

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid
Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس

مستغانم

كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BOUCHAFA Djamila

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

SPÉCIALITÉ : MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE

THÈME

Les critères moléculaires utilisés pour classer
les champignons du genre *Aspergillus* section *flavi*

Soutenue publiquement le :

DEVANT LE JURY :

Mme CHOUGRANI, F

prof

Présidente

M. CHERIGUENE, A

prof

Directeur de mémoire

M. ZABOURI, Y

MCB

Examineur

Dédicace

*Je remercie d'abord **Dieu** le tout puissant qui m'a donné la force et m'a*

Aidé durant mon cursus universitaire

***A ma mère**, qui a toujours été mes côtés pour mes soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma
gratitude et mon affection*

***A mon père**, qui a toujours été à mes côtés et a fait l'impossible pour me fournir tout ce dont j'avais
besoin en terme d'encouragement matériel et moral*

A chaque personne qui m'a soutenu.



Remerciements

Ce travail est le fruit de la combinaison d'efforts de plusieurs personnes. Je remercie tout d'abord le tout puissant qui, par sa grâce m'a permis d'arriver au bout de mes efforts en me donnant la santé, la force, le courage et en me faisant entourer des merveilleuses personnes dont je tiens à remercier. Je remercie :

Mes remerciements vont avant tout à mon Dieu, créateur pour cette faveur qu'Il a bien voulu m'accorder

A mes parents, ABD ELKADER et KHADIDJA qui m'ont toujours accompagné dans mon éducation.

Pr Chériguene A mon directeur de mémoire pour son encadrement sans faille, pour ses multiples conseils et les efforts déployés par son équipe afin de nous assurer une formation de qualité son soutien moral, sa rigueur au travail, ses multiples occupations

Je remercie Mme CHOUGRANI, F, qui a accepté de présider le jury de la soutenance.

Je remercie M.ZABOURI, Y, d'avoir accepté d'examiner mon travail

Tous les enseignants de la département Biologie, pour leur enseignement de qualité et leurs conseils qui nous ont permis poursuivre notre itinéraire académique jusqu'à présent

MES frères et sœurs pour leurs encouragements durant tout mon parcours ; MES Camarades, amis et connaissances sœurs

Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Table des matières

Introduction générale	5
Chapitre I : Généralités sur la biologie moléculaire	8
Introduction.....	8
I.Support de l'information génétique	8
1.1. Composition chimique de l'ADN	8
1.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN	12
II. Expression de l'information génétique	13
2.1. Processus de réplication ou étapes de la réplication de l'ADN	13
1. Initiation.....	13
2.Élongation	13
3. La terminaison	14
2.2.Étapes de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes	16
1. Les origines de réplication.....	16
2. L'initiation de la réplication	16
3. L'élongation de la réplication	16
4. Le checkpoint de réplication	17
2.3.Étapes de la réplication de l'ADN chez les procaryotes	17
3 .La transcription	19
3.1.Étapes de la transcription chez les procaryotes	20

1. L'initiation	20
2. Elongation	20
3. La terminaison	20
3.2.Étapes de la transcription chez les eucaryotes	20
4. La traduction	21
4.1. La traduction chez les procaryotes	22
1. Initiation	22
2. L'élongation	23
3. Terminaison	23
4.2. La traduction chez Les eucaryotes	23
1. l'initiation	23
2. L'élongation	23
3. La terminaison.....	23
Chapitre II : Étude moléculaire d'<i>Aspergillus section flavi</i>	25
I. Les champignons	25
1-Aperçu sur les Champignons	25
2-Identification des champignons	25
II. Identification des moisissures par les outils moléculaires	27
I.1. Gènes utilisés pour classer les champignons	28
1.1. Région ITS	29
1.2. Gènes LSU et SSU	30
1.3. Gènes RPB1 et RPB2	31
1.4. Gène de la β -tubuline	32

1.5. Gène MCM7	33
1.6. Gène TEF1- α	33
1.7. TEF1- α pour <i>Ascomycota</i>	34
III. Réaction en chaîne de polymérase (PCR)	34
1. Principe de la PCR	34
2. Étapes de la PCR	35
IV. Classification du règne des <i>Fungi</i>	36
1. Genre <i>Aspergillus</i>	38
2. Caractères morphologiques de genre <i>Aspergillus</i>	38
3. Reproduction d' <i>Aspergillus</i>	39
4. Caractères morphologiques	41
V. Approches moléculaires de la classification et de l'identification des espèces d'aspergille	43
VI. Caractéristiques de la section <i>Flavi</i>	46
VII. Identification moléculaire de la section <i>Flavi D'Aspergillus</i>	47
Conclusion générale	53
Références bibliographiques	54

Liste des figures :

Figure 1: Structures chimiques des bases puriques (Adénine, Guanine) et des bases pyrimidiques (Cytosine, Thymine, Uracile)	10
Figure 2: Structure des appariements complémentaires de deux brins antiparallèles d'ADN.	11
Figure 3: Illustration schématique qui représente l'enroulement des deux brins d'ADN	11
Figure 4: Mécanisme de la réplication	15
Figure 5: La réplication chez les eucaryotes	17
Figure 6: La réplication chez les procaryotes	18
Figure 7: le Promoteurs chez les procaryotes	19
Figure 8: ARNT molécule	22
Figure 9: Organigramme pour l'identification fongique à l'aide de l'analyse phylogénétique moléculaire.....	28
Figure 10: Diagramme montrant la technologie ADNr.	30
Figure 11: diagramme montrant les gènes codant pour l'ARNr	31
Figure 12: Schéma de principe des gènes RPB1 et RPB2.....	32
Figure 13: Étapes et schématisation de la PCR : une vision très simplifiée.....	36
Figure 14: Arbre représentatif de la classification du règne des Fungi.....	37
Figure 15: Morphologie des têtes Aspergillaires unisériées (a) et bisériées (b)	39
Figure 16: Cycle de vie du champignon <i>Aspergillus nidulans</i>	41
Figure 17: la classification des espèces d'aspergille.....	44
Figure 18: Phylogénie combinée utilisant neuf loci (RPB1, RPB2, Cct8, Tsr1, CaM, BenA, SSU, LSU, ITS). Dans le phylogramme, seuls les sous-genres et les sections d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i>	45
Figure 19: Arbre phylogénétique d' <i>Aspergillus</i> section Flavi basé sur les données combinées benA + cmdA.	51

liste des tableaux

Tableau I: morphologie, production d'extrolites et identification moléculaire des espèces Flavi de la section Aspergillus. (NORLIA et al, 2019).....	49
---	----

Liste des Abréviations :

A : adenine

Aa-t-RNA : Aminoacyl transport RiboNucleic Acid

ATP : Adenosine triphosphorique

BLAST: Basic Local AlignmentSearch Tool

BLASTn : Basic Local AlignmentSearch Tool nucleotide

BLASTp : Basic Local AlignmentSearch Tool protein

C : cytosine

CaM : Calmodulin gene

COI/ cox1: Cytochrome Oxidase Subunit 1

CTP : Cytidine triphosphate

D1 : Domaine 1

D2 : Domaine 2

DNA : DeoxyriboNucleic Acid

DRBC : Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

EF : Elongation Factor

e-IF : eukaryotic initiation factor

eRF : eukaryotic releasing factor

fmet : formyl methionine

G : guanine

GTP : Guanosine triphosphate

IF : Initiation Factor

ITS : Internal Transcribed Spacer

LSU : Large Sub Unit

matK: megakaryocyte-associated tyrosine Kinase

MCM7: Minichromosome Maintenance Complex Componen7

MEGA7 : Molecular EvolutionaryGeniticsAnalysis version 7

mRNA : messenger RNA

NCBI : National Center For BiotechnologyInformation

PDB : Potato Dextrose Broth

PCR: Polymerase Chain Reaction

Q PCR : Quantitative PCR

rbcL : ribulose biphosphate carboxylase large chain

RF : releasing factors

RNA :RiboNucleic Acid

RPB1: largest subunit of RNA polymerase II.

RPB2: Second largest subunit of RNA polymerase II

rRNA : ribosomal RNA

SDS : sodium dodecyl sulphate

SSB : Single Strand Binding

SSU : Small Sub Unit

STRs : Short Tandem Repeats

T : thymine

ter : termination

Tm : Melting point

tRNA : transfer RNA


U : uracil

UTP : Uridine triphosphate



Résumé

Certains champignons, notamment les Ascomycètes, peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques pour les hommes et les vertébrés, appelés mycotoxines. Étant donné que la présence de ces champignons dans les aliments de base constitue un risque potentiel pour la santé humaine et animale, les aliments de base sont éliminés lorsqu'ils sont contaminés. La section Flavi est un des groupes de champignons les plus importants du point de vue économique et sanitaire car il comprend des espèces productrices de mycotoxines. Parmi les mycotoxines produites par ce groupe se trouvent les aflatoxines (AF), considérées comme une préoccupation majeure en raison de leurs effets délétères chez les vertébrés. Les espèces de la section Flavi se développent principalement dans les régions tropicales et subtropicales car elles bénéficient de conditions environnementales optimales. De plus, les conditions de récolte et de stockage sont souvent inappropriées, favorisant ainsi leur développement. Dans les régions tempérées, ces espèces se rencontrent moins fréquemment. Cependant, le réchauffement climatique pourrait favoriser leur colonisation. L'identification des espèces d'*Aspergillus* de la section Flavi est un défi, en raison de l'inter- et intra-variabilité des caractères. Par conséquent, l'utilisation d'une seule méthode d'identification (caractérisation morphologique, moléculaire ou du profil des métabolites secondaires) est insuffisante. Inversement, le développement d'outils moléculaires a facilité la tâche. Le but de notre étude était de déterminer les relations entre les espèces d'*Aspergillus* de la section Flavi à partir de différents marqueurs moléculaires (ITS, *benA*, *cmdA*, *amdS*, *préA*, *perB*, *ppgA*, *aflP*, gènes *Mat1*), puis d'identifier ceux qui permettent une classification des espèces par inférence phylogénétique. L'utilisation de l'inférence phylogénétique dans cette étude a montré qu'il s'agit d'une approche robuste pour identifier les espèces d'*Aspergillus* de la section Flavi. En effet, l'ajout de marqueurs moléculaires a permis de confirmer le placement phylogénétique des espèces dans la section Flavi.



Résumé

Abstract :

Some fungi, especially Ascomycetes, can synthesize secondary metabolites toxic to humans and vertebrates, called mycotoxins. Since the presence of these fungi in staple foods poses a potential risk to human and animal health, staple foods are eliminated when contaminated. The Flavi section is one of the most important groups of fungi from an economic and health point of view because it includes species that produce mycotoxins. Among the mycotoxins produced by this group are the aflatoxins (AFs), which are considered to be of major concern due to their deleterious effects in vertebrates. The species of the Flavi section thrive mainly in the tropics and subtropics because they benefit from optimal environmental conditions. In addition, harvesting and storage conditions are often inappropriate, thus favoring their development. In temperate regions, these species are found less frequently. However, global warming could favor their colonization. The identification of *Aspergillus* species from the Flavi section is a challenge, due to the inter- and intra-variability of characters. Therefore, the use of a single identification method (morphological, molecular or secondary metabolite profile characterization) is insufficient. Conversely, the development of molecular tools has made the task easier. The aim of our study was to determine the relationships between *Aspergillus* species of the Flavi section from different molecular markers (ITS, benA, cmdA, amdS, preA, perB, ppgA, aflP, Mat1 genes), then from identify those which allow a classification of species by phylogenetic inference. The use of phylogenetic inference in this study showed that this is a robust approach to identify *Aspergillus* species from the Flavi section. Indeed, the addition of molecular markers made it possible to confirm the phylogenetic placement of the species in the Flavi section.

الملخص:

يمكن لبعض الفطريات وخاصة الفطريات الزقية تصنيع المستقلبات الأيضية الثانوية سامة للإنسان والفقاريات تسمى السموم الفطرية، نظرا لان وجود هذه الفطريات في الأطعمة الأساسية يشكل خطرا محتملا على صحة الإنسان والحيوان يتم التخلص من الأطعمة الأساسية عند تلوثها، تعتبر مجموعة *Flavi* من اهم مجموعات الفطريات من الناحية الاقتصادية والصحية لأنه يشمل الأنواع التي تنتج السموم الفطرية.

من بين السموم الفطرية التي تنتجها هذه المجموعة هي الافلاتوكسينات والتي تعتبر مصدر قلق كبير بسبب آثارها الضارة في الفقاريات.

تزدهر أنواع مجموعة *Flavi* بشكل رئيسي في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية لأنها تستفيد من الظروف البيئية المثلى بالإضافة إلى ذلك، فان ظروف الحصاد و التخزين غالبا ما تكون غير مناسبة مما يساعد على تنميتها في المناطق المعتدلة. توجد هذه الأنواع بشكل اقل تواترا و مع ذلك فان الاحتماس الحراري يمكن أن يفضل استعمارهم. يعد تحديد أنواع الرشاشيات من مجموعة *Flavi* تحديا بسبب التباين داخل و بين الخصائص لذلك فان استخدام طريقة تحديد واحدة (سمات مورفولوجية أو الصفات الجزيئية أو خصائص المستقلبات الأيضية الثانوية) غير كاف على العكس من ذلك فان تطوير الطرق الجزيئية جعل المهمة اسهل، الهدف من دراستنا هو تحديد العلاقات بين أنواع الرشاشيات في مجموعة *Flavi* من خلال استعمال العلامات الجزيئية (ITS, benA, cmdA, amdS, préA, perB, ppgA, afIP, gènes Mat1) و من ثم تحديد تلك التي تسمح بالتصنيف من الأنواع عن طريق الاستدلال النشوء و التطور اظهر استخدام الاستدلال الوراثي في هذه الدراسة أن هذا نهج قوي لتحديد أنواع الرشاشيات من مجموعة *Flavi*، و بالفعل فان إضافة الواسمات الجزيئية جعلت من الممكن تأكيد موضع النشوء و التطور للأنواع في مجموعة *Flavi* .



INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

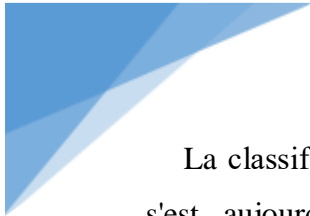
La qualité des approvisionnements alimentaires a toujours été un problème dans les sociétés humaines. Avoir accès à des l'approvisionnement alimentaire est nécessaire pour éviter les risques potentiels pour la santé humaine et animale. Certains champignons, en particulier d'Ascomycètes, sont capables de synthétiser une pléthore de produits dans le cadre de leur métabolisme, certains d'entre eux toxiques pour les humains et les vertébrés, appelés mycotoxines. La présence omniprésente de champignons dans les agrafes ne peuvent être évitées, ainsi, leur présence devient un risque potentiel pour la santé des humains et Bétail.

Les champignons sont le deuxième plus grand groupe d'organismes eucaryotes sur terre avec des estimations allant 1,5 à 5,1 millions d'espèces (Hawksworth 2001, Blackwell 2011) et seulement environ 5 à 6 % d'entre eux ont été décrits (Dulla et al. 2016). Ils ont des rôles essentiels dans le cycle des nutriments, la santé végétale et animale, la décomposition organique, la protection de l'environnement protection et symbioses mutualistes obligatoires avec les plantes, les algues et les cyanobactéries (Gadd, 2013 ; Grossart et al, 2016).

Aspergillus section *Flavi* est l'un des groupes de moisissures les plus importants économiquement ; leur les effets néfastes sont un problème de santé publique important, de plus la stabilité de sa taxonomie est préoccupante sur le plan pratique (Geiser et al, 2007 ; Pildain et al, 2008).

La section contient des espèces capables de produisent plusieurs mycotoxines, parmi lesquelles les aflatoxines sont une préoccupation majeure car leur effets chez les vertébrés (IARC 2002).

La classification d'*Aspergillus* a subi plusieurs modifications au cours des dernières années en utilisant différentes approches visant à regrouper le nombre croissant d'espèces selon leur phylogénétique relation (Scheidegger et Payne 2003).



Introduction générale

La classification d'*Aspergillus* était traditionnellement basée sur traits morphologiques, et s'est aujourd'hui étendu pour inclure le profil métabolique secondaire et approches moléculaires.

