

ROYAUME DU MAROC

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II Rabat



Mémoire du troisième cycle pour l'obtention du diplôme
d'Ingénieur d'Etat en Industries Agricoles et Alimentaires

**IDENTIFICATION MOLECULAIRE PAR AMPLIFICATION ET
SEQUENÇAGE DE L'ADN DES CHAMPIGNONS
FILAMENTEUX ISOLÉS DES MAÂSRAS AU MAROC**

Présenté & soutenu publiquement par

Hakim EL AZIZ

Devant le Jury composé de

Pr. Moussa ETTALIBI	(I.A.V Hassan II- RABAT)	Président
Pr. Patrick BOIRON	(FACULTÉ DE PHARMACIE – LYON)	Rapporteur
Pr. Mustapha ISMAILI ALAOUI	(I.A.V Hassan II- RABAT)	Rapporteur
Dr. Sevastianos ROUSSOS	(I.R.D - MARSEILLE)	Rapporteur
Dr. Hervé MACARIE	(I.R.D - MARSEILLE)	Examineur
Dr. Khadija LAMRANI	(I.A.V Hassan II- RABAT)	Examineur

18 juillet 2005

المملكة المغربية



معهد الحسن الثاني للزراعة و البيطرة – الرباط

التعرف الجزيئي بواسطة التضخيم و التسلسل الجيني للحامض النووي للفطريات
الخيطة المستخرجة من معاصر زيت الزيتون بالمغرب

أطروحة السلك الثالث لنيل شهادة مهندس دولة في الصناعات الغذائية

المنجزة والمقدمة علنيا من طرف :

العزیز حکيم

أمام اللجنة المكونة من :

رئيسا
مقرا
مقرا
مقرا
ممتحنة
ممتحن

(معهد الحسن الثاني للزراعة و البيطرة)
(معهد الحسن الثاني للزراعة و البيطرة)
(معهد البحث للتنمية بمارسيليا)
(كلية الصيدلة ليون)
(معهد الحسن الثاني للزراعة و البيطرة)
(معهد البحث للتنمية بمارسيليا)

الأستاذ موسى الطالب
الأستاذ مصطفى إسماعيلي العلوي
الدكتور سباستيانوس غسوس
الأستاذ باتريك بواغون
الدكتورة خديجة لمراني
الدكتور هيرفي مكاري

18 يوليوز 2005

Résumé

Le secteur oléicole bénéficie d'une importance cruciale sur le plan socio-économique marocain. Ce secteur est caractérisé par l'abondance de moulins traditionnels de trituration des olives appelés 'Maâsra'. Les pratiques suivies lors de l'extraction de l'huile d'olive au niveau des Maâsra, offrent des conditions propices pour le développement de moisissures sur les olives, les grignons et les margines. Quelles sont ces moisissures ? Sommes-nous certains de leur identification morphologique ? L'identification moléculaire permet-elle de compléter l'identification morphologique ou de la remplacer ?

A partir d'une collection de 134 souches de champignons filamenteux isolées des Maâsras, 53 souches ont été choisies sur la base de critères morphologiques et culturaux comme étant représentatives de la collection. D'abord, la technique de PCR a été utilisée pour l'amplification de la région ITS de l'ADNr au biais de la paire d'amorces ITS1 (sens) et ITS4 (antisens). Ensuite, la région amplifiée a été séquencée en utilisant l'amorce ITS4. Les chromatogrammes élaborés par le séquenceur automatique ont été analysés en utilisant le logiciel Chromas afin d'obtenir des séquences exploitables. Enfin, les séquences obtenues ont été soumises au logiciel Blast pour la recherche de séquences similaires. Suite à cette recherche dans la banque de données génétiques GenBank, les noms de souches de moisissures ont été classés de manière décroissante suivant le pourcentage de similarité de leurs séquences avec la séquence de la souche d'intérêt.

Les techniques utilisées, largement appliquées pour l'identification des souches de champignons filamenteux, nous ont permis d'identifier 37 souches appartenant aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Galactomyces*, *Ceratocystis*, *Dipodascus*, *Thanatephorus* et *Trichoderma*. L'identification moléculaire du genre fongique concorde chez 73 % des souches avec celle établie morphologiquement lors des travaux précédents. Cependant la congruence entre l'espèce moléculaire et morphologique, mérite d'être approfondie. En perspective, le problème de la fiabilité des données relatives à certaines souches de moisissures figurant au niveau de GenBank justifie la création d'une banque de données génétiques IAV-IRD utilisant des critères rigoureux pour l'admission de séquences.

Mots clés : Huile d'olive, Maâsra, Maroc, moisissures, identification moléculaire, ADN, PCR, ITS, électrophorèse, Séquençage, Banque de données génétiques.

Abstract

In Morocco, the olive oil sector is of utmost importance with regards to the socioeconomic situation. The sector is dominated by traditional oil mills called "Maâsras". These small grinding units are always characterized by a low level of technology and the non-compliance with basic hygienic practices. These practices ensure favorable conditions to the growth of moulds on olives, pomace and wastewater. What are these moulds? Are we sure of their morphological identification? Can a molecular identification confirm or replace a given morphological identification ?

From 134 filamentous fungal strains isolated from Maâsras, 53 strains were selected on the basis of morphological and cultural criteria as being representative of the collection. Initially, the PCR technique was carried out to amplify the ITS rDNA region by using ITS1 forward and ITS4 reverse primers. The amplified PCR product was automatically sequenced using the ITS4 primer. Then, sequence data were analyzed using Chromas software in order to obtain exploitable sequences. Finally, processed sequences were subjected to similarity searches against GenBank using Blast software. At the end of those searches, the obtained names of mould strains were classified in a decreasing manner according to the percentage of similarity of their sequences with that of the studied strain.

The techniques used, largely applied for the identification of filamentous fungi, enabled us to identify 37 strains belonging to the genres of : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Galactomyces*, *Ceratocystis*, *Dipodascus*, *Thanatephorus* et *Trichoderma*. Molecular identification of the studied mould genres is in agreement for 73 % of strains with prior morphological data. However, similarity at the species level requires a more in depth study. In prospect, the problem of the reliability of data relative to certain mould strains appearing in GenBank justifies the creation of a IAV-IRD genetic data bank using rigorous criteria for the admission of sequences.

Key words: Olive oil, Maâsra, Morocco, mould, molecular identification, DNA, PCR, ITS, electrophoresis, sequencing, genetic databank.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xiii
Introduction générale.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
Chapitre I : Secteur Oléicole.....	5
1- Situation oléicole mondiale.....	6
1.1- Production d’huile d’olive	6
1.2- Consommation d’huile d’olives	7
2- Situation nationale	8
3- Maâsra : unité traditionnelle de trituration d’olive	9
3.1- Récolte des olives	10
3.2- Stockage des olives	11
4- Contamination fongique naturelle des olives.....	11
Chapitre II : Champignons Filamenteux et Identification Moléculaire	14
I- Champignons filamenteux.....	14
1- Définition des champignons filamenteux.....	14
2- Classification des champignons filamenteux.....	15
3- Conditions de développement des champignons filamenteux	16
3.1- Eléments nutritifs	16
3.2- Activité de l’eau du substrat.....	16
3.3- Oxygène	16
3.4- pH	16
3.5- Température de croissance	17
4- Mycotoxines.....	18
II- Identification des champignons filamenteux	20
1- Approche morphologique	20
2- Approche chimique	21
3- Approche moléculaire	22

III- Techniques de biologie moléculaire	23
1- Réaction de polymérisation en chaîne	23
2- Variantes de PCR	27
2.1- PCR nichée ou nested PCR	27
2.2- Reverse Transcription PCR	27
2.3- PCR quantitative	28
3- Analyse de Restriction Enzymatique et Polymorphisme de Taille des Fragments de Restriction	31
4- Amplification Aléatoire de l'ADN Polymorphique	33
5- Polymorphisme de Taille des Fragments Amplifiés	34
6- Polymorphisme de Conformation de l'ADN Simple Brin	35
7- Séquençage	36
8- Microsatellites	39
IV- Etude morphologique et moléculaire de quelques genres de moisissures ..	40
1- <i>Aspergillus</i>	40
1.1- Approche phénotypique	40
1.2- Approche moléculaire	42
2- <i>Penicillium</i>	43
2.1- Approche phénotypique	43
2.2- Approche moléculaire	44
3- <i>Trichoderma</i>	46
3.1- Approche phénotypique	46
3.2- Approche moléculaire	47
Conclusion	49
MATERIELS ET METHODES	50
1- Nature et origine des souches	51
2- Culture des souches	57
2.1- Entretien des souches	57
2.2- Production de la biomasse pour l'extraction de l'ADN	57
3- Extraction de l'ADN	57
3.1- Micro-extraction au Chelex 100®	58
3.2- Extraction à l'achromopeptidase	59
3.3- Extraction à l'eau	59
4- Amplification de la région ITS par PCR	60
5- Contrôle de l'amplification sur gel d'électrophorèse	62
6- Séquençage des produits d'amplification	63
7- Analyse des séquences	64

RESULTATS ET DISCUSSION	65
1- Culture des souches.....	66
2- Extraction et amplification de l'ADN.....	66
3- Analyse des séquences.....	70
4- Discussion.....	99
Conclusion générale	10665
Références bibliographiques	108

Liste des figures

Figure 1 : Principaux pays producteurs d'huile d'olive en 2003.	6
Figure 2 : Principaux pays consommateurs d'huile d'olive en 2002.	7
Figure 3 : Production et consommation d'huile d'olive dans le monde et dans l'Union européenne.	8
Figure 4 : Tendances de la production nationale d'olive (DPV, 2004).	8
Figure 5 : Tendances de la production nationale d'huile d'olive (DPV, 2004).	9
Figure 6 : Maâsra traditionnelle	9
Figure 7 : La région ITS de l'ADN humain.....	23
Figure 8 : Courbe de la variation de la dénaturation de l'ADN en fonction de la température. Définition de la température de fusion (T _m).	24
Figure 9 : Principe de la PCR.....	26
Figure 10 : LightCycler : Thermocycleur à PCR quantitative.	29
Figure 11 : Utilisation de sondes fluorescentes pour la détection de l'ADN.	30
Figure 12 : Utilisation de fluorophore pour la détection de l'ADN.	30
Figure 13 : Technique de Southern blot.	32
Figure 14 : Profil d'amplification par RAPD d'ADN des souches de <i>Penicillium</i> utilisant deux amorces différentes ; NS2 (a) et NS7 (b).....	34
Figure 15 : Schéma des différentes étapes de la méthode d'AFLP.....	35
Figure 16 : Principe du séquençage de l'ADN	37
Figure 17 : Lecture manuelle de la séquence d'ADN	38
Figure 18 : Chromatogramme du séquençage d'ADN représentant.....	39
Figure 19 : Exploitation des microsatellites pour la différenciation des tissus sains (N) et des tissus cancéreux (T).....	40
Figure 20 : Caractères morphologiques des structures asexuées des <i>Aspergillus</i>	41
Figure 21 : Gel électrophorétique montrant le profil de restriction de certaines souches d' <i>A.</i> <i>fumigatus</i>	42
Figure 22 : Caractères morphologiques des structures asexuées des <i>Penicillium</i>	43
Figure 23 : Gel électrophorétique montrant le profil de restriction des souches de <i>Penicillium</i> isolées des aliments.....	45

Figure 24 : Structures morphologiques de l'espèce <i>Trichoderma viride</i>	47
Figure 25 : Southern blots de l'ADN des isolats de <i>Trichoderma</i> digéré par <i>EcoRI</i> et hybridé avec la sonde de ADNmt de <i>T. harzianum</i> 2924 digéré par <i>BamHI</i> . A gauche, le marqueur de poids moléculaire. Le N°25 correspond à la souche <i>T. viride</i> , les autres N° sont ceux de <i>T. harzianum</i>	48
Figure 26 : Bain-marie à sec.	58
Figure 27 : Centrifugeuse, couvercle fermé (à gauche) et couvercle ouvert (à droite) avec les tubes d'Eppendorf 1,5 ml et tubes de PCR 'Ready-To-Go™ PCR Beads'	59
Figure 28 : Emplacement des amorces ITS1 et ITS2.....	60
Figure 29 : Thermocycleur pour l'amplification de l'ADN.....	61
Figure 30 : Cuve du gel d'agarose avec les traces de migration des fragments de l'ADN.....	62
Figure 31 : Installation d'électrophorèse.....	62
Figure 32 : Installation de visualisation sous UV avec appareil de photographie	63
Figure 33 : Séquence d'ADN traitée par le logiciel Chromas.....	64
Figure 34 : Culture des moisissures sur milieu Malt Extract Agar 'MEA'	66
Figure 35 : Visualisation sous UV de la migration des bandes d'ADN sur le gel d'Agarose...	70
Figure 36 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 1.....	71
Figure 37 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 9.....	72
Figure 38 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 10.....	73
Figure 39 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 13.....	73
Figure 40 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNT 15.....	74
Figure 41 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNT 16.....	75
Figure 42 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 20.....	75
Figure 43 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 85.....	76
Figure 44 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 102.....	76
Figure 45 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 109.....	77
Figure 46 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche H 17.....	77
Figure 47 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 1.....	78
Figure 48 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 367.....	79
Figure 49 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 791.....	80
Figure 50 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 794.....	80
Figure 51 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 807.....	81
Figure 52 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 855.....	82
Figure 53 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 803.....	83

Figure 54 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 840.....	84
Figure 55 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 86.....	84
Figure 56 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 83.....	85
Figure 57 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 788.....	86
Figure 58 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 837.....	86
Figure 59 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 782.....	87
Figure 60 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 806.....	88
Figure 61 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 75.....	89
Figure 62 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 60.....	90
Figure 63 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 89.....	91
Figure 64 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 92.....	91
Figure 65 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 781.....	92
Figure 66 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 815.....	93
Figure 67 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 841.....	94
Figure 68 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 846.....	95
Figure 69 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 848.....	95
Figure 70 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche KLM 166.....	96
Figure 71 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 794.....	97
Figure 72 : Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 786.....	98
Figure 73 : Interface du logiciel Chromas montrant. La partie de la séquence à supprimer (à droite).	103
Figure 74 : Représentation schématique de la région ADN _r avec les positions des nouvelles amorces.....	103
Figure 75 : Arbre phylogénique réalisé avec l’algorithme du voisin le plus proche (Neighbor Joining) et basé sur l’analyse de la séquence de la région ITS de la souche LOMY 807 et les séquences de ses voisins les plus proche provenant de GENBANK. Les chiffres indiquent la valeur de bootstrap de chaque nœud. . .	103
Figure 76 : Amplification de l’ADN de quelques espèces de <i>Penicillium</i> et d’ <i>E. coli</i> révélée sur gel d’agarose.....	105

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification du genre de moisissures isolées (à 25°C) des échantillons prélevés de maâsras.	12
Tableau 2: Classification simplifiée des champignons	15
Tableau 3: Classification des champignons en fonction de leurs températures cardinales de croissance.	17
Tableau 4: Souches utilisées dans l'étude des <i>Penicillium</i> isolées à partir des aliments.	44
Tableau 5: séquences d'amorces	45
Tableau 6: Liste des souches isolées par Salih <i>et al.</i> , (2004).	51
Tableau 7 : Liste des souches isolées par Zaouia <i>et al.</i> , (2004).	53
Tableau 8: Liste des souches de la collection IAV Hassan II – IRD de Marseille.	55
Tableau 9: Résultats d'amplification de l'ADN en fonction de la méthode d'extraction utilisée.	68
Tableau 10: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 1.	71
Tableau 11: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 9.	72
Tableau 12: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 10.	72
Tableau 13: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 13.	73
Tableau 14: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 15.	74
Tableau 15: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNT 16.....	75
Tableau 16: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 20.	75
Tableau 17: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 85.	76
Tableau 18: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 102.	76
Tableau 19: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 109.	77
Tableau 20: Identification morphologique et moléculaire de la souche H 17.	77
Tableau 21: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 1.....	78
Tableau 22: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 367.....	78
Tableau 23: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 791.....	79
Tableau 24: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 785.....	80
Tableau 25: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 807.....	81
Tableau 26: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 855.....	82
Tableau 27: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 803.....	83
Tableau 28: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 840.....	84
Tableau 29: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 86.	84

Tableau 30: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 83.	85
Tableau 31: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 788.....	85
Tableau 32: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 837.....	86
Tableau 33: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 782.....	87
Tableau 34: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 806.....	88
Tableau 35: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 75.	89
Tableau 36: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 60.	90
Tableau 37: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 89	90
Tableau 38: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 92.	91
Tableau 39: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 781.....	92
Tableau 40: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 815.....	93
Tableau 41: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 841.....	94
Tableau 42: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 846.....	94
Tableau 43: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 848.....	95
Tableau 44: Identification morphologique et moléculaire de la souche KLM 166.	96
Tableau 45: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 794.....	97
Tableau 46 : Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 786.....	98
Tableau 47: Résultats d'identification moléculaire des souches regroupées par genre.	99

Liste des abréviations

A.	: <i>Aspergillus</i> .
ADN	: Acide désoxyribonucléique.
ADNc	: ADN complémentaire.
ADNr	: ADN ribosomal.
AFLP	: Polymorphisme de Taille des Fragments Amplifiés ‘Amplified Fragments Length Polymorphism’.
ARNm	: Acide ribonucléique messenger.
ARNr	: ARN ribosomal.
ATCC	: American Type Culture Collection.
a_w	: Activité de l’eau.
CIP	: Collection de l’Institut Pasteur.
CNUCED	: Conférence des Nations Unies pour le Commerce et le Développement.
dATP	: Désoxyadénosine-Tri-Phosphates
dCTP	: Désoxycytosine-Tri-Phosphates
ddNTP	: didésoxyribonucléoside.
dGTP	: Désoxyguanosine-Tri-Phosphates
dNTP	: DésoxyNucléosides-Tri-Phosphates
DPV	: Direction de Production Végétale, Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural. Rabat. Maroc.
DSMZ	: Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
dTTP	: Désoxythymine-Tri-Phosphates
F.	: <i>Fusarium</i> .
IAV	: Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement.
ITS	: Espaceurs Internes Transcrits ‘Internal Transcribed Spacer’.
JCM	: Japan Collection of Microorganisms.
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne ‘Polymerase Chain Reaction’.
PNTTA	: Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture.
PRAD	: Programme de Recherche Agronomique pour le Développement.
p/v	: Poids sur volume.
QBM	: Qualité Biologie Moléculaire.
RAPD	: Amplification Aléatoire de l’ADN Polymorphique ‘Randomly Amplified Polymorphic DNA’.
REA	: Analyse de Restriction Enzymatique ‘Restriction Enzym Analysis’.
RFLP	: Polymorphisme de Taille des Fragments de Restriction ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’.
RT-PCR	: Transcription inverse PCR ‘Reverse Transcription PCR’.
SSCP	: Polymorphisme de Conformation de l’ADN Simple Brin ‘Single Straind conformational Polymorphism’.
T _m	: Température de fusion.

Introduction générale

Pour terminer ma formation d'ingénieur en Industries Agricoles et Alimentaires au sein de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II 'IAV Hassan II' de Rabat, et contribuer au développement du secteur oléicole marocain, j'ai effectué un travail de mémoire de fin d'étude sur : « Identification moléculaire par amplification et séquençage d'ADN des champignons filamenteux isolées des 'Maâsra' au Maroc».

Le secteur oléicole revêt une grande importance socio-économique pour le Maroc. Or, la promotion de cette filière est jonchée d'obstacles d'ordre climatique (l'irrégularité de la pluviométrie), physiologique (le phénomène d'alternance) et technique (outils traditionnels et rudimentaires). L'utilisation de la méthode du gaulage pour la récolte des olives, la manutention et le stockage inadéquats en vrac ou en sacs en vue de l'extraction de l'huile au niveau des unités traditionnelles de trituration des olives 'Maâsra' sont des conditions propices au développement de moisissures. D'où la probabilité significative de l'existence de mycotoxines aussi bien dans l'huile que dans les grignons rendant ainsi impropre voire même périlleuse leur consommation respective par l'Homme et par le bétail.

Le travail qui nous a été confié est dans le cadre d'un Projet de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD). L'acronyme choisi « Moisi ZérO » pour désigner ce projet de recherche est composé de trois mots : Moisissures Zéro dans les Olives. Il y a trois objectifs à atteindre dans ce projet : (1) Réaliser un travail scientifique orienté vers l'identification classique et moléculaire des moisissures nuisibles et de leurs mycotoxines présentes dans les maâsras, empêcher la prolifération de ces moisissures et contribuer à un développement durable du secteur oléicole marocain. (2) Former par la recherche une jeune équipe marocaine sur les techniques modernes de biologie moléculaire pour l'identification et la détection des moisissures nuisibles. (3) Organiser au Maroc en 2004 un congrès international sur « Biotechnologie et Qualité pour le développement de la culture de l'olivier (OliveBioteQ-2004) ».

Durant les trois précédentes années du projet, de jeunes chercheurs marocains ont isolé des souches de moisissures mésophiles et thermophiles productrices de mycotoxines. Elles appartiennent principalement aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Les souches

isolées ont aussi un intérêt biotechnologique puisqu'elles se sont révélées productrices d'enzymes telles que les phytases, les tannases et les lipases.

L'objectif de ce travail qui entre dans le cadre des projets PRAD (04/16) et (02/13), est d'identifier par voie de biologie moléculaire les souches de champignons filamenteux qui ont été identifiées morphologiquement en 2003, 2004 et 2005, dans le cadre du projet PRAD (04/15) par l'équipe de recherche de IAV Hassan II et de l'Institut de Recherche pour le Développement 'IRD' de Marseille (Kammas *et al.*, 2002 ; Iraqi *et al.*, 2002 ; Salih *et al.*, 2004 ; Zaouia, *et al.*, 2005). Pour ce faire, j'ai effectué un stage au sein du Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée aux Biotechnologies Industrielles à la Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard, Lyon I, au Laboratoire de Microbiologie et des Fermentations en Milieu Solide à l'IRD de Marseille et à l'IAV Hassan II de Rabat.

La classification morphologique des champignons filamenteux a dominé la systématique fongique jusqu'à la fin du XX^e siècle. Toutefois, cette approche reste inefficace devant certains cas de champignons, en l'occurrence des moisissures peu différenciées et/ou sensibles aux conditions environnementales. L'émergence des techniques de biologie moléculaire a permis l'acquisition d'un complément d'information sur la taxonomie des champignons et une meilleure délimitation des espèces qui, autrefois, pouvait être confondues avec l'espèce dominante du genre. La technique de la réaction de polymérisation en chaîne ('Polymerase Chain Reaction', PCR) est devenue une technique incontournable pour l'amplification d'ADN.

Ce document, traite différents aspects que nous venons d'évoquer brièvement. Il est composé de trois sections :

- Section 1 : Revue bibliographique.

On trouvera ainsi, dans le premier chapitre, un aperçu sur le secteur oléicole mondial et marocain. Un deuxième chapitre est consacré à l'étude des champignons filamenteux ; de leur classification, des conditions de développement, des différentes catégories de mycotoxines, des méthodes de biologie moléculaire et notamment la technique de PCR, que nous avons utilisée pour l'amplification de la région des Espaceurs Internes Transcrits ('Internal Transcribed Spacer', ITS) de l'ADN des moisissures.

- Section 2 : Matériel et Méthodes.

L'origine des souches et les conditions de culture seront exposées dans cette section. Nous détaillerons ensuite les méthodes d'extraction de l'ADN, son amplification, le séquençage des amplifiats et l'analyse des séquences.

- Section 3 : Résultats et discussion.

Afin de faciliter la consultation des résultats, nous les avons résumés dans 37 tableaux. A la fin de cette section, nous avons mené une discussion pour apporter des éléments de réponses permettant d'expliquer les résultats obtenus.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Secteur Oléicole

Occupant une superficie de 128.000 ha en 1960, l'oliveraie au Maroc voit sa surface pratiquement quadrupler durant ces dernières décennies pour atteindre 500.000 ha. Ceci fait de l'olivier la principale espèce fruitière plantée au Maroc, soit plus de 50 % de la superficie occupée par l'arboriculture. Grâce à ses capacités d'adaptation à tous les étages bioclimatiques, cet arbre endémique est rencontré dans un vaste périmètre qui s'étend de la côte méditerranéenne à la région du Sous.

A côté de ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terres agricoles et de fixation des populations dans les zones marginales, l'oléiculture nationale mobilise une activité agricole intense permettant de générer plus de 11 millions de journées de travail par an, soit l'équivalent de 55.000 emplois permanents. De même, une activité industrielle d'une importance cruciale est générée en aval par l'approvisionnement de 16.000 moulins traditionnels « Maâsras », 260 unités modernes de trituration et une cinquantaine de confiseries d'olives (PNTTA, 1998).

La *Picholine marocaine* constitue la variété majoritairement cultivée au Maroc, soit 96 % de la superficie oléicole nationale. D'autres variétés telles que *Dahbia*, *Meslala*, *Picual* et *Picholine* du Languedoc complètent le profil variétal oléicole (PNTTA, 2003).

1- Situation oléicole mondiale

Le secteur de l'huile d'olive représente un créneau économique important pour la majorité des pays de la Méditerranée. Le Conseil Oléicole International (2002) rapporte que la production mondiale annuelle d'huile d'olive s'est élevée pour la campagne 2001/2002 à environ 2,69 millions de tonnes, soit une augmentation de 5,3 % par rapport au chiffre moyen des campagnes depuis 1996. Les données concernant la situation oléicole mondiale qui est exposée ci-dessous sont inspirées en grande partie du site Internet de la Conférence des Nations Unies pour le Commerce et le Développement (CNUCED) :

(<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/olive/marche.htm>).

1.1- Production d'huile d'olive

La production d'huile d'olive a toujours été concentrée dans les pays du pourtour méditerranéen : Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Syrie, Turquie, Tunisie et Maroc. A eux seuls ces pays représentent plus de 90 % de la production mondiale (Figure 1).

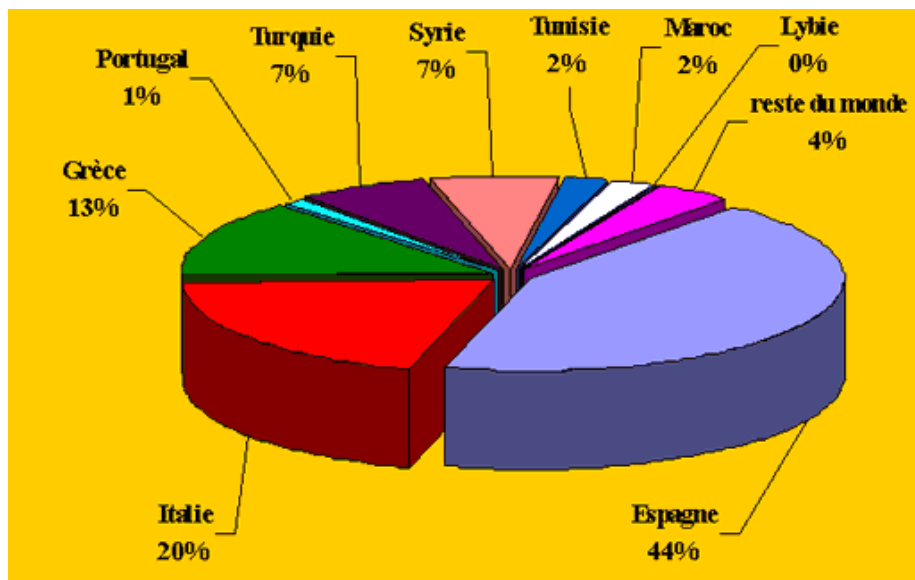


Figure 1: Principaux pays producteurs d'huile d'olive en 2003.

1.2- Consommation d'huile d'olives

Les principaux pays consommateurs d'huile d'olives sont également les principaux pays producteurs comme le montre la figure ci-dessous. L'ensemble des pays de l'Union européenne représentent 71 % de la consommation mondiale. Les pays du pourtour méditerranéen représentent 77 % de la consommation mondiale. Les autres pays consommateurs de cette huile sont les Etats-Unis d'Amérique, le Canada, l'Australie et le Japon.

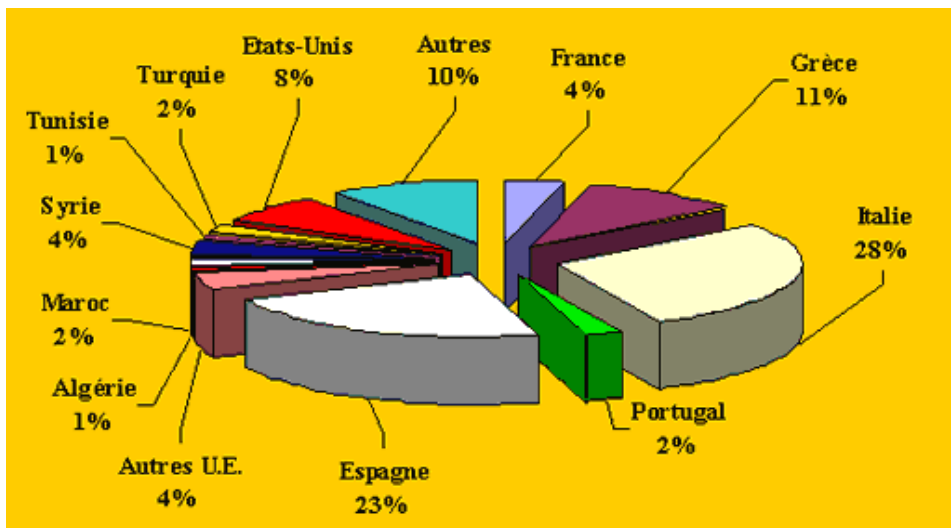


Figure 2: Principaux pays consommateurs d'huile d'olive en 2002.

