 22 :50)

<https://www.univbrest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Methodes+d%27%C3%A9tudes/Milieude+culture> (Milieux de culture) (consulté à 14,04,2021 / 16 :04)