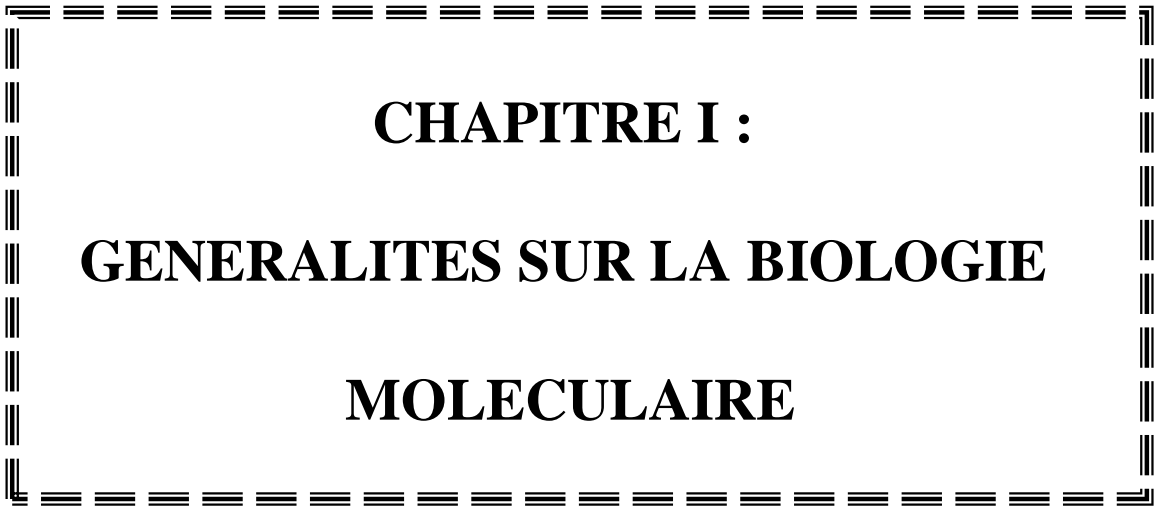
Ce mémoire se concentrera sur approches moléculaires de la section Flavi pour L'objectif général de était d'identifier les marqueurs moléculaires qui permettent caractérisation appropriée au niveau de l'espèce dans *Aspergillus* section Flavi.et pour distinguer entre

Espèces du la section *Flavi* qui produisent et non produisent des mycotoxines et se trouvent dans divers alimentaire, évitant ainsi ses risques.

Le présent travail est structuré en deux grands chapitres :

Chapitre I : généralités sur la biologie moléculaire.

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus* section *Flavi*



CHAPITRE I :
GENERALITES SUR LA BIOLOGIE
MOLECULAIRE

Chapitre I : Généralités sur la biologie moléculaire :

Introduction

La fonction capitale de l'ADN d'une cellule vivante est de contenir l'information génétique nécessaire au fonctionnement cellulaire. (ALBERTS et al ; non daté)

Cette molécule porte la plupart des instructions génétiques utilisées dans le développement, le fonctionnement et la reproduction de tous organismes vivants connus et de nombreux virus. (ALBERTS et al, 2002)

I. Support de l'information génétique :

Toutes les cellules vivantes sur la Terre stockent leur information génétique sous forme de molécules d'ADN. (ALBERTS et al ; non daté)

La plupart de l'ADN est situé dans le noyau de la cellule, mais une petite quantité d'ADN peut également être trouvée dans les mitochondries. (Tariku, 2018)

1.1. Composition chimique de l'ADN

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des macromolécules composées d'un enchaînement d'unités structurales appelées nucléotides. (Abderrahman et al, 2018)

L'ADN est un acide nucléique bicaténaire, c'est-à-dire constitué de deux brins associés par des liaisons hydrogène (MAFTAH et al, 2018)

Chaque monomère d'un simple brin d'ADN – c'est-à-dire chaque nucléotide – est constitué de deux parties : un sucre (désoxyribose) auquel est attaché un groupement phosphate, et une base qui peut être soit l'adénine (A), soit la guanine (G), soit la cytosine (C), soit la thymine (T) (ALBERTS et al ; non daté)

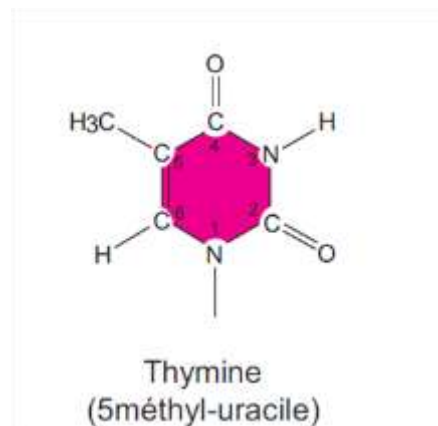
Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

Donc, Chaque acide nucléique contient quatre bases. Trois d'entre elles (adénine, cytosine et guanine) sont communes à l'ADN et l'ARN, la quatrième diffère. On trouve la thymine dans l'ADN et l'uracile dans l'ARN. La différence entre ces deux bases porte uniquement sur le carbone n° 5 (avec ou sans CH₃). On trouve deux catégories de bases :

- les purines constituées de deux cycles aromatiques ;
- les pyrimidines constituées d'un seul cycle aromatique.

Les atomes de carbone et d'azote des cycles aromatiques sont numérotés de 1 à 9 (bases puriques) et de 1 à 5 (bases pyrimidiques). Les flèches bleues indiquent la liaison qui se produit entre la base et le sucre. (PHILIPPE, 2018)

Les atomes des bases (C et N) portent les chiffres 1 à 6 pour les pyrimidines et 1 à 9 pour les purines, alors que les atomes C du pentose portent les chiffres 1' à 5'. Le signe prime ajouté à ces derniers les distingue de ceux des bases. L'ose, par son carbone 1', établit une liaison N-glycosidique avec l'azote 1 des pyrimidines ou l'azote 9 des purines. Par son carbone 5', il forme une liaison ester avec un premier groupe phosphate (désigné pour cette raison phosphate a). Ce dernier peut former des liaisons anhydride d'acide (Fig. 1-3) avec des groupes phosphate b et g ou des liaisons ester avec un groupe OH porté par le carbone 3' du pentose précédent (MAFTAH et al, 2018)



Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

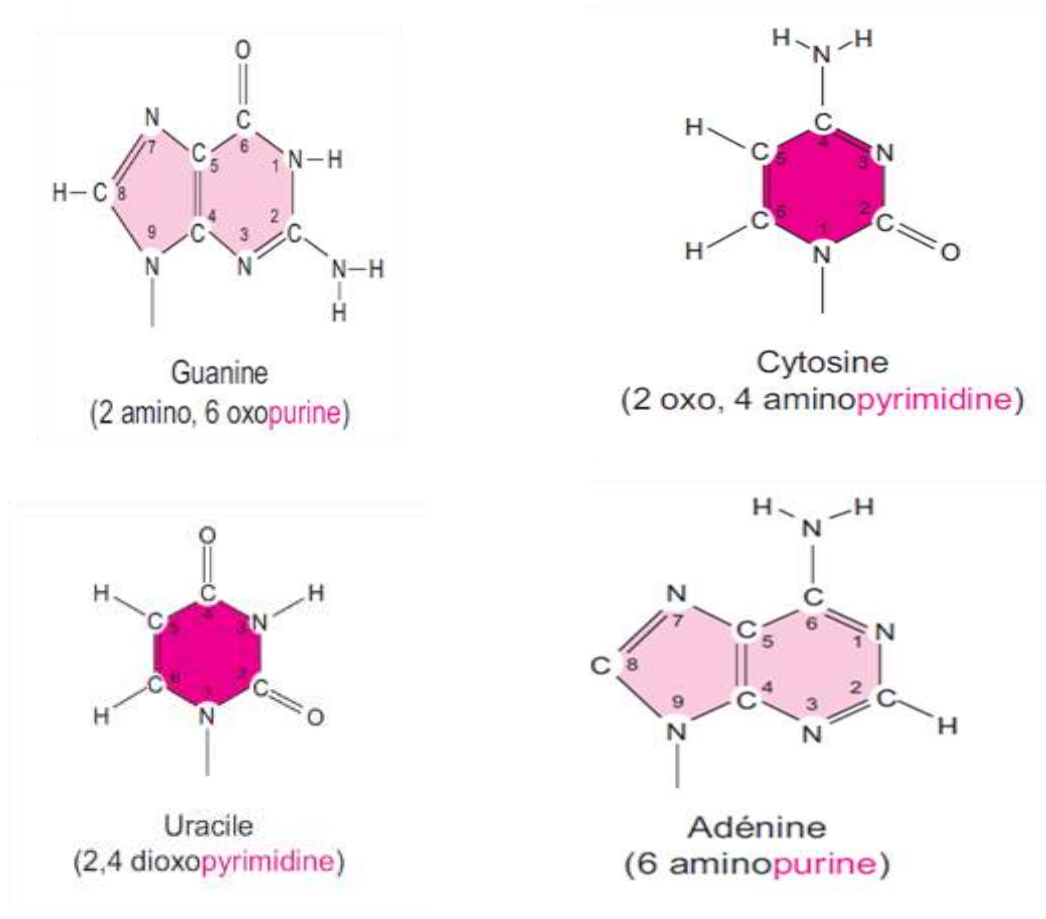


Figure 1: Structures chimiques des bases puriques (Adénine, Guanine) et des bases pyrimidiques (Cytosine, Thymine, Uracile) des acides (MAFTAH et al, 2018)

La structure secondaire du DNA est telle que les deux brins sont enroulés l'un autour de l'autre. Chacun des deux brins est orienté (5'→3') dans le sens opposé à celui de l'autre brin (3'→5'). On dit qu'ils sont antiparallèles.

- Les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de la double hélice de façon à ce que chacune s'hybride avec une base de l'autre brin (A avec T, C avec G, etc..). On dit que les bases successives de chacun des brins sont complémentaires.

- La double hélice a un « pas » de 3,4 nm c'est à dire qu'il y a environ 10 paires de nucléotides pour chaque tour d'hélice. (HOUSSET et RAISONNIER, 2009).

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

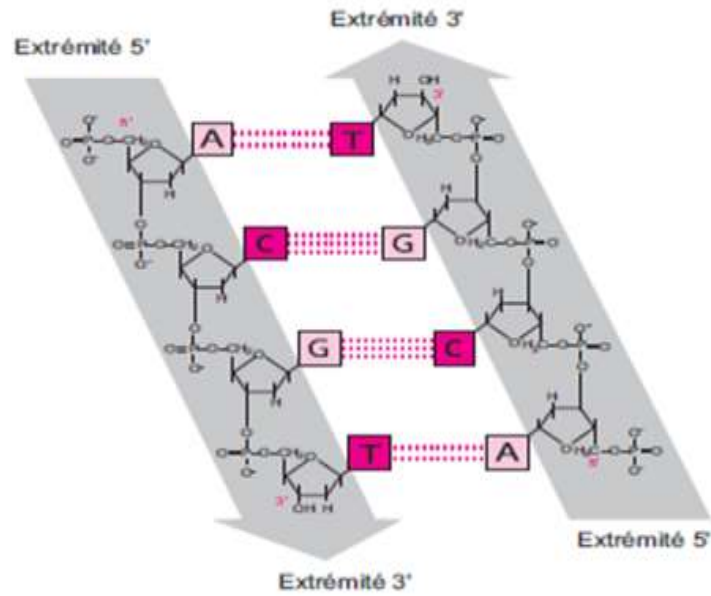


Figure 2: Structure des appariements complémentaires de deux brins antiparallèles d'ADN (MAFTAH et al, 2018)

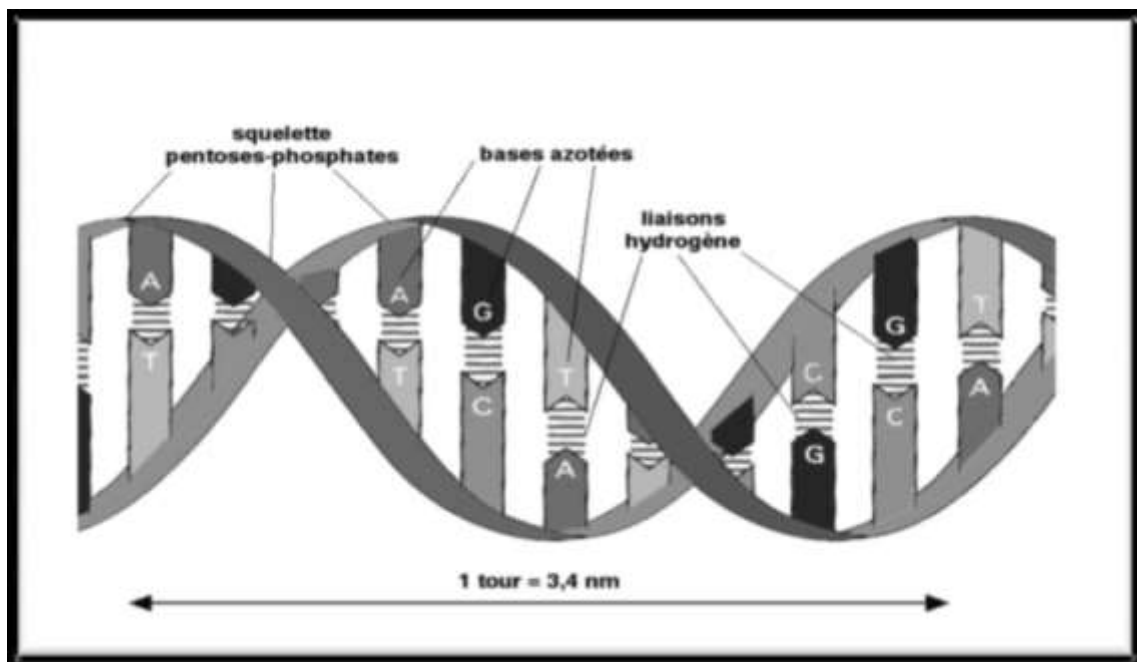


Figure 3: Illustration schématique qui représente l'enroulement des deux brins d'ADN (HOUSSET et RAISONNIER, 2009).

1.2. Propriétés physico-chimiques de l'ADN :

L'ADN possède plusieurs propriétés physico-chimiques qui sont :

- La structure de la double hélice donne une nature fibreuse à la molécule d'ADN dont les propriétés sont exploitées dans de nombreuses expériences de biologie moléculaire :

- Les alcools, et en particulier l'éthanol, précipitant les molécules d'ADN sous forme d'agglomérat en longues fibres.

- La charge des molécules à pH physiologique est négative et directement proportionnelle à la longueur (nombre de nucléotides).

- Quelle que soit l'origine de l'ADN, le nombre de purines est toujours égal au nombre de pyrimidines : $[Pur] = [Pyr]$ ou encore $[A] + [G] = [T] + [C]$, cette caractéristique est désignée sous le nom de règle de CHARGAFF 1940.

- Les proportions ($[A] + [T]$) et ($[G] + [C]$) ne sont pas égales et varient de 35 à 75% selon l'ADN.

- L'ADN présente une absorbance dans l'ultraviolet avec un maximum à 260nm. Quand il est dénaturé a une absorption à 260 nm plus élevée que l'ADN natif, d'un facteur 1,6. Cette propriété est appelée l'effet hyperchrome ou hyperchromicité (la fusion est accompagnée d'une augmentation de l'absorption de 40%).

L'absorption de l'ADN natif, à 260 nm, en fonction de la température (courbe de fusion), présente l'allure d'une sigmoïde : le point d'inflexion de cette courbe, qui correspond à la demi-variation d'absorbance, est la température de fusion de la molécule, notée T_m (melting temperature).

-Lors d'un refroidissement lent, l'absorption suit la courbe de fusion en sens inverse. Lors d'un refroidissement rapide, l'absorption ne suit pas la courbe de fusion en sens inverse mais une autre courbe qui n'aboutit à la même valeur originale.

-La température de fusion T_m de l'ADN est dépendante de la force ionique du milieu et qu'elle diminue lorsque cette dernière augmente (dans des milieux où $[NaCl] > 1M$). La valeur

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

de la température de fusion T_m est d'autant plus élevée que le pourcentage de bases G+ C est grand (TAFININE, 2018)

II. Expression de l'information génétique :

Pour remplir sa fonction de porteur d'information, l'ADN doit faire plus que juste se recopier. Il doit aussi exprimer cette information, c'est-à-dire permettre à cette information de guider la synthèse d'autres molécules dans la cellule. Cette expression se produit dans tous les organismes vivants grâce au même mécanisme, conduisant d'abord et avant tout à la synthèse de deux autres classes de polymères clés : les ARN et les protéines. (BRUCE et al, non daté)

2.1. Processus de réplication ou étapes de la réplication de l'ADN

1. Initiation

Selon BERG et al (2002) dans une cellule, la réplication de l'ADN commence à des emplacements spécifiques, ou des origines de réplication, dans le génome.

Les séquences utilisées par les protéines initiatrices ont tendance à être « riches en AT » (riches dans les bases adénine et thymine), car les paires de bases AT ont deux liaisons hydrogène (plutôt que les trois formées dans une paire CG) qui sont plus faciles à décompresser (JOHNSON, 2015), Une fois l'origine localisée, ces les initiateurs recrutent d'autres protéines et forment la pré-réplication complexe, qui décompresse l'ADN double brin. (TARIKU, 2018)

Les brins séparés de l'ADN sont stabilisés sous forme simple brin grâce à la fixation de protéines appelées SSB (pour « single strand binding »). Ces protéines SSB empêchent les deux brins d'ADN de se réapparier. (DAKAR, 2006)

2.Élongation :

Déroulement de l'ADN à l'origine et synthèse de nouveaux brins entraîne une croissance bidirectionnelle des fourches de réplication à partir de l'origine. une nombre de protéines sont associées à la fourche de réplication qui aide en termes d'initiation et de poursuite de la synthèse de l'ADN. Plus particulièrement, l'ADN polymérase synthétise le nouvel ADN en ajouter des nucléotides complémentaires au brin matrice. (DAKAR, 2006)

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

La fourche de réplication est une structure qui se forme au sein du noyau lors de la réplication de l'ADN. Il est créé par des hélicases, qui rompent les liaisons hydrogène qui maintiennent les deux brins d'ADN ensemble. La structure résultante a deux "branches" ramifiées, chacune constituée d'un seul brin d'ADN. Ces deux brins servent de modèle pour les brins avant et arrière, qui sera créé comme l'ADN polymérase correspond à des nucléotides complémentaires aux modèles ; les modèles peuvent être correctement appelés le modèle de brin principal et le modèle de brin retardé. L'ADN est toujours synthétisé dans le sens 5' vers 3', Depuis le leader et les modèles de brins retardés sont orientés dans des directions opposées à la fourche de réplication.