L'évolution de la production et de la consommation de l'huile d'olives depuis 1970 (Figure 3) montre une faible croissance jusqu'au début des années 90, puis une brusque augmentation à la fois de la production et de la consommation pour les années 1996, 1997 et 1998. Malgré la chute de la production qui s'en est suivie, la consommation semble ne pas diminuer.

Le parallélisme des courbes de consommation mondiale et européenne d'huile d'olives, indique l'importance de la consommation européenne. Cependant, l'écart entre ces courbes s'est amplifié au cours des dernières années du fait de l'ouverture de nouveaux marchés pour l'huile d'olive.

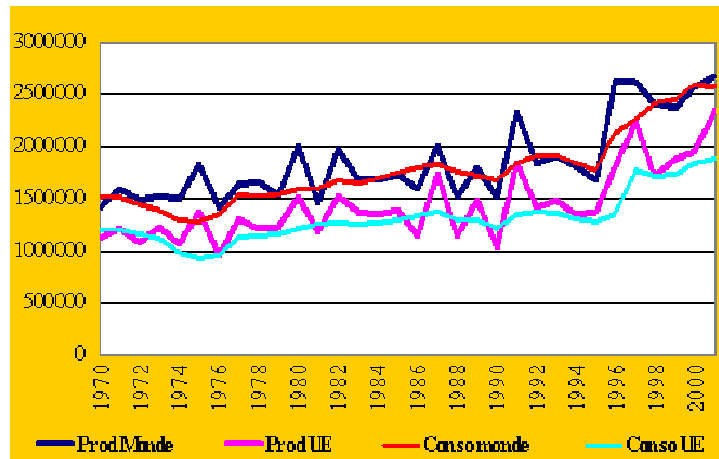


Figure 3: Production et consommation d'huile d'olive dans le monde et dans l'Union européenne.

2- Situation nationale

Malgré les atouts dont dispose le secteur oléicole national, le diagnostic de la situation actuelle met en exergue l'état modeste des niveaux de production. En effet, la production nationale d'huile d'olive qui est de l'ordre de 48.000 tonnes/an ne couvre qu'environ 10 % des besoins nationaux en huile végétale alimentaire, alors que la consommation avoisine les 350.000 tonnes/an (Chimi, 2001). L'évolution de la production nationale d'olive et de son huile connaît une grande fluctuation d'une année à l'autre (Figures 4 et 5). Ceci est en raison des conditions et des aléas climatiques, du phénomène de l'alternance, de l'âge des plantations et du mode de conduite des oliveraies (DPV, 2004).

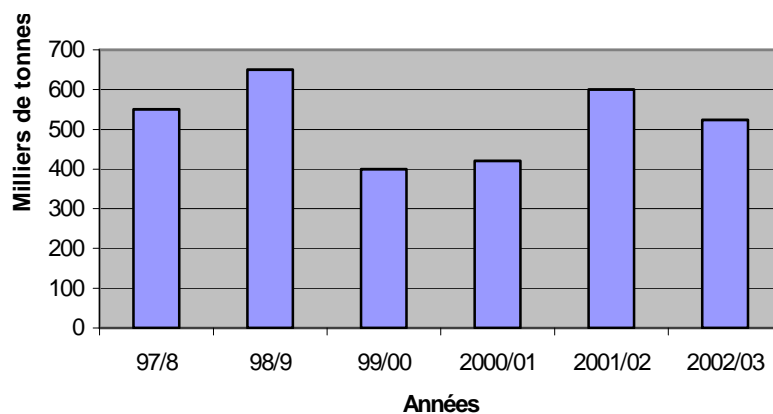


Figure 4: Tendence de la production nationale d'olive (DPV, 2004).

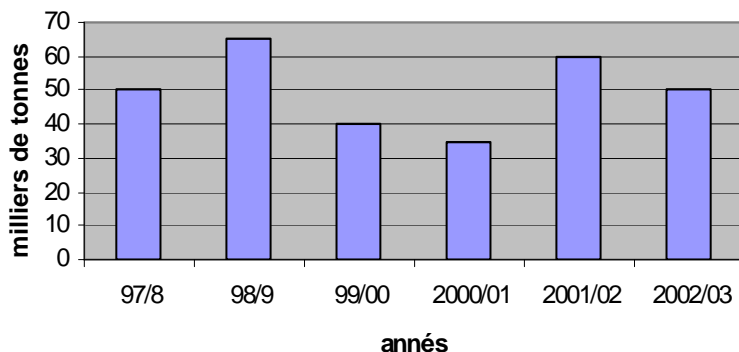


Figure 5: Tendence de la production nationale d'huile d'olive (DPV, 2004).

3- Maâsra : unité traditionnelle de trituration d'olive

Au Maroc les unités traditionnelles de trituration des olives sont appelées communément 'Maâsra' (Figure 6), elles ont généralement une faible capacité de trituration (250 à 300 kg d'olives/ jour). Les propriétaires des maâsras travaillent soit pour leur compte soit dans le cadre d'une location temporaire de l'unité par les agriculteurs ou par acquisition de service par ces derniers (RAHMANI, 1996).



Figure 6: Maâsra traditionnelle.

Les circuits de production et de transformation des olives, particulièrement auprès des maâsras, engendrent de nombreuses pertes, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Les maâsras ne valorisent pas au mieux le potentiel de la production d'olives. Ces unités traditionnelles traitent en moyenne 150.000 à 200.000 tonnes d'olives/an; avec des rendements en huiles qui ne dépassent pas 14 % dans le meilleur des cas (Chimi, 2001).

Les maâsras sont équipées en pressoirs métalliques ou en bois, elles utilisent des meules, pour broyer la pâte des olives, qui fonctionnent avec de l'énergie animale, humaine ou mécanique. L'huile produite est stockée dans des bacs de décantation en ciment, faïence ou argile.

Le processus d'extraction de l'huile consiste en un broyage des olives par des meules, une mise de la pâte produite dans des scourtins puis une extraction de l'huile par pression et enfin une séparation par décantation des phases liquides (huile et margines).

Afin de mieux appréhender les traitements post-récoltes des olives destinées à la trituration au sein des maâsras, un groupe de chercheurs de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (IAV-Hassan II) a mené une enquête nationale dans le cadre du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA) auprès de 132 maâsras artisanales, choisies au sein des principales régions de production d'olives. De cette enquête, il ressort que (Chimi, 2001):

Le degré de maturité des olives, la méthode de récolte, les conditions de manutention de ces fruits en vue de l'extraction de l'huile, sont des critères importants pour l'obtention d'huiles de bonne qualité. Les méthodes de récolte et de stockage sont décrites ci-dessous.

3.1- Récolte des olives

Les méthodes de récoltes des olives au Maroc sont généralement traditionnelles. La majorité des régions de production des olives utilisent le gaulage (90 %) mais 10 % des agriculteurs pratiquent la cueillette des olives ou les ramassent naturellement lorsqu'elles sont tombées. Le gaulage provoque la lésion des fruits, lesquelles lésions facilitent la pénétration et le développement des micro-organismes ce qui nuit considérablement à la qualité de l'huile d'olive.

3.2- Stockage des olives

Dans les unités artisanales mais également dans les maâsras coopératives, les olives récoltées ne sont pas directement traitées à cause de leur abondance et de la capacité restreinte des unités traditionnelles. Un stockage inadéquat des olives porte atteinte à la qualité de l'huile d'olive. Le stockage des olives en vrac est à éviter à cause de l'entassement que subissent les fruits. De façon optimale il doit être réalisé en couches minces de 22 à 25 cm pour éviter la croissance microbienne indésirable. L'utilisation de caisses à parois perforées est le moyen de stockage, à court terme, le plus recommandé. A travers les résultats de l'enquête, 56 % des maâsras triturent des olives stockées en vrac, 38 % utilisent des fruits stockés dans des sacs et seulement 6 % fonctionnent avec des olives stockées dans des caisses. Il a été aussi constaté que 43 % des maâsras ne dépassent pas une durée de stockage de 7 jours, par contre 57 % triturent des olives stockées plus de 15 jours.

4- Contamination fongique naturelle des olives

Les conditions particulières de récolte, de stockage et de trituration des olives auprès des maâsras, notamment le gaulage et le séjour prolongé des olives avant leur traitement, font des olives un milieu propice pour la croissance fongique. Ainsi, les huiles produites peuvent présenter un risque de contamination par les mycotoxines et les grignons d'olive issus de telles olives pourraient présenter un danger pour le bétail du fait de la concentration préférentielle des mycotoxines dans les tourteaux plutôt que dans l'huile de pression.

Des études antérieures ont montré la présence sur les olives de spores de moisissures réputées toxigènes notamment les *Aspergillus*. Certaines espèces appartenant à ce genre, notamment *A. flavus* et *A. ochraceus* se sont montrées capables d'élaborer leurs toxines correspondantes sur les olives. L'huile de pression issue de telles olives peut renfermer de faibles quantités de ces mycotoxines (Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1983).

En 2004, Salih *et al.* ont étudié la mycoflore des olives et des grignons d'olives dans les maâsras marocaines. Un total de 50 échantillons composés essentiellement d'olives et de grignons d'olives ont été prélevés à partir des maâsras des différentes régions du Maroc

(Errachidia Fés Méknés Rabat et Khémisat). Ainsi, 84 souches mésophiles appartenant à 9 genres de moisissures ont été isolées (Tableau 1). Tous ces genres ont été déjà rapportés comme étant des contaminants naturels des aliments (Domsch *et al.*, 1980). Tantaoui-Elaraki *et al.*, (1990) rapportent que quelques moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, et *Alternaria* ont déjà été isolés des olives. Les souches thermophiles qui ont été isolées sont au nombre de 12 et appartiennent aux genres *Rhizopus* et *Mucor* en plus de deux souches d'*A. fumigatus*.

Un autre projet de recherche a été réalisé dans le cadre du PRAD entre l'IAV Hassan II et à l'IRD de Marseille, portant sur l'isolement de champignons filamenteux thermophiles à partir de grignons d'olives pour la production de phytases, de lipases et de tannases. Dans ce travail, environ 450 souches de champignons filamenteux thermophiles ont été isolées. Ces souches appartiennent essentiellement aux genres *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* et *Aspergillus*. Trente pourcent des souches isolées correspondaient à l'espèce *A. fumigatus*.

Tableau 1 : Identification du genre de moisissures isolées (à 25°C) des échantillons prélevés de maâsras.

Genre	Nombres de souches isolées	Mycoflore totale mésophile (%)
<i>Aspergillus</i>	27	32.1
<i>Penicillium</i>	26	31.0
<i>Geotrichum</i>	10	11.9
<i>Mucor</i>	9	10.7
<i>Rhizopus</i>	6	7.1
<i>Trichoderma</i>	3	3.6
<i>Alternaria</i>	1	1.2
<i>Acremonium</i>	1	1.2
<i>Ulocladium</i>	1	1.2

Ces moisissures sont en général saprophytes pour l'homme et l'animal, mais peuvent renfermer des espèces pathogènes. C'est le cas notamment des *Aspergillus* et des *Penicillium* dont certaines espèces sont impliquées dans la production de dangereuses mycotoxines. En effet, Tantaoui-Elaraki *et al.*, (1983) ont démontré que les olives noires entières, mais ayant subi des endommagements mécaniques superficiels, et ensemencées respectivement avec des

conidiospores d'*A. flavus* et d'*A. ochraceus* étaient le siège d'une certaine sécrétion d'aflatoxine B1 ou d'ochratoxine A.

Salih (2004) a prélevé 14 échantillons d'huile d'olive des différents maâsras de la région d'Errachidia pour la recherche des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 et la présence de l'ochratoxine A. Sur la totalité des échantillons d'huile d'olive qui ont été analysés, aucun échantillon ne s'est révélé contaminé par l'une ou l'autre des mycotoxines recherchées.

I- Champignons filamenteux

A côté des champignons supérieurs dits macromycètes, il y a ce que l'on appelle les micromycètes ou champignons inférieurs. Ceux-ci constituent un monde de champignons filamenteux ou de levures microscopiques dont seul le microscope a révélé leur existence. Les champignons filamenteux, appelés communément moisissures, ont été largement étudiés sur plusieurs plans : morphologie, métabolisme, biologie moléculaire, biotechnologie, etc.

1- Définition des champignons

Les champignons sont définis comme étant des micro-organismes eucaryotes sporogènes non chlorophylliens. Ils sont classés en trois groupes selon leurs intérêts industriels : les champignons filamenteux, les levures et les champignons supérieurs (Brock *et al.*, 1994).

Leur développement se fait par croissance apicale par élongation des filaments à partir de leurs extrémités, dans tous les sens et de façon identique. Leur mode de reproduction se fait par voie sexuée ou asexuée. La forme sexuée est appelée téléomorphe, la forme asexuée, anamorphe et l'organisme complet, holomorphe.

2- Classification des champignons filamenteux

Bien qu'aucun schéma phylogénétique des champignons n'ait reçu un agrément unanime de la part de la communauté scientifique, la classification simplifiée suivante peut être proposée. Celle-ci permet de distinguer deux grandes divisions qui se séparent chacune en une série de sous-groupes (Tableau 2) (Boiron, 1996) :

- les Chromista ou Pseudomycota, pour les Oomycètes et les Hyphochytridiomycètes, à côté de certaines algues ;
- les Fungi ou Eumycota pour les autres, appelés champignons « vrais ».

Tableau 2: Classification simplifiée des champignons

Division	Classe	Sous-classe
Chromista (ou Pseudomycota)	Oomycètes Hyphochytridiomycètes	
Fungi (ou Eumycètes)	Chytridiomycètes Zygomycètes	
	Ascomycètes	Hemiascomycetidea Euascomycetidea Loculoascomycetidea
	Basidiomycètes	Teliomycetidea Eubasidiomycetidea
	Deutéromycètes	Hyphomycetidea Coelomycetidea Blastomycetidea

3- Conditions de développement des champignons filamenteux

Bien qu'elles soient relativement peu exigeants, un certain nombre de facteurs, nutritifs et environnementaux, doivent être réunis pour que les champignons filamenteux se développent. Les principaux facteurs de développement sont :

3.1- Éléments nutritifs

Les plus importants sont le carbone et l'azote, utilisées sous forme de composés organiques et présents en quantité suffisante dans les denrées alimentaires et ne constituent donc pas un facteur limitant à leur développement (William Bridge Cook, 1979). Les ions minéraux (potassium, phosphore, magnésium, etc.) en quantités faibles et parfois quelques vitamines peuvent stimuler ou orienter le développement.

3.2- Activité de l'eau du substrat

La croissance des champignons requiert une activité de l'eau (a_w) faible par rapport aux bactéries. La limite inférieure de l' a_w en dessous de laquelle les moisissures ne peuvent pas se développer est de 0,65 (William Bridge Cook, 1979).

3.3- Oxygène

La plupart des champignons se développent à l'extérieur de la substance contaminée. Ils sont des aérobies. Néanmoins, certaines moisissures sont moins exigeantes et se développent en conditions de faible concentration d'oxygène (William Bridge Cook, 1979).

3.4- pH

Les champignons sont peu sensibles au pH du milieu. Il se développent de préférence en milieux acides entre 2 et 8 avec un optimum entre 5,5 et 5,7. Certaines espèces (*Aspergillus niger*) peuvent se développer jusqu'à un pH de 1,7 et 2. Cette faculté de se

développer en milieu acide permet de les séparer plus facilement des bactéries pour l'isolement.

3.5- Température de croissance

Chaque micro-organisme se caractérise par sa croissance dans une gamme de températures cardinales bien définie. Cet intervalle est caractérisé par (tableau 3) :

- Une température minimale au-dessous de laquelle il n'y a pas de croissance microbienne.
- Une température optimale pour laquelle la croissance microbienne est la plus élevée.
- Une température maximale au-dessus de laquelle il n'y a pas de croissance microbienne.

La majorité des moisissures est mésophile avec un minimum entre 0 et 15°C, un optimum entre 25 et 30°C et un maximum en dessous de 35°C. Par ailleurs, il existe une autre catégorie de champignons, dits thermophiles, qui se développent à des températures supérieures à 50°C. D'autres champignons sont capables de supporter des températures inférieures à 0°C et sont donc appelés psychrophiles (Dix, *et al.*, 1995a, b).

Tableau 3: Classification des champignons en fonction de leurs températures cardinales de croissance.

Catégorie de micro-organismes	Températures cardinales de croissance en °C		
	Minimale	Optimale	Maximale
Psychrophiles	≥ 0	15	20
Psychrotolérants	0	25-30	35
Mésophiles	5	25-30	35
Thermotolérants	5	30-40	50
Thermophiles	20	≥ 45	> 50

4- Mycotoxines

Les mycotoxines font partie des contaminants naturels de l'alimentation, par opposition aux molécules apportées intentionnellement ou accidentellement par l'homme tel que les additifs alimentaires et les résidus de produits phytosanitaires.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. En raison de leur structure chimique, les mycotoxines sont stables. Elles le sont particulièrement à la chaleur, ce qui les rend d'autant plus dangereuses pour le consommateur puisqu'on peut alors les retrouver dans les aliments après cuisson.

En sécurité alimentaire, il y a six familles de mycotoxines qui, si elles sont présentes dans l'alimentation à des doses suffisantes, peuvent faire courir des risques aux consommateurs. Ce sont:

Les aflatoxines sont essentiellement produites par quelques souches d'*Aspergillus flavus* et par d'autres souches d'*Aspergillus* comme *A. parasiticus*, et *A. nomius*. Il y a quatre sortes d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2). Dans les produits d'origine végétale, on rencontre essentiellement les aflatoxines B1 et G1 (Pittet, 1998).

L'ochratoxine A (OTA), est une mycotoxine produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*. Cette mycotoxine a été identifiée en Tunisie depuis 1983 et elle est systématiquement détectée dans diverses denrées alimentaires (Maaroufi 1998). L'OTA a été détectée dans le sang des populations surtout rurales en Tunisie (néphropathie). L'ochratoxine A est fortement cancérigène (I.A.R.C., 1993).

Les fumonisines : Riley *et al.* (1998) ont présenté différentes hypothèses concernant les mécanismes d'action des fumonisines, mycotoxines produites par *Fusarium moniliforme*, dont leurs principales manifestations toxiques chez l'animal, incluant : l'œdème pulmonaire porcin, la leucoencéphalomalacie équine, la néfrotoxicité et l'hépatotoxicité chez de nombreuses espèces animales, et l'action promotrice dans la survenue de cancers de foie chez le rat. Une perturbation du métabolisme des sphingolipides est observée de façon précoce *in vitro* sur la plupart des systèmes de culture.

La zéaralénone (ZEN) est une mycotoxine produite par différentes espèces de *Fusarium*, elle contamine les céréales et divers aliments pour animaux. La ZEN, mycotoxine génotoxique, elle induit des lésions au niveau de l'ADN, elle est probablement mutagène (Bacha *et al.*, 1998).

La patuline est produite par plusieurs moisissures, mais principalement *Penicillium expansum*, un contaminant très fréquent des pommes abîmées et stockées. Le jus de pommes et le cidre sont les principaux vecteurs, sa stabilité à la température et à l'acidité étant très grande. La génotoxicité de la patuline n'est pas entièrement avérée, non plus que sa cancérogénicité chez l'animal.

Les trichotécènes (deoxynivalenol, T2-toxine) constituent un groupe de métabolites secondaires issus de nombreuses espèces de *Fusarium* se développant sur les épis de céréales (principalement blé, orge, maïs, avoine) dans certaines conditions atmosphériques (froid et humidité). Ils sont retrouvés dans une proportion importante (50 %) de grains et de produits dérivés. Le passage dans la chaîne alimentaire (viande, œufs, lait) est très limité. Les trichotécènes ont été à l'origine d'empoisonnements graves d'animaux et d'Hommes, connus sous le nom d'aleucie, en Union Soviétique, Europe Centrale, USA, Finlande et Chine. Ils ne sont ni génotoxiques ni cancérogènes.

II- Identification des champignons filamenteux

1- Approche morphologique

La morphologie est l'outil principal de la systématique des champignons. La majorité des 75.000 espèces de champignons filamenteux décrites jusqu'à présent sont des espèces morphologiques. En pratique, la délimitation des espèces s'appuie sur la quête des traits caractéristiques de la morphologie et des cultures d'isolats sur milieu approprié.

Parmi les critères morphologiques, on peut citer :

- L'étude microscopique du mycélium : la vérification de la présence ou l'absence de cloisons, la détermination de sa couleur, l'ornementation et la largeur de ses parois, son mode de ramification et la différenciation des thallospores.
- L'étude microscopique des organes différenciés et leur contenu : forme, couleur, dimension, texture des parois et ornementation.

Pour ce qui est des caractères cultureux, on doit déterminer : la vitesse de croissance apicale, la texture du thalle (velouté, laineux, etc.), la couleur du thalle (la pigmentation du mycélium, couleur des conidies), la couleur du revers de la culture et présence d'un pigment diffusible, l'odeur et présence d'exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien).

En revanche, ces caractères morphologiques sont parfois délicats à exploiter en absence d'une expérience approfondie. On assiste alors à des problèmes d'observation et de stabilité des caractères morphologiques. Par exemple, l'identification de certaines espèces appartenant au genre *Alternaria* basée exclusivement sur la morphologie est très difficile. Ceci est dû à la sensibilité de ces champignons aux conditions de cultures (Anderson *et* Thrane, 1996).

Pour l'identification des champignons filamenteux peu différenciés tels que *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Alternaria* l'approche phénotypique reste inefficace. En outre, les

méthodes physiologiques et biochimiques s'avèrent laborieuses et insatisfaisantes (Anderson et Thrane, 1996; Frisvad *et al.*, 1998; Guarro *et al.*, 1999).

2- Approche chimique

L'approche chimique qui se base sur des méthodes chromatographiques et spectroscopiques permet de mener des analyses aussi bien quantitatives que qualitatives pour élucider les structures des métabolites ou des composés de la membrane cellulaire. Il s'agit principalement des polysaccharides, des lipides insaponifiables, des acides gras, des métabolites secondaires volatiles et non volatiles.

Les polysaccharides constituent 80 à 90 % de la membrane cellulaire des champignons. Leur étude est très laborieuse en raison de la nécessité de la connaissance des monomères et de leur séquence, de la position des liaisons et de la configuration anomérique.

Les lipides insaponifiables qui, sont étudiés dans le cadre de la chimiotaxonomie, appartiennent à la famille des : ubiquinones, stéroïdes et caroténoïdes. Concernant, le profil en acides gras, il peut être le même de point de vue composition chez de nombreuses espèces d'un champignon filamenteux donné. Tout de même, ces espèces peuvent être différenciées grâce à la concentration relative de chaque acide gras. Ainsi, Lopes da Silva *et al.* (1998) sont arrivés à différencier des espèces de *Penicillium*.

Bien que l'utilisation des métabolites secondaires volatils pour l'identification des champignons filamenteux soit très controversée, certains auteurs les ont employés pour décrire quelques espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* (Wilkins *et* Larsen, 1995 ; Sunesson *et al.* , 1995 ; Frisvad *et al.*, 1998) et au genre *Penicillium* (Börjesson *et al.*, 1990; Larsen *et* Frisvad, 1995a; Larsen *et* Frisvad, 1995b). Dans les industries agro-alimentaires, l'intérêt de ces composés a été mis en évidence par Magan *et* Evans, (2000). En effet, grâce à un nez électronique les auteurs ont pu détecter rapidement la détérioration des stocks de grains. Désormais les espèces mycotoxinogènes peuvent être détectées grâce à l'émergence de cette technique.

Les métabolites secondaires non volatils permettent de procurer des données précises et complémentaires aux données morphologiques et moléculaires. Smedsgaard *et* Frisvad, (1997) sont arrivés à obtenir des profils de métabolites secondaires non volatiles caractéristiques de certaines espèces du genre *Penicillium*.

3- Approche moléculaire

La biologie moléculaire a connu un essor extraordinaire ces deux dernières décennies. Quand les champignons filamenteux sont peu différenciés et/ou sensibles aux conditions environnementales, les méthodes morphologiques, physiologiques et biochimiques s'avèrent alors non seulement laborieuses et longues mais aussi quelquefois inefficaces. En outre, de nombreuses espèces de champignons ont été décrites à partir d'un seul spécimen, ou dans les meilleurs cas, d'un groupe d'individus très restreint. Ceci engendre une vulnérabilité certaine au niveau de la taxonomie morphologique en raison de la grande variabilité phénotypique dans le monde fongique.

Les experts de la biologie moléculaire, suivant la finalité de leur recherche, prennent pour cible soit un gène (locus) ; soit un fragment d'ADN défini (espaceurs, introns, etc.), soit plusieurs gènes (multiloci) ou même l'ADN total .

En taxonomie moléculaire des champignons, les gènes les plus sollicités sont ceux qui codent pour l'ARN ribosomique (Frisvad *et al.*, 1998). Pour la comparaison des taxons de rangs supérieurs (familles, ordres, classes) l'ADN ribosomal 18S, très conservé, s'avère plus adapté. La discrimination des espèces proches se base plutôt sur les séquences de la région Espaceurs Internes Transcrits ('Internal Transcribed Spacer', ITS) de l'ADN ribosomal (Chen *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001). Ceci en raison de la facilité de l'étude de ces unités, qui sont des régions non codantes et variables selon l'espèce, après amplification par PCR. En effet, elles sont présentes en 100 à 150 copies répétées en tandem chez les champignons comme chez la majorité des eucaryotes. La figure 7 illustre les différents gènes et séquences constituant la région ITS.

La région ITS est formée de l'ITS1, de l'ADNr 5,8 et de l'ITS2. Elle encadrée par les gènes de l'ARNr 18S et de l'ARNr 28S.

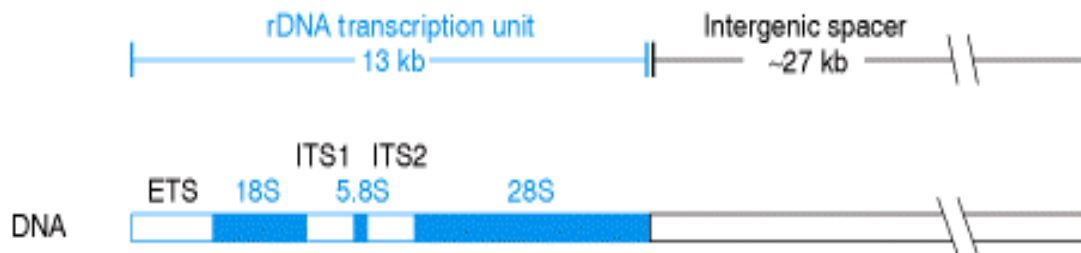


Figure 7: La région ITS de l'ADN humain
(Strachan *et al.*, 1999)

III- Techniques de biologie moléculaire

1- Réaction de polymérisation en chaîne

Cette technique décrite pour la première fois en 1985 par l'équipe de Mullis permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter considérablement la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides).

Cette technique d'amplification de fragments spécifiques d'ADN *in vitro*, a vu le jour lorsque l'on a découvert une enzyme, la *Taq* polymérase, capable de résister aux températures de la dénaturation. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.

Cette réaction s'effectue par extension itérative (répétition de la succession cyclique) de deux amorces spécifiques à la région que l'on désire amplifier, grâce à l'enzyme thermostable. Ainsi, celle-ci part de ces deux amorces situées de part et d'autre de la région cible pour y ajouter des nucléotides de façon complémentaire et antiparallèle à la séquence considérée. Le produit de la réaction est un fragment d'ADN double brin dont les limites sont déterminées par les amorces utilisées.

Théoriquement, 25 cycles d'amplification reproduisent environ 33 millions de fois le produit spécifique, selon la formule:

$$N_c = N_0 \cdot 2^C$$

- Soit :
- N_0 : le nombre de fragment d'ADN initiaux,
 - N_c : le nombre de copies au cycle C.

La PCR consiste en une succession cyclique de trois phases :

➤ **Dénaturation thermique**

Les deux brins d'ADN sont séparés par élévation de la température supérieure à la température de fusion qui est spécifique à chaque fragment d'ADN de séquence donnée. La température de fusion T_m est définie comme étant la température où 50 % des fragments sont sous forme simple brin (Figure 8).

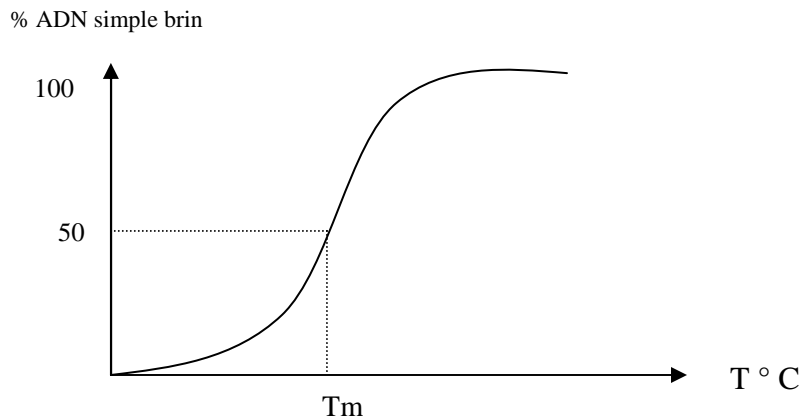


Figure 8: Courbe de la variation de la dénaturation de l'ADN en fonction de la température. Définition de la température de fusion (T_m).

➤ **Hybridation des amorces**

Une paire d'amorces sens et antisens vont s'hybrider sur les brins d'ADN et délimiter ainsi la séquence à amplifier. La température d'hybridation doit être inférieure au T_m des amorces pour favoriser et conserver leur association sur l'ADN cible.