- **Le brin principal :** est le brin d'ADN naissant qui est synthétisé dans le même sens que la réplication croissante fourchette. Une polymérase « lit » le modèle de brin principal et ajoute nucléotides complémentaires au brin leader naissant sur une base continue.
- **Le brin retardé :** est le brin d'ADN naissant dont la direction de synthèse est opposée à la direction de la réplication croissante fourchette.

Le brin retardé est synthétisé en segments courts et séparés. Au la matrice de brin en retard, une primase « lit » l'ADN matrice et initie la synthèse d'une courte amorce d'ARN complémentaire. UNE L'ADN polymérase étend les segments amorcés, formant Okazaki fragments. Les amorces d'ARN sont ensuite retirées et remplacées par L'ADN et les fragments d'ADN sont reliés entre eux par l'ADN ligase. (TARIKU, 2018)

3. La terminaison :

Les fragments d'ADN deviennent contigus et sont soudés les uns aux autres par l'intervention d'une enzyme qui est une DNA-ligase. (DAKAR, 2006)

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

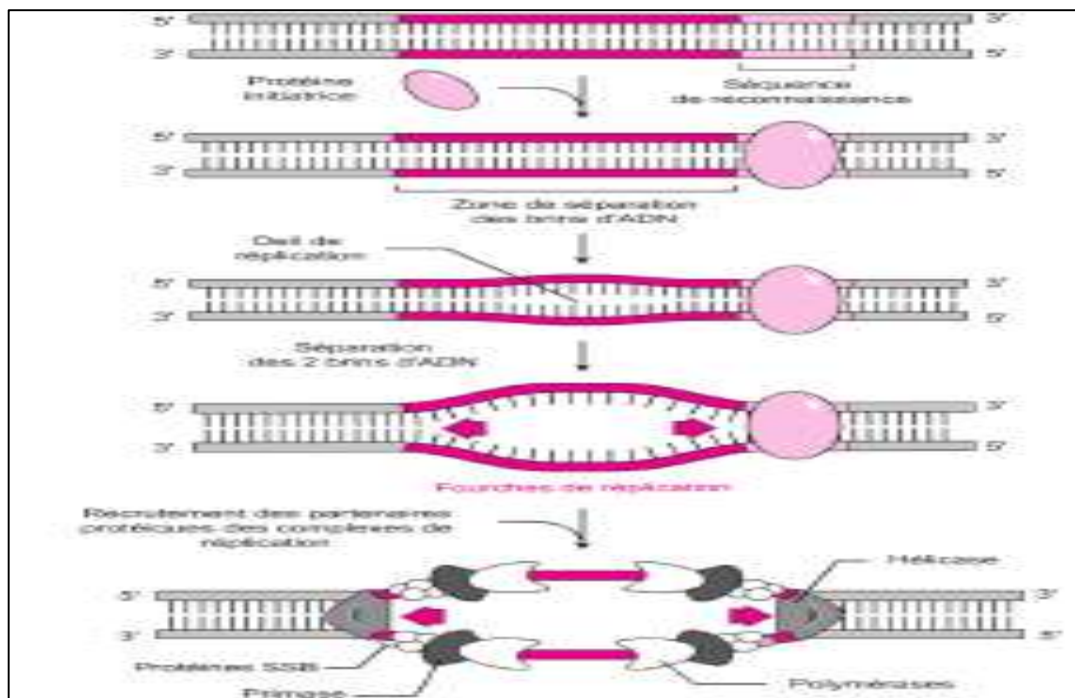
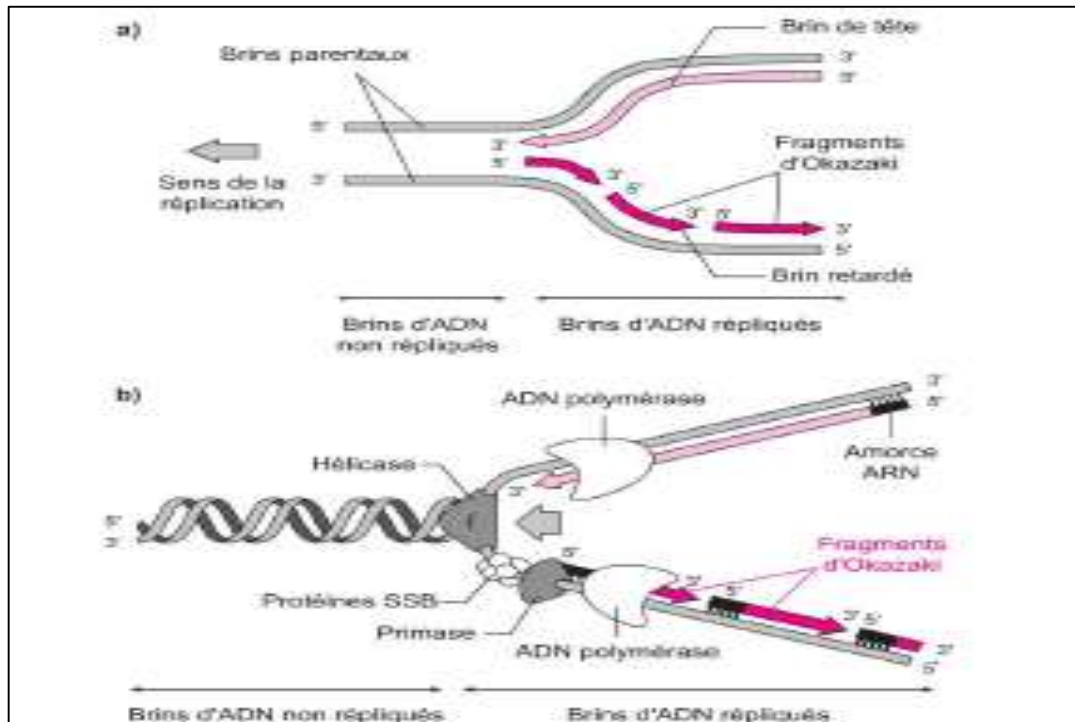


Figure 4: Mécanisme de la réplication (Ag Belarbi-,2019)

2.2.Étapes de la réplication de l'ADN chez les eucaryotes :

1. Les origines de réplication

Chez tous les eucaryotes, la réplication démarre au niveau de sites spécifiques appelés « origines de réplication ». Chez les eucaryotes supérieurs, les caractéristiques des origines de réplication ne sont pas clairement établies, bien qu'une étude récente mette en évidence la présence de motifs nucléotidiques spécifiques autour des origines de réplication (CAYROU et al, 2011)

2. L'initiation de la réplication :

Le processus de réplication débute en G1 avec la fixation séquentielle aux origines de plusieurs protéines qui forment le complexe pré-répliatif (pré-RC). A la transition G1/S, l'action des S-CDK (CDKs spécifiques de phase S) et de DDK (DBF4-dependent kinases) permet le recrutement de facteurs d'initiation au niveau des origines, l'ouverture de l'ADN et l'engagement des ADN polymérases répliatives (LABIB, 2010).

3. L'élongation de la réplication :

L'ADN polymérase α associée à la primase initie une courte amorce d'ARN, qui va permettre la synthèse initiale d'ADN. Le complexe RFC se lie à la jonction entre l'amorce et la matrice et catalyse le recrutement de PCNA (Pol30 chez *S cerevisiae*) qui encercle l'ADN. PCNA sert de plateforme au niveau de la fourche de réplication dans le but de coordonner la réplication avec plusieurs autres mécanismes tels que l'assemblage des nucléosomes ou l'établissement de la cohésion (MOLDOVAN et al, 2007). Les polymérases Pol α ou Pol β , plus processives que Pol γ , sont alors recrutées pour synthétiser la majorité de l'ADN. Ces polymérases possèdent une activité 3'-5' exonucléase de « proof-reading » qui réduit fortement les erreurs d'incorporation de nucléotides. Les deux brins d'ADN sont synthétisés par des mécanismes différents. Le brin précoce est synthétisé de façon continue dans le sens 5'-3' par Pol (PURSELL et al, 2007). Le brin retardé orienté 3'-5' est synthétisé de manière discontinue, par Pol γ sous forme de fragments d'Okazaki, dans le sens inverse de progression de la fourche (NICK MCELHINNY et al, 2008). Les fragments d'Okazaki sont ensuite maturés et fusionnés

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

par l'ADN ligase I (Cdc9 chez *S. cerevisiae*). Bien que la synthèse des deux brins ait lieu en sens opposé, la fourche forme un seul complexe homogène : le réplisome. (Julien, 2011)

4. Le checkpoint de réplication :

Chez tous les eucaryotes, le checkpoint de réplication (CR) empêche le désassemblage (ou 10 collapse) des fourches de réplication arrêtées et ralentit la progression en phase S (NYBERG et al, 2002). En l'absence du checkpoint de réplication l'arrêt des fourches induit par des agents génotoxiques comme l'Hydroxyurée (HU) ou le Methyl MethaneSulfonate (MMS) est irréversible (LOPES et al, 2001 ; TERCERO and DIFFLEY, 2001). Ceci est dû à la formation d'intermédiaires de réplication anormaux (SOGO et al, 2002). Le checkpoint stabilise les ADN polymérasés des fourches arrêtées et empêche le désassemblage du réplisome (LOPES et al, 2001 ; TERCERO et al, 2003).

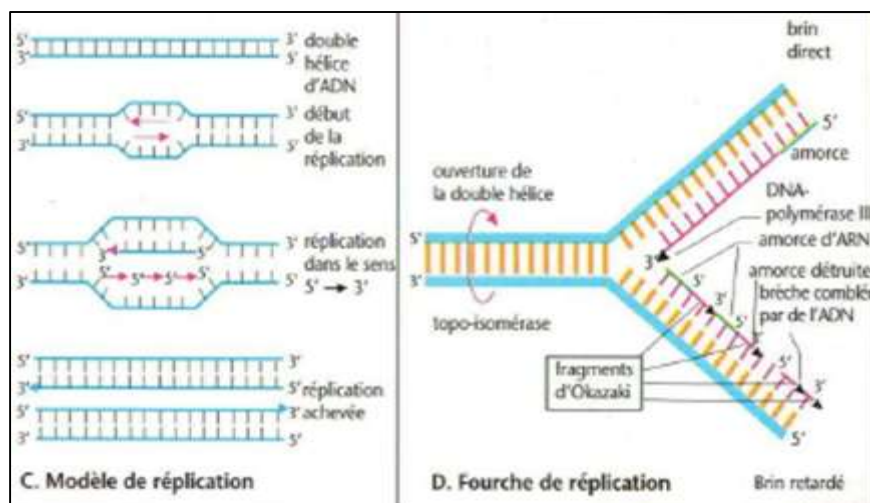


Figure 5: La replication chez les eucaryotes (AG BELARBI-,2019)

2.3.Étapes de la réplication de l'ADN chez les procaryotes :

L'ADN procaryote est circulaire et présente une seule origine de réplication.

Le temps nécessaire à la réplication du chromosome d'E coli est rapide et peut descendre à 40 minutes. (AG BELARBI-,2019)

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

La plupart des bactéries ne passent pas par un cycle cellulaire bien défini mais au lieu de cela, copiez continuellement leur ADN ; lors d'une croissance rapide, cette peut entraîner la survenance simultanée de plusieurs séries de réplication. (SLATER, 1995)

, la réplication d'ADN est régulée par plusieurs mécanismes, notamment : l'hémiméthylation et la séquestration de la séquence d'origine, le rapport de l'adénosine triphosphate (ATP) à l'adénosine diphosphate (ADP) et les niveaux de protéine DnaA. Tous ces contrôles la liaison des protéines initiatrices aux séquences d'origine Cet ADN hémiméthylé est reconnu par la protéine SeqA, qui lie et séquestre la séquence d'origine ; de plus, l'ADNA (nécessaire pour l'initiation de réplication) se lie moins bien à l'ADN hémiméthylé. Comme un résultat, les origines nouvellement répliquées sont empêchées immédiatement initier un autre cycle de réplication de l'ADN. (REECE et al, 1991)

L'ATP s'accumule lorsque la cellule est dans un milieu riche, déclenchant La réplication de l'ADN une fois que la cellule a atteint une taille spécifique. ATP est en concurrence avec l'ADP pour se lier à l'ADNA, et le complexe DnaA-ATP est capable de lancer la réplication. Un certain nombre de protéines DnaA sont également requis pour la réplication de l'ADN. Chaque fois que l'origine est copiée, le nombre de sites de liaison pour l'ADNA double, nécessitant la synthèse de plus d'ADNA pour permettre une autre initiation de réplication. (TARIKU, 2018)

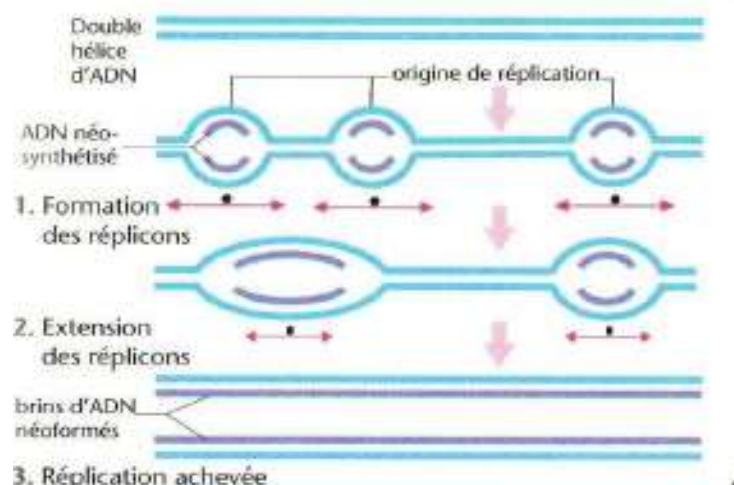


Figure 6: La replication chez les procaryotes (AG BELARBI, 2019)

3 .La transcription :

La transcription : c'est la production d'une copie de l'ADN en ARN messager (ARN = Acide RiboNucléique), qui a une structure chimique très proche. (PELIN PELIT et al, 2014) Et ensuite la conversion de cet ARN en protéine. Lorsque l'information génétique de l'ADN de chaque individu (génotype) est convertie en protéines, il révèle le caractère unique de l'individu caractères (phénotype). (GRIFFITHS et al, 2000)

La transcription est initiée à partir de une région appelée promoteur, qui est d'abord liée par rapport protéines chez les bactéries et les eucaryotes. (GAGNIUC et al, 2013)

➤ **Promoteur** : Promoteur qui sert de point de contrôle dans la régulation de la transcription des gènes est une région du segment d'ADN vers 5' prime du gène. Il comprend des éléments de des séquences d'ADN spécifiques reconnues par les protéines du facteur de transcription

➤ **Promoteurs procaryotes** : Les promoteurs des procaryotes sont composés de deux courtes séquences du site de démarrage de la transcription qui sont situés en amont à -10 et -35 pb (paires de bases) position.

➤ **Promoteurs eucaryotes** : ces promoteurs s'étendent généralement vers 5' du gène et ont divers éléments éloignés du site de démarrage de la transcription. (PELIN PELIT et al, 2014)

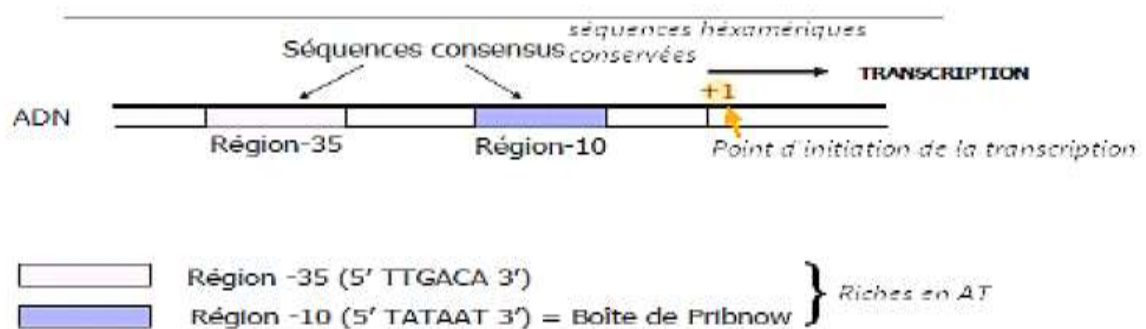


Figure 7: le Promoteur chez les procaryotes [https:// spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files](https://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files)

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

3.1.Étapes de la transcription chez les procaryotes :

1. L'initiation :

L'ARN polymérase réalise la polymérisation de ribonucléotides face à un bras d'ADN de 5 vers 3. Cette enzyme grâce à son facteur σ ; est capable d'assurer la reconnaissance de séquences spécifiques situées l'égerment en amant du point d'initiation de la transcription (+1). (PELIN PELIT et al, 2014)

2. Elongation

Le core-enzyme continue la polymérisation toute en déroulant l'ADN en aval et en le ré-enroulant une fois la séquence copié.