➤ **Elongation :**

L'association d'un brin et d'une amorce est le substrat de l'ADN polymérase '*Taq pol*', qui avec l'apport des 4 nucléotides extérieurs : dGTP, dATP, dTTP, dCTP appelés DésoxyNucléosides-Tri-Phosphates (dNTPs), permet la synthèse du brin complémentaire. Cette extension se fait à partir de l'extrémité 3' où se situe l'amorce, à une température intermédiaire entre celle nécessaire à la dénaturation et celle de l'hybridation des amorces. A la fin de l'élongation, on obtient un ADN duplex : brin ancien/brin néo-synthétisé.

La figure 9 illustre la succession cyclique des trois phases de la PCR.

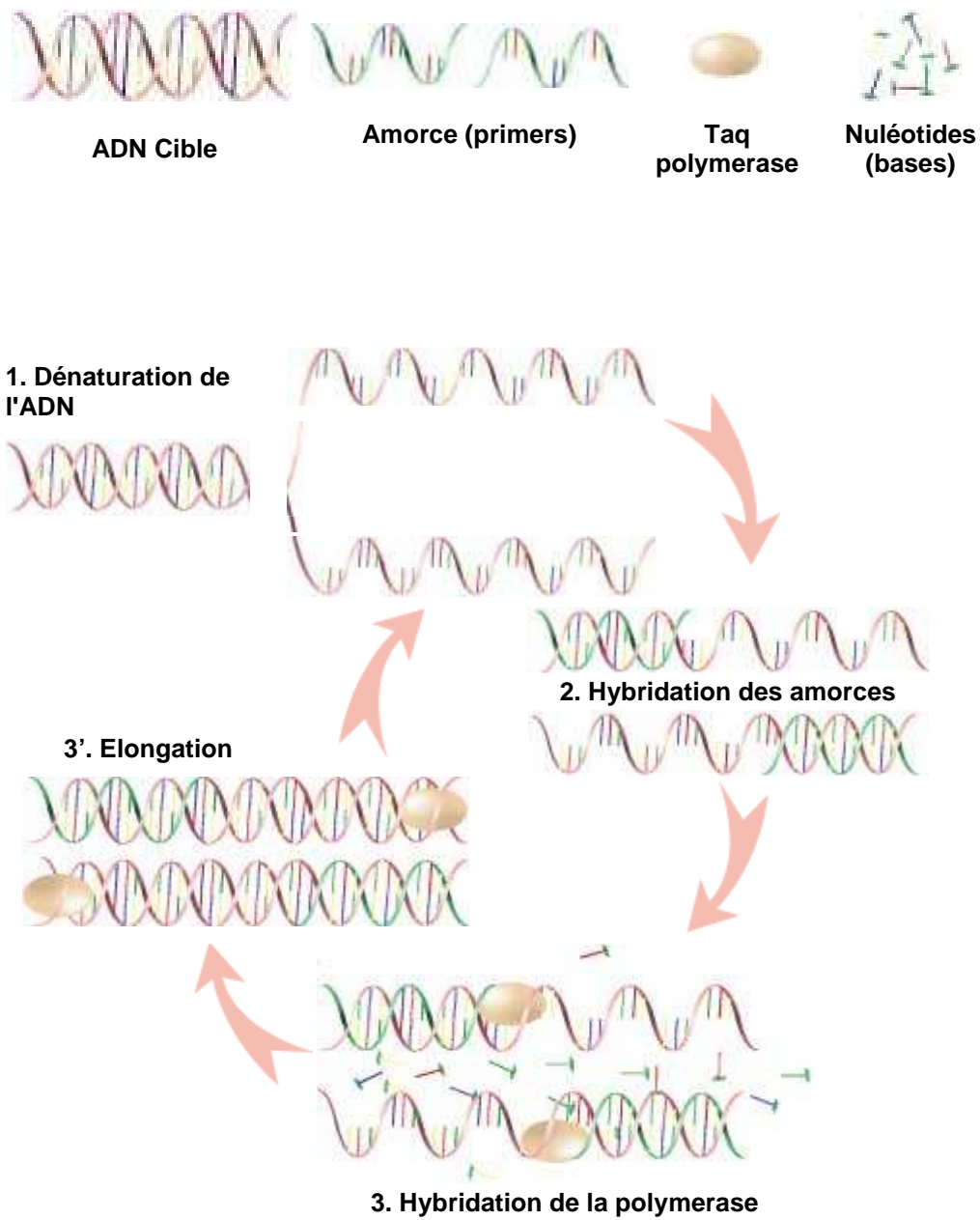


Figure 9: Principe de la PCR.

2- Variantes de PCR

La PCR a considérablement évolué et a permis le développement de certaines variantes.

2.1- PCR nichée ou nested PCR

Appelée également PCR emboîtée, il s'agit de deux PCR. La première utilise des amorces universelles complémentaires de séquences hautement conservées et communes à tous les champignons filamenteux. La seconde se sert d'une autre paire d'amorces plus spécifiques à un genre pour amplifier l'implicon (amplifiat) obtenu lors de la PCR précédente. Ainsi, l'usage de deux couples d'amorces accroît la spécificité de la réaction et améliore considérablement la sensibilité de la méthode.

2.2- Reverse Transcription PCR

La Reverse Transcription PCR (RT-PCR) est une méthode qui permet d'étudier un gène à partir de l'ARN messager (ARNm). Elle se déroule en deux phases. Une première phase correspond à la copie de l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc). Une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADNc synthétisé.

Dans la première phase, l'ARNm à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul brin d'ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse ou rétrotranscriptase permet la synthèse du brin complémentaire sous une forme d'ADNc simple brin. Une seconde amorce oligonucléotidique spécifique permet la synthèse du second brin par extension. L'ADNc synthétisé servira par la suite de matrice pour une réaction PCR classique.

2.3- PCR quantitative

La PCR quantitative permet de mesurer la quantité de molécules d'ADN synthétisé au cours de l'amplification. Elle utilise une référence ou étalon sur lequel on se base pour quantifier les échantillons.

La PCR quantitative est dite absolue lorsque le nombre de molécules de la référence est connu. Dans ce cas, une quantité absolue en nombre de copies d'ADN pourra être attribuée à l'échantillon. Si le nombre de molécules n'est pas connu, on lui assigne une valeur arbitraire (1 ; 100 % ; ...) et l'échantillon prend alors une valeur relative à la référence ; la PCR quantitative est dite relative.

L'évolution de l'amplification peut être représenté par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde. Deux phases constituent cette évolution ; la première correspond à une amplification exponentielle et modélisable. La quantité d'amplifiat obtenue à chaque moment de cette phase est directement fonction du nombre de copies initiales du fragment d'ADN. La seconde qui est une phase de plateau, correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être dû à l'épuisement des différents réactifs de la PCR tels que les amorces. Cette phase est difficilement modélisable et elle est rarement reproductible.

- Soit :
- N_0 : nombre de copies initiales,
 - N_c : nombre de copies au cycle c
 - E : efficacité de la PCR.

$$N_1 = N_0 \cdot (1+E)$$

$$N_2 = N_1 \cdot (1+E)$$

...

$$N_c = N_0 \cdot (1+E)^c$$

- Exemple particulier :

Si $E = 100\%$, à chaque cycle, le nombre de copies double est : $N_c = N_0 \cdot 2^c$

Actuellement, la PCR quantitative en temps réel gagne du terrain au détriment de la PCR conventionnelle. Grâce au LightCycler (Figure 10) qui est un thermocycleur rapide (à air

pulsé), couplé à un microspectrofluorimètre, on peut mesurer la quantité d'ADN synthétisé après chaque cycle d'élongation. Cette technique assure la rapidité, la simplicité et la sécurité de manipulation (non utilisation de bromure d'éthidium qui est un produit cancérigène).



Figure 10: LightCycler : Thermocycleur à PCR quantitative.

Pour détecter les produits d'amplification, le LightCycler utilise l'une des deux méthodes basées sur la fluorescence :

- **Détection de l'ADN avec un fluorophore, le SYBR Green**

Le caractère fluorescent du SYBR Green ne se manifeste que lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Il est très stable : au bout de 30 cycles d'amplification, seulement 6% de son activité est perdue. Le microspectrofluorimètre couplé au LightCycler permet de lire cette fluorescence (Figure 11).

- **Sondes d'hybridation**

La détection de l'ADN se fait à l'aide de deux sondes marquées par deux fluorochromes, qui émettent une fluorescence à une longueur d'ondes donnée après hybridation avec l'ADN cible (Figure 12).

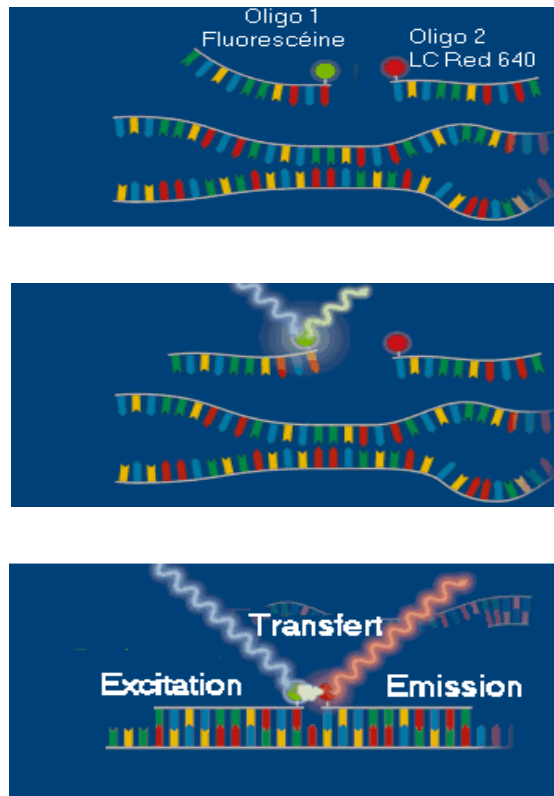


Figure 11: Utilisation de sondes fluorescentes pour la détection de l'ADN.

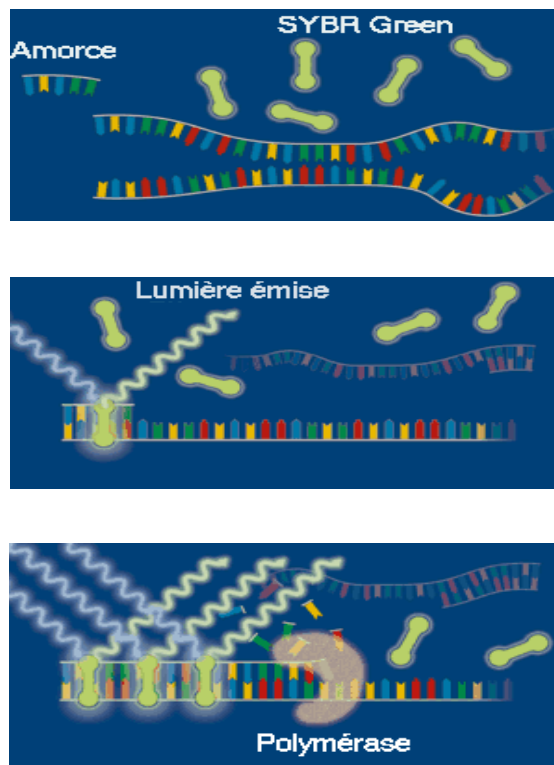


Figure 12: Utilisation de fluorophore pour la détection de l'ADN.

3- Analyse de Restriction Enzymatique et Polymorphisme de Taille des Fragments de Restriction

L'Analyse de Restriction Enzymatique ('Restriction Enzym Analysis', REA) est une technique qui est destinée à l'étude de l'ADN génomique total. Ainsi, elle est souvent utilisée pour la cartographie du génome. En revanche, le Polymorphisme de Taille des Fragments de Restriction ('Restriction Fragment Length Polymorphism', RFLP) est consacrée à l'étude des régions connues d'ADN notamment celles de l'ADN ribosomal et de l'ADN mitochondrial.

L'ADN extrait des cellules fongiques est amplifié *in vitro* par PCR, puis il subit une digestion enzymatique avec une ou plusieurs endonucléases. Les fragments de restriction obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les mutations ponctuelles, telles que les insertions ou les délétions de nucléotides qui affectent aussi bien les sites de restriction des enzymes employées que les régions qui les séparent, engendrent des profils de restriction différents d'une souche à l'autre.

La RFLP est une technique qui s'appuie sur l'étude de la variabilité de la taille des fragments d'ADN amplifié après digestion enzymatique. Comparée à la technique de REA, la RFLP présente l'atout d'être pointue. Autrement dit, grâce à la PCR, la région du génome abritant la mutation à mettre en évidence se trouve mieux ciblée.

Pour mieux visualiser ces variations obtenues par RFLP, les fragments d'ADN séparés par électrophorèse, sont dénaturés chimiquement et transférés sur une membrane par Southern blot et hybridés avec des sondes radiomarquées (Figure 13).

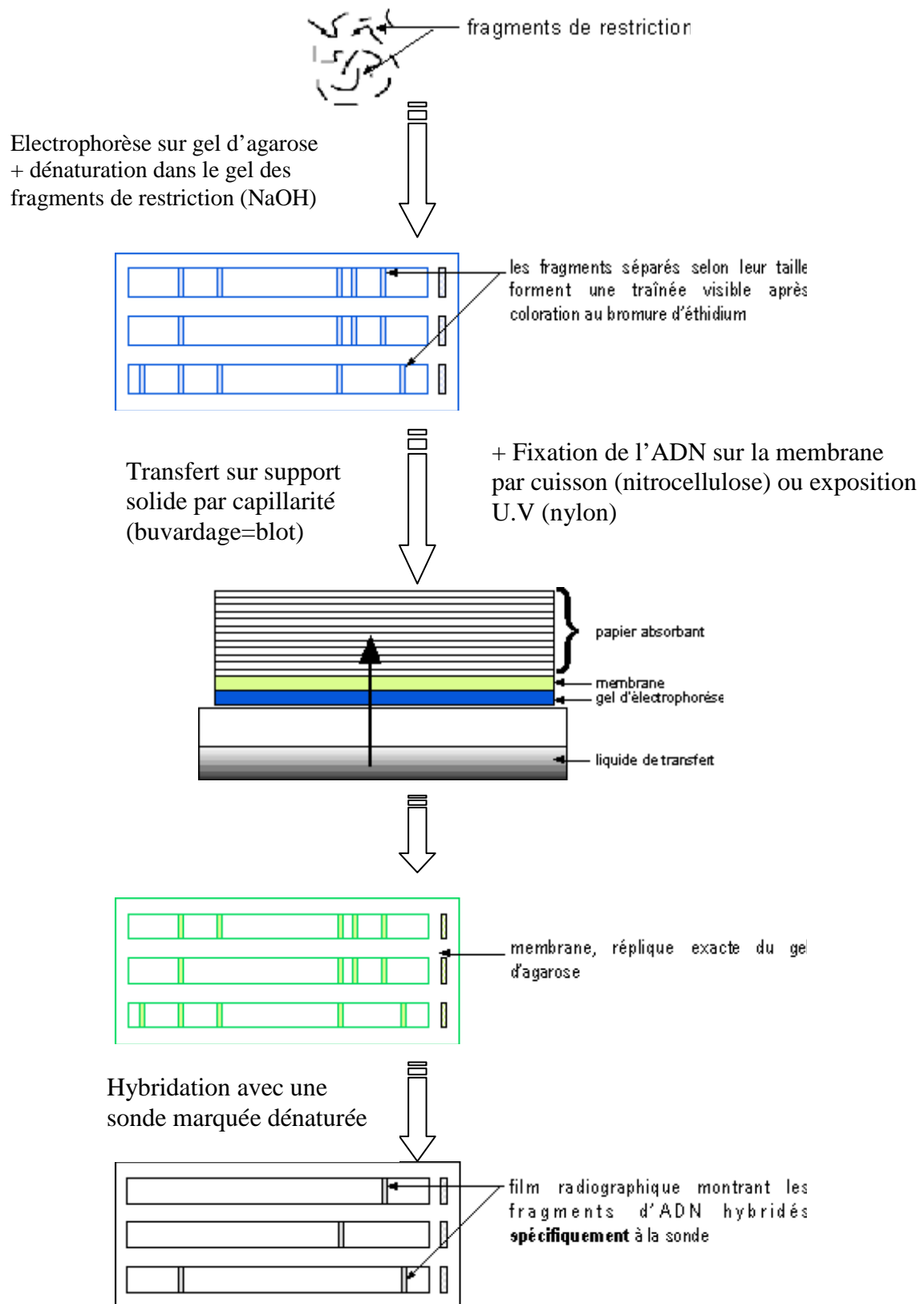


Figure 13: Technique de Southern blot.

4- Amplification Aléatoire de l'ADN Polymorphique

L'Amplification Aléatoire de l'ADN Polymorphique ('Randomly Amplified Polymorphic DNA', RAPD) est une des techniques de 'fingerprints' : empreintes moléculaires qui cible l'ensemble du génome. Elle fait appel à la PCR pour amplifier des segments d'ADN génomique avec une amorce courte, généralement 10 nucléotides, d'une séquence arbitraire et une température d'hybridation basse (Arisan-Atac *et* Kubicek, 1995 ; Frisvad *et al.*, 1998).

La RAPD et la RFLP partagent un point commun, en cela qu'elles mettent en évidence la variation de taille des fragments d'ADN. En revanche, l'analyse RAPD exploite les sites d'hybridation de l'unique amorce de la PCR au lieu des sites de restriction des endonucléases.

La révélation des amplimères se fait par séparation électrophorétique sur gel d'agarose et visualisation au biais de fluorescence du bromure d'éthidium sous rayons ultraviolets (Figure 14). Les bandes au niveau des profils d'amplification des différents isolats sont soumises à une analyse afin de déceler d'éventuelles variations.

L'atout principal de cette technique est qu'elle ne requiert pas des connaissances préalables des génomes étudiés. En outre, sa rapidité, sa simplicité et sa haute sensibilité pour la détection des variations qu'omet la RFLP, font d'elle une des méthodes privilégiées pour le typage moléculaire des champignons filamenteux (Bostock *et al.*, 1993 ; Lehmann *et al.*, 1992 ; Magee *et al.*, 1992 ; Taylor *et al.*, 1999).

Le manque de reproductibilité constitue la contrainte majeure de cette méthode. Sa sensibilité peut être considérée comme un inconvénient dans le sens où quelques variations dans les conditions de la PCR telles que la température et la concentration en MgCl₂ influencent l'affinité de l'amorce (Ellsworth *et al.*, 1993). Par ailleurs, si le problème de la reproductibilité est résolu, on ne peut guère trancher et dire que deux bandes de mobilité électrophorétique identique sont forcément homologues ; car leur séquence peut être différente même si elles aient le même poids moléculaire.

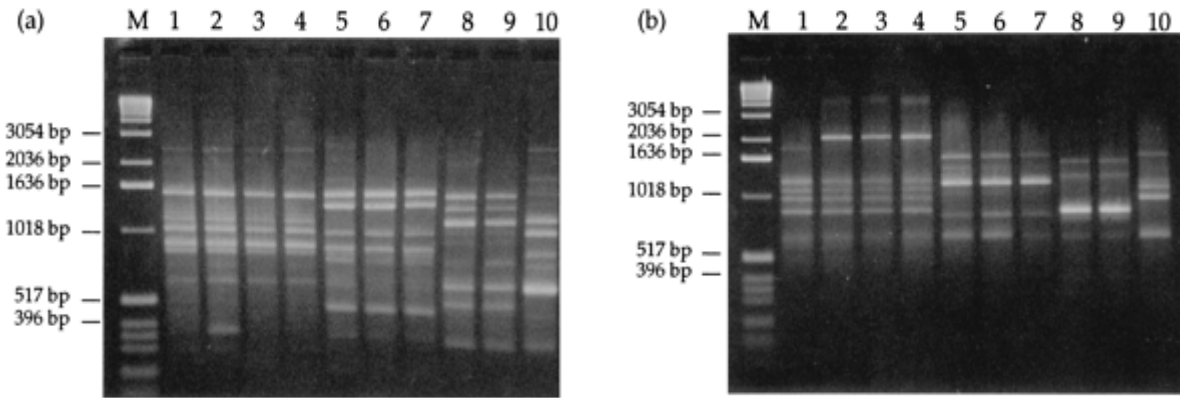


Figure 14: Profil d'amplification par RAPD d'ADN des souches de *Penicillium* utilisant deux amorces différentes ; NS2 (a) et NS7 (b).

5- Polymorphisme de Taille des Fragments Amplifiés

Une combinaison des méthodes RFLP et PCR a donné naissance à la technique du Polymorphisme de Taille des Fragments Amplifiés ('Amplified Fragments Length Polymorphism', AFLP) (Figure 15). Après digestion enzymatique de l'ADN par deux enzymes de restriction, des adaptateurs oligonucléotidiques doubles brins spécifiques à ces dernières s'hybrident par ligation aux extrémités des fragments de restriction. Cette ligation empêche que les sites de restriction initiaux soient reconstitués. Ce qui veut dire que la digestion et la ligation se déroulent simultanément. Les fragments sont amplifiés par PCR en faisant appel à des amorces oligonucléotidiques complémentaires des séquences des adaptateurs et qui sont prolongées de 1 à 3 nucléotides arbitraires, appelés bases débordantes, au niveau de l'extrémité 3'.

La spécificité de l'AFLP est notablement élevée du fait que seuls les fragments possédant les bases complémentaires des bases débordantes seront amplifiés. L'analyse du polymorphisme se fait après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

L'analyse AFLP est d'une utilité notable du fait qu'elle ne nécessite pas une connaissance préalable du génome étudié. De même, elle s'avère très pratique pour étudier les champignons qui sont difficiles à cultiver car elle n'a besoin que d'une petite quantité d'ADN (Rosendahl *et Taylor*, 1997).

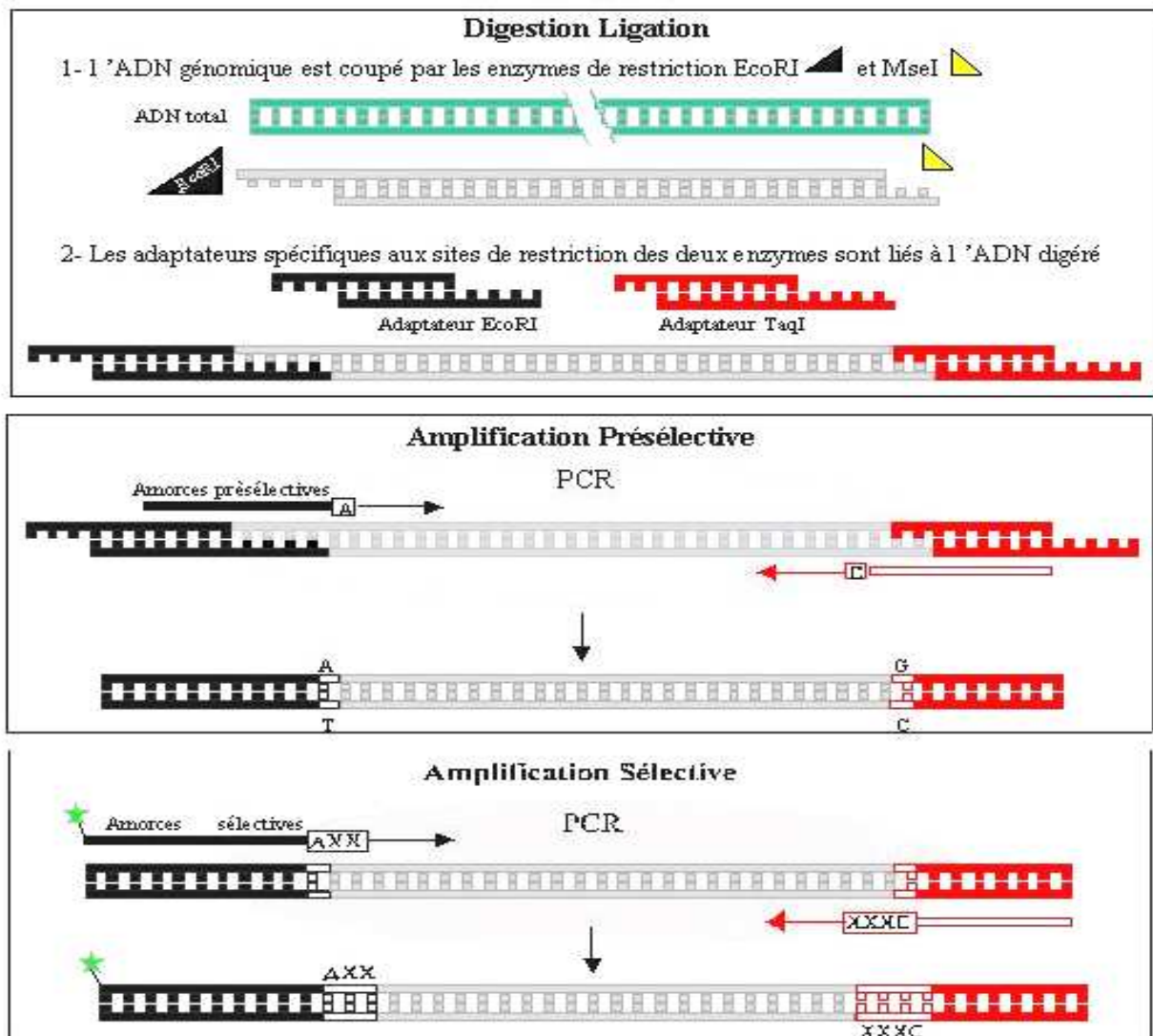


Figure 15: Schéma des différentes étapes de la méthode d'AFLP.

6- Polymorphisme de Conformation de l'ADN Simple Brin

La méthode du Polymorphisme de Conformation de l'ADN Simple Brin ('Single Straind Conformational Polymorphism', SSCP) permet de détecter des variations fines entre souches montrant des profils RAPD ou RFLP identiques. En effet, les bandes d'égale mobilité électrophorétique (monomorphes) sont découpées, éluées du gel, dénaturées par la chaleur puis refroidies brusquement de manière à obtenir de l'ADN simple brin. Elles sont ensuite déposées sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes.

Pour parvenir à discriminer les simples brins, ceux-ci doivent se différencier entre eux par un changement de conformation dû à la substitution nucléotidique. Ceci se manifeste par des variations de mobilité des bandes variables qui sont alors excisées du gel et séquencées. Le résultat du séquençage permet de confectionner des amorces pour amplifier ces fragments pour tous les isolats de l'étude.

La SSCP a une reproductibilité satisfaisante et elle est facile à analyser, d'une part. D'autre part, l'avantage que l'amplification RAPD lui offre, la rend une technique intéressante pour le typage de routine pour un grand nombre d'isolats.

7- Séquençage

Les évolutionnistes optent généralement pour le séquençage du génome dans leur étude phylogénétique des espèces. Cette méthode utilise une ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire de l'ADN à séquencer par ajout des dNTPs se trouvant en grande quantité dans le milieu réactionnel. Celui-ci contient également une faible proportion d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) (à Adénine, Guanine, Thymine, ou à Cytosine) qui diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Lorsqu'une ADN polymérase utilise, à un moment totalement aléatoire, un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

En pratique, on utilise un milieu contenant du ddATP, un deuxième contenant du ddGTP, un troisième contenant du ddCTP, et un quatrième milieu contenant du ddTTP.

La figure 16 explique le principe du séquençage dans le cas d'un milieu contenant du ddGTP.

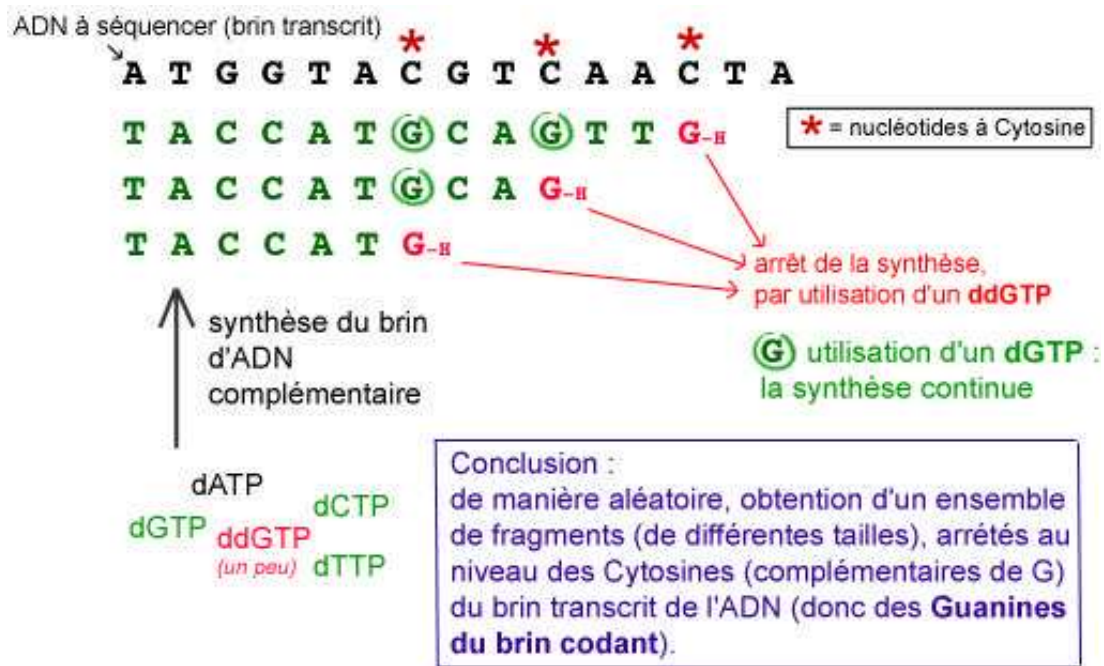


Figure 16: Principe du séquençage de l'ADN

La lecture de la séquence (Figure 17) se fait après migration pendant deux à quatre heures sur gel d'acrylamide. La révélation des bandes est assurée soit par fluorescence de l'amorce utilisée, soit par un nucléotide marqué radioactivement. Suivant la taille des gels, la séquence lue est limitée de 200 à 750 nucléotides environ. Les bandes doivent être suffisamment espacées pour que leur ordre soit déterminable.

L'ancienne méthode du séquençage dite 'à la main' était onéreuse et techniquement difficile. Aujourd'hui le séquençage est automatique. L'automate est capable de réaliser et le séquençage et la lecture des séquences. En effet, les fragments marqués auparavant par des marqueurs fluorescents sont détectés à la sortie de la colonne chromatographique par le séquenceur ainsi que leur taille précise. Le résultat est donné sous forme de chromatogramme dont les pics représentent les bases nucléotidiques (Figure 18).

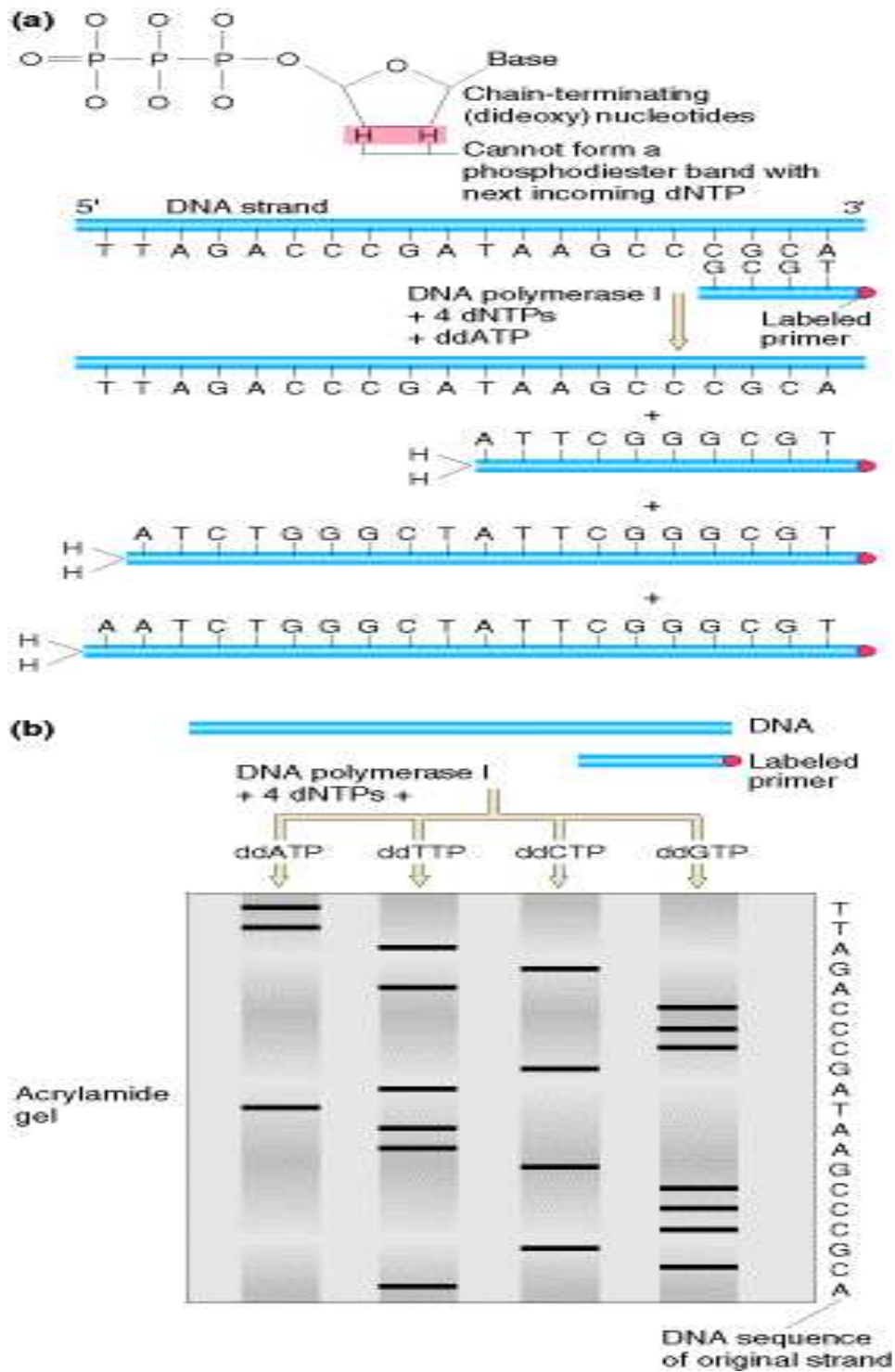


Figure 17: Lecture manuelle de la séquence d'ADN

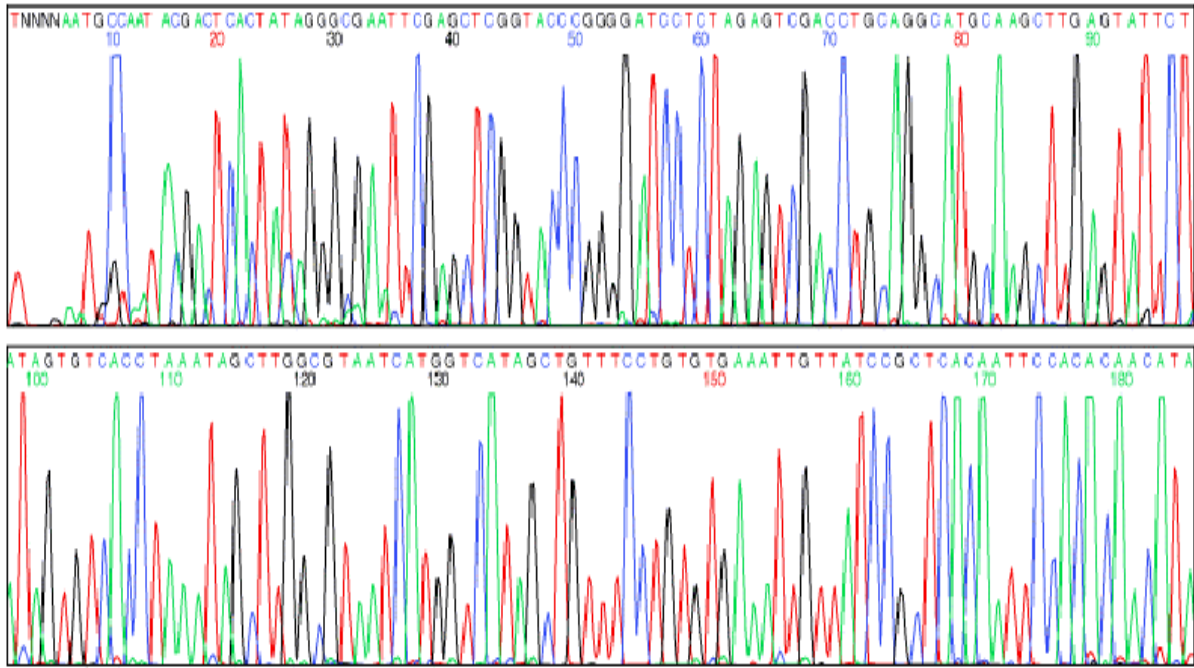


Figure 18: Chromatogramme du séquençage d'ADN représentant les bases nucléotidiques et les pics correspondants.

8- Microsatellites

L'analyse de polymorphisme de taille des séquences microsatellites (Figure 19) est réputée être parmi les techniques les plus discriminantes. Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétition est comprise entre 1 et 6 pb. Les séquences microsatellites appartiennent à des régions d'ADN non-codant, ce qui rend les fonctions des gènes moins influencées par d'éventuelles variations de longueurs de ces segments.

Les séquences microsatellites sont d'abord amplifiées par PCR, puis dénaturées par la chaleur et refroidies brusquement afin d'obtenir des fragments d'ADN simple brin. Ceux-ci sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide. Le polymorphisme de taille des diverses souches étudiées est ainsi mis en évidence par comparaison des profils électrophorétiques.



Figure 19: Exploitation des microsatellites pour la différenciation des tissus sain (N) et des tissus cancéreux (T). (Strachan *et* Read, 1999)

IV- Etude morphologique et moléculaire de quelques genres de moisissures

1- *Aspergillus*

1.1- Approche phénotypique

a) Classification taxonomique

Règne	Division	Sous Division	Groupe	Genre
<i>Fungi</i>	<i>Amastigomycètes</i>	<i>Deutéromycètes</i>	<i>Hyphomycètes</i>	<i>Aspergillus</i>

b) Critères morphologiques du genre

Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressée (Figure 20), non ramifiés, terminés en vésicules (tête conidienne unisérie) ou portée sur des métules ou stérigmates (tête conidienne biséries). Conidies sèches en chaîne divergente ou associées en colonnes compactes, unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, brun, noir ou vert. Cellules à paroi épaisse et sclérotées parfois présents (Botton *et al.*, 1985).

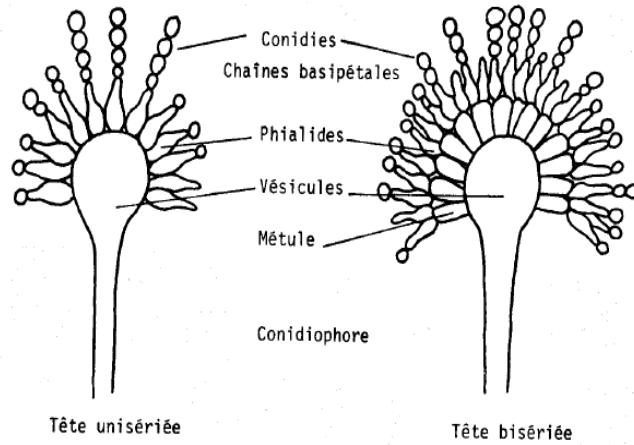


Figure 20: Caractères morphologiques des structures asexuées des *Aspergillus*.

c) Clé d'identification du genre

Le genre comprend près de 180 espèces (d'après la classification de Raper , 1965) répartie en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur. Les *Aspergillus* sont identifiés en utilisant des clés d'identification (Raper, 1965).

d) Pathogénicité

Les espèces d'*Aspergillus* sont des contaminants très communs, polyphages, parfois pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux, et susceptibles de produire des métabolites hautement toxiques pour l'homme et les animaux comme les mycotoxines (aflatoxines, ochratoxines, etc.).

1.2- Approche moléculaire

Pour l'identification des souches d'*Aspergillus fumigatus*, Kambouris *et al.*, (1999) ont fait appel à la RFLP. Après une amplification par PCR du gène de pepsine en utilisant l'amorce sens (pep1: 5'-TAGACACCGGCACCACCCTC-3') et antisens (pep22: 5'-CTATGCCTGAGGGGCGAA-3'), 0.5-1 µg d'amplifiat est mis à la digestion par 20 U de l'endonucléase de restriction *MspI*. Après 16 heures de digestion, le résultat est révélé par électrophorèse sur gel d'agarose de 2-3 % (Figure 21).

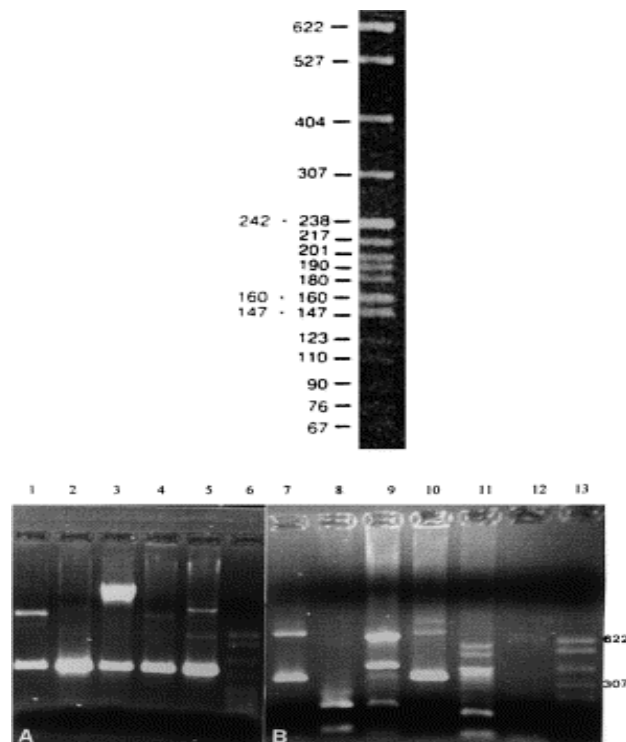


Figure 21: Gel électrophorétique montrant le profil de restriction de certaines souches d'*A. fumigatus*.

La description des gels est la suivante : En haut: marqueur de poids moléculaire PBR322 x *MspI* sur gel d'agarose à 2 %. En bas: A: gel d'agarose à 3 %: Bandes du gène de pepsine de quelques espèces d'*Aspergillus* amplifié par la paire d'amorce pep1/pep22. B: profil de digestion par *MspI* des amplifiats du gène pepsine de quelques espèces d'*Aspergillus*. Piste 1 : *A. flavus* ; 2: *A. niger*; 3: *A. fumigatus*; 4: *A. parasiticus*; 5: *A. niger*; 6: marqueur de poids moléculaire PBR322 X *MspI*; 7: *A. flavus*; 8: *A. niger*; 9: *A. fumigatus*; 10: *A. parasiticus*; 11: *A. niger*; 12: *A. fumigatus* (les bandes sont très fines); 13 : marqueur de poids moléculaire PBR322 X *MspI*.

2- *Penicillium*

2.1- Approche phénotypique

a) Classification taxonomique

Règne	Division	Sous Division	Groupe	Genre
<i>Fungi</i>	<i>Amastigomycètes</i>	<i>Deutéromycètes</i>	<i>Hyphomycètes</i>	<i>Penicillium</i>

b) Critères morphologiques du genre

Thalle vert ou plus rarement blanc, dont la texture est souvent utilisée comme critère de détermination. Conidiophores isolés (Figure 22), groupés en faisceaux lâches ou agrégés, hyalins lisses ou granuleux, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille. Pénicilles constitués, suivant le cas, soit un simple verticille (monoverticillés), soit d'un verticille de ramification (métules) portant les phialides (biverticillés), soit de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications, des métules et des phialides (triverticillés, quadriverticillés, etc.). Les caractères des pénicilles servent à la différenciation des groupes et des espèces (Botton *et al.*, 1985).

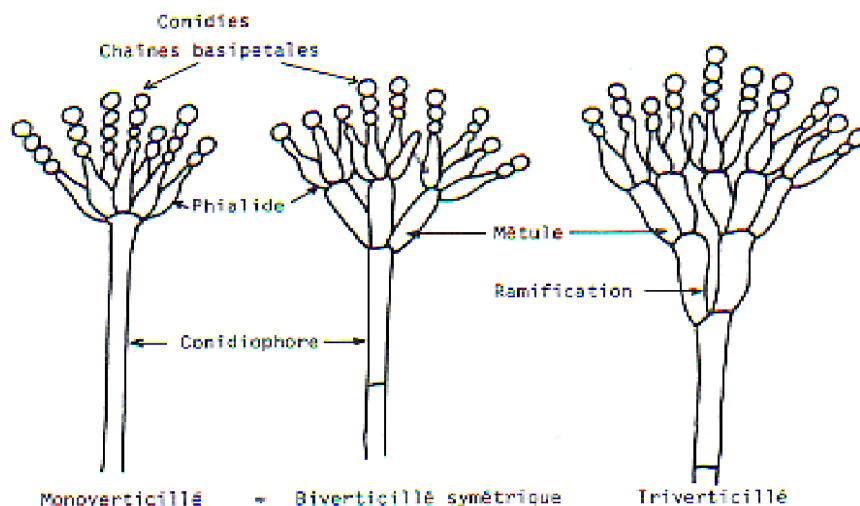


Figure 22: Caractères morphologiques des structures asexuées des *Penicillium*.

c) Clé d'identification du genre

Le genre *Penicillium* regroupe près d'une centaine d'espèces. Leur détermination fait intervenir essentiellement les caractères du thalle des pénicilles et des spores. Pitt utilise aussi comme critères la vitesse de croissance du mycélium à différentes températures et sur différents milieux de culture (Pitt, 1985).

d) Pathogénicité

Les *Penicillium* sont pour la plupart très communs, polyphages et responsables de nombreuses dégradations. Plusieurs mycotoxines (aflatoxines, patuline, l'acide penicillique, etc.) sont produites par une variété d'espèces de *Penicillium* durant les opérations de transport et de stockage des denrées alimentaires (Botton *et al.*, 1985).

2.2- Approche moléculaire

La PCR combinée à la RFLP a été utilisée par Colombo *et al.*, (2002), pour l'identification des souches de *Penicillium* isolées à partir d'aliments (Tableau 4).

Tableau 4: Souches utilisées dans l'étude des *Penicillium* isolées à partir des aliments.

Collection strains
<i>P. aurantiogriseum</i> n. 225–290 (AU1 or AU1X)
<i>P. aurantiogriseum</i> n. 792–795 (AU2 or AU2X)
<i>P. chrysogenum</i> n. 478–484 (CR2 or CRX)
<i>P. commune</i> n. 269–297 (PC2 or PCX)
<i>P. solitum</i> n. 141–186 (PS2 or PSX)
Strains isolated from foods
<i>P. aurantiogriseum</i> (AUA)
<i>P. aurantiogriseum</i> (AUB)
<i>P. chrysogenum</i> (CHA)
<i>P. commune</i> (COB)
<i>P. solitum</i> (SOA)

La séquence cible est d'une taille entre 350 et 600 pb, elle correspond au gène 5.8 S et les deux régions non codantes ITS 1 et 2 de l'ARNr. ITS5-ITS4 et ITS3-ITS4 sont les paires d'amorces utilisées et qui ont été citées par White *et al.*, (1990), (Tableau 5).

Tableau 5: séquences d'amorces

ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

Dix unités de chaque enzyme : *Ava*I, *Bg*II et *Hae*III ont été ajoutées à 10 µl d'amplifiat. La digestion de RFLP se déroule à 37°C pendant 3 heures (Kumeda et Asao, 1996). Le profil de restriction est révélé par électrophorèse sur gel (Figure 23).

La RFLP effectuée au niveau de la zone ITS4-ITS5 par l'enzyme *Hae*III a permis l'identification de *P. aurantiogriseum*. En effet, une bande caractéristique est toujours alignée avec la bande de 300 pb du marqueur de poids moléculaire. Alors que pour d'autres espèces, cette bande est déplacée en deçà de la ligne 300 pb.

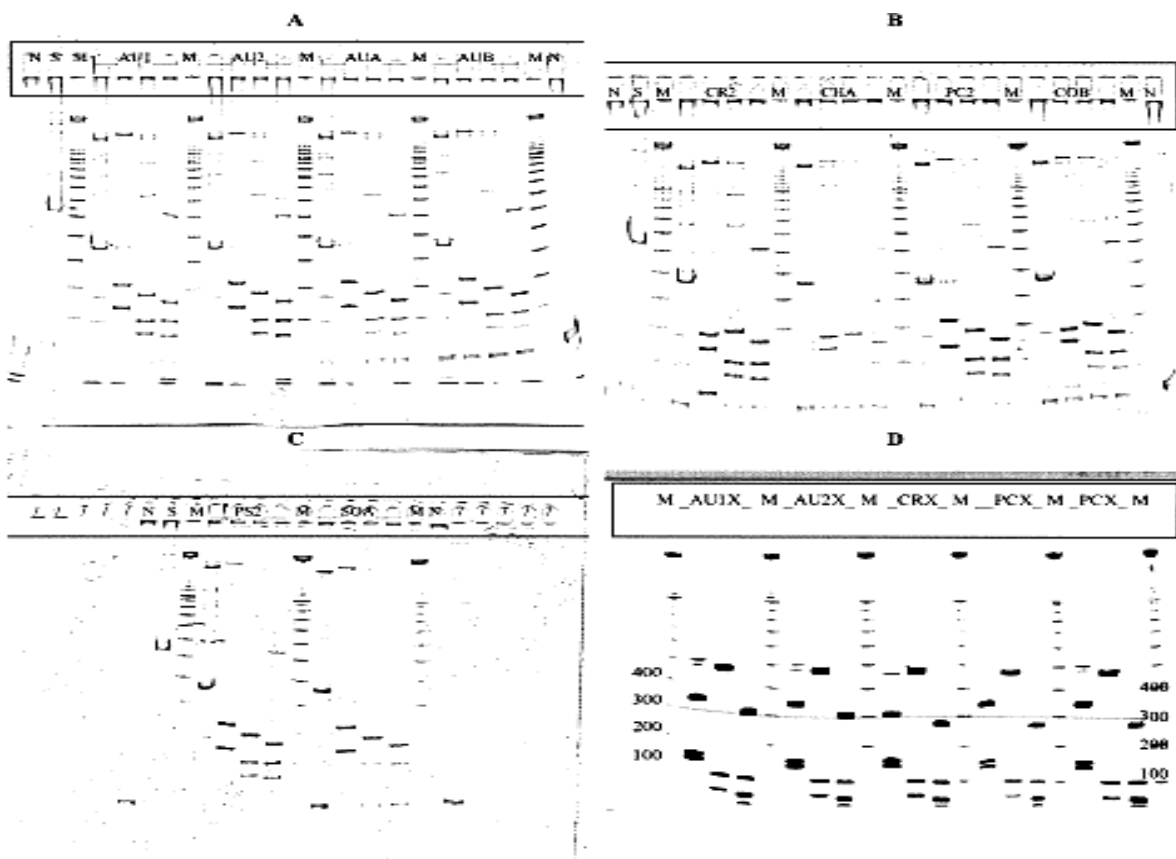


Figure 23: Gel électrophorétique montrant le profil de restriction des souches de *Penicillium* isolées des aliments.

Les pistes du gel sont définies comme suit : S—standard (500 bp); N— Essai à blanc (réaction PCR sans ADN). M— marqueur de poids moléculaire. /—piste vide. Les autres étiquettes correspondent aux échantillons de moisissures listées au niveau du tableau IV. A–C: gel électrophorétique des fragments RFLP d’ADN amplifié par les amorces ITS3-ITS4. Chaque échantillon d’ADN d’une souche fongique est déposé dans quatre puits : le premier contient un amplifiat de PCR non digéré. Les trois autres puits contiennent des amplifiats digérés respectivement par les enzymes de restriction *AvaI*, *BgII* et *HaeIII*. D : gel électrophorétique des fragments RFLP d’ADN amplifié par les amorces ITS4-ITS5. Chaque échantillon d’ADN d’une souche fongique est déposé dans trois puits : le premier contient un amplifiat de PCR digéré par *AvaI*. Les deux autres puits contiennent des amplifiats digérés respectivement par les enzymes de restriction *BgII* et *HaeIII*. La ligne dessinée sur l’image du gel D, montre le seuil du 300 pb qui discrimine *P. aurantiogriseum* des autres espèces.

3- *Trichoderma*

3.1- Approche phénotypique

a) Classification Taxonomique

Règne	Division	Sous Division	Groupe	Genre
<i>Fungi</i>	<i>Amastigomycètes</i>	<i>Deutéromycètes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Trichoderma</i>

b) Critères morphologiques du genre

Thalle à croissance rapide, d’abord lisse puis plus ou moins floconneux, souvent zoné, blanc ou vert. Conidiophores en touffes plus ou moins compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit (Figure 24). Genre très commun dans le sol ou sur les matières végétales en décomposition, comprenant une vingtaine d’espèces d’un grand intérêt économique en raison d’une forte activité cellulolytique.

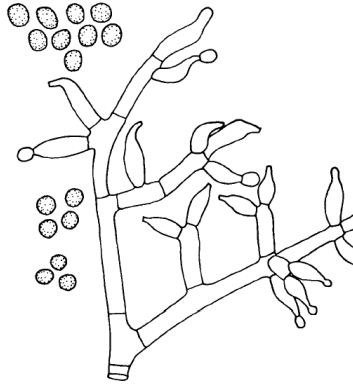


Figure 24: Structures morphologiques de l'espèce *Trichoderma viride*.

c) Pathogénicité

Très peu de cas d'infection par *Trichoderma* sont signalés. Ces infections sont généralement opportunistes et se développent chez les patients immunodéprimés.

3.2- Approche moléculaire

Afin d'identifier 17 souches de lutte biologique, dont 16 ont été identifiées auparavant sur la base de critères morphologiques en tant que *Trichoderma harzianum*, et une en tant que *Trichoderma viride*, Hermosa *et al.*, (2000) ont utilisé différentes techniques moléculaires entre autres l'hybridation d'une sonde par le Southern blotting. D'abord, 8 µg de l'ADN génomique sont digérés par une enzyme de restriction EcoRI ou EcoRV à 37°C. Les fragments de restriction sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8 %. Les bandes d'ADN sont transférées par capillarité du gel à la membrane en nylon puis immobilisées par cuisson à 80 °C pendant 90 min. L'hybridation s'effectue durant la nuit par l'addition de 20 ng/ml d'une sonde d'ADN mitochondrial (ADNmt) dénaturé suivant la procédure décrite par Sambrook *et al.*, (1998) (Figure 25).

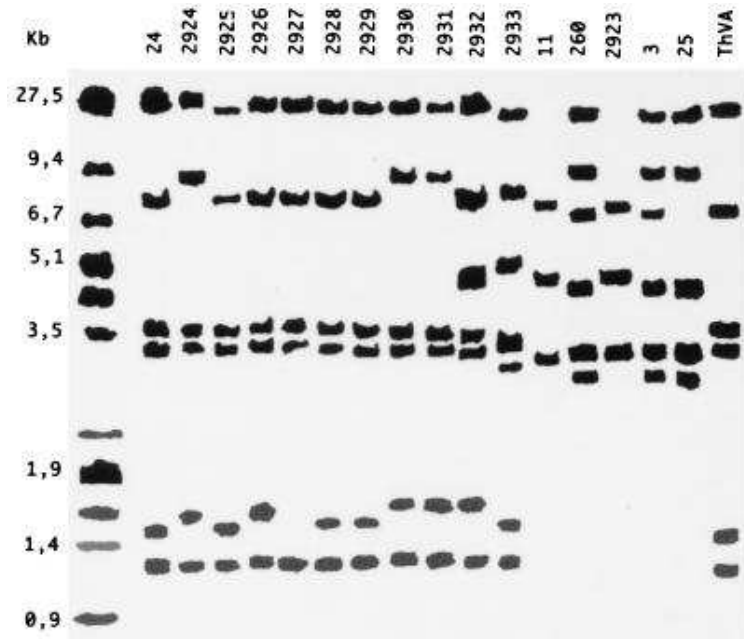


Figure 25: Southern blots de l'ADN des isolats de *Trichoderma* digéré par *EcoRI* et hybridé avec la sonde de ADNmt de *T. harzianum* 2924 digéré par *BamHI*. A gauche, le marqueur de poids moléculaire. Le N°25 correspond à la souche *T. viride*, les autres N° sont ceux de *T. harzianum*.

Conclusion

L'identification des champignons filamenteux fait appel, généralement, aux caractères cultureux et aux caractéristiques morphologiques. Pour une expression correcte des caractères à étudier, les moisissures doivent être cultivées dans des milieux standards favorisant une bonne croissance.

Quand les caractères morphologiques s'avèrent inefficaces, la chimiotaxonomie qui regroupe les méthodes chimiques et les méthodes moléculaires peut venir en aide. Les moisissures peu différenciées et/ou sensibles aux conditions environnementales, sont mieux identifiées en adoptant l'approche moléculaire. Il est indéniable que la technique de PCR est l'un des outils incontournables qui ont fait le succès de l'identification moléculaire des champignons filamenteux.

Il existe un certain nombre de critères auquel une technique de typage moléculaire doit répondre. En effet, elle doit être rapide, économique, reproductible, applicable à tous les individus d'une espèce donnée et elle doit avant tout discriminer entre des isolats n'ayant aucun lien entre eux.

MATERIELS ET METHODES

Le travail expérimental de biologie moléculaire a été réalisé au laboratoire de mycologie fondamentale et appliquée aux biotechnologies industrielles de la Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard, Lyon I, durant un premier séjour (période 1) : septembre - décembre 2004 et un second séjour (période 2) : mai – juin 2005.

1- Nature et origine des souches

Les différentes souches étudiées ainsi que leur identification basée sur l’approche morphologique sont indiquées dans les tableaux 6, 7 et 8. Les souches figurant dans le tableau VI, ont été isolées au niveau des maâsras marocaines à partir d’olives, de grignons d’olives et des margines, par Salih *et al.*, (2004) lors de la campagne oléicole 2003-2004. Les souches du tableau VII ont été isolées par Zaouia *et al.*, (2005) pendant la campagne oléicole 2004-2005. Le tableau VIII contient les souches de la collection IAV Hassan II - IRD de Marseille.

Les souches des champignons filamenteux sont conservés à une température de 4 °C, dans des piluliers à gélose inclinée à base de ‘Potato-dextrose agar’ (PDA).

Tableau 6: Liste des souches isolées par Salih *et al.*, (2004).