1. Les premiers nucléotides de la chaîne d'ARN formée, ne sont pratiquement jamais ceux que l'on retrouve dans l'ARN traduit.

2. Des nucléases enlèvent quelques nucléotides ; parfois un clivage plus éloigné se produit. Ce qui sera important, en fait, c'est le codon d'initiation pour la traduction, et les séquences d'ARN permettant l'interaction avec le ribosome. (PELIN PELIT et al, 2014)

3. La terminaison :

La terminaison de la chaîne est assurée par des séquences particulières appelées signaux de terminaison. Un signal de terminaison est précédé par des sites dits de pause où la polymérase sera ralentie. Ces sites sont, soit des séquences riches en G-C, difficiles à ouvrir, soit des structures à caractère palindromique, c'est-à-dire présentant une symétrie (PELIN PELIT et al, 2014)

3.2.Étapes de la transcription chez les eucaryotes :

La transcription eucaryote est plus compliquée. Il y a quelques raisons à cela complexant, avant L'enzyme ARN polymérase II commence la synthèse d'ARN, elle nécessite la liaison de nombreuses protéines au promoteur. Alors que certaines de ces protéines connues sous le nom

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

de transcription générale les facteurs se lient à l'ADN avant que l'enzyme ne se lie, certains d'entre eux se lient après la liaison de l'enzyme.

Le matériel génétique des cellules chez les eucaryotes est stocké dans le noyau, la synthèse d'ARN a lieu dans le noyau et nécessitent d'être traités avant le transfert du noyau au cytoplasme pour la traduction. Aussi, l'ADN génomique matrice est organisé en chromatine. Certaines structures de la chromatine peuvent empêcher l'accès à l'ADN. Cette caractéristique de la chromatine rend la régulation des gènes eucaryotes très mécanisme complexe. (GRIFFITHS et al, 2000 ; KUEHNER et al, 2011 ; HENTZE, 2001)

4. La traduction :

L'ARN est le messager de l'information génétique, et son message se traduit par la synthèse d'une protéine. Les protéines ainsi produites par l'organisme jouent des rôles physiologiques divers : rôle structural (membranes des cellules, etc.), biosynthèse de molécules indispensables à la vie (glucides, lipides, acides nucléiques), rôle de messagers (hormones) (GIOVANNANGELI,

Les éléments nécessaires à la traduction :

- l'ARNm qui indique, par un codage nucléotidique, l'ordre (ou séquence) des acides aminés qui seront incorporés dans la chaîne polypeptidique par le ribosome.
- les ribosomes qui sont des organites cytoplasmiques constitués par l'assemblage de deux sous-unités protéiques (une grande et une petite) et d'ARNr.
- les ARNt qui servent d'adaptateurs entre l'ARNm et l'acide aminé. Ils possèdent un site d'accrochage des acides aminés à leur extrémité 3' (séquence 5'-CCA-3') et un site appelé anti-codon qui reconnaît le codon complémentaire sur l'ARNm.

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

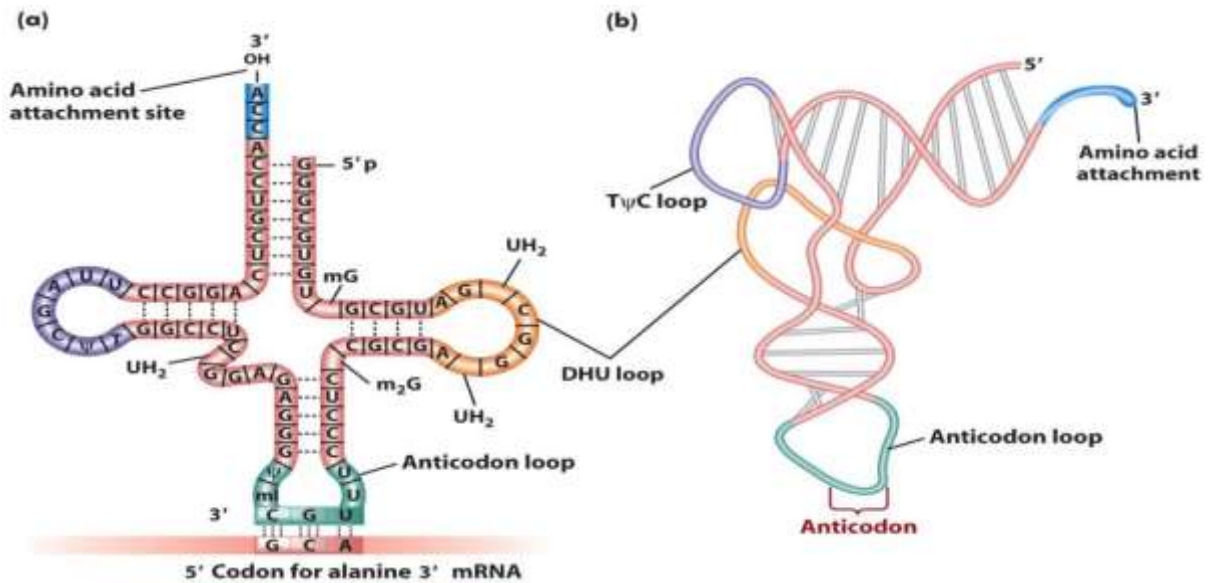


Figure 8: ARNT molécule (GRIFFITHS, 2004).

- les acides aminés qui vont se lier les uns aux autres (liaison peptidique) pour constituer la protéine.
- une enzyme, l'aminocyl-ARNt synthase, qui lie l'aminocyl (ou acide aminé) à l'ARNt qui lui correspond. C'est ce complexe. (DAKAR, 2006)

4.1. La traduction chez les procaryotes :

1. Initiation :

Le démarrage de la traduction se fait par l'association des ribosomes à un autre élément crucial. Il s'agit de l'ARNt. L'ARNt du premier codant est assez particulier. Il est appelé ARNt-FMet initiateur ; ce dernier porte la Formylméthionine.

L'ARNt-FMet va alors se fixer au niveau du site P de la petite sous unité 30 S du ribosome et il va se lier avec le codon AUG de l'ARNm.

Après l'assemblage et la stabilisation, la grande sous unité 50S va s'associer à la sous unité 30S pour former le complexe d'initiation de la traduction (LUCETTA, 2009).

Chapitre I : généralité sur la biologie moléculaire

2. L'élongation :

Après la formation du complexe d'initiation le site E est libre, le site P est occupé par l'ARNt-fMet, le site A est libre (LUCHETTA, 2009).

3. Terminaison

Les facteurs de terminaison (RF) interviennent lorsque le site A du ribosome arrive à un codon stop. (LUCHETTA, 2009)

4.2. La traduction chez Les eucaryotes :

1. l'initiation :

Durant laquelle les sous-unités ribosomiques s'assemblent sur l'ARNm et se positionnent sur le codon d'initiation. (HELENE, 2012)

2. L'élongation

La protéine est synthétisée lors de l'élongation par ajout successif d'acides aminés au peptide en cours de synthèse. Chaque ajout peut être décrit comme un cycle de 4 étapes :

- a) Reconnaissance du codon par un ARNt aminoacylé.
- b) Accommodation de l'ARNt aminoacylé au site A.
- c) Transfert de la chaîne peptidique présente au site P sur l'acide aminé au site A.
- d) Translocation :
 - De l'ARNm
 - De l'ARNt déacylé du site P au site E
 - De l'ARNt peptidyl du site A au site P (HELENE, 2012)

3. La terminaison

La terminaison se produit lorsqu'un des 3 codons stop (UAA, UAG ou UGA) entre au site A. (HELENE, 2012)

== == == == == == == == == == == ==
	CHAPITRE II : ÉTUDE	
	MOLECULAIRE D'ASPERGILLUS	
	SECTION FLAVI	
L == == == == == == == == == == == ==

Chapitre II : Étude moléculaire d'Aspergillus section flavi

I. Les champignons

1-Aperçu sur les Champignons :

Les champignons ou les mycètes sont des organismes uni- ou pluricellulaires incluant des espèces macroscopiques (*macromycètes*) et d'autres microscopiques (*micromycètes*), d'aspect filamenteux ou levuriforme.

Les champignons sont ubiquitaires et se trouvent partout dans la nature. Leur rôle essentiel est la biodégradation et le recyclage des matières organiques. Il s'agit de microorganismes hétérotrophes qui nécessitent une source de carbone et d'azote pour leur développement. Dans la classification du monde vivant, les mycètes constituent un règne distinct de celui des végétaux et des animaux (CHABASSE et al, 2002).

Leur particularité morphologique est d'être étroitement liée à leur substrat nutritif grâce à un réseau mycélien très développée. Leur reproduction est aussi une caractéristique remarquable.

En fait, les champignons produisent un très grand nombre de spores, ce qui leur assure un grand pouvoir de diffusion ou de contamination. Ces spores sont issus de deux modalités de reproduction sexuée ou asexuée. Les micromycètes deviennent parfois visibles lorsqu'elles forment de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères. C'est ce qu'on appelle les moisissures (CHABASSE et al, 2002).

2-Identification des champignons :

Les champignons sont le deuxième plus grand groupe d'organismes eucaryotes sur terre avec des estimations allant de 1,5 à 5,1 millions d'espèces (HAWKSWORTH, 2001 ; BLACKWELL, 2011) et seulement environ 5 à 6 % d'entre eux ont été décrits (DULLA et al, 2016). Ils ont des rôles essentiels dans le cycle des nutriments, la santé végétale et animale, la décomposition organique, la protection de l'environnement protection et symbioses mutualistes

Chapitre II : Étude moléculaire d'Aspergillus section flavi

obligatoires avec les plantes, les algues et les cyanobactéries (GADD, 2013 ; GROSSART et al, 2016). Par conséquent, une identification rapide et fiable des champignons au le niveau des espèces est critique pour de nombreux domaines de recherche tels que la taxonomie, la biodiversité, l'écologie, conservation et santé (MARTIN et al, 2011 ; ARAUJO, 2014 ; XU, 2016). Les champignons présentent une large variété de tailles, de formes et de couleurs, des levures monocellulaires microscopiques aux filaments et champignons et moisissures multicellulaires (BADOTTI et al, 2018). Le royaume se compose d'une immense variété d'organismes présentant des habitats, des fonctions et des stratégies de vie différents.

Une telle hétérogénéité rend l'identification un processus complexe et difficile (RAJA et al, 2017). L'identification classique basée sur la morphologie souffre de plasticité phénotypique et la variabilité génétique, ce qui peut conduire à des interprétations erronées. Par conséquent, les données moléculaires les données morphologiques complémentaires sont très prometteuses pour la délimitation et l'identification des espèces, classification taxonomique et inférence phylogénétique. Les données moléculaires sont basées sur la variabilité des séquences d'ADN d'espèces étroitement apparentées et ont été appliqués à déterminer les espèces fongiques depuis les années 1990 (WHITE et al, 1990 ; BRUNS et al, 1991).

Le terme codage à barres ADN a été inventé en 2003 en tant que technique moléculaire, qui utilise une région d'ADN courte, variable et standardisée pour l'identification des espèces et la phylogénie (HEBERT et al, 2003, DULLA et al, 2016). C'est une méthode rapide, précise et standardisée très prometteur pour l'identification au niveau de l'espèce, en particulier dans les régions peu étudiées et des groupes taxonomiques complexes (AGY et EHF, 2015 ; GRILLI et al, 2016 ; IRINYI et al, 2016).

Le code-barres ADN est utilisé non seulement pour identifier un échantillon inconnu en comparant la séquence à la bibliothèque d'ADN de référence (LIIMATAINEN, 2013) mais aussi pour résoudre des problèmes phylogénétiques relations avec d'autres taxons (STIELOW et al, 2015 ; RAJA et al, 2017).

II. Identification des moisissures par les outils moléculaires

La méthode traditionnelle de l'identification des moisissures est fondée sur les caractéristiques morphologiques. Cette identification nécessite une culture, parfois sur des milieux spécifiques, pendant 7 jours minimum afin d'obtenir la formation des conidies.

L'absence de l'apparition des conidies rendra impossible l'identification du mycélium.

D'autre part, la présence d'un très grand nombre d'espèces au sein d'un seul genre rend la distinction très difficile et nécessite un haut degré de spécialisation. En outre, les changements constants dans la taxonomie peuvent conduire à une mauvaise identification et une fausse

évaluation de son potentiel toxigène. Par conséquent, de nombreuses études visant à développer des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire, essentiellement sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction), ont été réalisées. L'identification par PCR est utilisée aussi bien en mycologie médicale qu'en mycologie alimentaire. De nombreux travaux utilisent la biologie moléculaire pour dépister les souches fongiques toxigènes (NIESSEN, 2007). Les outils de biologie moléculaire sont également utilisés pour prédire le risque potentiel des mycotoxines par la quantification des espèces toxigènes (NIESSEN, 2007).

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

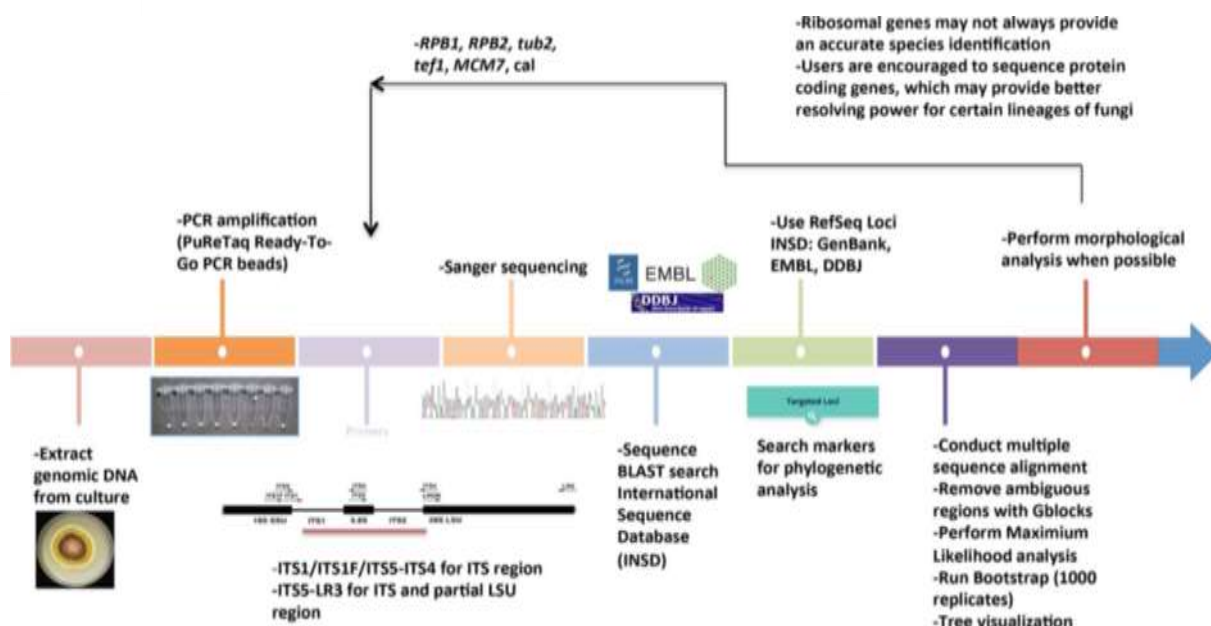


Figure 9: Organigramme pour l'identification fongique à l'aide de l'analyse phylogénétique moléculaire. (HUZEFA et al,2021)

I.1. Gènes utilisés pour classer les champignons :

Les méthodes traditionnelles qui reposent uniquement sur des caractères morphologiques peuvent ne pas être suffisantes quand en particulier les spécimens sont morphologiquement très similaires et inclus dans des taxons. Par conséquent, une méthode d'identification plus simple, plus rapide et plus fiable est nécessaire pour éliminer les erreurs d'identification. Les données moléculaires sont devenues inestimables pour l'identification des taxons, étudier la taxonomie et la phylogénie surtout lorsque les caractères morphologiques sont insuffisants ou indisponibles pour une affectation correcte des espèces à des spécimens inconnus (MUTANEN et al, 2015 ; GHORBANI et al, 2017).

Les séquences d'ADN de différents marqueurs peuvent être utiles pour déterminer les espèces cryptiques au sein des espèces fongiques précédemment décrites et pour contribuer à la biodiversité du microbiote. Cependant, la voie vers l'adoption d'un champignon code-barres comportait un grand nombre de rebondissements (SEIFERT, 2009). Utilité et succès de ce marqueur ou le code-barres dépend essentiellement de la vitesse d'évolution, de la longueur de la séquence et régions flanquantes conservées (YANG et RANNALA, 2012 ; GIUDICELLI et al, 2015). Le marqueur idéal comprend une petite partie de l'ADN de 500 à 800

Chapitre II : Étude moléculaire d'Aspergillus section flavi

pb, avec un inter- et une faible divergence de séquence intra-espèce, et amorces spécifiques délimitant la région (STIELOW et al, 2015).