N° LOMY ¹	N° GS ²	Echantillon	Genre	Espèce
807	52	5	<i>Acremonium</i>	sp.
835	89	33	<i>Alternaria</i>	sp.
790	30	3	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
795	36	11	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
797	38	19	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
801	43	6	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
828	77	21	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
838	93	43	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
854	120	47	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
783	4	13	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
787	25	17	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>

Tableau VI (suite)				
N° LOMY ¹	N° GS ²	Echantillon	Genre	Espèce
791	31	28	<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>
793	34	1	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
798	39	5	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
799	41	6	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
800	42	7	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
802	44	2	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
805	48	34	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
825	74	36	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
826	75	33	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
827	76	42	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
842	100	26	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
803	45	2	<i>Geotrichum</i>	sp.
834	88	36	<i>Geotrichum</i>	sp.
840	98	28	<i>Geotrichum</i>	sp.
843	102	35	<i>Geotrichum</i>	sp.
850	113	39	<i>Geotrichum</i>	sp.
853	119	44	<i>Geotrichum</i>	sp.
855	122	45	<i>Geotrichum</i>	sp.
788	28	5	<i>Mucor</i>	sp.
794	35	2	<i>Mucor</i>	sp.
837	91	26	<i>Mucor</i>	sp.
781	1	1	<i>Penicillium</i>	sp.
782	3	13	<i>Penicillium</i>	sp.
804	46	7	<i>Penicillium</i>	sp.
806	50	4	<i>Penicillium</i>	sp.
814	61	33	<i>Penicillium</i>	sp.
815	62	40	<i>Penicillium</i>	sp.
816	63	42	<i>Penicillium</i>	sp.
817	64	21	<i>Penicillium</i>	sp.
839	95	23	<i>Penicillium</i>	sp.

Tableau VI (suite)				
N° LOMY ¹	N° GS ²	Echantillon	Genre	Espèce
846	104	27	<i>Penicillium</i>	sp.
847	108	46	<i>Penicillium</i>	sp.
848	109	49	<i>Penicillium</i>	sp.
849	111	47	<i>Penicillium</i>	sp.
851	116	51	<i>Penicillium</i>	sp.
852	117	44	<i>Penicillium</i>	sp.
784	9	5	<i>Rhizopus</i>	sp.
789	29	10	<i>Rhizopus</i>	sp.
808	53	17	<i>Rhizopus</i>	sp.
786	24	13	<i>Trichoderma</i>	sp.
792	32	6	<i>Trichoderma</i>	sp.
796	37	13	<i>Trichoderma</i>	sp.
785	10	15	<i>Ulocladium</i>	sp.

¹ : Numéro attribué par le Laboratoire de Mycologie et des Fermentations en Milieu Solide de l'IRD de Marseille .

² : Numéro attribué par Salih *et al.*, (2004).

Tableau 7 : Liste des souches isolées par Zaouia *et al.*, (2004).

N° ZN	Identification morphologique
M ³ 9	<i>Aspergillus awamori</i>
M 20	<i>Aspergillus awamori</i>
M 22	<i>Aspergillus awamori</i>
M 28	<i>Aspergillus awamori</i>
M 32	<i>Aspergillus awamori</i>
M 47	<i>Aspergillus awamori</i>
M 57	<i>Aspergillus awamori</i>
M 90	<i>Aspergillus awamori</i>
M 101	<i>Aspergillus awamori</i>
M 10	<i>Aspergillus carbonarius</i>
M 12	<i>Aspergillus carbonarius</i>

Tableau VII (suite)	
N° ZN	Identification morphologique
M 84	<i>Aspergillus carbonarius</i>
M 85	<i>Aspergillus carbonarius</i>
M 13	<i>Aspergillus niger</i>
M 16	<i>Aspergillus niger</i>
M 17	<i>Aspergillus niger</i>
M 23	<i>Aspergillus niger</i>
M 29	<i>Aspergillus niger</i>
M 91	<i>Aspergillus niger</i>
M 1	<i>Aspergillus flavus</i>
M 102	<i>Aspergillus flavus</i>
M 109	<i>Aspergillus flavus</i>
T ⁴ 15	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 16	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 17	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 18	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 20	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 24	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 32	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 39	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 40	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 41	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 42	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 45	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 46	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 47	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 48	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 51	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 61	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 68	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 74	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Tableau VII (suite)	
N° ZN	Identification morphologique
T 79	<i>Aspergillus fumigatus</i>
T 80	<i>Aspergillus fumigatus</i>
M 6	<i>Penicillium viridicatum</i>
M 36	<i>Penicillium viridicatum</i>
M 75	<i>Penicillium viridicatum</i>
M 3	<i>Penicillium verrucosum</i>
M 37	<i>Penicillium verrucosum</i>
M 60	<i>Penicillium verrucosum</i>
M 64	<i>Penicillium verrucosum</i>
M 92	<i>Penicillium verrucosum</i>
M 86	<i>Penicillium sp.</i>
M 89	<i>Penicillium sp.</i>

³: Le symbole 'M' signifie que la souche est mésophile.

⁴: Le symbole 'T' signifie que la souche est thermophile.

Tableau 8: Liste des souches de la collection IAV Hassan II – IRD de Marseille.

N° LOMY	Genre	Espèce
13	<i>Aspergillus</i>	<i>awamori</i>
36	<i>Aspergillus</i>	<i>awamorri</i>
175	<i>Aspergillus</i>	<i>carbonarius</i>
11	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
323	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>
21	<i>Aspergillus</i>	<i>foetidus</i>
1	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
12	<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>
367	<i>Aspergillus</i>	<i>ochraceus</i>
10	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>
2	<i>Aspergillus</i>	<i>parasiticus</i>
222	<i>Aspergillus</i>	<i>phoenicus</i>

Tableau VIII (suite)		
N° LOMY	Genre	Espèce
29	<i>Penicillium</i>	<i>aurentium-violaceum</i>
38	<i>Penicillium</i>	<i>candidum</i>
39	<i>Penicillium</i>	<i>caseicolum</i>
30	<i>Penicillium</i>	<i>expansum</i>
40	<i>Penicillium</i>	<i>roquefortii</i>
328	<i>Rhizopus</i>	<i>microsporus</i>
KLM 26	<i>Rhizopus</i>	<i>miehei</i>
KLM 113	Non identifié	Non identifié
KLM 122	Non identifié	Non identifié
KLM 166	<i>Rhizopus</i>	sp.
H 1	<i>Myceliophthora</i>	<i>thermophila</i>
H 2	<i>Rhizopus</i>	sp.
H 17	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>

2- Culture des souches

2.1- Entretien des souches

Nous avons utilisé le milieu PDA (infusion de pomme de terre : 200 g, saccharose : 20 g, agar : 15 g, eau distillée : 1000 ml) pour réensemencer les souches dans des piluliers contenant de la gélose inclinée dont la préparation est la suivante :

Trente neuf grammes du milieu PDA 'prêt à utilisé' sont dissous dans un litre d'eau distillée. Le milieu est ensuite agité et porté à ébullition pour une bonne homogénéisation, puis stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes.

2.2- Production de la biomasse pour l'extraction de l'ADN

Les champignons ont été de nouveau réensemencés sur boîtes de Petri contenant le milieu 'malt extract agar' (MEA) pour préparer les souches à l'extraction de l'ADN. La préparation du MEA est la suivante :

Vingt grammes de malt sont pesés puis dissous dans un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,4 à l'aide de quelques goûtes de soude. Ensuite, 15 g d'agar sont pesés et bouillis jusqu'à homogénéisation. Le milieu est réparti en flacons puis stérilisé à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes. En raison de la baisse du pH après autoclavage, on anticipe et ajuste le pH à 6,6 au lieu de 6,4.

Les cultures de moisissures mésophiles sont incubées dans une étuve à 28 °C pendant 2 à 3 jours, puis on les sort de l'étuve pour l'extraction de l'ADN.

3- Extraction de l'ADN

Pour extraire l'ADN fongique à partir de colonies jeunes, nous avons utilisé trois méthodes.

3.1- Micro-extraction au Chelex 100®

Le protocole utilisé est une adaptation aux champignons filamenteux du protocole décrit pour les levures par Bernal *et al.*, (1997). Deux cent microlitres d'eau Qualité Biologie Moléculaire (QBM), bidistillée et stérilisée pour éliminer les DNases et RNases, sont mis dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml. Le mycélium de moisissure (culture jeune 2 à 7 jours) est prélevé en grattant superficiellement à l'aide de deux à trois cèses de manière à éviter le risque de prendre de la gélose, car celle-ci inhibe la PCR. Ensuite, 60 µl de la suspension d'extraction, le Chelex 100®, sont ajoutés sous agitation. Le Chelex 100® est une résine chélatrice contenant des billes minuscules, à peine visibles à l'œil nu, de silice capables de fixer l'ADN. Il présente l'avantage d'éliminer de nombreux inhibiteurs de la *Taq* polymérase. La suspension de mycélium est agitée à l'aide d'un agitateur rotatif « vortex » pendant 2 minutes puis portée à ébullition à 100 °C pendant 30 minutes sur un bloc chauffant ou dans un bain-marie à sec (Figure 26). Une centrifugation (Figure 27) pendant 8 minutes à 13.000 tours par minute permet de récupérer l'ADN en solution qui sera conservé à - 20 °C jusqu'à son utilisation.

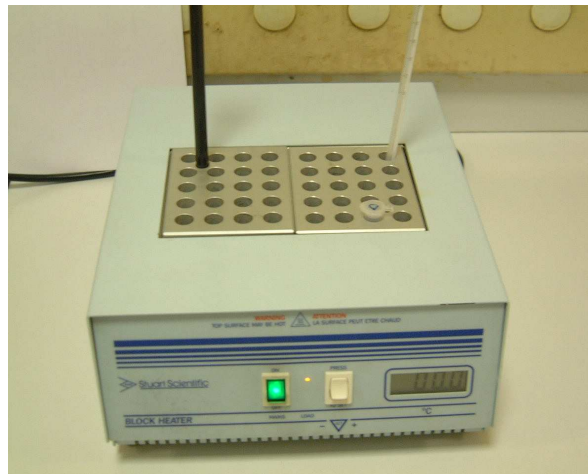


Figure 26: Bain-marie à sec.

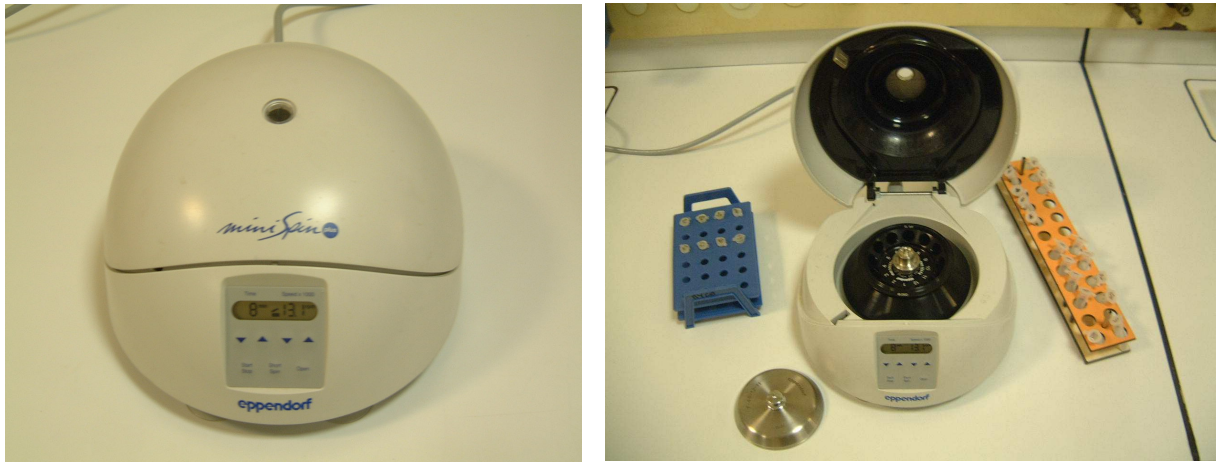


Figure 27: Centrifugeuse, couvercle fermé (à gauche) et couvercle ouvert (à droite) avec les tubes d'Eppendorf de 1,5 ml et tubes de PCR 'Ready-To-Go™ PCR Beads'.

3.2- Extraction à l'achromopeptidase

Les microtubes Eppendorf sont remplis de deux spatulettes de billes de verre et de 300 μ l d'eau QBM puis stérilisés à 120 °C pendant 20 minutes. Deux à trois œses du mycélium sont ajoutées dans le microtube qui est agité au vortex jusqu'à homogénéisation de la suspension. On la chauffe ensuite au bain-marie à 70 °C pendant 30 minutes. On remélange au vortex pendant 2 minutes et on prélève 80 μ l de la suspension avec des cônes dont le bout est coupé pour faciliter le prélèvement. On ajoute 3 μ l d'achromopeptidase et on réchauffe au bain-marie à 55 °C pendant 20 minutes. L'ADN en solution est séparé du surnageant après une centrifugation à 13.000 tours par minute pendant 8 minutes.

3.3- Extraction à l'eau

Dans les microtubes Eppendorf, contenant les billes de verre et 300 μ l d'eau QBM, on ajoute trois à quatre œses de mycélium. On agite ensuite pendant 3 minutes au vortex et on chauffe au bain-marie à sec pendant une heure à 100 °C. On centrifuge la suspension pendant 8 minutes à 13.000 tours par minutes. Deux cent microlitres du surnageant sont prélevés dans un nouveau microtube stérile puis recentrifugés. On répète le prélèvement du surnageant et sa centrifugation jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de particules en suspension. Ainsi, on récupère l'ADN fongique en solution.

4- Amplification de la région ITS par PCR

La paire d'amorces universelles ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') (sens) et ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (antisens) décrites par White et *al.*, (1990), a été utilisée pour l'amplification de la région ITS. Cette paire d'amorces permet d'amplifier une partie de la séquence des gènes 18S et 28S codant pour l'ARNr et la totalité de la région composée de l'ADNr 5,8S encadré par les deux ITS 1 et 2 (Figure 28).

Sous la hotte, la solution mère d'amorce à 100 µM est diluée extemporanément au 1/10^e en QBM. Pour ce faire, on prélève 18 µl d'eau QBM et 2 µl de l'amorce ITS1, donc on a une concentration de 0,01 µmol/ml soit 125 pmol/12,5 µl. La même chose sera pour l'amorce ITS4. On prépare ensuite le 'Mix' en mélangeant 385 µl d'eau, 12,5 µl de la solution diluée au 1/10^e de l'amorce ITS1 et la même quantité pour l'amorce ITS4. Ce Mix peut servir pour 27 réactions d'amplification.

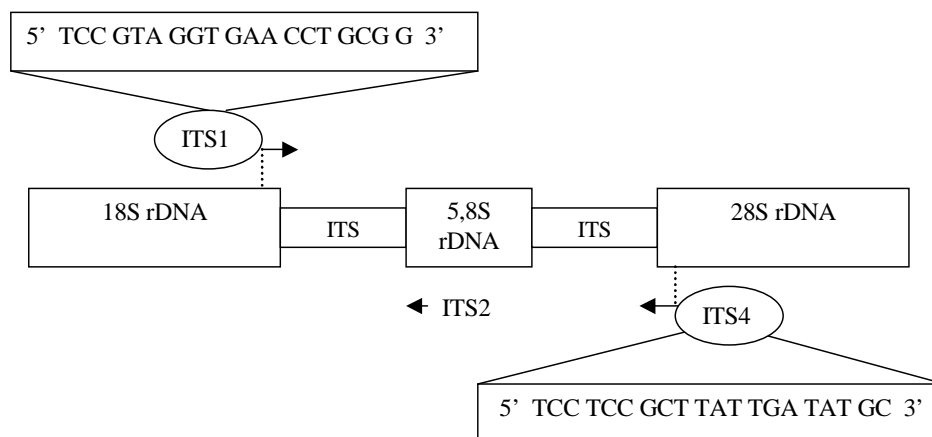


Figure 28: Emplacement des amorces ITS1 et ITS4.

Les réactions de PCR sont réalisées dans des tubes de commerce prêt à l'emploi, de type Ready-To-GoTM PCR Beads. Dans chaque tube contenant une bille de réactifs lyophilisés, on additionne 15 µl du Mix et 10 µl de la solution d'ADN diluée au 1/10^e s'il est extrait au Chelex 100[®], au ½ s'il est extrait à l'achromopeptidase, et sans dilution si l'extraction est effectuée à l'eau. Le mélange réactionnel ainsi reconstitué contient 1,5 unité de *Taq* DNA polymérase, 10 mM de NH₂C(CH₂OH)₃HCl 'Tris-HCl' (pH 9,0 à température ambiante), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂ et 200 mM de chaque désoxynucléoside

triphosphate. Un test à blanc obtenu en remplaçant la solution d'ADN par un volume équivalent d'eau ayant servi aux dilutions, est inclus dans chaque série d'amplification pour détecter d'éventuelles contaminations.

Le mélange réactionnel contenu dans les microtubes de PCR est prêt à l'amplification. Pour cela, on utilise un thermocycleur (Figure 29) de type PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). Le protocole utilisé est celui décrit par Attili *et al.*, (1998) légèrement modifié. La réaction de PCR commence par une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 95 °C, ensuite l'amplification est assurée par l'itération de cycles en nombre de 45 durant lesquels a lieu une dénaturation à 95 °C pendant soixante secondes, une hybridation des deux amorces ITS1 et ITS4 à 54 °C pendant 60 secondes, et une extension à 72 °C pendant 120 secondes. A la fin du dernier cycle, l'amplification est achevée par une extension finale de 7 minutes. La réaction de PCR dure généralement de 3 à 4 heures.

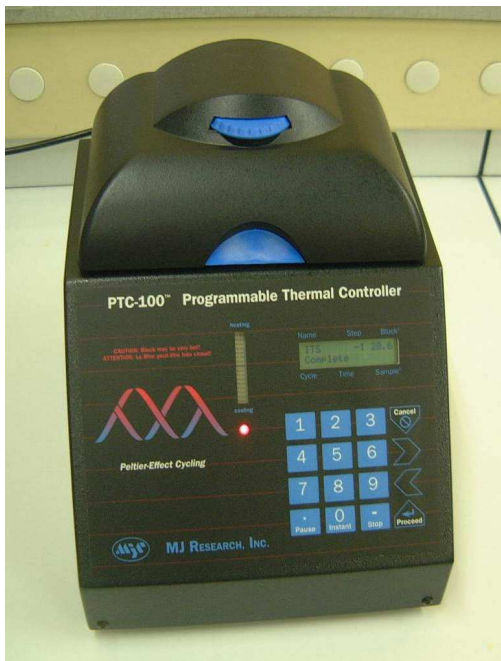


Figure 29: Thermocycleur pour l'amplification de l'ADN.

5- Contrôle de l'amplification sur gel d'électrophorèse

La qualité de la réaction de PCR est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (p/v). Ainsi, on pèse 0,6 g d'agarose que l'on mélange dans 30 ml de TAE 1X (0,04 M Tris-acétate pH 8,3 ; 0,001 M EDTA), et on porte la préparation à ébullition jusqu'à dissolution de l'agarose. Quand la température du gel est descendu à environ 50 °C, on y ajoute 2 gouttes de Bromure d'éthidium (BET) (0,5 µg/ml) qui joue le rôle du révélateur en s'intercalant entre les bases puriques et pyrimidiques de la double hélice des fragments de la région ITS. Après solidification du gel dans la cuve d'électrophorèse (Figure 30) et on y dépose un mélange de 3 µl d'eau qualité biologie moléculaire, 2 µl du bleu de bromophénol et 1 µl d'amplifiat. On réserve un puits pour mettre 1 µl du marqueur de taille de 100 pb. Après que l'on ait déposé les échantillons sur le gel immergé dans du tampon TAE 0,5 X, on met le système d'électrophorèse (Figure 31) sous une tension de 90 volts pour la séparation des fragments d'ADN. Ceux-ci chargés négativement par la présence de leurs groupements phosphate, migrent, pendant 45 minutes environ, vers l'anode en fonction de leur masse moléculaire et de leur encombrement stérique. Les bandes d'ADN sont, enfin, visualisées par fluorescence du BET sous les rayons ultraviolets (figure 32).

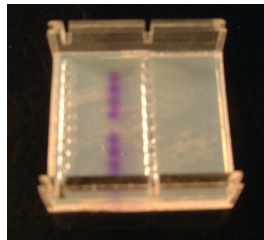


Figure 30: Cuve du gel d'agarose avec les traces de migration des fragments de l'ADN.

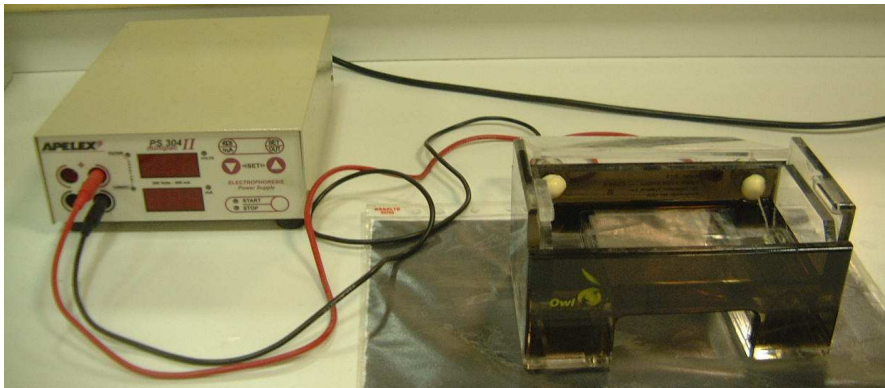


Figure 31: Installation d'électrophorèse.



Figure 32: Installation de visualisation sous UV avec appareil de photographie instantanée du type Polaroid.

6- Séquençage des produits d'amplification

Le séquençage est réalisé par un laboratoire privé appelé 'BIOFIDAL' ; 170 avenue Gabriel Peri, 69120 Vaulx en Velin. On envoie les tubes d'amplifiats accompagnés d'une fiche :

Référence : SSBN 550.

Nom de l'échantillon : xyz (*i.g* : 785).

Taille du produit PCR : Taille déterminée sur le gel (*i.g* : 600 pb).

Concentration et volume : 20 ng/ μ l ; 25 μ l.

Méthode de purification : SPCR 002.

Nom de l'amorce : ITS4

Le séquençage simple brin est réalisé en utilisant l'amorce ITS4. La purification des produits d'amplification, qui est une opération indispensable, est entreprise par le même laboratoire du séquençage.

7- Analyse des séquences

Nous recevons les chromatogrammes des ADN via Internet et nous les traitons par le logiciel Chromas 162 (figure 33).

- Tout d'abord, on ouvre le chromatogramme, on sélectionne ensuite la partie à supprimer au début de la séquence (~ 50 pb) en plaçant le curseur entre deux bases et en cliquant sur le bouton 'Edit' puis sur 'Set Left Cutoff'. La partie colorée en jaune ne sera pas prise en compte dans la suite de l'analyse.
- Pour modifier une base, on clique dessus puis on écrit la lettre jugée correcte.
- On sélectionne la partie à supprimer à la fin de la séquence en cliquant sur 'Edit' puis sur 'Set Right Cutoff'.
- On copie la séquence en cliquant sur 'Edit' puis 'Copy sequence' ensuite 'FASTA Format'.
- Enfin, on soumet la séquence ainsi copiée dans BlastTM, qui est un logiciel disponible sur le site international du National Health Institute, USA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?CMD=Web&LAYOUT=TwoWindows&AUTO_FORMAT=Semiauto&ALIGNMENTS=50&ALIGNMENT_VIEW=Tabular&CLIENT=web&DATABASE=nr&DESCRIPTIONS=100&ENTREZ_QUERY=%28none%29&EXPECT=10&FILTER=L&FORMAT_OBJECT=Alignment&FORMAT_TYPE=HTML&NCBI_GI=on&PAGE=MegaBlast&SERVICE=plain&SET_DEFAULTS.x=34&SET_DEFAULTS.y=8&SHOW_OVERVIEW=on&END_OF_HTTPGET=Yes&SHOW_LINKOUT=yes&GET_SEQUENCE=yes&PERC_IDENT=None,1.-2) et qui permet de rechercher dans la banque de données GenBankTM les séquences analogues à celles obtenues par séquençage.

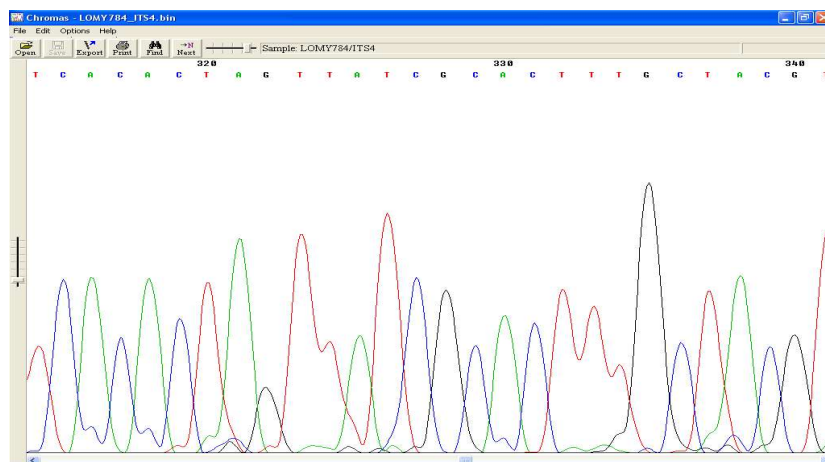


Figure 33: Séquence d'ADN traitée par le logiciel Chromas.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Culture des souches

Nous avons réensemencé les 134 souches de moisissures sur milieu MEA dans des boîtes de Petri, et les avons incubé pendant 72 heures à 28 °C. Hormis les souches d'*Alternaria* sp. (LOMY 835), de *Rhizopus* sp. (LOMY 785) et de *Trichoderma* sp. (LOMY 796), les 131 souches restantes ont toutes bien poussé (figure 34).

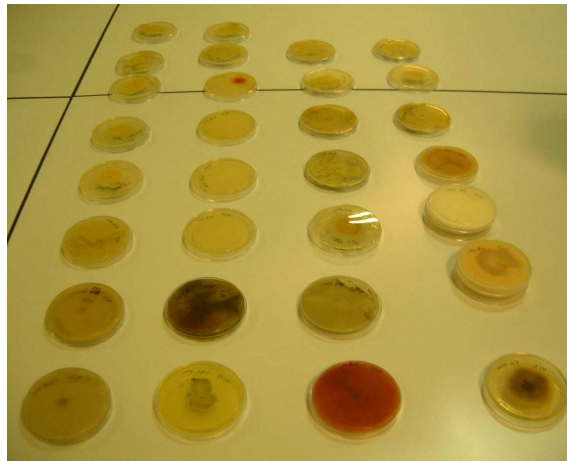


Figure 34: Culture des moisissures sur milieu Malt Extract Agar 'MEA'.

Nous avons fait plusieurs tentatives de réensemencement des 3 souches ont toutes échouées. Nous pensons que nous les avons perdu lors de leur période de conservation.

2- Extraction et amplification de l'ADN

Dans ce qui suit, nous allons d'abord décrire les résultats obtenus lors de la première période de notre travail (2004), puis les résultats obtenus pendant la deuxième période (2005).

□ Première période [septembre-décembre 2004]

En se basant sur des caractères morphologiques macroscopiques, nous avons choisi 32 souches, chacune est susceptible de représenter un groupe de moisissures de même espèce. Pour ce qui est d'*Aspergillus fumigatus*, nous avons estimé que l'identification morphologique basée sur les caractères culturaux était suffisante pour la délimitation de cette espèce puisqu'elle est la seule à se développer à 50°C parmi les espèces d'*Aspergillus*.

La première méthode d'extraction que nous avons utilisé est la micro-extraction au Chelex 100[®]. C'est une méthode qui est généralement utilisée pour l'extraction de l'ADN des moisissures au niveau du Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée aux Biotechnologies Industrielles de la Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard, Lyon I.

Vu que nous n'avons pu amplifier que 3 extraits d'ADN sur 14, soit un pourcentage de 21 %, nous avons pensé que la concentration du Chelex 100[®] est à l'origine de ce mauvais résultat. Nous avons, alors, tenté de trouver une zone d'équilibre entre la concentration en Chelex 100[®] et celle de l'ADN. Autrement dit, la zone où le Chelex 100[®] n'aurait pas d'effet inhibiteur sur la PCR et où la quantité d'ADN serait suffisante pour l'amplification. Pour ce faire, nous avons dilué davantage les échantillons d'ADN que l'on met dans les tubes de PCR pour l'amplification. Ainsi, au lieu de travailler avec des dilutions de 1/10^e, nous avons utilisé des dilutions de 1/20^e et 1/50^e.

Malheureusement, nous n'avons pas pu amplifier les extraits d'ADN des souches choisies par cette méthode.

Par conséquent, nous avons essayé une deuxième méthode qui est l'extraction à l'achromopeptidase pour 23 souches et nous avons eu 9 amplifications.

Pour parvenir à amplifier l'ADN des moisissures restantes, nous avons fait appel à la troisième méthode la plus simple qui est l'extraction à l'eau. Sur 13 champignons, nous avons réussi à amplifier l'ADN de 5 souches.

A la fin de cette première période de stage en France en 2004, nous avons réussi à amplifier l'ADN de 17 champignons filamenteux en utilisant trois méthodes différentes (tableau 9).

□ Deuxième période [mai-juin 2005]

Lors du deuxième stage en France en 2005, nous avons repris la méthode d'extraction au Chelex100[®] et nous l'avons légèrement modifiée. La première modification concerne le temps d'agitation au vortex que nous avons augmenté à 4 minutes au lieu de 2. La deuxième, correspond à la reprise de la centrifugation quatre à cinq fois surtout lorsqu'il s'agit d'*Aspergillus niger*, *Penicillium flavus* ou autre espèce produisant abondamment des spores. Celles-ci nuisent beaucoup à l'amplification. La troisième modification, a trait à la révélation des bandes sur gel électrophorétique. Nous avons concentré davantage l'ADN déposé dans les puits du gel en optant pour la composition suivante : 4 µl d'eau QBM, 2 µl du bleu de bromophénol et 1 µl d'amplifiat. Les résultats obtenus étaient très satisfaisants. Ainsi, nous sommes parvenus à amplifier l'ADN de 22 souches parmi 24 représentatives de la collection.

Au total, nous avons réussi à amplifier l'ADN de 39 champignons filamenteux.

Tableau 9: Résultats d'amplification de l'ADN en fonction de la méthode d'extraction utilisée.

Souches	Méthode d'extraction		
	Chelex [®]	Achromopeptidase	Eau
Première période			
LOMY 11	-	-	-
LOMY 13	-	-	-
LOMY 190	-	-	-
LOMY 21	-	-	-
LOMY 328	-	-	-
LOMY 367	NE	+	NE
LOMY 781	-	+	NE
LOMY 782	-	-	+
LOMY 784	-	-	NE
LOMY 785	-	+	NE
LOMY 786	-	-	-
LOMY 788	NE	+	NE
LOMY 791	-	-	-
LOMY 792	-	-	-
LOMY 794	+	-	NE
LOMY 803	NE	+	NE
LOMY 805	-	-	-
LOMY 807	NE	+	NE
LOMY 808	-	-	-
LOMY 815	NE	+	NE
LOMY 826	-	-	-
LOMY 837	NE	NE	+
LOMY 840	NE	+	NE
LOMY 841	NE	+	NE

Tableau IX (suite)			
Souches	Chelex [®]	Achromopeptidase	Eau
LOMY 846	NE	NE	+
LOMY 848	NE	NE	+
LOMY 855	NE	NE	+
KLM 26	+	NE	-
KLM 113	-	NE	-
KLM 122	-	NE	-
KLM 166	+	NE	-
Deuxième période			
LOMY 1	+	NE	NE
LOMY 784	+	NE	NE
LOMY 786	+	NE	NE
LOMY 791	+	NE	NE
ZNM 1	+	NE	NE
ZNM 9	+	NE	NE
ZNM 10	+	NE	NE
ZNM 13	+	NE	NE
ZNT 15	+	NE	NE
ZNT 16	+	NE	NE
ZNM 17	-	NE	NE
ZNM 20	+	NE	NE
ZNM 60	+	NE	NE
ZNM 75	+	NE	NE
ZNM 83	+	NE	NE
ZNM 85	+	NE	NE
ZNM 86	+	NE	NE
ZNM 89	+	NE	NE
ZNM 92	-	NE	NE
ZNM 102	+	NE	NE
ZNM 109	+	NE	NE
H 1	-	NE	NE
H 2	+	NE	NE
H 17	+	NE	NE

(+) : ADN amplifié ;

(-) : ADN non amplifié ;

NE : non expérimenté.

La migration électrophorétique et la visualisation sous rayons ultra-violets nous ont permis de nous assurer de l'amplification de l'ADN (figure 35).

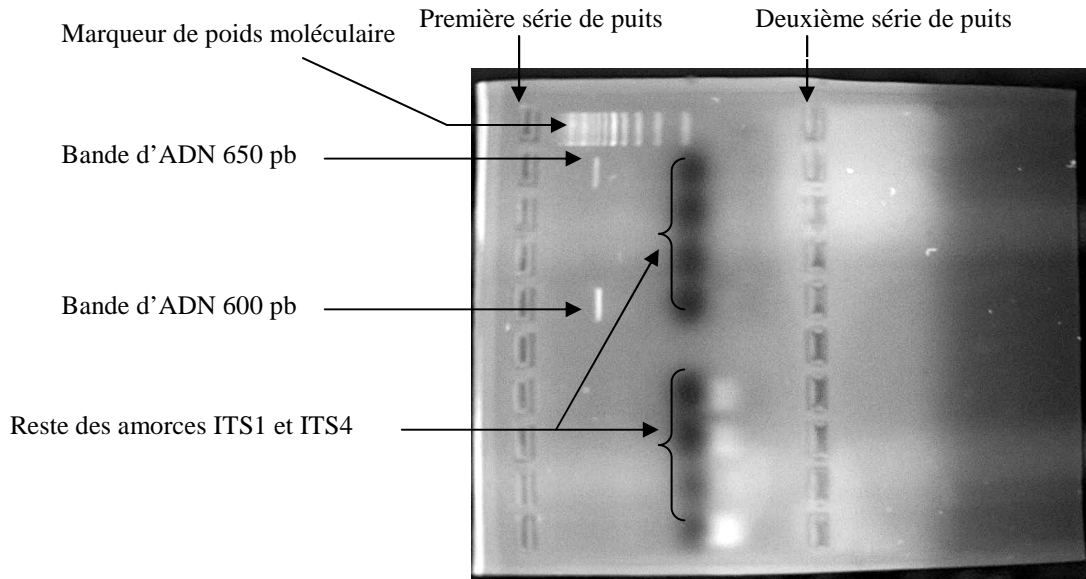


Figure 35: Visualisation sous UV de la migration des bandes d'ADN sur le gel d'Agarose à double série de puits (utilisation de la partie gauche).

3- Analyse des séquences

Après le traitement informatique du chromatogramme obtenu du séquenceur automatique, nous avons soumis les séquences dans BlastTM pour la recherche des séquences analogues dans les banques de données GenBankTM. Le résultat que l'on obtient est une liste de souches dans l'ordre décroissant : de la souche analogue la plus probable à la souche analogue la moins probable. Les figures [36 à 72] et tableaux [10 à 46] résument et regroupent les résultats par genre. On note que malgré l'amplification de l'ADN des deux souches KLM 26 et H 2, leurs séquences respectives sont inexploitables.

□ **Genre *Aspergillus***

Tableau 10: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 1.

ZNM 1			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité¹	Gap²
<i>Aspergillus oryzae</i> souche SRRC 2103	AY373857	556/563 (98%)	Ab.G ³
<i>Aspergillus flavus</i> souche SRRC 1000A	AY373848	556/563 (98%)	
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 506	AF459735	546/554 (98%)	
<i>Aspergillus flavus</i> souche UWFP 533	AY214444	546/554 (98%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus flavus</i>		

1	TCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTGCGTTCCGGC	60
61	AAGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGC	120
121	GGTGCCCGCCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAACACAC	180
181	AAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGG	240
241	GGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTAT	300
301	CGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTA	360
361	ACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCC	420
421	GGCGGGCGCGGGCCCGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAG	480
481	CAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGT	540
541	AATGATCCTTCCGCAGGTTACCCTAGAA	569
<u>ZNM 1</u>		

Figure 36: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 1.

- *Aspergillus oryzae* est isolé fréquemment au Japon à partir de « Koji », et rarement d'autres sources. Cette espèce produit de l'acide kojique, l'acide Cyclopiazonique, la Maltoryzine et l'acide 3-Nitropropionique.
- *Aspergillus flavus* est retrouvé sur sols cultivés, végétaux en décomposition, graines, épices, parfois fruits secs. Il produit des mycotoxines (aflatoxines B1 et B2), l'acide aspergillique, l'acide kojique, l'acide cyclopiazonic, l'acide 3-nitropropionique.

¹: La probabilité est calculée en divisant le nombre de nucléotides de la séquence analogue par le nombre de nucléotides de la séquence d'ADN de la souche étudiée.

²: Le 'Gap' est le pourcentage de nucléotides que le logiciel Blast élimine pour établir l'analogie entre la séquence d'ADN de la souche étudiée et la séquence nucléotidique de la banque de données.

³: Absence de Gap.

Tableau 11: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 9.

ZNM 9			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus tubingensis</i>	AJ280008	558/568 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus niger</i> souche UWFP 515	AY213633	558/568 (98%)	
<i>Aspergillus tubigensis</i> souche CBS	AF455522	557/568 (98%)	
<i>Aspergillus niger</i> isolat wb209	AF455522	555/568 (97%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus awamori</i>		

- *Aspergillus tubingensi* est le nom synonyme d'*Aspergillus niger* var. *tubingensis*.

1	ACTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTC	60
61	GGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGA	120
121	CGCGGTGCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACA	180
181	CACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAG	240
241	GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTT	300
301	ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTT	360
361	TAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGT	420
421	CTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGG	480
481	CCCGCCGAAACAACAGGGTATTATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGAACCGCA	540
541	CTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTGAAG	575

ZNM 9

Figure 37: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 9.

- ✓ Les champignons N°: ZNM : 20, 22, 28, 32, 47, 57, 90 et 101 sont similaires, du point de vue morphologique, à ZNM 9.

Tableau 12: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 10.

ZNM 10			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus tubingensis</i>	AJ280008	531/539 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus niger</i> souche UWFP 515	AY213633	531/539 (98%)	
<i>Aspergillus tubigensis</i> souche CBS 134.48	AJ223853	530/539 (98%)	
<i>Aspergillus niger</i> isolat wb209	AF455522	528/539 (97%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus carbonarius</i>		

```

1   TGTACCCCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCA 60
61  TGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCC 120
121 GTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGA 180
181 CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGA 240
241 TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT 300
301 GCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGAC 360
361 TGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAA 420
421 AGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGAC 480
481 ACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTTAC 540

```

ZNM 10

Figure 38: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 10.

- ✓ Les champignons N°: ZNM 12, 84 et 85 sont similaires, du point de vue morphologique, à ZNM 10.

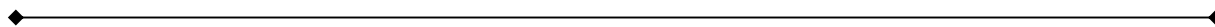


Tableau 13: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 13.

ZNM 13			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus tubingensis</i>	AJ280008	559/566 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus niger</i> souche UWFP 515	AY213633	559/566 (98%)	
<i>Aspergillus tubigensis</i> souche CBS 134.48	AJ223853	559/566 (98%)	
<i>Aspergillus niger</i> isolat wb209	AF455522	556/566 (98%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus niger</i>		

```

1   CTTAGTCAGCGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAATGGTTGGAAAAC 60
61  GTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATC 120
121 GGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCA 180
181 GGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCA 240
241 ACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATAC 300
301 CAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA 360
361 GTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAG 420
421 TTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGG 480
481 GGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGC 540
541 GGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCC 600
601 GCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTTAC 632

```

ZNM 13

Figure 39: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 13.

- ✓ Les champignons N°: ZNM 16, 17, 23, 29 et 91, sont similaires, du point de vue morphologique, à ZNM 13.

Tableau 14: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 15.

ZNT 15			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus fumigatus</i> isolat wb161	AF455542	485/508 (95%)	5/508 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> isolat wb147	AF455534	485/508 (95%)	5/508 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> isolat wb324	AF455475	485/508 (95%)	5/508 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> isolat wb330	AF455474	485/508 (95%)	5/508 (0%)
Identification morphologique	<i>Aspergillus fumigatus</i>		

- *Aspergillus fumigatus* est un contaminant très fréquent des matières organiques humides et des composts dont il entraîne une rapides décomposition avec dégagement de chaleur. C'est un agent d'aspergillose aviaire et humaines, il doit être manipulé avec précaution. Il élabore plusieurs métabolites dont plusieurs très toxiques : fumagilline, acide helvolique, gliotoxine, dérivés quinoniques, alcaloïdes voisines de ceux de l'ergot de seigle.

1	AGAATAAAAACATCCTTgCTAATCTTAGA	ccAaGAAAGATGTGTGTCGGCTGGCGCCGGC	60
61	CGGGCCTACAGAGCAGGTGACAAAAGTCCCATA	tGCTCGAGAGATCGGACGCGGTGCCGCC	120
121	GCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCGGGATAGGGG	GACGGGGGCCCAAtACACAAGCCGTGC	180
181	TTGAGGGCATCAATGACGCTCGGACAGGCATG	CCCCCGCGAATACCATGGGGCGCAATG	240
241	TGCGTGCAA	ctACTCAATGATTCACTGAATTCAGATNACTTATCGCATTTCG	300
301	CTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGAT	CCGTTGTTGAAAGTTTTTAAGTACTGATTA	360
361	CCATAATCAACTCAGACTGCATACTTTCAGAAC	CAGCGTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGG	420
421	CGCGGGCCCCGGGGCGCAAGGCCTCCCCGGC	GCNGTCAAACCGGTGGGCCCGCCGAAGC	480
481	AACAAGGTACGATAGACACGGGTTGGGAGGTT	TGGACCAATAGGGCCCTCACTCGGTAAT	540
541	GATCCTTCCGGAAGGTTACCTtACGGAAGGG		573

ZNT 15

Figure 40: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNT 15.

- ✓ Les champignons N°: ZNT :17, 18, 20, 24, 32, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 51, 61, 68, 74, 79 et 80 sont similaires, du point de vue morphologique, à ZNT 15 et ZNT 16.

Tableau 15: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNT 16.

ZNT 16			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche SRRC 43	AY373851	495/559 (88%)	Ab.G
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche UWFP 500	AY214447	495/559 (88%)	
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche ATCC 16907	AY214446	495/559 (88%)	
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche UWFP	AY214448	495/559 (88%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus fumigatus</i>		

1	GGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCG	60
61	GTGCCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGAGAGGGGACGGGGGCCCAACACACA	120
121	AGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGG	180
181	CGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCG	240
241	CATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAANAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAC	300
301	TGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTCAGAACAGCGTTCATGTTGGGGTCTTC	360
361	GGCGGGCGGGGCCCGGGGCGCAAGGCCTCCCCGGCGGCCGTCGAAACGGCGGGCCCCGC	420
421	CGAAGCAACAAGGTACGATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGG	480
481	TAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGG	515

ZNT 16

Figure 41: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNT 16.

Tableau 16: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 20.

ZNM 20			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus tubingensis</i>	AJ280008	530/538 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus niger</i> souche UWFP 515	AY213633	530/538 (98%)	
<i>Aspergillus tubigensis</i> souche CBS 134.48	AJ223853	529/538 (98%)	
<i>Aspergillus niger</i> isolat wb209	AF455522	527/538 (97%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus awamori</i>		

1	TGTCACCCTGGAAAAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCA	60
61	TGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGGCC	120
121	GTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGA	180
181	CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGA	240
241	TGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT	300
301	GCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAACTCAGAC	360
361	TGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAA	420
421	AGGCGCCCCCGGCGGGCCGACAAGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGAC	480
481	ACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTAC	540

ZNM 20

Figure 42: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 20.

Tableau 17: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 85.

ZNM 85			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus niger</i> isolat wb209	AF455522	547/556 (98%)	2/556 (0%)
<i>Aspergillus niger</i> souche IMI 050566	AY656630	547/556 (98%)	2/556 (0%)
<i>Aspergillus niger</i> souche ATCC 16888	AY373852	547/556 (98%)	2/556 (0%)
<i>Aspergillus foetidus</i> souche SRRC 321	AY373850	547/556 (98%)	2/556 (0%)
<i>Aspergillus awamori</i> souche SRRC 332	AY373840	547/556 (98%)	2/556 (0%)
Identification morphologique	<i>Aspergillus carbonarius</i>		

1	TACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGAAATGGTTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAA	60
61	TCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTG	120
121	CCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGA	180
181	GGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGT	240
241	TCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCG	300
301	TTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCA	360
361	ATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACC	420
421	CCCGGGGGCAGAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCAAGCAACAG	480
481	GGTACAATAGACACGGATGGGGAAGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCC	540
541	TTCCGCAGGTTACCTTACGGAAGG	565

ZNM 85

Figure 43: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 85.

Tableau 18: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 102.

ZNM 102			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus oryzae</i> souche SRRC 2103	AY373857	555/563 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus flavus</i> souche SRRC 1000A	AY373848	555/563 (98%)	
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 506	AF459735	555/563 (98%)	
<i>Aspergillus flavus</i> souche UWFP 533	AY214444	555/563 (98%)	
Identification moléculaire	<i>Aspergillus flavus</i>		

1	CTTTAGTCAGCGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGATTGATTTGCG	60
61	TTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATC	120
121	GGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTGGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCA	180
181	ACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA	240
241	CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACT	300
301	AGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAA	360
361	GTTTTAACTGATTGCGATAACAATCAACTCAGATCCACTAGATCAGACAGAGTTCTGTTG	420
421	GTCTCCGGCGGGCGGGCCCGGGCTGAGAGCCCCGGCGCCATGAATGGCGGGCCCG	480
481	CCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCTACA	540
541	CTCGGTTATGATCCTTCCGCAGGTTACC	569

ZNM 102

Figure 44: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 102.

Tableau 19: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 109.

ZNM 109			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus flavus</i> souche UWFP 570	AY214445	547/554 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus oryzae</i> souche SRRC 2103	AY373857	547/555 (98%)	1/555 (0%)
<i>Aspergillus flavus</i> souche SRRC 1000A	AY373848	547/555 (98%)	1/555 (0%)
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 506	AF459735	547/555 (98%)	1/555 (0%)
<i>Aspergillus flavus</i> souche UWFP 533	AY214444	547/555 (98%)	1/555 (0%)
Identification morphologique	<i>Aspergillus flavus</i>		

1	TATCCTATCTTAACCGCGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAGATTGATTT	60
61	GCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGG	120
121	ATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGAC	180
181	CCAACACACAAGCCGTGCTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGA	240
241	ATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTAC	300
301	ACTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTG	360
361	AAAGTTTAACTGATTGCGATAACAACCTCAGACTTCAGACTAGATCAGACAGAGTTCTG	420
421	GGTGTCTCCGGCGGGCGGGCCCGGGCTGAGAGCCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGC	480
481	CCGCCGAAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCC	540
541	ACACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACT	573

ZNM 109

Figure 45: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 109.

Tableau 20: Identification morphologique et moléculaire de la souche H 17.

H 17			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche SRRC 43	AY373851	476/553 (86%)	1/553 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche UWFP 500	AY214447	476/553 (86%)	1/553 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche ATCC 16907	AY214446	476/553 (86%)	1/553 (0%)
<i>Aspergillus fumigatus</i> souche UWFP	AY214448	476/553 (86%)	1/553 (0%)
Identification morphologique	<i>Aspergillus fumigatus</i>		

1	CTCCNGTAGCGGTATCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAAAATATAGTTGGGTGTC	60
61	NGCTGGCGCCGTCCGGGCTACAAAAGCAGGTGAttacCCCCATACGCTCTACGACCGGA	120
121	CGCGGTGCCGACGTGTGCTTTTCGGGCCCCGTCCCCGGGAGAGGGGGACGGGGGCCAAC	180
181	ACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCA	240
241	GGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT	300
301	TATCGCATTTCGCTGCGTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT	360
361	TAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACCTTCAGAACAGCGTTCATGTTGGGG	420
421	TCTTCGGCGGGCGGGCCCGGGGCGCAAGGCCCTCCCCGGCGGCCGTCGAAACGGCGGG	480
481	CCCGCCGAAGCAACAAGGTACGATAGACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCA	540
541	CTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACTACGAAAGG	579

H 17

Figure 46: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche H 17.

Tableau 21: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 1.

LOMY 1			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus oryzae</i> souche SRRC 2103	AY373857	546/554 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus flavus</i> souche SRRC 1000A	AY373848	546/554 (98%)	
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 506	AF459735	546/554 (98%)	
<i>Aspergillus flavus</i> strain UWFP 533	AY214444	546/554 (98%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus fumigatus</i>		

1	TATCCCTAGCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAGATTGATTTCGTTCCGGCAAGCGCCG	60
61	GCCGGGCCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGC	120
121	CGCTGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGTG	180
181	CTTGATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAAT	240
241	GTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTT	300
301	GCTGCGTTCCTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTG	360
361	CGATACAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGATTCGTGGTGTCTCCGGCGGGCG	420
421	CGGGCCCGGGGCTGAGAGCCCCGGCGGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAAGCAACTAAG	480
481	GTACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCCTACACTCGGTAATGATCC	540
541	TTCCGCAGGTTTAC	554

LOMY 1

Figure 47: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 1.

Tableau 22: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 367.

LOMY 367			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus ochraceus</i> souche ATCC 18412	AY373854	540/552 (97%)	5/552 (0%)
<i>Aspergillus ochraceus</i> souche SRRC 65	AY373855	535/552 (96%)	5/552 (0%)
Identification morphologique	<i>Aspergillus ochraceus</i>		

- *Aspergillus ochraceus* est une espèce synonyme de *Sterigmatocystis ochracea*. *Aspergillus ochraceus* est principalement responsable de la pourriture des semences et des graines. Ce champignon produit l'Ochratoxine A et l'acide pénicillique.

1	TCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGATGAAATAGATTGGTTGCTTTTCAGCGTCGGCCA	60
61	GCAGCCGGCCGGGCTACAAGAGCGGTGTGACAAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACG	120
121	CGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCNNNNNNNACGACGACCCAACACACA	180
181	AGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATACCCCCGGAATACCAGGGGG	240
241	TGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAATTATCG	300
301	CATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAAAC	360
361	TGATTGCGATAACAATCGACTCAGACGACAAAACCTCAGACAGTGTTACGTTGGTGTCTC	420
421	CGGCGAGCGCTGTGCCACCCCTAAAGGATAGGGGGGCGGGCTCGCCGAAGCAACAAGGTA	480
481	CGGTATACACGGGTGGGAGGTTGGGCCCGAGGGACCCTCACTCAGTAATGATCCTCCG	540
541	CAGGTTACCTA	552

LOMY 367

Figure 48: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 367.

Tableau 23: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 791.

LOMY 791			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Aspergillus niger</i> isolat wb209	AF455522	526/533 (98%)	Ab.G
<i>Aspergillus niger</i> souche IMI 050566	AY656630	526/533 (98%)	
<i>Aspergillus niger</i> souche ATCC 16888	AY373852	526/533 (98%)	
<i>Aspergillus foetidus</i> souche SRRC 321	AY373850	526/533 (98%)	
<i>Aspergillus awamori</i> souche SRRC 332	AY373840	526/533 (98%)	
Identification morphologique	<i>Aspergillus niger</i>		

- *Aspergillus niger* est un cosmopolite, il est fréquemment retrouvé dans les céréales, les fruits et les légumes moisissés, le fourrage, les produits laitiers, les arachides. Il est très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire pour la production de divers acides. Il produit l'acide oxalique, la flavaspérone et les aflatoxines par certaines souches.
- *Aspergillus foetidus* est retrouvé sur le sol, substrats organique variés.
- *Aspergillus awamori* est une moisissure lipolytique des oléagineux. Il produit les malformines, toxique pour les animaux et à l'origine de malformations d'organes végétaux.

1	TGATCCGAGTCAACTGGAAAGAATGGTTGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTAC	60
61	AGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTC	120
121	GGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAG	180
181	CAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG	240
241	ACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTC	300
301	ATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTAACTGATTGCATTCAATCAAC	360
361	TCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCGGG	420
421	GGGCAGAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAGGGTACA	480
481	ATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAG	540
541	GTTAC	546

LOMY 791

Figure 49: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 791.

□ **Genre *Ceratocystis***

Tableau 24: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 785.

LOMY 785			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Ceratocystis adiposa</i>	AF275545	460/462 (99%)	2/462 (0%)
<i>Ceratocystis adiposa</i>	AF043606	460/462 (99%)	2/462 (0%)
Identification morphologique	<i>Ulocladium</i> sp.		

- *Ceratocystis adiposa*.

Position dans la classification

Fungi, Ascomycota, Ascomycetes, Sordariomycetidae, Microascales, Ceratocystidaceae.

Synonymes : *Ceratocystis major* ; *Ceratostomella adiposa* et *Sphaeronaema adiposum*.

1	ACACCCGACCGAGGTCAACCTTACAAAAGTGGGTTGTTTTACGGCATGTTGTACAAGAGG	59
60	TTCAAAGCGTAACACAAAGTTTTACTACGCAGGGAAGCTGCAAATACTACAGCCGATGCA	119
120	TTTCGGCGGCCCGCTTGACAGCGGGTCCCTCCAACACCAAGCGAAGCTTGAGTGGTAAAT	179
180	GACGCTCGGACAGGCATGCCTAGCAGAATACTGCTAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTC	239
240	GATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCG	299
300	ATGCTAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAACTATTTGTTAAATGCAACTCAGC	359
360	AATGAATAATTCTCTAGAAATTTAAAGAGTTTGTAATACTACCGGCACAATCCCGAAG	419
420	GACCACGCCAAAGCAGTAAAGATAGGTATGTTTACAAAATGGTTTTAGAGTTGAAA	475

LOMY 785

Figure 50: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 794.

□ **Genre *Fusarium***

Tableau 25: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 807.

LOMY 807			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	AY188917	343/349 (98%)	Ab.G
<i>Fusarium kyushuense</i> souche NRRL25348	U85547	338/343 (98%)	1/343 (0%)
<i>Fusarium sporotrichioides</i> var. minor strain BBA 62425	AF414973	338/345 (97%)	Ab.G
<i>Fusarium sporotrichioides</i> souche BBA 70746	AF414970	338/345 (97%)	1/343 (0%)
<i>Fusarium sporotrichioides</i> NRRL 25479	AF006348	338/345 (97%)	
<i>Fusarium sporotrichioides</i> NRRL 25474	AF006347	338/345 (97%)	
<i>Fusarium kyushuense</i> souche BBA 70812	AF414971	337/343 (98%)	
Identification morphologique	<i>Acremonium</i> sp.		

- *Fusarium sporotrichioides* produit des mycotoxines appartenant au groupe des Trichothecenes.
- *Fusarium kyushuense*.

Position dans la classification

Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; mitosporic Hypocreales; Fusarium.

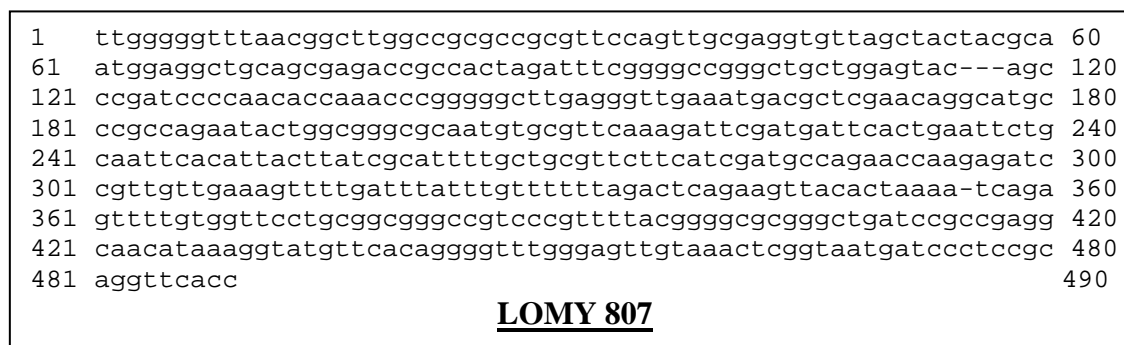


Figure 51: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 807.

Tableau 26: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 855.

LOMY 855			
Identification moléculaire	N° d'accession	Probabilité	Gaps
<i>Fusarium redolens</i>	X94169 X93905	509/510 (99%)	A.G.
<i>Fusarium oxysporum</i> isolat 12-151	AY667488	504/511 (98%)	3/511 (0%)
<i>Fusarium oxysporum</i> souche F-X.1.7-030520-(1-1)	AY669119	504/511 (98%)	3/511 (0%)
<i>Fusarium oxysporum</i> souche F-X.1.7-030520-13	AY669126	504/511 (98%)	A.G.
<i>Fusarium annulatum</i> souche CBS 258.54	AY213654	502/511 (98%)	1/511 (0%)
Identification morphologique	<i>Geotrichum</i> sp.		

1	ctgatccgaggtcaacattcagaagttgggggtttaacggcttggccgcgcccgcgttcca	60
61	gttgcgaggggtttactactacgcaatggaggctgcagcgagaccgccactagatttcgg	120
121	ggccggcttgccagaaaggctcgccgatccccaacaccaaaccgagggcttgaggggtg	180
181	aatgacgctcgaacaggcatgcccgcagaatactggcggcgcaatgtgcttcaaag	240
241	atcgatgattcactgaattctgcaattcacattacttatcgcatTTTTgctgcgttcttc	300
301	atcgatgccagaaccaagagatccggttggaaagttttgatttatttatggttttactc	360
361	agaagttacatatagaaacagagtttaggggtcctctggcggggccgtcccgtttaccgg	420
421	gagcgggctgatccgccgaggcaacagtaaggtatgttcacaggggtttgggagttgtaa	480
481	actcggtaatgatccctccgcaggttcacc	510
<u>LOMY 855</u>		

Figure 52: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 855.

□ **Genre Geotrichum**

Tableau 27: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 803.

LOMY 803			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Galactomyces geotrichum</i>	AJ279451	321/325 (98%)	1/325 (0%)
<i>Dipodascus australiensis</i>	AF157596	317/325 (97%)	1/325 (0%)
Identification morphologique	<i>Geotrichum</i> sp.		

- *Galactomyces geotrichum* est le nouveau nom de l'espèce *Dipodascus geotrichum*. C'est une espèce téléomorphe de *Geotrichum candidum*.

Position dans la classification

Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; Galactomyces.

- *Dipodascus australiensis.*

Position dans la classification

Fungi; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; mitosporic Dipodascaceae; Dipodascus.

1	ctgaggttgaactagtgttgtttttc	aaacgaatttgattc	gaaat	tttagaagagcaa	60
61	gcaattccaagagaga	aaacaacgctca	aaacaagtatact	ttgggggat	accccaaagtgc 120
121	aatgtgcgttcaaaaactgatgattc	acttctgcaattc	acaagaaat	atcgcgtttcgc	180
181	tgcgttcttcatcgatacgaga	accaagagatccattg	ttaaaag	ttttaattattaag	240
241	tattgattgatgattgatgtt	gtctgtggtaaattc	acaaatattatta	attcataatg	300
301	atccttccgcaggttcac	ctacgga			325

LOMY 803

Figure 53: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 803.