Les régions codantes et non codantes peuvent être utilisées comme codes-barres ADN et déterminer la ou les régions potentielles en tant que code-barres est l'une des étapes les plus importantes pour identifier un spécimen. Les codes-barres d'ADN courants proposés pour les champignons sont le noyau transcrit interne espaceur (ITS) des gènes de l'ARN ribosomique, et les gènes nucléaires codant pour le ribosome grande sous-unité (LSU; ARNr 28S) et petite sous-unité (SSU, ARNr 18S), le cytochrome sous-unité 1 de l'oxydase (COX1, COI), la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (RPB1), deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (RPB2), -tubuline, maintenance des minichromosomes composant complexe 7 (MCM7), facteur d'allongement translationnel 1- α (TEF1- α), γ -actine, sixième sous-unité de l'ATP synthase (ATP6) et de la calmoduline (CaM). Chacun de ces codes-barres les régions peuvent être utilisées seules ou avec différentes combinaisons pour déterminer les espèces et relations phylogénétiques (NOVA, 2019)

1.1. Région ITS :

La région ITS est présente sous toutes les formes vivantes et préservée de manière évolutive pendant longtemps.

Il a une importance biologique importante dans le traitement de l'ARN ribosomique (ARNr). ARNr forme des structures secondaires spécifiques qui sont nécessaires pour une reconnaissance correcte des sites ribosomiques et fournissent les sites de liaison pour les protéines ribosomiques pendant le ribosome maturation. Chez les champignons, les gènes codant pour les ARNr sont organisés en puces qui contiennent unités transcriptionnelles répétitives impliquant les ARNr 18S, 5.8S et 28S, deux transcrits intergéniques entretoises ITS1 et ITS2 (fig. 10). Même si de nombreuses études ont été réalisées pour indiquer l'utilité des codes-barres ADN pour un taxon spécifique, il a été observé que l'ADN potentiel les codes à barres varient d'une espèce à l'autre. En 2007, les participants du All Fungi Barcoding réunion a accepté que la région ITS du gène de l'ARNr nucléaire était la plus appropriée candidat au code-barres du royaume fongique (ROSSMAN, 2007). De plus, les membres de le Fungal Working Group (FWG) du Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ont comparé quatre marqueurs, trois régions de l'ADN ribosomique nucléaire (ITS, LSU, SSU) et un gène codant

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

pour une protéine (RPB1) et la région ITS proposée comme code-barres fongique principal marqueur. La région a été largement utilisée pour l'identification des espèces (SMITH et al, 2013), les phylogénies au niveau des espèces (HARROWER et al, 2011) et les études de codage à barres de l'ADN (SCHOCH et al, 2014). Bien que la plupart des études aient indiqué la région ITS comme code à barres standard marqueur pour les champignons, données ITS dans la base de données internationale de séquences nucléotidiques (INSD : GenBank, EMBL et DDBJ) ont révélé que cette région n'est pas également variable dans tous les groupes de champignons (NILSSON et al, 2008)

L'espaceur transcrit interne ribosomique (ITS), une région très variable entre le des séquences conservées de la petite sous-unité, 5.8S, et des gènes d'ARNr de la grande sous-unité, a été adopté comme principal marqueur de code-barres ADN pour les champignons (SCHOCH et al, 2012 ; SEIFERT et al, 2012)

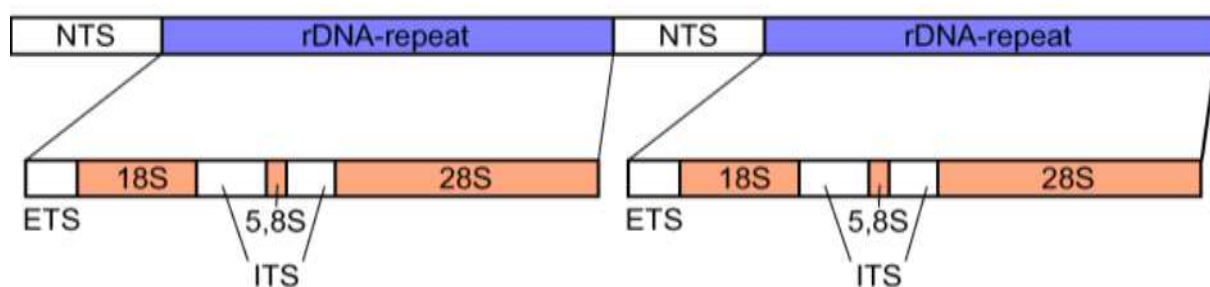


Figure 10: Diagramme montrant la technologie ADNr. <https://euro-fbp.org>

1.2. Gènes LSU et SSU :

Bien que la région ITS ait été proposée comme code à barres standard pour les champignons (SCHOCH et al, 2012), d'autres régions de l'ARNr restent également des choix populaires en tant que codes-barres fongiques. Les Gène nLSU (28S Nuclear ribosomal large subunit rRNA) situé immédiatement en aval de la région ITS est largement utilisé pour élucider les questions de phylogénie fongique (BRUNS et al, 1991). Surtout deux domaines hypervariables de LSU, D1 et D2, flanqués de relativement les régions conservées dans la plupart des champignons sont largement préférées pour les études (RAJA et al, 2017) (Fig.11). SSU (ARNr de grande sous-unité du ribosome nucléaire 18S) située immédiatement en amont de la région ITS évolue

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

lentement par rapport à ITS et LSU, ce qui entraîne une variation moindre parmi les taxons étudiés (MITCHELL et ZUCCARO, 2006).

La région LSU, en elle-même (VIZZINI et al, 2010 ; LIU et al, 2012 ; ACAR et al, 2017) ou en général combiné avec d'autres régions telles que ITS et SSU (TAYLOR et al, 2008 ; GEMM et al, 2009 ; SCHOCH et al, 2012 ; BROWN et al, 2014 ; MILLANES et al, 2016 ; TELLERIA et al, 2017 ; VIZZINI et al. 2018) est utilisé pour l'identification des espèces fongiques. (FELL et al, 2000 ; SCORZETTI et al, 2002).

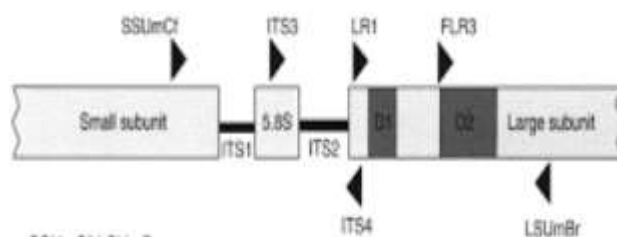


Figure 11: diagramme montrant les gènes codant pour l'ARNr

<https://jstor.org>

1.3. Gènes RPB1 et RPB2 :

Bien que les gènes d'ARNr soient les loci les plus couramment utilisés dans les études de systématique moléculaire des champignons, un pouvoir de résolution limité des SSU et LSU nucléaires peut être observé pour certains phylums fongiques. Des études ont manifestement démontré que l'utilisation de gènes codant pour des protéines est précieux pour déterminer des relations phylogénétiques profondes avec une prise en charge élevée des topologies déduits sur la base des gènes d'ARNr chez les champignons (LIU et al, 1999 ; MATHENY et al, 2002 ; TANABE et al, 2004). Le principal avantage de l'utilisation d'un gène codant pour une protéine est la présence d'une seule copie dans le génome fongique et éviter les pièges des paralogues. L'ARN polymérase II est une enzyme responsable de la transcription des gènes codant pour les protéines en transcrits pré-ARNm (MATHENY et al, 2002). La partie de début du RPB1 (encodant la plus grande sous-unité de ARN polymérase II) et région variable entre les domaines conservés 6 et 7 du RPB2 (codant la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II) (fig.12) les gènes ont un grand nombre de sites informatifs sur la parcimonie afin qu'ils puissent être utiles sur le plan phylogénétique pour étudier champignons à des

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

niveaux taxonomiques inférieurs (LIU et al, 1999 ; MATHENY et al, 2002 ; TANABE et al, 2002) es gènes RPB1 et RPB2 étaient phylogénétiquement plus efficaces que le ribosome nucléaire Gènes codant pour l'ARN pour la systématique moléculaire d'Ascomycota (DIEZMANN et al, 2004 ; HOFSTETTER et al, 2007).

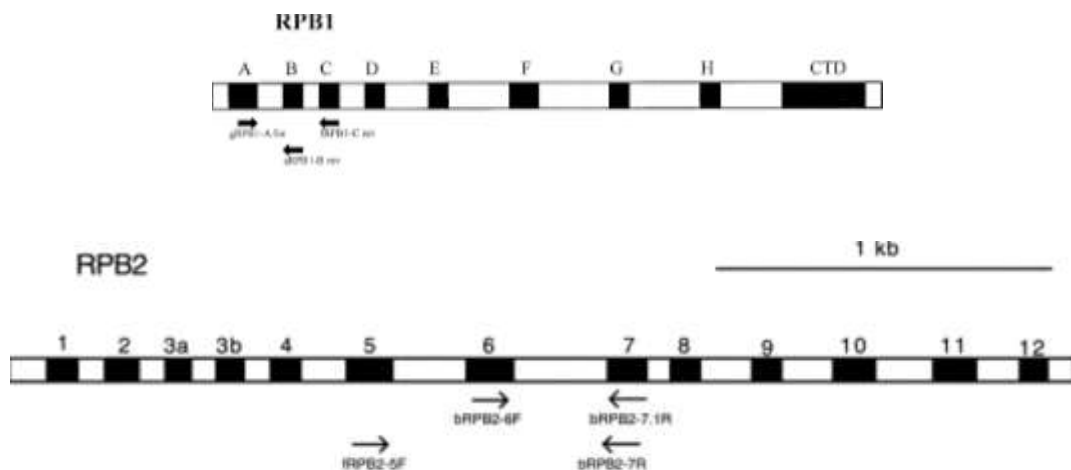


Figure 12: Schéma de principe des gènes RPB1 et RPB2. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com>

1.4. Gène de la β -tubuline :

Les gènes de la β -tubuline sont présents chez tous les eucaryotes, ce qui rend ce gène idéal pour analyse phylogénétique, notamment pour l'estimation des phylogénies profondes (EINAX et VOIGT, 2003). Les protéines de tubuline sont les principaux composants des microtubules qui jouent rôles cruciaux dans les processus cellulaires eucaryotes tels que la division cellulaire, le maintien de la forme, transport intracellulaire et motilité cellulaire. Ils constituent une famille de protéines impliquant (alpha)-, β (bêta)-, γ (gamma)-, (delta)-, ϵ (epsilon)-, (zêta)- et (êta)-tubulines (MCKEAN et al, 2001) et ils sont utilisés pour construire l'arbre fongique et résoudre les phylogénies de groupes d'espèces complexes (JAMES et al, 2006). Les tubulines et sont les plus tubulines abondantes dans la cellule eucaryote et situées ensemble dans un hétérodimère comme composant des microtubules. Les gènes codant pour les - et -tubulines ont été largement étudiés dans la plupart des principaux embranchements fongiques et ils se sont avérés utiles pour déterminer phylogénie fongique (CORRADI et al, 2004). En particulier, le gène de la β -tubuline reçoit une attention croissante dans l'étude des relations évolutives chez les champignons de du royaume au niveau de l'espèce (BALDAUF et al, 2000 ; EINAX et VOIGT, 2003)

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

1.5. Gène MCM7 :

MCM7, un composant clé du complexe des protéines de maintenance des minichromosomes (MCM), joue un rôle important dans l'initiation de la réplication de l'ADN et de la prolifération cellulaire. Les MCM7 s'est avéré être un marqueur supérieur pour les études phylogénétiques par rapport à de nombreux marqueurs codant pour les protéines (AGUILETA et al, 2008). L'utilité du gène au le niveau du genre a été prouvé par différentes études (SCHMITT et al, 2009 ; RAJA et al, 2011)

La séquence du gène peut être utilisée seule ou combinée avec d'autres marqueurs pour résoudre le genre relations de niveau en particulier à *Ascomycota*. RAJA et al. (2011) ont utilisé le gène MCM7 pour analyse phylogénétique moléculaire d'*Ascomycota* et a constaté qu'il était phylogénétiquement plus informatif que LSU qui est l'un des gènes les plus couramment utilisés pour *Ascomycota*. L'étude a proposé que la combinaison des données MCM7 et LSU puisse être utilisée pour résoudre les relations au niveau du genre même si MCM7 a montré une résolution légèrement meilleure et support par rapport à LSU. Utilité de la région seule ou combinée avec d'autres marqueurs a également été prouvée par plusieurs études (LEAVITT et al, 2011 ; HUSTAD et MILLER, 2015 ; DEL PRADO et al, 2016). MCM7 a été identifié comme le gène le plus puissant en termes de résolution, support statistique des nœuds, succès de l'amplification PCR et proposition comme marqueur de code-barres supplémentaire pour *Pestalotiopsis* après analyse de cinq marqueurs (SCHOCH et al, 2012). Même si la région des STI a été recommandée comme marqueur principal pour *Pestalotiopsis* s.l, de meilleurs résultats ont été observés si la région était complétée par le Gène MCM7 comme marqueur secondaire (SCHOCH et al, 2012 ; JUDITH-HERTZ, 2016).

1.6. Gène TEF1- α :

Le gène du facteur d'élongation traductionnelle 1-alpha (TEF1- α) code le gène hautement exprimé facteur d'allongement de la traduction protéine EF1 α qui est responsable de la réaction de liaison d'aminoacyl-ARNt (AA-ARNt) aux ribosomes (TRIANA-ALONSO et al, 1995).

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

1.7. TEF1- α pour *Ascomycota* :

De nombreuses souches appartenant à l'espèce du complexe *Fusarium* ont été analysées phylogénétiquement sur la base des séquences TEF-1 α et des arbres phylogénétiques distingués étroitement espèces apparentées et séparé clairement tous les taxons morphologiques (GEISER et al, 2004 ; DIVAKARA et al, 2014 ; CHEHRI et al, 2015 ; RAMDIAL et al, 2016)

La calmoduline (CaM) est un polypeptide monomère acide hautement conservé présent dans cellules eucaryotes et appartient à une grande famille de protéines liant le calcium (KRETSINGER, 1980). Le gène de la calmoduline a été indiqué comme précieux pour l'étude moléculaire de taxons appartenant au *Penicillium* (WANG et ZHUANG, 2007 ; Serra et Peterson 2007). En outre, SAMSON et al, (2014) ont proposé la calmoduline comme marqueur d'identification secondaire pour l'Espèce d'*Aspergillus*. Par conséquent, le gène de la calmoduline pourrait être proposé comme un nouveau marqueur pour *Ascomycota* (RANGEL-GAMBOA et al, 2016 ; AHMADI et al, 2016).

III. Réaction en chaîne de polymérase (PCR) :

La réplication de l'ADN peut également être réalisée in vitro (artificiellement, à l'extérieur d'une cellule). ADN polymérases isolées de cellules et artificielles Les amorces d'ADN peuvent être utilisées pour initier la synthèse d'ADN à des séquences dans une molécule d'ADN matrice. La chaîne polymérase réaction (PCR), une technique de laboratoire courante, s'applique cycliquement une telle synthèse artificielle pour amplifier un fragment d'ADN cible spécifique à partir d'un pool d'ADN. . (Tariku, 2018)

1. Principe de la PCR :

Le PCR C'est une réaction en chaîne, une molécule d'ADN est utilisée pour produire deux copies, puis quatre, puis huit et ainsi de suite. Ce doublement continu est accompli par des protéines connues sous le nom de polymérases, enzymes qui sont capable d'enchaîner la construction d'ADN individuel blocs pour former de longs brins moléculaires. À faire leur travail les polymérases nécessitent un apport d'ADN blocs de construction, c'est-à-dire les nucléotides constitués des quatre bases adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et la guanine (G). Ils ont aussi besoin d'un petit fragment d'ADN, appelé amorce, auquel ils attachent les

Chapitre II : Étude moléculaire d'Aspergillus section flavi

blocs de construction ainsi qu'un plus long Molécule d'ADN servant de modèle pour construire le nouveau brin. Si ces trois ingrédients sont fournis, les enzymes construisent des copies exactes des modèles. La PCR C'est un moyen d'amplifier sélectivement un segment particulier de ADN. Le segment peut représenter une petite partie de un mélange vaste et complexe d'ADN, par exemple un exon spécifique d'un gène humain. On peut penser comme photocopieur moléculaire. Le produit PCR peut être digéré par des enzymes de restriction, séquencé ou cloné. (GAURAV, 2012)

2. Étapes de la PCR :

Il y a trois étapes principales impliqués dans la technique PCR : dénaturation, renaturation et allongement.

1. dénaturation :

On parle d'un mélange contenant l'amorce présente en excès et du fragment d'ADN à amplifier, ce mélange d'amorce et de fragment est chauffé à environ 98°C. à cette température, le fragment d'ADN bicaténaire se dissocie en brin monocaténaire. (RAVEN et al, 2007).

2. renaturation :

La solution est ensuite refroidie à 60°C environ. En refroidissant, les brins isolés d'ADN se réassocient en brin bicaténaire.