Tableau 28: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 840.

LOMY 840			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Galactomyces geotrichum</i>	AJ279445	239/242 (98%)	Ab.G
<i>Dipodascus australiensis</i>	AF157596	235/242 (97%)	
Identification morphologique	<i>Geotrichum</i> sp.		

1	ttgactagtgttgttttttcaaacgaatttgattcgaaattttagaaaagcaatgcaattc	60
61	caagagagaacaacgctcaacaagtatactttgggggatacccccaggcaatgtgc	120
121	gttcaaaaactgatgattcacttctgcaattcacaagaaatcgcgcttcgctgcttc	180
181	ttcatcgatacgagaaccaagagatccattgttaaaagtttgattatgttggat	240
241	tg	242

LOMY 840

Figure 54: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 840.

Tableau 29: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 86.

ZNM 86			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Galactomyces geotrichum</i>	AJ279445	335/341 (98%)	Ab.G
<i>Dipodascus australiensis</i>	AF157596	324/341 (95%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

1	GTAcCTAACAaGTAATCCTACTTGATCTGAGGTTGAATAGTGTTGTTTTTCAAACGAATT	60
61	TGATTCGAAATTTTAGAAAAGCAATGCAATTC AAGAGAGAAACAACGCTCAAACAAGTA	120
121	TACTTTGGGGGATACCCCAAAGTGCAATGTGCGTTCAAAAAC TGATGATTCACTTCTGCA	180
181	ATTCACAAGAAATATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATACGAGAACCAAGAGATCCA	240
241	TTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGGTGTGAtTATAAAATTATTGTTTGCTGTGTAAATT	300
301	TCACAAATATTAAtTAATTCTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGAAAGG	355

ZNM 86

Figure 55: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 86.

Tableau 30: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 83.

ZNM 83			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Galactomyces geotrichum</i>	AJ279445	343/346 (99%)	Ab.G
<i>Dipodascus australiensis</i>	AF157596	330/346 (95%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

1	CAGCGGGTAATCCTACTTGATCTGAGGTTGAATAGTGTTGTTTTTCAAACGAATTTGATT	60
61	CGAAATTTTAGAAAAGCAATGCAATTCGAAGAGAGAAAACAACGCTCAAACAAGTATACTT	120
121	TGGGGGATACCCCAAAGTGCAATGTGCGTTCAAAAAGTATGATTCACTTCTGCAATTCA	180
181	CAAGAAATATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATACGAGAACCAAGAGATCCATTGTT	240
241	AAAAGTTTTGATTATTTTGGTTTTGATTGTANNATTATTGTTTGCTGTGTAATTTTACA	300
301	AATATTATCAATTCTTAATGATCCTTCCGCAGTTTACCTACGGAAGGAT	350
<u>ZNM 83</u>		

Figure 56: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 83.

❑ **Genre *Mucor***

Tableau 31: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 788.

LOMY 788			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Mucor racemosus</i> souche UWFP	AY213662	575/588 (97%)	2/588 (0%)
<i>Mucor racemosus</i> sequevar 1 souche UWFP	AY213660	574/588 (97%)	2/588 (0%)
<i>Mucor racemosus</i> souche NRRL 1428	AY625074	557/570 (97%)	Ab.G
<i>Mucor racemosus</i> souche UWFP 1053	AY213661	557/570 (97%)	1/570 (0%)
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>racemosus</i> souche CBS 260.68	AY213659	557/570 (97%)	Ab.G
Identification morphologique	<i>Mucor</i> sp.		

- *Mucor racemosus* est très répandu et souvent isolé du sol, des excréments de bétail, des produits laitiers et carnés, des oeufs, des fruits et légumes, des céréales, du foin, etc. Il peut provoquer une fermentation alcoolique en milieu mal aéré. Il serait expérimentalement toxique pour les animaux.

```

1  TCCCACCTGATTTAGATAAAATTTAAAAGAGATTTATTTGGGAGGCCCATCAAAGTCA 58
59 ATTACAAGAGCTTTCCTTTATATTAATAAAAAAGTTTCAGGCATTAACAAGTTCAGGCCTT 118
119 AGTAAATTTCAAGGGTTTCAAGATCTATACAGATCGAGAGGCCCAATAATCCTATACA 178
179 ACAAAGTTGAATAGAGGGTTTGTGTTGATACTGAAACAGGCGTGCTCATTGGAATACCA 238
239 ATGAGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATATGCAATTCACACTAGTT 298
299 ATCGCACTTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTG 358
359 TTTTATAGATTTTTTAGGTCTATGTTACAATATTAATTCTGAATTCATTTGGTAAATAAT 418
419 AATAGGATACCAGGCCTAAACCTGATTATGACTCGGTTAACATTTCCAATGTCTATCCTT 478
479 ATAACATTGGAACATCCCTCAAACGTCAAATAATAATACAGTTCACAGTAAATAGATAAT 538
539 AATGGACAAGCCAAGATTATTGATTATTTAATGATCCTTCCGCAGGTT 586

```

LOMY 788

Figure 57: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 788.

Tableau 32: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 837.

LOMY 837			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Mucor fragilis</i>	AF474242	569/578 (98%)	Ab.G
<i>Mucor fragilis</i>	AJ608958	567/578 (98%)	1/578 (0%)
Identification morphologique	<i>Mucor</i> sp.		

```

1  agatttcagatcaaatttaaagatggtgattttgggaggccccagcacagttttatcgcaa 61
62  gagcttctctttatattnnnnnnngttcaggcattcaacaagatcaggcctttgtata 121
122 tttcaagagggttcaagatcagaatagatcaagagactctcagtcacacctattcaacaaaa 181
182 gttggatagagggtttggtttgatactgaaacaggcgtgctcattggaataccaatgagc 241
242 gcaagttgcttcaagactcgatgattcactgaatatgcaattcacactagttatcgca 301
302 ctttgctacgttcttcatcgatgcgagaaccaagagatccggttgtaaaagttggtttat 361
362 agattttttacgtctatggttacaatattaattctgaattcttttggttaataataatagg 421
422 ataccaagcctaagcttgattatgactcgggttaacatttccagtgccctatccttatagca 481
482 ttggaacatccctcaagcgtcaagtaataataacagttcacagtaaatagataatgatgga 541
542 caagccaaaattattgattattttaatgatccttccgca 579

```

LOMY 837

Figure 58: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 837.

□ **Genre Paecilomyces**

Tableau 33: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 782.

LOMY 782			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Paecilomyces variotii</i> souche ATCC 22319	AY373941	248/255 (97%)	Ab.G
<i>Paecilomyces variotii</i> isolat wb556	AF455416	248/255 (97%)	
<i>Paecilomyces variotii</i>	AY247956	248/255 (97%)	
<i>Paecilomyces variotii</i> souche NRRL 1115	AF033395	248/255 (97%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

- *Paecilomyces variotii* est l'un des *Paecilomyces* les plus communs, c'est contaminant fréquent des aliments.

Position dans la classification

Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiales; Trichocomaceae; mitosporic Trichocomaceae; Paecilomyces.

Synonymes: *Penicillium divaricatum* et *Penicillium viniferum*.

1	gggtatccctacctgatccgaggtcaacctaaagaga-aatataggtgaccgtgaaggtcg	59
60	tgtggccagcaagccggccggttctactgaagcgtgtgacaaagccccatacgctcgagg	119
120	accggacgcgacgcgcgctgcttttcggggcccgctccccnnnnnnnnnacggcgggcc	179
180	caacacaccagccgggctggagggtagcaatgacgctcggacagggcatgcccccgaa	239
240	tgccagggggcgcaatgtgcggtcaaagattcgatgattcacggaattctgcaattcaca	299
300	ttacttatcgcatctcgtgctgttcttcatcgatgccggaaccaagagatccggttgttga	359
360	aagttttaattgattgattgtataactcaaacggcaaccttccaggcagcgttccaggggt	419
<u>LOMY 782</u>		

Figure 59: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 782.

Tableau 34: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 806.

LOMY 806			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Paecilomyces variotii</i> souche ATCC 22319	AY373941	518/518 (100%)	Ab.G
<i>Paecilomyces variotii</i> isolat wb556	AF455416	515/515 (100%)	
<i>Paecilomyces variotii</i> souche NRRL 1115	AF033395	500/500 (100%)	
<i>Paecilomyces variotii</i>	AY247956	390/390 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

1	agaaaaatataggtgatggccagcaagccggccggttctactgaagcgtgtgacagagcc	60
61	ccatacgtcagaggaccggacgcgacgccgcccgtgcctttcgggcccgtccccgggga	120
121	ggggggacggcggcccaacacaccagccgggctggagggttagcaatgacgctcggacag	180
181	gcatgccccccggaatgccagggggcgcaatgtgcggttcaaagattcgatgattcacgga	240
241	attctgcaattcacattacttatcgcatttcgctgcggttcttcatcgatgccggaaccaa	300
301	gagatccggttggtgaaagttttaattgattgattgtatactcagacggcaaccttccagg	360
361	cagcgttccaggggtcttcggcgggcgcgggcccggggcgtgaacccccggcggccgg	420
421	ggcgtgaaccacggcgggcccgcgaagcaacagggtgtcaggacaacacggatgggaggt	480
481	tgggccccgagggaccctcactcggtaatgatccttcc	518
<u>LOMY 806</u>		

Figure 60: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 806.

□ **Genre *Penicillium***

Tableau 35: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 75.

ZNM 75			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	547/547 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR	AY373907	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	547/547 (100%)	
<i>Penicillium griseoroseum</i> souche VIC	AY425983	546/546 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium viridicatum</i>		

- *Penicillium expansum* est un anamorphe d'*Eupenicillium expansum*.

Synonymes: *Penicillium crustosum* et *Penicillium glaucum*.

Cette espèce est souvent responsable de la pourriture des pommes et poires en stockage. Il est isolé de tissus de divers végétaux, de textiles, de papier, de produits laitiers et carnés, etc. Il produit des mycotoxines: la patuline, et la clavacine détectée dans les pommes altérées.

- *Penicillium commune* est un anamorphe d'*Eupenicillium commune*.

Synonymes: *Penicillium verrucosum* var. *Album*.

- *Penicillium crustosum* est anamorphe d'*Eupenicillium crustosum*.

Synonyme: *Penicillium solitum* var. *Crustosum*.

- *Penicillium griseoroseum* est un anamorphe de *Eupenicillium griseoroseum*.

Synonymes: *Penicillium concentricum* et *Penicillium cyaneofulvum*.

1	GGCcGTAGACAACAGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAATTTGGGTT	60
61	GATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGAC	120
121	GGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGAGATCGGGGGACGGGGCCC	180
181	AACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA	240
241	CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTA	300
301	CGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG	360
361	TTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTTCAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCT	420
421	TCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCCGCCG	480
481	AAGCAACAAGGTAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTA	540
541	ATGATCCTCCGCAGGTTACCCCT	565
<u>ZNM 75</u>		

Figure 61: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 75.

- ✓ Les champignons N°: **ZNM 6** et **ZNM 36** sont similaires, du point de vue morphologique, à **ZNM 75**.

Tableau 36: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 60.

ZNM 60			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	547/547 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR	AY373907	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	547/547 (100%)	
<i>Penicillium griseoroseum</i> souche VIC	AY425983	546/546 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium verrucosum</i>		

1	CAGCGGGTAATCCACCTGACTTCAGATCATAGTCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAA	60
61	NTTNGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACG	120
121	CTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCGGAGATCGGGGG	180
181	ACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC	240
241	CCCGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAA	300
301	TTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGT	360
361	TGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTTCAATCTTCAGACAGAGTTCG	420
421	AGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCG	480
481	GGCCCCCGAAGCAACAAGGTAAAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCT	540
541	CACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTAC	571
<u>ZNM 60</u>		

Figure 62: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 60.

Tableau 37: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 89

ZNM 89			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	547/547 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR	AY373907	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	547/547 (100%)	
<i>Penicillium griseoroseum</i> souche VIC	AY425983	546/546 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

1	CCTTTAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAAATTTGGGTT	60
61	GATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGAC	120
121	CGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCGGAGATCGGGGGACGGGGCCC	180
181	AACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA	240
241	CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTA	300
301	CGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG	360
361	TTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTTCAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCT	420
421	TCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCCGCCG	480
481	AAGCAACAAGGTAAAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTA	540
541	ATGATCCTTCCGCAGGTTAC	561

ZNM 89

Figure 63: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 89.

Tableau 38: Identification morphologique et moléculaire de la souche ZNM 92.

ZNM 92			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	547/547 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR	AY373907	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	547/547 (100%)	
<i>Penicillium griseoroseum</i> souche VIC	AY425983	546/546 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium verrucosum</i>		

1	CCTTTAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAAATTTGGGTT	60
61	GATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGAC	120
121	CGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCGGAGATCGGGGGACGGGGCCC	180
181	CGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCGGAGATCGGGGGACGGGGCCC	240
241	AACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA	300
301	CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTA	360
361	CGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG	420
421	TTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTTCAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCT	480
481	TCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCCGCCG	540
541	AAGCAACAAGGTAAAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTA	600
601	ATGATCCTTCCGCAGGTTACTAT	624

ZNM 92

Figure 64: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche ZNM 92.

Tableau 39: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 781.

LOMY 781			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium citrinum</i> souche FRR 1841	AY373904	508/515 (98%)	Ab.G
<i>Penicillium citrinum</i> souche NRRL 31486	AF484404	492/499 (98%)	
<i>Penicillium citrinum</i> souche NRRL 31478	AF484402	492/499 (98%)	
<i>Penicillium citrinum</i> souche NRRL 31475	AF484401	492/499 (98%)	
<i>Penicillium citrinum</i> souche NRRL 31468	AF484400	492/499 (98%)	
<i>Penicillium citrinum</i> souche NRRL 800	AF033423	492/499 (98%)	
<i>Penicillium citrinum</i> souche NRRL 31481	AF484403	491/499 (98%)	
<i>Penicillium sartoryi</i> souche NRRL 783	AF033421	490/499 (98%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

- *Penicillium citrinum* est synonyme de *Penicillium aurifluum* et *Penicillium sartoryi*.

Penicillium citrinum est l'une des forme de vie eucaryotique les plus commune sur terre, il est présent abondamment dans la terre, les végétaux pourris, les aliments, les textiles et autres matériaux biodégradable. Il élabore une toxine importante, la citrinine, à l'origine de néphrotoxicoses. Certaines souches produisent des aflatoxines.

1	ATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAGATAATTAAGGTTGGGGGTCGGCTGGCGCCG	60
61	GCCGGGCTACTAGAGCGGGTGACGAAGCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCG	120
121	CCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGCNNNNNNNACGGGGCCCAACACACAAGCCGGG	180
181	CTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATG	240
241	TGCGTTCAAAGACTCGATGATTTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCG	300
301	CTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAACTAATTC	360
361	GTTATAGGTCTCAGACTGCAACTTCAGACAGCGTTTCAGGGGGCCGTCGGCGGGCGCGGG	420
421	GCCCGCCGAGGCAACATAGGTTCCGGGCAACACGGGTGGGAGGTTGGGCCCCGAGGGGCC	480
481	GCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACTAC	515
<u>LOMY 781</u>		

Figure 65: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 781.

Tableau 40: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 815.

LOMY 815			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	520/520 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche souche FRR 1669	AY373907	520/520 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	520/520 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	520/520 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

1	ataaaaaatttggggttgatcggcaagcgccggccggggcctacagagcgggtgacaaagccc	60
61	catacgctcgaggaccggacgcggtgccgctgcctttcgggcccgtccccgggat	120
121	cgggggacggggcccaacacacaagccgggcttgagggcagcaatgacgctcggacaggc	180
181	atgcccccggaataaccagggggcgcaatgtgctgttcaaagactcgatgattcactgaat	240
241	ttgcaattcacattacgtatcgcatttcgctgcttcttcatcgatgccggaaccaagag	300
301	atccggttggtgaaagttttaataatttatattttcactcagacttcaatcttcagacag	360
361	agttcgaggggtgtcttcggcgggcgcgggcccggggcgtaagcccccgccggccagtt	420
421	aaggcgggcccgcgaagcaacaaggtaaaataaacacgggtgggaggtggaccagag	480
481	ggccctcactcggtaatgatccttccgcaggttcacctac	520
<u>LOMY 815</u>		

Figure 66: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 815.

- ✓ Les champignons N°: **LOMY 839; 847; 814; 816; 817; 852; 804** sont similaires, du point de vue morphologique, à **LOMY 815**.

Tableau 41: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 841.

LOMY 841			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	528/528 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR 1669	AY373907	528/528 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	528/528 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	528/528 (100%)	
<i>Penicillium griseoroseum</i> souche VIC	AY425983	517/517 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

1	tcaacctggataaaaaatttgggttgatcggcaagcgccggccgggcctacagagcgggtg	60
61	acaaagccccatacgctcgaggaccggacgcggtgcccgcgctgcctttcgggcccgtcc	120
121	ccggagatcgggggacggggcccaacacacaagccgggcttgagggcagcaatgacgct	180
181	cggacaggcatgcccccggaataaccagggggcgcaatgtgctgttcaaagactcgatgat	240
241	tactgaatttgcaattcacattacgtatcgcatttcgtgctgttcttcacgatgccgg	300
301	aaccaagagatccggttggtgaaagttttaataatttatattttcactcagacttcaatc	360
361	ttcagacagagttcgagggtgtcttcggcgggcccggggcggtaagccccccgg	420
421	cggccagttaaggcgggcccgcgaagcaacaaggtaaaataaacacgggtgggaaggtg	480
481	gaccagaggggccctcactcggtaatgatccttcgcaggttcaccta	528
LOMY 841		

Figure 67: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 841.

Tableau 42: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 846.

LOMY 846			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	547/547 (100%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR 1669	AY373907	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	547/547 (100%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	547/547 (100%)	
<i>Penicillium griseoroseum</i> souche VIC	AY425983	546/546 (100%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

```

1   tatccctacctgatccgaggtcaacctggataaaaaatttggggttgatcggcaagcgcgg 60
61   ccgggcctacagagcgggtgacaaagccccatacgctcgaggaccggacgcggtgcc 120
121  gctgcctttcgggcccgtcccccgagatcgggggacggggcccaacacacaagccggg 180
181  ttgagggcagcaatgacgctcggacagggatgcccccggaataaccagggggcgcaatgt 240
241  gcggtcaaagactcgatgattcactgaatttgcaattcacattacgtatcgatttcgt 300
301  gcggtcttcatcgatgccggaaccaagagatccggttggtgaaagttttaataattata 360
361  ttttactcagacttcaatcttcagacagagttcgaggggtgtcttcggcgggcccggcc 420
421  cgggggcgtaagcccccgccagtttaaggcggggcccgcgaagcaacaaggtaaaa 480
481  taaacacgggtgggaggttgaccagagggccctcactcggtaatgatccttccgcagg 540
541  ttcacct 547

```

LOMY 846

Figure 68: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 846.

- ✓ Les champignons N°: LOMY: 851; 849 sont similaires, du point de vue morphologique, à LOMY 846.

Tableau 43: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 848.

LOMY 848			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gap
<i>Penicillium expansum</i> souche VIC	AY425984	549/550 (99%)	Ab.G
<i>Penicillium crustosum</i> souche FRR 1669	AY373907	549/550 (99%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb193	AF455527	549/550 (99%)	
<i>Penicillium commune</i> isolat wb555	AF455418	549/550 (99%)	
Identification morphologique	<i>Penicillium</i> sp.		

```

1   gggatccctacctgatccgaggtcaacctggataaaaaatttggggttgatcggcaagcgc 60
61   cggccgggcctacagagcgggtgacaaagccccatacgctcgaggaccggacgcggtgcc 120
121  gccgctgcctttcgggcccgtcccccgagatcgggggacggggcccaacacacaagccg 180
181  ggcttgagggcagcaatgacgctcggacagggatgcccccggaataaccagggggcgcaa 240
241  tgtgcgttcaaagactcgatgattcactgaatttgcaattcacattacgtatcgatttc 300
301  gctgcgttcttcatcgatgccggaaccaagagatccggttggtgaaagttttaataatt 360
361  atattttcactcagacttcaatcttcaaacagagttcgaggggtgtcttcggcgggcccgg 420
421  gcccgggggcgtaagcccccgccagtttaaggcggggcccgcgaagcaacaaggtta 480
481  aaataaacacgggtgggaggttgaccagagggccctcactcggtaatgatccttccgc 540
541  aggttcacct 550

```

LOMY 848

Figure 69: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 848.

□ **Genre *Rhizomucor***

Tableau 44: Identification morphologique et moléculaire de la souche KLM 166.

KLM 166			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Rhizomucor pusillus</i>	AF461764	590/594 (99%)	3/594 (0%)
<i>Rhizomucor pusillus</i>	AY211270	566/566 (100%)	Ab.G
<i>Rhizomucor pusillus</i>	AJ278365	536/537 (99%)	1/537 (0%)
Identification morphologique	<i>Rhizopus</i> sp.		

- *Rhizomucor pusillus*.

Synonyme: *Mucor pusillus*.

Rhizomucor est un genre appartenant à l'ordre des *Mucorales* et la famille des *Mucoraceae*. Il contient 3 espèces : *pusillus*, *miehei* et *variabili*. La morphologie du *Rhizomucor* observée sous microscope est intermédiaire entre *Rhizopus* et *Mucor*.

1	agcgggtaatcccatctaagttcagatccatagttgaaatattttgtggttgattgacc	60
61	tttatacttgatcatctcgaagcacactggtaaaaaattagataccaatgcaagccctca	120
121	aggaaatatcaagggtcaacaacatacaaaattgttcgggtagcttgaacggatgaaaatc	180
181	catcagcaccgcaaaccaaagatttatcaaaaaataaacctttaggggtaataaagat	240
241	actgaactagacgtaccaatggatgaaccaaagggtgcaagggtgcgcttcgagaattcga	300
301	tgattcgcaaaggctgcagatcgacttttcgcaatttgctacgctcttcacgatg	360
361	cgagaaccaagtgatccattgcttaaagttgttttgaaatatttatcgtcttgaatcattt	420
421	ctgatccaaaactttcaatttgtaaacacagtcfaatcaaatatgtaaaataaaaggtc	480
481	gagagatctggagcaatccctcagaacatttcacaaaaaggagagaatcgcggtcacca	540
541	atagagggtcaccacgatttccacaactttttaatgatccttccgcagggttcacc	594

KLM 166

Figure 70: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche KLM 166.

□ **Genre *Thanatephorus***

Tableau 45: Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 794.

LOMY 794			
Identification moléculaire	N° d'accension	Probabilité	Gaps
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb348	AF455463	591/591 (100%)	Ab.G
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb357	AF455459	591/591 (100%)	
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb382	AF455454	591/591 (100%)	
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb407	AF455445	591/591 (100%)	
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb425	AF455438	591/591 (100%)	
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb351	AF455461	589/591 (99%)	
<i>Thanatephorus cucumeris</i> isolat wb433	AF455435	589/591 (99%)	
Identification morphologique	<i>Mucor</i> sp.		

- *Thanatephorus cucumeris*.

Position dans la classification

Fungi; Basidiomycota; Hymenomyces; Homobasidiomycetes; Ceratobasidiales; Ceratobasidiaceae; Thanatephorus.

Synonymes: *Hypochnus cucumeris*.

1	GGTAGTCCTACCTGATTTGAGCTCAGAGTTCAGAAATTTGTCCGAAGACGGTTAGAAGC	60
61	GCGAACACTAGAATACCCTCCACAGCAACGCAGATAATTATCACGCTGAAGCGGCTGGTA	120
121	ACGTTTCGCACTAATGCATTTTCAGAGGAGCCGACTACGAGAGCCGGCACGACCTCCAAGTC	180
181	CAAGCCTTCGTCAATAAAGCCGAAGGTTGAGAATTCATGAGACTCAAACAGGCATGCTC	240
241	CTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCA	300
301	ATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCG	360
361	TTGCTGAAAGTTGTATATAAATGCGTTATAGCAAAGTATGACATTCTAAAACCTGAATCG	420
421	TTTGTAGTAAAGCATAAGCCCGACACCTACAAGTGCGCGAACGCACCCACAAGCCGGCCT	480
481	ATGAAAAGTGACACAGAAGTTGAGAGTGGATGAGACAGGCGTGCACATGCCCTTGCGAGCC	540
541	AGCAGACAACCCGTTCAAAACTCGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	591
<u>LOMY 794</u>		

Figure 71: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 794.

□ Genre *Trichoderma*

Tableau 46 : Identification morphologique et moléculaire de la souche LOMY 786.

LOMY 786			
Identification moléculaire	N° d'accèsion	Probabilité	Gaps
<i>Hypocrea virens</i> Ir. 11	AY154945	583/586 (99%)	1/586 (0%)
<i>Trichoderma virens</i> souche GL-21	AF099008	583/586 (99%)	1/586 (0%)
<i>Trichoderma virens</i> souche GL-3	AF099006	583/586 (99%)	1/586 (0%)
<i>Trichoderma virens</i> souche GL-20	AF099007	583/586 (99%)	1/586 (0%)
<i>Trichoderma virens</i> souche GLi 39	AF099005	583/586 (99%)	1/586 (0%)
Identification morphologique	<i>Trichoderma</i> sp.		

- *Hypocrea virens* est la nouvelle espèce téléomorphe de *Trichoderma virens*. Très utilisée dans la lutte biologique.

Position dans la classification :

Fungi ; Ascomycota ; Pezizomycotina ; Scordariomycètes ; Hypocreomycetidae ; Hypocreales ; Hypocreaceae ; Hypocrea.

1	TCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAGTTTGGGGTGTTTAACGGCTG	60
61	TGGACGCGCCGCGCTCCCAGATGCGAGTGTGCAAACACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGCGA	120
121	GACCGCCACTGTATTTTCGGGGCCGGCCCGTAAAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCC	180
181	GGAGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGG	240
241	CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCG	300
301	CATTTGCTGCGTTCATTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAT	360
361	TCATTTTCGAAACGCCACGAGGGGCGCCGAGATGGCTCAGATAGTAAAAAACCCGCGAG	420
421	GGGTATACAATAAGAGTTTTGGTTGGTCCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGA	480
481	CGCACCCGGGGCAGAGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGG	540
541	GAGTTGTAAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGG	589

LOMY 786

Figure 72: Séquence nucléotidique de la région ITS de la souche LOMY 786.

4- Discussion

Le séquençage total des régions ITS1, ITS2, du gène ribosomal 5.8S et partiel des gènes ribosomiaux 18S et 28S nous a permis de délimiter les espèces des champignons filamenteux isolés des Maâsras marocaines. Sur les 53 souches représentatives de la collection de départ de 134 souches, nous sommes parvenus à amplifier l'ADN de 39 souches et identifier 37 souches (tableau 47).

Tableau 47: Résultats d'identification moléculaire des souches regroupées par genre.

Souches	Identification morphologique	Identification moléculaire (% similarité)
LOMY 807	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (98 %) <i>Fusarium kyushuense</i> (98 %)
ZNM 20	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> (98 %) <i>Aspergillus niger</i> (98 %)
ZNM 9	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> (98 %) <i>Aspergillus niger</i> (98 %)
ZNM 10	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> (98 %) <i>Aspergillus niger</i> (98 %)
ZNM 85	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus niger</i> (98 %) <i>Aspergillus foetidus</i> (98 %) <i>Aspergillus awamori</i> (98 %)
ZNM 1	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (98 %) <i>Aspergillus flavus</i> (98 %)
ZNM 102	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (98 %) <i>Aspergillus flavus</i> (98 %)
ZNM 109	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (98 %) <i>Aspergillus flavus</i> (98 %)
H1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (86 %)
LOMY 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (98 %) <i>Aspergillus flavus</i> (98 %)
ZNT 15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (95 %)

Tableau XLVII (suite)

Souches	Identification morphologique	Identification moléculaire (% similarité)
ZNT 16	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (88 %)
LOMY 791	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> (98 %) <i>Aspergillus foetidus</i> (98 %) <i>Aspergillus awamori</i> (98 %)
ZNM 13	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> (98 %) <i>Aspergillus niger</i> (98 %)
LOMY 367	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i> (97 %)
LOMY 803	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Galactomyces geotrichum</i> (98 %) <i>Dipodascus australiensis</i> (97 %)
LOMY 840	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Galactomyces geotrichum</i> (98 %) <i>Dipodascus australiensis</i> (97 %)
LOMY 855	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Fusarium redolens</i> (99 %) <i>Fusarium oxysporum</i> (98 %) <i>Fusarium annulatum</i> (98 %)
LOMY 788	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor racemosus</i> (97 %)
LOMY 794	<i>Mucor</i> sp.	<i>Thanatephorus cucumeris</i> (100 %)
LOMY 837	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor fragilis</i> (98 %)
LOMY 781	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i> (98 %)
LOMY 782	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Paecilomyces variotii</i> (97 %)
LOMY 806	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Paecilomyces variotii</i> (100 %)
LOMY 815	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %)
LOMY 841	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %) <i>Penicillium griseoroseum</i> (100 %)
LOMY 846	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %) <i>Penicillium griseoroseum</i> (100 %)

Tableau XLVII (suite)

Souches	Identification morphologique	Identification moléculaire (% similarité)
LOMY 848	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %)
ZNM 83	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Galactomyces geotrichum</i> (98 %) <i>Dipodascus australiensis</i> (97 %)
ZNM 86	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Galactomyces geotrichum</i> (98 %) <i>Dipodascus australiensis</i> (97 %)
ZNM 89	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %) <i>Penicillium griseoroseum</i> (100 %)
ZNM 60	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %) <i>Penicillium griseoroseum</i> (100 %)
ZNM 92	<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %) <i>Penicillium griseoroseum</i> (100 %)
ZNM 75	<i>Penicillium viridicatum</i>	<i>Penicillium expansum</i> (100 %) <i>Penicillium commune</i> (100 %) <i>Penicillium griseoroseum</i> (100 %)
KLM 166	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizomucor pusillus</i> (100 %)
Lomy 786	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma virens</i> (99 %)
Lomy 785	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Ceratocystis adiposa</i> (99 %)

On constate une concordance au niveau du genre entre l'identification moléculaire et celle établie selon l'approche morphologique chez 73 % de souches. Cependant, la congruence entre l'espèce morphologique et moléculaire laisse encore à désirer. Ceci pourrait être expliqué, d'une part, soit par le fait que l'identification morphologique établie se limite souvent au niveau du genre, soit par une identification erronée de l'espèce. D'autre part, l'identification moléculaire pourrait aussi être mise en question.

L'analyse des séquences de certaines souches appartenant au genre *Penicillium* donne un pourcentage de similarité de 100 % entre les espèces *expansum*, *commune* et *griseoroseum*. Celui du genre *Aspergillus* est de 98 % de similarité entre l'espèce *oryzae* et *flavus*. C'est également le cas pour les espèces de *Fusarium* : *sporotrichioides*, *kyushuense*, *pulverosum*, *redolens*, *oxysporum* et *annulatum* avec un pourcentage de similarité de 98 et 97 %. Ce qui n'est guère discriminant et nous incite à mettre en question la robustesse de la précision de l'espèce de certaines souches.

Face à cette situation, nous avons tenté de pousser davantage l'analyse des séquences en question en faisant appel à la phylogénie pour mieux affiner notre identification (Figure 75). Or, elle n'a pas donnée les résultats escomptés.

La difficulté que nous avons rencontrée pour la délimitation de l'espèce de certaines souches nous a incité à faire la quête de solutions plausibles. Dans ce qui suit, nous allons présenter également quelques facteurs vraisemblablement à l'origine de ces résultats.

Le séquençage automatique des amplifiats d'ADN est accompagné par un bruit de fond de l'appareil séquenceur. Des perturbations sont alors engendrées au niveau de la correspondance entre les bases nucléotidiques et les pics du chromatogramme. Lors de l'analyse par le logiciel Chromas, nous nous retrouvons contraints à supprimer les parties de la discordance située au début et à la fin de la séquence (Figure 73). Cette suppression peut atteindre une cinquantaine de bases. Ce qui se traduit éventuellement par des répercussions sur l'aptitude de la délimitation de l'espèce, puisque la taille de la séquence se trouve fortement réduite.

Les données génétiques correspondant à certains microorganismes fongiques ne proviennent pas forcément de souches types ayant fait l'objet d'études approfondies et bénéficiant de l'unanimité de la communauté scientifique. De même, elles n'appartiennent pas à des collections internationalement reconnues telles que : American Type Culture Collection (ATCC), Collection de l'Institut Pasteur (CIP), Japan Collection of Microorganisms (JCM) ou Deutsch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). L'identification devient assujettie à quelques imprécisions. Ce constat révèle que la consultation de ces banques peut conduire et a probablement conduit à des erreurs concernant l'identification d'espèces. Les travaux de Turenne *et al.* (2001) ont montré que, sur soixante-

dix-neuf séquences d'ADNr 16S du genre *Mycobacterium*, seules 23 % présentaient une similarité de 100 % avec les séquences de GENBANK. Parmi les séquences d'ADNr 16S de mycobactéries, vingt-et-une faisaient référence à des noms d'espèces non validés.

C'est vrai que la mise en commun de données est un atout formidable des banques dites généralistes comme GENBANK, mais la libre soumission des séquences et de leurs caractéristiques par les auteurs conduit à des imprécisions, des omissions, voire même des erreurs tant au niveau des séquences que des annotations.

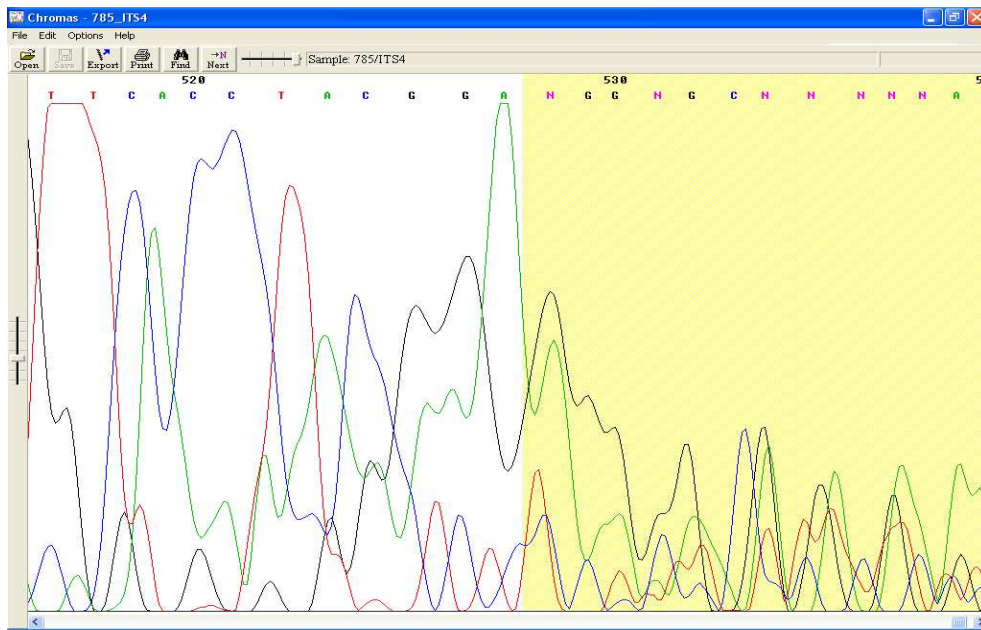


Figure 73: Interface du logiciel Chromas montrant. La partie de la séquence à supprimer(à droite).

L'amplification de la région ITS pourrait bien évidemment être entreprise par des amorces autres que ITS1 et ITS4. Larena *et al.*, (1999), ont noté que l'utilisation des paires d'amorces ITS5-ITS4A et ITS1F-ITS4A pour l'amplification de la région ITS a conduit à une meilleure discrimination au sein des *Ascomycètes* (figure 74).

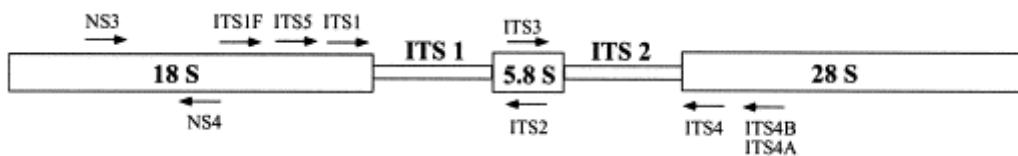


Figure 74: Représentation schématique de la région ADNr avec les positions des nouvelles amorces ITS1F et ITS4A.

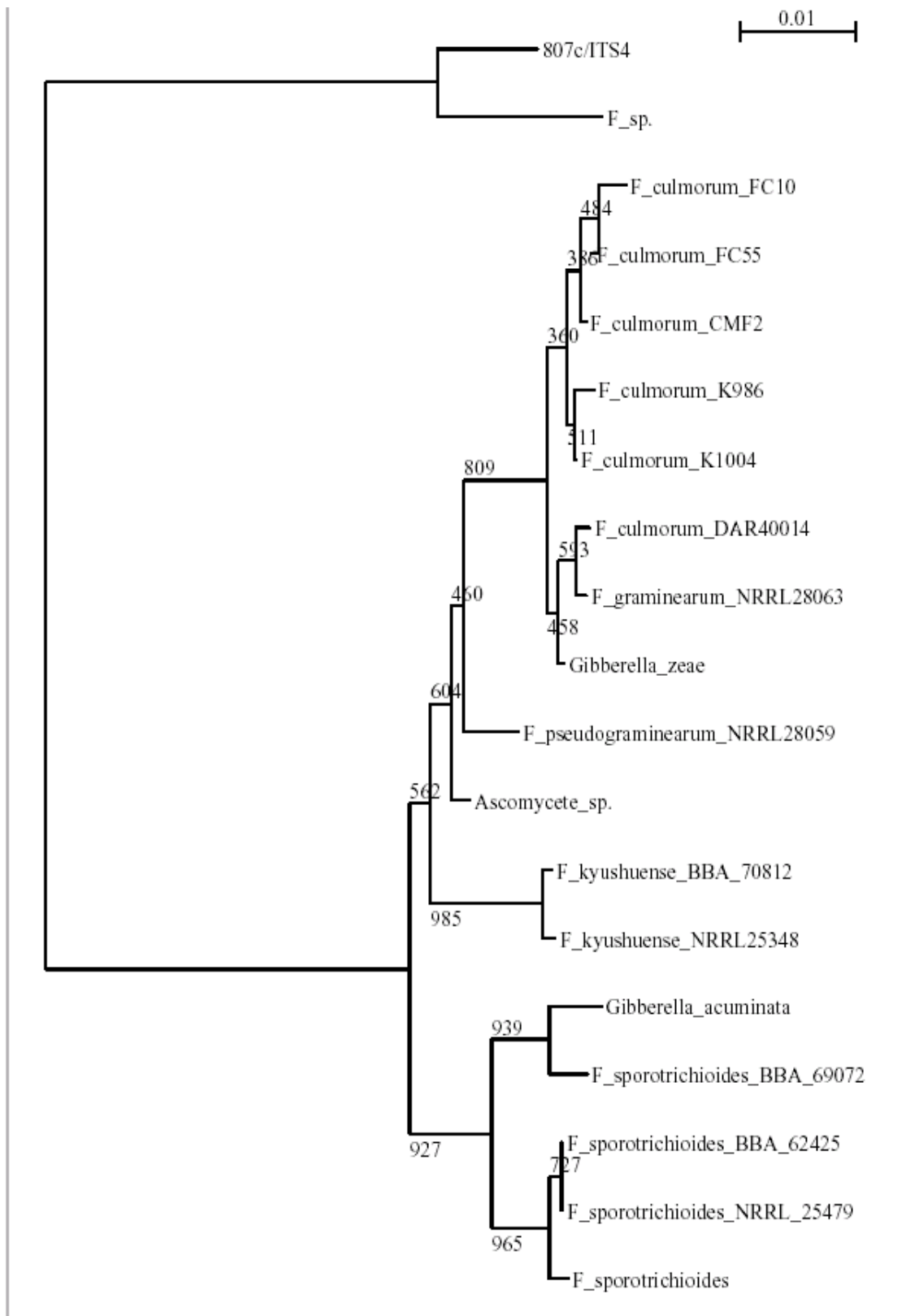


Figure 75: Arbre phylogénique réalisé avec l’algorithme du voisin le plus proche (Neighbor Joining) et basé sur l’analyse de la séquence de la région ITS de la souche LOMY 807 et les séquences de ses voisins les plus proche provenant de GENBANK. Les chiffres indiquent la valeur de bootstrap de chaque nœud.

L'approche commune utilisant la méthode de PCR pour la détection moléculaire des champignons filamenteux s'effectue en amplifiant les gènes d'ARNr (Kappe *et al.*, 1996; Vanittanakom *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2000), qui sont hautement conservés et présents en multiples copies dans le génome fongique. Les résultats insatisfaisants du séquençage des gènes de l'ARNr 18S et 28S de *Penicillium expansum*, ont mené Marek *et al.*, (2003) à sélectionner une paire d'amorces (PEF) sens et (PER) antisens basées sur le gène polygalacturonase (*Pepg1*) codant pour l'enzyme responsable de la pourriture des fruits (Yao *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1998). L'amplification d'une région conservée à l'intérieur de ce gène a montré la spécificité de ces amorces (figure 76).

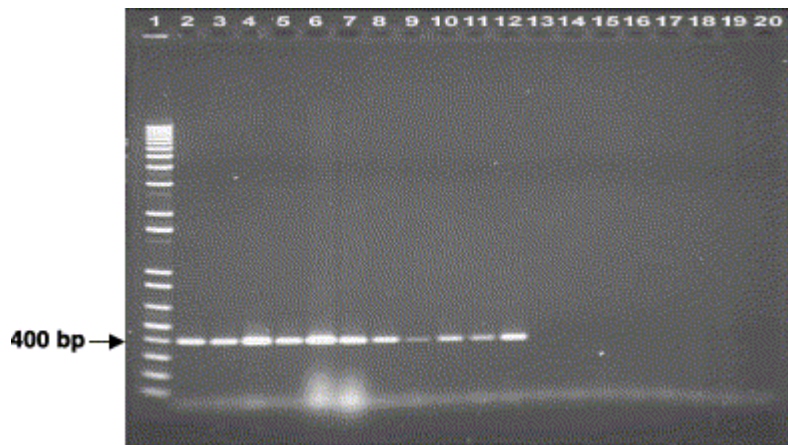


Figure 76: Amplification de l'ADN de quelques espèces de *Penicillium* et d'*E. coli* révélée sur gel d'agarose

Les couloirs du gel sont définis comme suit : piste 1 : marqueur de poids moléculaire 1 kb-plus ladder ; 2 : *P. expansum* 132; 3 : *P. expansum* 46; 4 : *P. expansum* M-8; 5 : *P. expansum* C-1; 6 : *P. expansum* FRR 1600; 7 : *P. expansum* NRRL 2304; 8 : *P. expansum* 1745; 9 : *P. expansum* 1801; 10 : *P. expansum* 1835; 11 : *P. expansum* 2220; 12 : *P. expansum* 2350; piste 13, *Penicillium roqueforti*; 14 : *Penicillium solitum*; 15 : *Penicillium eschinulatum*; 16 : *Penicillium crustosum*; 17 : *Penicillium commune*; 18 : *Penicillium notatum*; 19 : *Penicillium chrysogenum*; 20 : *E. coli*.

A l'instar de ces résultats, nous croyons fort que la recherche d'amorces spécifiques à un gène particulier pourrait être la solution pour la discrimination de l'espèce des souches difficilement identifiables par les amorces universelles.

Conclusion générale

Dans le cadre du stage du mémoire de fin d'études, il nous a été confié d'identifier des souches de champignons filamenteux isolées des olives, de grignons d'olive et des margines, lors des campagnes oléicoles 2003-2004 et 2004-2005 en utilisant les techniques de la biologie moléculaire. Ces souches ont été identifiées auparavant suivant l'approche morphologique par l'équipe de recherche de l'IAV Hassan II, Rabat, Maroc et l'IRD, Marseille, France. Et ce dans le cadre du PRAD (04/15) sur la biodiversité des moisissures dans les unités traditionnelles de trituration des olives 'Maâsras' au Maroc.

D'une manière très générale, l'identification moléculaire des genres fongiques concorde avec celle établie morphologiquement lors des travaux précédents. Quant à la congruence entre l'espèce moléculaire et morphologique, elle mérite d'être approfondie.

La technique de PCR couplée au séquençage, largement appliquée pour l'identification des souches de champignons filamenteux, nous a permis d'identifier 37 souches appartenant aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Galactomyces*, *Ceratocystis*, *Dipodascus*, *Thanatephorus* et *Trichoderma*.

Les résultats obtenus démontrent l'intérêt de cette approche dans le domaine agro-industriel tant en terme de délai et de qualité que de simplicité d'identification. Des retombées sont notamment attendues dans le domaine des biotechnologies (production d'enzymes, d'acides organiques et d'antibiotiques). Le consommateur est de plus en plus exigeant sur la qualité des aliments qu'il consomme. L'ouverture des marchés impose aux entreprises des exigences sévères en matière d'hygiène des aliments. Afin de répondre à cette problématique, les cadres de ce secteur doivent disposer de méthodes rapides, en l'occurrence les outils de biologie moléculaire, leur permettant d'évaluer la qualité et la sécurité de leurs produits. Le secteur de l'alimentation, en particulier celui de l'huile d'olive doit plus que jamais apporter la preuve de la qualité et de la sécurité de ses produits.

Dans ce cadre d'application, les banques de séquences sont un élément clef et incontournable de l'identification. Or, quelques résultats obtenus à partir de la banque de données GenBank de NCBI présentent certaines confusions. Ceci est dû, d'une part, à la double classification que connaît la systématique fongique. Ainsi, *Trichoderma virens* est

appelée également *Hypocrea virens* quand il s'agit de la forme téléomorphe. D'autre part, les noms des genres et des espèces listés après la soumission des séquences au logiciel Blast ont souvent des noms obsolètes et/ou plusieurs synonymes tel est le cas de *Penicillium expansum* et *Penicillium crustosum*.

Ces bases de données contiennent outre les données génétiques de souches types, les séquences de souches dont les travaux aboutissant à leur réalisation ne sont pas publiés et/ou faisant référence à des noms d'espèces non validés.

Au terme de notre travail et au vu de nos résultats nous suggérons ce qui suit :

Afin d'éviter la suppression d'un grand nombre de nucléotides et de comparer ainsi la séquence en sa quasi-totalité, il est préférable que le séquençage soit effectué dans les deux sens.

L'approche de type multilocus est, à notre sens, recommandable. L'utilisation combinée des séquences de plusieurs gènes permet d'augmenter la capacité de discrimination des espèces.

En amont de ces techniques moléculaires combinant amplification et séquençage, le développement d'outils bio-informatiques adaptés est primordiale. D'où la nécessité de la construction de banques de données dites « propres » comportant des séquences parfaites, sans ambiguïté, de taille normalisée avec un système d'annotation homogène.

Références bibliographiques et webographique

- Anderson A., Thrane U. (1996).
Differentiation of *Alternaria alternata* based on morphology, metabolites profiles and cultural characteristics. *Can. J. Microbiol.* 42. p. 685-689.
- Arisan-Atac IHE., Kubicek CP. (1995).
Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chesnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Lett.* 126. p. 249-256.
- Attili D. S., De Hoog G. S., Pizzirani-Kleiner A.A. (1998).
rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. *Med. Mycol.* 36. p. 219-25.
- Bacha H., Ghedira-Chekir L., Maaroufi K., Abid S., Zakhama A., Creppy E.E. (1998).
Induction du système de réparation SOS de E.coli lysogène comme marqueur de la génotoxicité de la zéaralénone : Prévention par la vitamine E. *Méd. Vét.* 149 (6). p. 654.
- Bernal M., Baquero-Mezence MI., Provot F., Laurent F., Martinez-Machin G., Boiron P. (1997).
A one step *Candida albicans* DNA extraction method using 'Chelex[®] 100 Resin' suitable for DNA amplification (PCR). *J. Mycol. Méd.* 7. p. 53-54.
- Boiron P. (1996).
Organisation et biologie des champignons. Editions Nathan. p. 17.
- Börjesson T., Stöllman U., Schnürer J. (1990).
Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (12). p. 3705-10.
- Bostock A., Khattak MN., Matthews R., Burnie J. (1993).
Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 139. 2179-84.
- Botton, (1985).
Les moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Masson-Paris. p. 265.
- Brock, T.D., Madingan, M.T., Martingo, J.M. et Parker, J. (1994).
Metabolisme, Biosynthesis and Nutrition. *Biology of microorganisms.* Prentice-Hall International, Inc. New Jersey. p. 89-124.

- Chen YC., Eisner JD., Kattar MM., Rassouljian-Barrett SL., Lafe K., Bui U., Limaye AP., Cookson BT (2001).
Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 39. p. 4042-51.
- Chimi H., Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA) (2001).
Qualité des huiles d'olive au Maroc : enquête nationale et analyse au laboratoire. Bulletin mensuel d'information et de liaison N° 79, avril 2001.
- Colombo F., Vallone L., Giaretti M., Dragoni I. (2002).
Identification of *Penicillium aurantiogriseum* species with a method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_aset=V-WA-A-W-B-MsSAYVW-UUA-U-AAWWCCDUUW-AAWUABDYUW-AEDVCYVCE-B-U&_rdoc=2&_fmt=full&_udi=B6T6S-47CH56B-1&_coverDate=04%2F30%2F2003&_cdi=5038&_orig=search&_st=13&_sort=d&_view=c&_acct=C000009002&_version=1&_urlVersion=0&_userid=113324&md5=173a3bef23e175eccfe9dd7e38ae7223
- Conférence des Nations Unies pour le Commerce et le Développement (CNUCED)
(<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/olive/marche.htm>).
- Conseil Oléicole international (COI), 1990.
Amélioration de la qualité de l'huile d'olives. Conseil Oléicole International, Madrid.
- Conseil Oléicole International (COI) (2002).
Le marché mondial de l'huile d'olive. *OLIVAE*, 92, 6. p. 22-27.
- Dix NJ, Webster J. (1995 a).
Structure of Fungal Communities. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall. London. p. 39-84.
- Dix NJ, Webster J. (1995 b).
Fungi of Extreme Environments. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall. London. p. 322-32.
- Direction de Production Végétale (DPV), (2004).
Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Rabat. Maroc.
- Domsch K. H, Gams W, Anderson T, (1980).
Compendium of soil fungi. Vol I: 859. Edition: Academic Press.
- Ellsworth DL., Rittenhouse KD, Honeycutt RL. (1993).
Artificial variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*. 14. p. 214-17.
- Frisvad JC., Bridge PD., Arora DK. (1998).
Chemical fungal taxonomy. New York: Marcel Dekker.
- Guarro J., Gené J. Stchigel AM. (1999).
Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (3). p. 454-500.

Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga E. A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I., (2000).

Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp.

<http://aem.asm.org/cgi/content/full/66/5/1890>

I.A.R.C, (1993).

Ochratoxin A. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans.

(Lyon: Internat. Agency Research Cancer), p. 489-521.

Iraqi Housaïni L., Gaime I., Lamrani K., Ismaili Alaoui M., Rio B., Roussos S. (2002).

Sélection et identification des champignons filamenteux thermophiles isolés au Maroc pour la production des phytases par FMS sur grignons d'olives. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.

Kambouris M. E., Reichard U., Legakis N. J. , Velegraki A. (1999).

Sequences from the aspergillopepsin PEP gene of *Aspergillus fumigatus*: evidence on their use in selective PCR identification of *Aspergillus* species in infected clinical samples.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_aset=V-WA-A-W-Z-MsSAYWW-UUA-U-AAWWCCZWYV-AAWUABDUYV-AEDVVUVWB-Z-U&_rdoc=6&_fmt=full&_udi=B6T2T-3X23B93-4&_coverDate=08%2F15%2F1999&_cdi=4927&_orig=search&_st=13&_sort=d&_view=c&_acct=C000009002&_version=1&_urlVersion=0&_userid=113324&md5=03da3469023e67e945ed21f7b4ce5bc4

Kammas N., Gaime I., Lamrani K., Ismaili Alaoui M., Rio B., Roussos S. (2002).

Sélection de souches de champignons filamenteux thermophiles à partir d'échantillons prélevés des Maâsras au Maroc, pour la production de tannases par fermentation en milieu solide. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.

Kappe R., Fauser C., Okeke C.N., Maiwald M. (1996).

Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rRNA. *Mycoses* 39. p. 25–30.

Kumeda Y., Asao T. (1996).

Single-strand confirmational polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section Flavi. *Applied and Environmental Microbiology* 62. p. 2947–52.

Larena I., Salazar O., González V., Julián M. C., Rubio V. (1999).

Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for *Ascomycetes*.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_aset=V-WA-A-W-A-MsSAYVW-UUW-U-AAWWCEUVYD-AAWUADAWYD-AEEUWYZDE-A-U&_rdoc=1&_fmt=full&_udi=B6T3C-3XK6TM4-B&_coverDate=10%2F08%2F1999&_cdi=4943&_orig=search&_st=13&_sort=d&_view=c&_acct=C000009002&_version=1&_urlVersion=0&_userid=113324&md5=f817ecded74f6451e0a2ea0eb36c4701

- Larsen TO., Frisvad JC.(1995 a).
Characterization of volatiles metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycol. Res.* 99.
p. 1153-66.
- Larsen TO., Frisvad JC.(1995 b).
Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatiles metabolites. *Mycol. Res.* 99.
p. 1167-74.
- Lehmann PF, Lin D, Lasker BA (1992).
Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida*
by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30.p. 3249-54.
- Lopes da Silva T., de Sousa E., Pereira PT., Ferrao AM., Roseiro JC. (1998).
Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 16.p. 303-10.
- Maaroufi K., Abid S., Cherif A., Zakhama A., Achour A., Creppy E., Bacha H. (1998).
Caryomegalie des cellules tubulaires rénales comme marqueur précoce de la néphrotoxicité induite par l'ochratoxine A chez le rat. *Rev. Méd. Vét.* 149 (6). p. 645.
- Magan N., Evans P. (2000).
Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stored Prod. Res.* 36.p. 319-40.
- Magee PT, Bowdin L, Staudinger J (1992).
Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. clin. Microbiol.* 30.p. 2674-79.
- Marek P., Annamalai T., Venkitanarayanan K. (2003).
Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_aset=V-WA-A-W-A-MsSAYVA-UUA-U-AAWWCEACY- AAUADWBY-AEEUZYDEE-A-U&_rdoc=1&_fmt=full&_udi=B6T7K-48FCGGX-3&_coverDate=12%2F31%2F2003&_cdi=5061&_orig=search&_st=13&_sort=d&_view=c&_acct=C000009002&_version=1&_urlVersion=0&_userid=113324&md5=20883676aac595bdd0d7cc70c6422cf4
- Pitt J, (1985).
The genus *Penicillium*. Edition: Academic Press. p. 634.
- Pittet A. (1998).
Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- an updated review. *Rev. Méd. Vét.* 149 (6).p. 479-92.
- Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA) (1998).

- Plan national oléicole : les axes d'intervention et le plan d'action 1998-2010. Bulletin mensuel d'information et de liaison n°51, décembre 1998.
- Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA) (2003).
L'amandier, l'olivier, le figuier et le grenadier. Bulletin mensuel d'information et de liaison, n°105, juin 2003.
- Rahmani M. (1996).
Guide des bonnes pratiques de production de l'huile d'olive : unités traditionnelles et industrielles. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II.
- Raper K. B., (1965).
The genus *Aspergillus*. Edition: Krieger.
- Riley R.T., Voss K.A., Norred W.P., Sharma R.P., Wang E., MERRIL A.H. (1998).
Fumonisins : mechanism of mycotoxicity. Rev. Méd. Vét. 149 (6).p. 617-26.
- Rosendahl S., Taylor JW. (1997).
Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. Mol. Ecol. 6.p. 821-30.
- Salih G., Gaimé I., Lamrani K., Ismaili Alaoui M., Rio B., Roussos S. (2004).
Mycoflore des Maâsras marocaines : toxigenèse des souches isolées d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*, détection et analyse des mycotoxines dans l'huile d'olive. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.
- Sambrook, J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1998).
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Smedsgaard J., Frisvad C. (1997).
Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts. I. Chemosystematics. Biochem. Syst. Ecol. 25.p. 51-64.
- Strachan T., Read A. P. Human Molecular Genetics 2, (1999).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=hmg.TOC&depth=2>
- Sunesson AL., Vaes W., Nilsson , Blomquist G., Anderson B., Carlson R. (1995).
Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. Appl. Environ. Microbiol. 61.p. 2911-18.
- Tantaoui-Elaraki A, Le tutour B et Aboussalim A. (1983).
Conséquence de la contamination des olives par des *Aspergillus* toxigènes sur la qualité et la quantité de l'huile de pression. Revue française des corps gras. Vol 11, n°12.p. 473-6.
- Tantaoui-Elaraki A, Samane S, Roquebert M.F. (1990).
Mycoflora of moroccan « Greek style » black olives. I- Inventory. Microbiology-aliments-nutrition, vol 8.p. 257-64.

- Taylor JW., Geiser DM., Burt A., Koufoupanou V. (1999).
The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* 12.p. 126-46.
- Turenne C. Y., Tschetter L., Wolfe J., Kabani A. (2001).
Necessity of quality-controlled 16S rDNA gene sequence databases: identification non-*tuberculous Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 39.p. 1-12.
- Vanittanakom N., Vanittanakom P., Hay R.J. (2002).
Rapid identification of *Penicillium marneffeii* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 40 (5).p. 1739–42.
<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/40/5/1739>
- Voigt K., Cigelnik E., O'donnell K., (1999).
Phylogeny and PCR Identification of Clinically Important Zygomycetes Based on Nuclear Ribosomal-DNA Sequence Data.
<http://jcm.asm.org/cgi/content/full/37/12/3957>
- White TJ, Bruns, Lee S, Taylor J. (1990)
Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis N, Gelfand J, White T, eds. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press. p. 315-22.
- Wilkins K., Larsen K. (1995).
Variation of volatile organic compound patterns of mold species from damp building. *Chemosphere.* 31 (5).p. 3225-36.
- William Bridge Cook, (1979).
The ecology of fungi. p. 41-48.210.
- Yao C., Conway W.S., Sams C.E. (1996).
Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. *Phytopathology* 86 (11).p. 1160–65.
- Yao, C., Conway, W.S., Ren, R., Sams, C.E., (1998).
Cloning and analysis of a gene encoding polygalacturonase in *Penicillium expansum*. Direct Submission Genbank, accession AF047713.
- Zaouia N., Gaime I., Lamrani K., Ismaili Alaoui M., Roussos S. (2005).
Mycoflore des Maâsras marocaines : Toxinogénèse des souches isolées et analyse des mycotoxines dans l'huile d'olive. Mémoire de troisième cycle. Filière des Industries Agricoles et Alimentaires. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.

Zhao J., Kong F., Li R., Wang X., Wan Z., Wang D. (2001).

Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 39.p. 2261-66.

Zhou G., Whong W.-Z., Ong T., Chen B. (2000).

Development of a fungal-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol. Cell. Probes* 14.p. 339-48.