Cependant, en raison de l'important excès d'amorce, chaque brin du fragment forme des paires de bases avec une amorce complémentaire voisine de la région à amplifier, le reste du fragment restant simple (RAVEN et al, 2007).

3. Extension de l'amorce :

On ajoute maintenant une ADN polymérase très thermostable, la polymérase Taq, ainsi qu'une provision des quatre nucléotides. À partir de l'amorce, la polymérase recopie le reste du fragment comme s'il répliquait l'ADN. Quand la synthèse est terminée, l'amorce a été allongée

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

d'une copie complémentaire de tout le fragment monocaténaire. Les deux brins d'ADN ayant été répliqués, on maintenant deux exemplaires du fragment d'origine. (RAVEN et al, 2007).

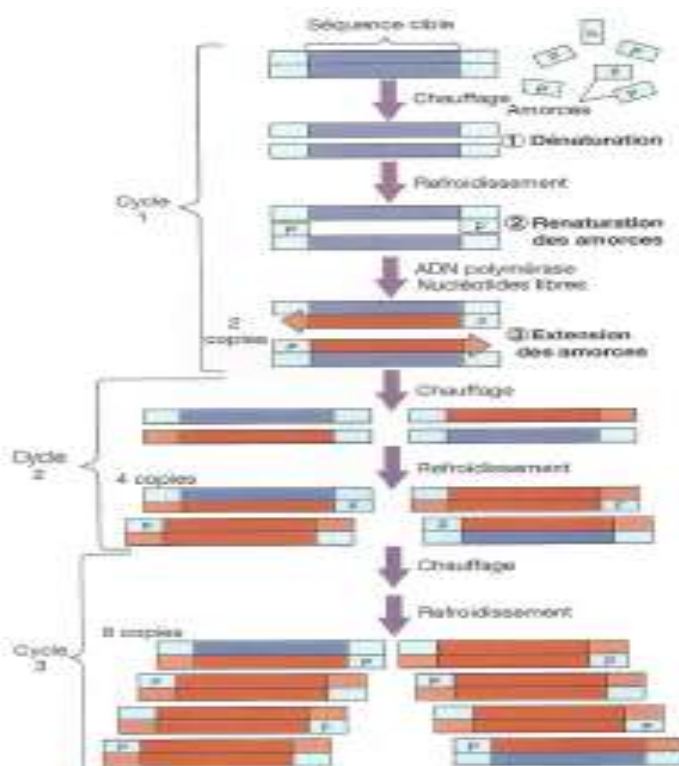


Figure 13: Étapes et schématisation de la PCR : une vision très simplifiée. D'après RAVEN et al, (2007).

IV. Classification du règne des *Fungi* :

Les eucaryotes, les bactéries et les archées constituent les trois domaines du vivant. Le domaine des eucaryotes est divisé en 5 groupes majeurs, parmi lesquels celui des *Unicontes*, qui comprend tous les eucaryotes primitivement uni-flagellés que sont les *Opisthcontes* et les *Amoebozoa*. Les champignons ou *Fungi* appartiennent au groupe des *Opisthcontes*, au même titre que les animaux. Les recherches portant sur l'évolution ont montré que les règnes fongique et animal sont plus proches entre eux qu'ils ne le sont des autres domaines du vivant (BALDAUF et PALMER 1993 ; BALDAUF, 2008 ; MCLAUGHLIN et al, 2009 ; SPATAFORA et al, 2017). Le règne fongique comprend de très nombreux organismes très

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

différents les uns des autres et regroupés dans différentes divisions, ou embranchements. Les premiers organismes fongiques seraient apparus il y a un milliard d'années (LÜCKING et al, 2009 ; PRIETO et WEDIN, 2013), sous une forme unicellulaire, vivant dans des environnements aquatiques et se reproduisant via des spores asexuées propulsées par un flagelle. Ces organismes seraient similaires à ceux retrouvés aux premiers embranchements de la classification fongique (les 11 *Cryptomycota*, *Chytridiomycota* et *Blastocladiomycota*), qui produisent également des spores mobiles et vivent majoritairement dans des environnements aquatiques (Fig.14). *Les Microsporidia* ont également été placés avec ces trois groupes, bien qu'à ce jour, les spores des espèces de ce groupe n'aient jamais été décrites comme mobiles (TORRUELLA et al, 2015).

Mucoromycota, dont les espèces sont caractérisées par la production d'une spore à paroi très épaisse appelée *zygospore*. Les deux derniers *phyla*, *Ascomycota* et *Basidiomycota* sont capables de former des structures complexes destinées à la production des spores.

Les deux *phyla* ou divisions suivants dans l'évolution fongique sont *les Zoopagomycota* et *les Mucoromycota*, dont les espèces sont caractérisées par la production d'une spore à paroi très épaisse appelée *zygospore*. Les deux derniers *phyla*, *Ascomycota* et *Basidiomycota* sont capables de former des structures complexes destinées à la production des spores. (LAURA ,2018)

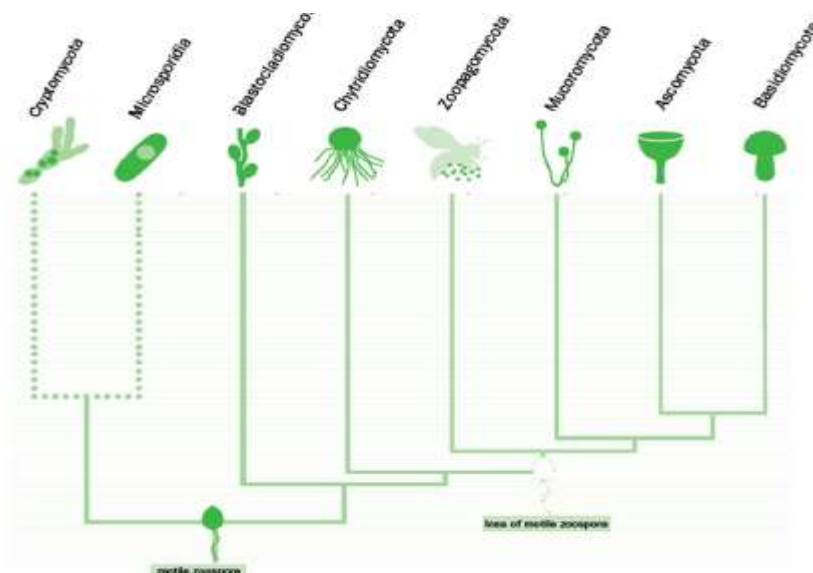


Figure 14: Arbre représentatif de la classification du règne des Fungi (adapté de WILLIS, 2018)

Chapitre II : Étude moléculaire d'Aspergillus section flavi

1. Genre *Aspergillus* :

Les Aspergillus sont des champignons filamenteux, (PRESCOTT et al, 1993).

Aspergillus est un genre diversifié à fort impact économique et social. Les espèces sont présentes dans le monde entier dans divers habitats et elles sont connues pour gâcher la nourriture, produire des mycotoxines et sont fréquemment signalées comme pathogènes pour l'homme et les animaux. De plus, de nombreuses espèces sont utilisées en biotechnologie pour la production de divers métabolites tels que des antibiotiques, des acides organiques, des médicaments ou des enzymes, ou comme agents dans de nombreuses fermentations alimentaires. (SAMSON et al, 2014)

2. Caractères morphologiques de genre *Aspergillus* :

Aspergillus est un genre de moisissures nommé d'après la structure morphologique qui porte spores asexuées, l'*Aspergillum*, qui ressemble à un dispositif liturgique. Ce genre contient plusieurs espèces d'importance économique positive ou négative dans l'industrie, agriculture et médecine. La majorité des *Aspergillus*, y compris la plupart des espèces d'importance économique, ne se reproduisent que par des spores asexuées (JOAN WENNSTROM, 2009)

Le genre *Aspergillus* se distingue par la présence d'une vésicule, extrémité renflée du conidiophore (tige) portant phialides (metulae) en une ou deux séries. Les phialides portent des chaînes de conidies cylindriques ou divergentes (radiées). Les conidies restent attachées les unes aux autres par un pont conjonctif (disjoncteur), qui peut être bien visible ou presque invisible.

Les conidies sont portées de façon basipétale, la plus jeune conidie étant à la base et la plus ancienne étant à l'extrémité de la chaîne. Les colonies du champignon sont généralement à croissance rapide, poudreuses, blanches, jaune verdâtre, brunes ou noires.

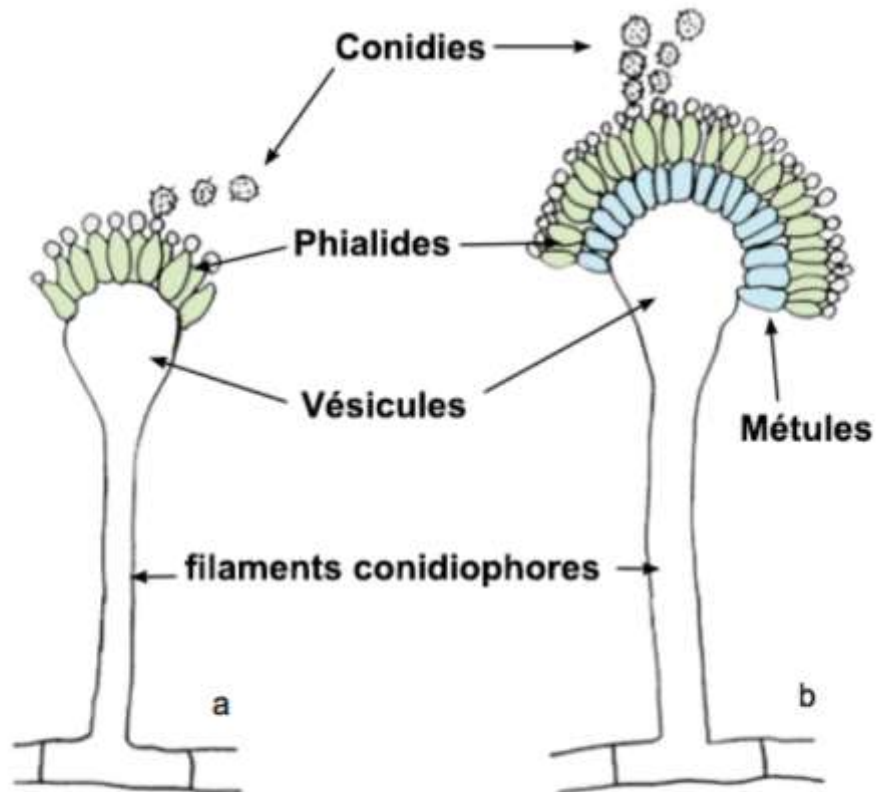


Figure 15: Morphologie des têtes Aspergillaires unisériées (a) et bisériées (b) . (adapté de ELLIS et al, 2007)

3. Reproduction d'*Aspergillus* :

La plupart des espèces d'*Aspergillus* se reproduire uniquement de manière asexuée ; l'état sexuel (téléomorphe) n'est connu que pour quelques espèces, mais les téléomorphes les plus proches sont connu même pour les espèces qui n'ont pas d'état sexuel. (HARISH, 2003)

Pour *Aspergillus*, le sexe est la capacité à former une cellule diploïde pour un instant fugace. Le zygote diploïde immédiatement subit la méiose pour produire des ascospores haploïdes.

Tout cela se déroule dans une structure singulièrement peu sexy appelé cléistothèce. Le cleistothecium est un petit corps sphérique, ressemblant macroscopiquement à un coquelicot graine qui peut ou non être recouverte de blanc mycélium, contenant des milliers d'*Ascospores* (JOAN WENNSTROM, 2009)

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

Environ un tiers des espèces connues d'*Aspergillus*, y compris *A. fumigatus* et *A. nidulans*, peut se reproduire de façon sexuée. Le développement sexué débute par la formation d'un cléistothèce, dans lequel se forme un ascogone à deux noyaux résultant de la fusion de deux hyphes. Les noyaux des dicaryons vont fusionner puis une méiose suivie d'une mitose va permettre la formation de 8 ascospores contenues dans un asque. Chaque ascospore Morphologie des têtes aspergillaires unisériées (a) et bisériées (b) (adapté de ELLIS et al, 2007) donnera un nouveau mycélium haploïde. Un cléistothèce peut contenir plusieurs milliers d'*Ascospores* (fig. 16) (SOHN et YOON, 2002).

La plupart des espèces *téléomorphes* ont une reproduction sexuée qui se fait à partir d'un même mycélium (reproduction sexuée homothallique), mais elles sont également capables de se reproduire à partir de deux hyphes différentes (reproduction sexuée hétérothallique). Récemment, un cycle sexuel hétérothallique a pu être observé chez certaines espèces d'*Aspergillus* (dont *A. fumigatus*) connues jusque-là comme seulement asexuées. Comparée au développement asexué, la reproduction sexuée confère de nombreux avantages, comme la création de nouveaux génotypes pouvant s'avérer plus adaptés à un environnement potentiellement variable, l'élimination des mutations délétères du génome et le développement d'organes de fructification résistants aux conditions difficiles (LEE et al, 2010).

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

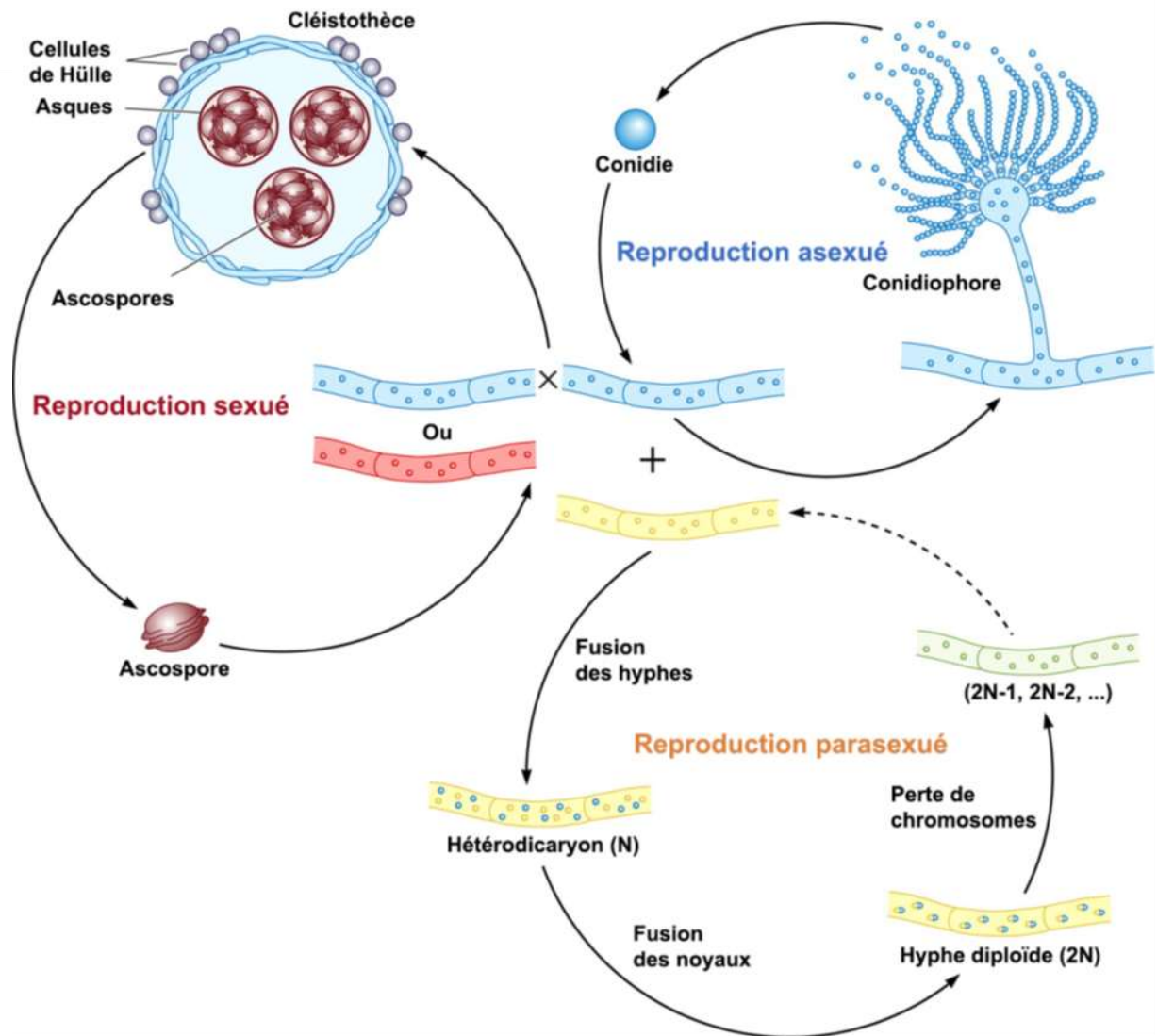


Figure 16: Cycle de vie du champignon *Aspergillus nidulans* (adapté de LEE et al, 2010)

4. Caractères morphologiques :

La morphologie constitue une partie importante du concept d'espèce d'*Aspergillus*. Caractères de la colonie utilisés pour caractériser les espèces incluent les taux de croissance des colonies, la texture, le degré de sporulation, production de sclérotés ou de cléistothèques, couleurs de mycélium, sporulation, pigments solubles, exsudats, revers de colonie, sclérotés, Cellules de Hülle et cléistothèques. À la fois sexuelle et asexuée la reproduction se produit dans *Aspergillus* et les caractéristiques microscopiques de ces structures sont importantes. *Conidiophore* diagnostique les caractères incluent la forme des têtes de conidies, la présence ou absence de métules entre la vésicule et les phialides (c. ou bisériate), la couleur des stipes,

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

et la dimension, la forme et texture des stipes, vésicules, métules (lorsqu'elles sont présentes), phialides, conidies et cellules de Hülle (lorsqu'elles sont présentes). Il en est de même pour *cléistothèces*, *asques* et *ascospores*. Pour les *cléistothèces*, le développement des ascomes et la façon dont leurs parois sont produites est également un personnage important. Tailles et morphologie des *ascospores*, en particulier l'ornementation souvent diagnostique (rugueux, bords, ailes, sillons, etc.) sont importants pour l'identification des espèces. Médias, la technique d'inoculation et les conditions d'incubation affectent la morphologie caractères (OKUDA, 1994 ; OKUDA et al, 2000).

La plupart des espèces d'*Aspergillus* ont été décrites en utilisant des caractéristiques morphologiques pour distinguer les espèces, en particulier dans des études antérieures (RAPER et FENNEL, 1965 ; GAM et al, 1985). Ainsi, d'importantes monographies sur les taxonomies d'*Aspergillus* sont strictement basées sur des caractéristiques morphologiques

Basé sur le Centre national de « Le système de classification de l'information sur la biotechnologie (NCBI) » *Aspergillus* est classé comme suit : (ZULKIFLI, 2015)

Royaume : *Champignons*

Sous-royaume : *Dikarya*

Embranchement : *Ascomycota*

Sous-embranchement : *Pezizomycotina*

Classe : *Eurotiomycètes*

Sous-classe : *Eurotiomycetidae*

Commande : *Eurotiales*

Famille : *Aspergillacées*

Genre : *Aspergillus*

L'identification morphologique s'est avérée fiable pour l'identification au niveau de la section, ce qui est très important pour trier les isolats en vue d'une identification ultérieure par d'autres méthodes. (ZULKIFLI, 2015)

V. Approches moléculaires de la classification et de l'identification des espèces d'aspergille :

Pour identifier avec précision les espèces d'*Aspergillus* au niveau de l'espèce, les deux l'identification morphologique et moléculaire est appliquée. Morphologique caractéristiques peuvent ne pas être suffisantes, car les données microscopiques et les caractéristiques macroscopiques de certaines espèces sont similaires, telles quels caractéristiques de l'*Aspergillus* noir (HARISH, 2003)

L'identification et la caractérisation moléculaires par séquençage de l'ADN sont largement utilisées. Le séquençage de l'ADN utilisé pour l'identification dépend beaucoup du locus cible. Le locus doit être orthologue, avoir un niveau élevé de variation interspécifique avec une faible variation intraspécifique, facile à amplifier et un jeu d'amorces «universel» standardisé, et le locus ne doit pas subir de recombinaison (BALAJEE et al, 2007).

Par conséquent, interne transcrit les séquences d'espacement (ITS) et de b-tubuline sont utilisées pour identification. La région ITS est le code-barres universel des champignons et est utilisé pour l'identification initiale d'*Aspergillus*. La b-tubuline est recommandée comme marqueur d'identification secondaire pour *Aspergillus* et utilisé principalement pour l'analyse phylogénétique pour la confirmation des espèces (SAMSON et al, 2014). Combinaison d'identification morphologique et le séquençage de l'ITS et de la b-tubuline peut identifier de manière fiable *Aspergillus* isolats au niveau de l'espèce. (ZULKIFLI, 2015) (fig.17)

Certains préfixes de gènes utilisés dans la classification d'*Aspergillus* :

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

Locus	Amplification	Annealing temp (°C)	Cycles	Primer	Direction	Primer sequence (5'–3')	Reference
Internal Transcribed Spacer (ITS)	standard	55 (alt. 52)	35	ITS1	Forward	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. 1990
				ITS4	Reverse	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990
				V9G	Forward	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	de Hoog & Gerrits van den Ende 1998
				LS266	Reverse	GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C	Masclaux et al. 1995
β-tubulin (BenA)	standard	55 (alt. 52)	35	Bt ₂ a	Forward	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass & Donaldson 1995
				Bt ₂ b	Reverse	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass & Donaldson 1995
Calmodulin (CaM)	standard	55 (alt. 52)	35	CMD5	Forward	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	Hong et al. 2005
				CMD6	Reverse	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	Hong et al. 2005
				CF1	Forward	GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR	Peterson et al. 2005
				CF4	Reverse	TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC	Peterson et al. 2005
RNA polymerase II second largest subunit (RPB2)	touch-up	50–52–55 (alt. 48–50–52)	5–5–30	5F	Forward	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	Liu et al. 1999
				7CR	Reverse	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	Liu et al. 1999
				5Feur	Forward	GAY GAY CGK GAY CAY TTC GG	Houbraken et al. 2012
				7CReur	Reverse	CCC ATR GCY TGY TTR CCC AT	Houbraken et al. 2012

Figure 17: la classification des espèces d'aspergille (ZULKIFLI, 2015)

D'après FRISVAD et al, 2019, HOUBRAKENET al, 2020, Il y en a six sous classes et d'autres 1111 Sous-genres principaux du genre *Aspergillus*, à savoir *Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Polypaecilum*, *Cremeri* et *Aspergillus*. Chacun de ces sous-genres est divisé en 27 groupes, contenant Tous ont un ou plusieurs espèces. En 2020, 446 espèces d'*Aspergillus* ont été dénombrées. (fig.18)

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

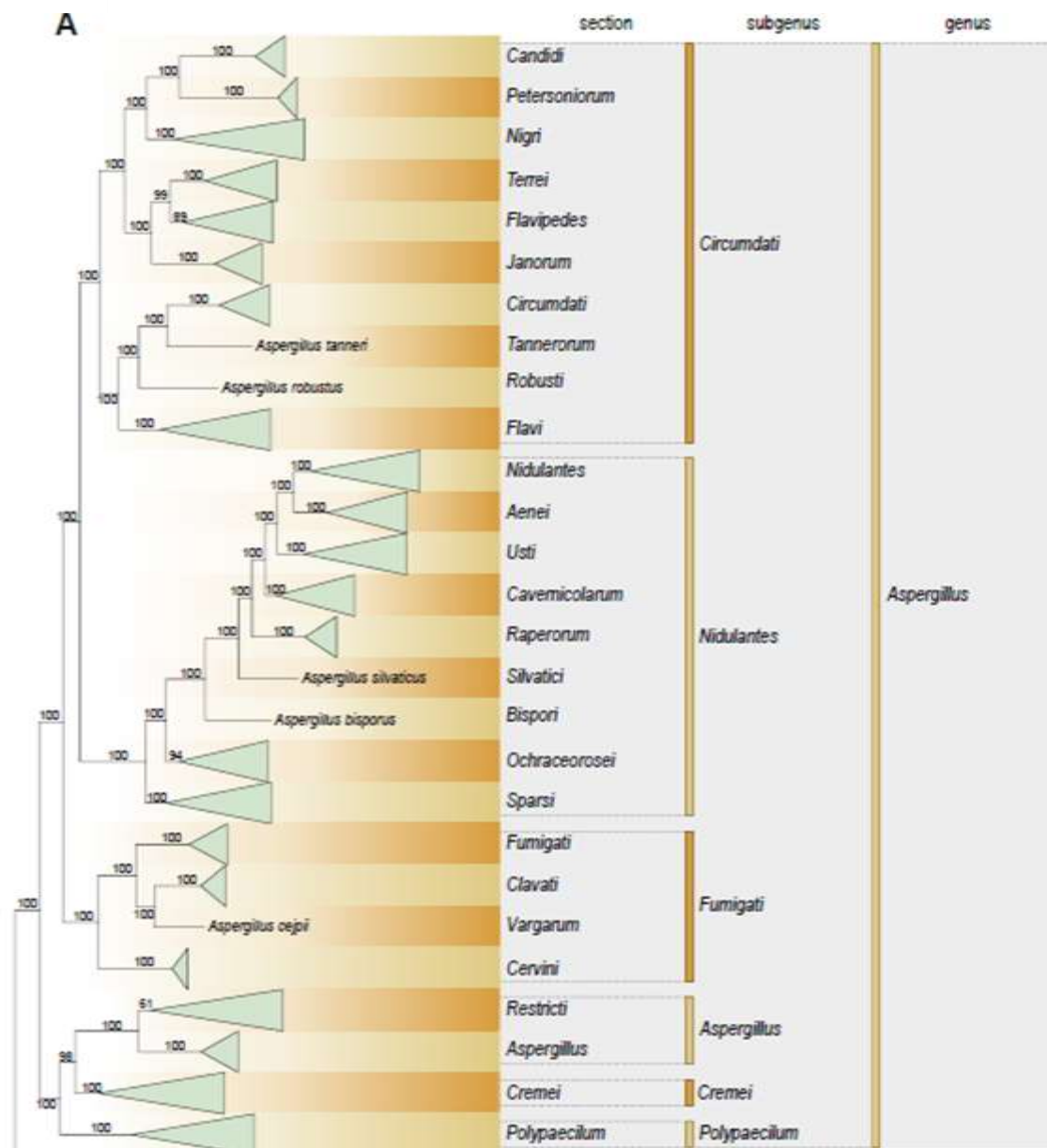


Figure 18: Phylogénie combinée utilisant neuf loci (RPB1, RPB2, Cct8, Tsr1, CaM, BenA, SSU, LSU, ITS). Dans le phylogramme, seuls les sous-genres et les sections d'*Aspergillus* et *Penicillium* (HOUBRAKEN et al, 2020)

La section *Flavi* est l'une des sections les plus importantes du genre *Aspergillus*. (RODRIGUES et al, 2011), qui sont d'importance en biotechnologie, aliments et santé (VARGA et al, 2011).

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

Un grand nombre d'espèces dans la section d'*Aspergillus Flavi* sont communes dans les cultures, et certains d'entre eux produisent plusieurs mycotoxines, telles que les aflatoxines, 3-acide nitropropionique, acide ténuazonique et acide cyclopiazonique (VARGA et al, 2011).

VI. Caractéristiques de la section *Flavi* :

La section *Aspergillus Flavi* est principalement composée de moisissures saprophytes présentes dans divers niches écologiques et jouant un rôle clé dans les premières étapes du cycle des nutriments (COTTY et al, 1994 ; RODRIGUES et al, 2012). Parmi leurs caractéristiques phénotypiques générales figurent les têtes conidiennes teintées jaune-vert à brunes, unisériées ou bisériées et la production de sclérotes noirs (VARGA et Al, 2011 ; HOUBRAKEN et al, 2014). Les métabolites secondaires caractéristiques du groupe comprennent aflatoxines (AF), paspaline, acide kojique, acide aspergillique et acide cyclopiazonique (CPA) (Frisvad et Samson 2000). Ces moisissures se développent mieux dans des conditions environnementales d'humidité (environ 0,85 à 0,99 aw) (MEDINA et al, 2015 ; YOGENDRARAJAH et al, 2016) et des températures allant de 28 à 42 °C et plusieurs poussent plus vite à 37 °C (VARGA et al, 2011). L'humidité et la température ambiantes les préférences rendent les espèces de la section *Flavi* aptes à pousser dans les régions tropicales et subtropicales dans le monde, mais certains d'entre eux sont capables de pousser dans les régions tempérées, comme *A. flavus*.

Par ailleurs, le changement climatique affecte principalement ces deux variables environnementales, créant de nouvelles niches dans les zones qui, dans le passé, n'étaient pas adaptés au développement de l'espèce *Aspergillus section Flavi*, qui pourrait favoriser leur colonisation dans les régions tempérées (Perrone et al, 2014).

Les extralites produites par ces champignons rendent la section intéressante à des fins d'étude. Certains espèces telles que *A. flavus* et *A. parasiticus* ont un impact sur la santé humaine et animale ainsi que sur économie internationale, car ils sont capables de produire des aflatoxines, en particulier l'aflatoxine B1 (AFB1). Par exemple, *A. oryzae* et *A. sojae* synthétisent l'acide kojique, un métabolite secondaire utilisé dans la production de sauce de soja, un marché avec des parts estimées à des milliards de dollars dans le monde (CHANG et al, 2007a).

Chapitre II : Étude moléculaire d'Aspergillus section flavi

Bien qu'il existe certains caractères morphologiques et métabolites secondaires qui permettent l'identification au niveau de l'espèce, lorsque des espèces cryptiques sont présentes, elles deviennent insuffisantes pour la différenciation taxonomique. De plus, les analyses morphologiques pour discriminer entre les isolats peuvent être délicates, car le phénotype de la moisissure est affecté par les conditions environnementales et nutritionnelles, créant un chevauchement des traits phénotypiques (CHANG et al, 2007a). L'intégration des analyses moléculaires aux méthodes susmentionnées est cruciale pour l'identification des espèces et pour définir clairement les relations au sein de la *Flavi* (SAMSON et al, 2014). Cependant, trouver des différences au niveau moléculaire peut être difficile puisque les espèces de ce groupe partagent plusieurs traits conservés. Par exemple, *Aspergillus flavus* et *A.parasiticus* partagent environ 97 à 99 % d'identité nucléotidique de leurs génomes (CHANG et al, 2007a).

Le gène ITS est généralement utilisé comme gène de code-barres pour différencier les espèces fongiques, mais dans cette section, il est hautement conservé, ce qui le rend presque non informatif (VARGA et al, 2011 ; HOUBRAKEN et al, 2014). Même bien qu'il soit difficile de caractériser ces organismes au niveau de l'espèce, il est important de garder un système taxonomique pratique car il est à la base de l'élaboration de réglementations pour favoriser la sécurité et le contrôle des aliments (GEISER et al, 2007 ; GODET et MUNAUT, 2010).

Comme mentionné précédemment, l'identification des espèces d'*Aspergillus* peut être difficile, et la section *Flavi* est l'un des meilleurs exemples de leur complexité. Les espèces ont une grande variabilité inter et intra des caractères, faire une seule des méthodes d'identification (morphologique, caractérisation moléculaire et caractérisation secondaire du profil des métabolites) futile (TAYLOR et al, 2000 ; GEISER et al, 2007). À l'inverse, le développement d'outils moléculaires au cours des deux dernières décennies a permis le développement de nouvelles techniques utiles pour l'identification des espèces d'*Aspergillus*, néanmoins une combinaison de méthodes est recommandée pour obtenir des résultats solides (GEISER et al, 2007 ; VARGA et al, 2011).

VII. Identification moléculaire de la section *Flavi* d'*Aspergillus* :

La méthode traditionnelle d'isolement et de culture utilisant des méthodes sélectives sont fréquemment utilisées pour la détection et l'identification des champignons aflatoxinogènes. Cependant, ces méthodes sont laborieuses, chronophages et nécessitent une expertise

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

taxonomique car il est difficile de identifier correctement sur la base des seules caractéristiques morphologiques, en particulier ceux qui sont étroitement liés (RODRIGUES et al, 2009 ; REIS et al, 2014). AFSAH-HEJRI et al, (2013b)) ont rendu compte de l'apparition d'*A. flavus aflatoxigène* dans les arachides de Malaisie mais uniquement sur la base de l'identification morphologique. Outre, une étude similaire a été rapportée par Reddy et al, (2011) sur la présence d'*Aspergillus spp.* Dans divers produits alimentaires commercialisés en Malaisie sur la base d'une identification morphologique. Morphologie seul est insuffisant et peu fiable pour identifier correctement et différencier les espèces étroitement apparentées dans la section *Aspergillus Flavi*. Par conséquent, le profil chimique d'*Aspergillus spp.* Est souvent utilisé pour aider à l'identification morphologique (RODRIGUES et al, 2009 ; BAQUIÃO et al, 2013). Selon SAMSON et al, (2006), les aflatoxines, l'acide aspergillique et l'acide cyclopiazonique sont les principaux extrolites couramment utilisés pour l'identification d'*Aspergillus spp.* aflatoxigène de la section *Flavi*. Le tableau I montre la morphologie commune, les extrolites et moléculaires paramètres d'identification qui ont été utilisés comme paramètres principaux pour différenciation des espèces.

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus* section *flavi*

Tableau I: morphologie, production d'extrolites et identification moléculaire des espèces Flavi de la section *Aspergillus*. (NORLIA et al, 2019)

Species	Morphology	Extrolites	Molecular Identification	Origin	References
<i>A. flavus</i>	Yellow-green conidia, small and large sclerotia, orange reverse on AFPA	AFB (+/-), CPA (+/-), aspergill acid, asperteran (+/-), paspaltrin and paspalne (+/-)	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis hypogaea</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. parasiticus</i>	Dark-green conidia, orange reverse on AFPA	AFB, AFG, kojic acid, aspergill acid, parastictoides, paspaltrin and paspalne (+/-)	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis hypogaea</i> , <i>A. villosa</i> , <i>A. corrugata</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. nomius</i>	Yellow green conidia, orange reverse on AFPA	AFB, AFG, kojic acid, aspergill acid, nominine	β -tubulin and calmodulin	Wheat	Pildain et al., 2008
<i>A. pseudonominus</i>	n.a	AFB, kojic acid, chrysogine	ITS, β -tubulin and calmodulin	Diseased alkali bees	Varga et al., 2011
<i>A. bombycis</i>	Yellow-green conidia, orange reverse on AFPA	AFB, AFG, kojic acid, aspergill acid	β -tubulin and calmodulin	Fraiss in a silkworm rearing house	Pildain et al., 2008
<i>A. tamarif</i>	Dark-brown conidia, dark brown reverse on AFPA	Kojic acid, CPA (+/-)	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis hypogaea</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. pseudotamarif</i>	Dark-brown conidia, dark brown reverse on AFPA	Kojic acid, AFB, CPA (+/-)	β -tubulin and calmodulin	Soil	Pildain et al., 2008
<i>A. caesiatus</i>	Dark-brown conidia, dark brown reverse on AFPA	Kojic acid, CPA (+/-)	β -tubulin and calmodulin	Soil	Pildain et al., 2008
<i>A. pseudocaeiatus</i>	n.a	AFB, AFG, kojic acid, CPA	ITS, β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis bukartii</i>	Varga et al., 2011
<i>A. miniscerotigenes</i>	Yellow-green conidia, small sclerotia, orange reverse on AFPA	AFB, AFG, CPA, kojic acid, aspergill acid, parastictoides, aflavins, paspaltrin and paspalne, aflatrems and aflavines	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis hypogaea</i> , soil, and peanut field	Pildain et al., 2008
<i>A. arachidicola</i>	Dark-green conidia, orange reverse on AFPA	AFB, AFG, aspergill acid, kojic acid, parastictoides, chrysogine	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis glabrata</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. toxicarius</i>	n.a	n.a	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis hypogaea</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. parvisclerotigenus</i>	Yellow-green conidia, orange reverse on AFPA	Kojic acid, AFB, AFG, CPA, aspergill acid, aflavins, paspaltrin and paspalne, aflatrems and aflavines	β -tubulin and calmodulin	<i>Arachis hypogaea</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. korthogencis</i>	Yellow-green to brown conidia, small sclerotia, orange reverse on AFPA	AFB, AFG, kojic acid, CPA, aspergill acid, aflatrems, leporins, asparacone, aflavrin, aflavine, paspaltrin, and paspalne	ITS, <i>benA</i> , <i>cmdA</i> , <i>mcm7</i> , <i>amdS</i> , <i>rpb1</i> , <i>preB</i> , <i>ppgA</i> , and <i>preA</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Carvalho-campos et al., 2017
<i>A. leporis</i>	Yellow-green conidia	Kojic acid	β -tubulin and calmodulin	dung of <i>Lepus townsendi</i>	Pildain et al., 2008
<i>A. oryzae</i>	Yellow-green conidia	Kojic acid, asperteran, asprochlorin	β -tubulin and calmodulin	Unknown source, Japan	Varga et al., 2011
<i>A. sojae</i>	Yellow-green conidia	Kojic acid, aspergill acid, asperteran, asprochlorin	β -tubulin and calmodulin	Soy sauce	Varga et al., 2011
<i>A. avenaceus</i>	n.a	Asprochlorin	ITS, β -tubulin and calmodulin		Varga et al., 2011

n.a, data not available; AFPA, *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar; AFB, Aflatoxin B; AFG, Aflatoxin G; CPA, Cyclopiazonic acid; ITS, Internal Transcribed Spacer; +, present; -, absent.

- Les paramètres principaux pour différenciation des espèces :

De nos jours, l'approche moléculaire est largement utilisée pour identifier et décrire avec précision les espèces du genre *Aspergillus* surtout lors de l'introduction d'une nouvelle espèce (PETERSON, 2008 ; FRISVAD et al, 2019). analyse de la séquence d'ADN de certains régions, telles que l'espaceur transcrit interne (ITS), la b-tubuline, la calmoduline et le groupe de gènes de l'aflatoxine ont été analysés pour obtenir des informations sur la relation phylogénétique entre les espèces de cette section (PILDAIN et al, 2008 ; VARGA et al, 2011).

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus section flavi*

Cependant, aucun d'entre eux n'a utilisé une approche unique pour résoudre les problèmes d'identification. Une approche polyphasique, qui comprend les caractéristiques morphologiques, chimiques et moléculaires, est souvent utilisée pour identifier et caractériser les *Aspergillus spp.* Dans ce contexte, (BAQUIÃO et al, 2013 ; REIS et al, 2014). GODET et MUNAUT (2010) ont réussi à identifier neuf espèces au sein de l'*Aspergillus Section Flavi* utilisant une stratégie moléculaire en six étapes, y compris le temps réel PCR, RAPD et digestion SmaI. Les résultats ont été validés par le séquençage partiel du gène de la calmoduline pour confirmer l'identifiant.

L'ADN ribosomique nucléaire (ADNr) de la région ITS est la région la plus largement séquencée et recommandée comme ADN marqueur de code-barres pour l'identification fongique au niveau et au-dessous du genre ainsi que la source de l'information phylogénétique. Il est donc nécessaire d'inclure les séquences ITS chaque fois qu'une nouvelle espèce fongique est décrite (SCHOCH et al, 2012). La région ITS est située entre les gènes 18S (SSU) et 28S (LSU) dans l'unité de répétition d'ADNr qui comprend les régions ITS1 et ITS 2 et séparés par le gène 5.8S. De ses trois sous-régions, ITS1 et ITS2 sont typiquement spécifiques à une espèce et montrent un taux élevé d'évolution (NILSSON et al, 2009). Toute la séquence de l'ITS région variait généralement de 450 à 700 pb. L'amplification de la totalité ou une partie de la région ITS a été réalisée en utilisant divers les amorces avec les amorces les plus couramment utilisées ont été publiées par BLANC et al, (1990).

Néanmoins, des marqueurs d'identification secondaires, tels que gènes de la β -tubuline et de la calmoduline, sont encore nécessaires pour identifier *Aspergillus section Flavi* comme STI seul est encore insuffisant à des fins d'identification moléculaire (SAMSON et al, 2014).

La β -tubuline est un gène codant pour une protéine qui code pour la protéine tubuline qui peut être trouvée dans toutes les cellules eucaryotes comme sous-unité élémentaire des microtubules. Ça implique dans les processus cellulaires eucaryotes, et représente le principal composants du cytosquelette et flagelles eucaryotes (EINAX et Voigt, 2003). La calmoduline (CaM) est un agent de liaison au calcium protéine impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire dans les cellules eucaryotes. Il est hautement conservé et sert de principal récepteur du calcium intracellulaire (MA et al, 2009). Ces trois les gènes sont largement utilisés comme marqueurs d'ADN pour l'identification et l'analyse phylogénétique d'*Aspergillus spp.*

Chapitre II : Étude moléculaire d'*Aspergillus* section *flavi*



Figure 19: Arbre phylogénétique d'*Aspergillus* section *Flavi* basé sur les données combinées *benA* + *cmdA*. (AMARANTA, 2019)

CONCLUSION

GENERALE

Conclusion générale

Les progrès dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis aux scientifiques de classer les champignons et de choisir Des gènes spécifiques pour l'étude, qui sont soit un morceau spécifique d'ADN, soit plusieurs gènes, qui ont provoqué des changements dans le Classification par rapport aux méthodes traditionnelles. Parmi les gènes utilisés dans la classification des champignons figurent les virgules générales et la section *flavi* en particulier cloné interne (ITS), le gène codant pour les protéines chalmudine et β -tb et lin.

De notre note, nous avons conclu que la classification du genre *Aspergillus*, le groupe *Flavi*, a reçu une grande attention Surtout parce qu'il comprend divers agents pathogènes et la production de mycotoxines, en particulier les aflatoxines La classification de ce groupe a subi plusieurs modifications au cours de l'histoire, car la classification était basée sur des traits morphologiques, physiologiques puis moléculaires après le formidable développement des techniques de biologie moléculaire.

En conclusion, j'espère poursuivre mes futures études en recherchant des méthodes modernes permettant d'obtenir des résultats corrects pour identifier et classer les types de ce groupe en fonction des propriétés morphologiques, physiologiques, métaboliques et moléculaires et d'une combinaison de celles-c

Références bibliographiques :

- Abdelhakim (2016)** ; Biologie Moléculaire et Génétique Génie ; présentation conférence ; Université Ferhat Abbas-Sétif1
- Abderrahman Maftah ; Jean-Michel Petit ; Raymond Julien. (2018)** ; Mini manuel de De biologie moléculaire ; 4e édition ; édition : Dunod, Paris ; ISBN 978-2-10-077368-8
- Ag Belarbi-Amar N(2020)** ; Replication De L'ADN ; Université Oran1 Ahmed Benbella,
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. (2002)**, Chapter 5: DNA Replication Mechanisms. In: Molecular Biology of the Cell, Garland Science, UK.
- Amani Lahouar (2016)** ; Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysologiques ; thèse de doctorat ; Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir
- Aurélié LECELLIÉ (2013)** ; Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle, Université De Reims Champagne-Ardenne
- Ayten Dizkirici, Aysenur Kalmer (2019)** ; Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny, Cramer in Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, DOI: 10.1127/nova_hedwigia/2019/0528
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Clarke ND (2002)** ; Chapter 27: DNA Replication, Recombination, and Repair. In: Bio-chemistry. WH Freeman and Company, USA.
- Bruce Alberts et al (non daté)** ; biologie-moleculaire-de-la-cellule ; 6-ed ; editions.lavoisier.fr ; ISBN : 978-2-257-20678-7
- Chaabani Aya ;Douadi Khaoula (2019)** ; Modélisation du processus de la traduction d'une séquence d'ADN naturelle et d'une séquence chimère en séquence protéique ; mémoire de Master ; Université des Frères Mentouri Constantine
- DAKAR (2006)** ; formation biologie moléculaire ; Philippe Gauthier, CBGP-IRD Montpellier''livre''
- David S. et al, (2007)**, « A higher-level phylogenetic classification of the Fungi » ; Corresponding Editor : David L. Hawksworth ; 2007 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Gagniuc, P, Ionescu-Tirgoviste, C. (2013)**, Gene Promoters Show Chromosome-Specificity and Reveal Chromosome Territories in Humans, BMC Genomics,
- Gaurav Solanki (2012)** ; Polymerase Chain Reaction ; Volume 2 Issue 3
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., (2000)**, An Introduction to Genetic Analysis, (7th Ed.), New York, W. H. Freeman and Company.
- Griffiths, F. J. A, Wessler, R. S, Lewontin, C. R., Gelbart, M. W., Suzuki T. D., Miller, H. J. (2004)**, An Introduction to Genetic Analysis 8th Edition, Chapter 9: Proteins and Their Synthesis,
- Harry M. (2008)**, « Génétique Moléculaire et Evolutive, Collection Science Fondamentale », Maloine, Paris, seconde édition, 465p.
- Hélène Chommy. (2012)** ; Fidélité de la traduction chez les eucaryotes. De la molécule au génome. Sciences agricoles. UniversitéParis Sud-ParisXI, Français. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00749760>
- Hentze, M. W. (2001)**, Protein Synthesis: Believe it or not-translation in the Nucleus, Science
- Housset .C et Raisonier. A (2006)** ; Biologie Moléculaire ; Université Paris-VI

Références bibliographiques

Huzefa A. Raja, Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, and Nicholas H. Oberlies (2021), « Fungal Identification Using Molecular Tools : A Primer for the Natural Products Research Community » ; journal of naturel product. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

J. Houbraken, S. Kocsube, C.M. Visagie, N. Yilmaz, X.-C. Wang, M. Meijer, B. Kraak, V. Hubka, K. Bensch, R.A. Samson, and J.C. Frisvad Westerdijk (2020), « Classification of Aspergillus, Penicillium, Talaromyces and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species » ; Fungal Biodiversity Institute. Production and hosting by ELSEVIER B.V.

J. Lamorila , M. Bogardc , N. Ameziane, J.-C. Deybacha, P. Bouizegarènea (2007) , « Molecular biology in clinical microbiology » ,

James Watson, Tania Baker, Stephen Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick (2012), « La vue mendélienne du monde » ; Pearson France – Biologie moléculaire du gène, 6e éd.

Joan Wennstrom Bennett (2009), « Aspergillus: A primer for the novice », Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology , DOI: 10.1080/13693780802712515

Johnson RE, Klassen R, Prakash L, Prakash S (2015) ; A Major Role of DNA Polymerase δ in Replication of Both the Leading and Lagging DNA Strands. Molecular Cell 59(2): 163-175.

Julien Bacal (2011) ; Etude de la dynamique de réplication en présence de dommage à l'ADN chez la levure *S. cerevisiae*. Génétique. hal-01477900

Karouche (non daté) ; L'expression de l'information génétique

Kuehner, J. N., Pearson, E. L., Moore, C. (2011), Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination, Nat Rev Mol Cell Biol.,

Labib, K. (2010). How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? Genes Dev 24, 1208-1219.

Laura QUERO (2018) ; Développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides ; Thèse De Doctorat ; L'université De Bretagne Occidentale

Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pellicoli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. Nature 412, 557-561.

Luchetta, P. (2009). «Biologie moléculaire en 30 fichiers 2^eéd». Paris : Dunod. 155p.

Marie Godet et Franc,oise Munaut (2010), « Molecular strategy for identification inAspergillus sectionFlavi », Mycothe` que de l'Universite´ catholique de Louvain (MUC), Unite´ de Microbiologie, Universite´ catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium ; DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01890.x , Editor: Wolfgang

Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. Cell 129, 665-679.

MOUHOUBI Zina (2018) ; les outils de la biologie moléculaire ; Université A/Mira de Bejaia ,Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Nick McElhinny, S.A., Gordenin, D.A., Stith, C.M., Burgers, P.M., and Kunkel, T.A. (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. Mol Cell 30, 137-144.

Nitish Kumar Mahato, Priya Singh, Vipin Gupta, Rashmi Kumari (2017) ; « Microbial taxonomy in the era of OMICS : application of DNA sequences, computational tools and techniques » ; Article in Antonie van Leeuwenhoek ; DOI : 10.1007/s10482-017-0928-1

Noor atiqah Zulkifli (2015) ; « morphological and molecular identification of aspergillus species isolated from corn feed in penang » ; Universiti Sains Malaysia ; DOI: 10.13140/RG.2.2.13576.98566

Références bibliographiques

- Noor Atiqah Zulkifli (2015)** ; morphological and molecular identification of aspergillus species isolated from corn feed in penang. *mémoire Master*
- Norlia et al (2019)**, Aspergillus section Flavi and Aflatoxins: Occurrence, Detection, and Identification in Raw Peanuts and Peanut-Based Products Along the Supply Chain ; Edited by: István Pócsi, University of Debrecen, Hungary ; doi: 10.3389/fmicb.2019.02602
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002)**. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656
- Olivier Legrand (2005)** ; Conductivité de l'ADN : études à l'échelle de la molécule unique ; Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2005. Français
- P. Rodrigues , C. Santos, A. Vena ncio and N. Lima (2011)** ; Species identification of Aspergillus section Flavi isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular ; doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x
- Pelin Pelit Arayici ; Mesut Karahan ; Tayfun Acar (2014)** ; Transcription and translation ; <https://www.researchgate.net/publication/325827703>
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.-B., Johansson, E., and Kunkel, T.A. (2007)**. Yeast DNA Polymerase {epsilon} Participates in Leading-Strand DNA Replication. *Science* 317,127-130.
- PHILIPPE LUCHETTA, (2018)** ; l'essentiel de biologie moléculaire ; l'université de Cergy-Pontoise, maison d'édition : Dunod, Paris, ISBN 978-2-10-077866-9
- R.A.Samson, C.M. Visagie, J. Houbaken, S.-B. Hong, V. Hubka, C.H.W. Klaassen, G. Perrone, K.A. Seifert, A. Susca, J.B. Tanney, J. Varga, S. Kocsube, G. Szigeti, T. Yaguchi, and J.C. Frisvad (2014)**, « Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus » ; <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Reece RJ, Maxwell A, Wang JC (1991)** ; DNA Gyrase: Structure and Function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26(3-4): 335-375.
- S.B. Primrose and R.M. Twyman (2006)** ; Principles of Gene Manipulation and Genomics, edition :Blackwell Publishing
- Slater S, Wold S, Lu M, Boye E, Skarstad K, et al. (1995)** E. coli Seq A protein binds oriC in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell* 82(6): 927-936.
- Sylviane Bailly , Anwar El Mahgubi , Amaranta Carvajal-Campos , Sophie Lorber , Olivier Puel , Isabelle P. Oswald , Jean-Denis Bailly , and Béatrice Orlando (2018)** ; Occurrence and Identification of Aspergillus Section Flavi in the Context of the Emergence of Aflatoxins in French Maize ; doi:10.3390/toxins10120525
- Tanguy JEAN (2015)** ; Techniques de biologie moléculaire, génie génétique et biotechnologies ; <http://tanguyjean.businesscatalyst.com/>
- Tariku Simion (2018)** ; DNA Replication ; South Agricultura Research Institute, Arbaminch Agricultural Research Center, Ethopia ; DOI: 10.19080/CTBEB.2018.16.555942