



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecologie et Environnement

Intitulé :

Contribution à l'étude de l'effet des lombriciens sur la résistance du blé (*Triticum aestivum*) tendre aux maladies cryptogamiques

Présenté et soutenu par : **BOUZIDI Nadjat**

Le : 28/06/2017

Jury d'évaluation :

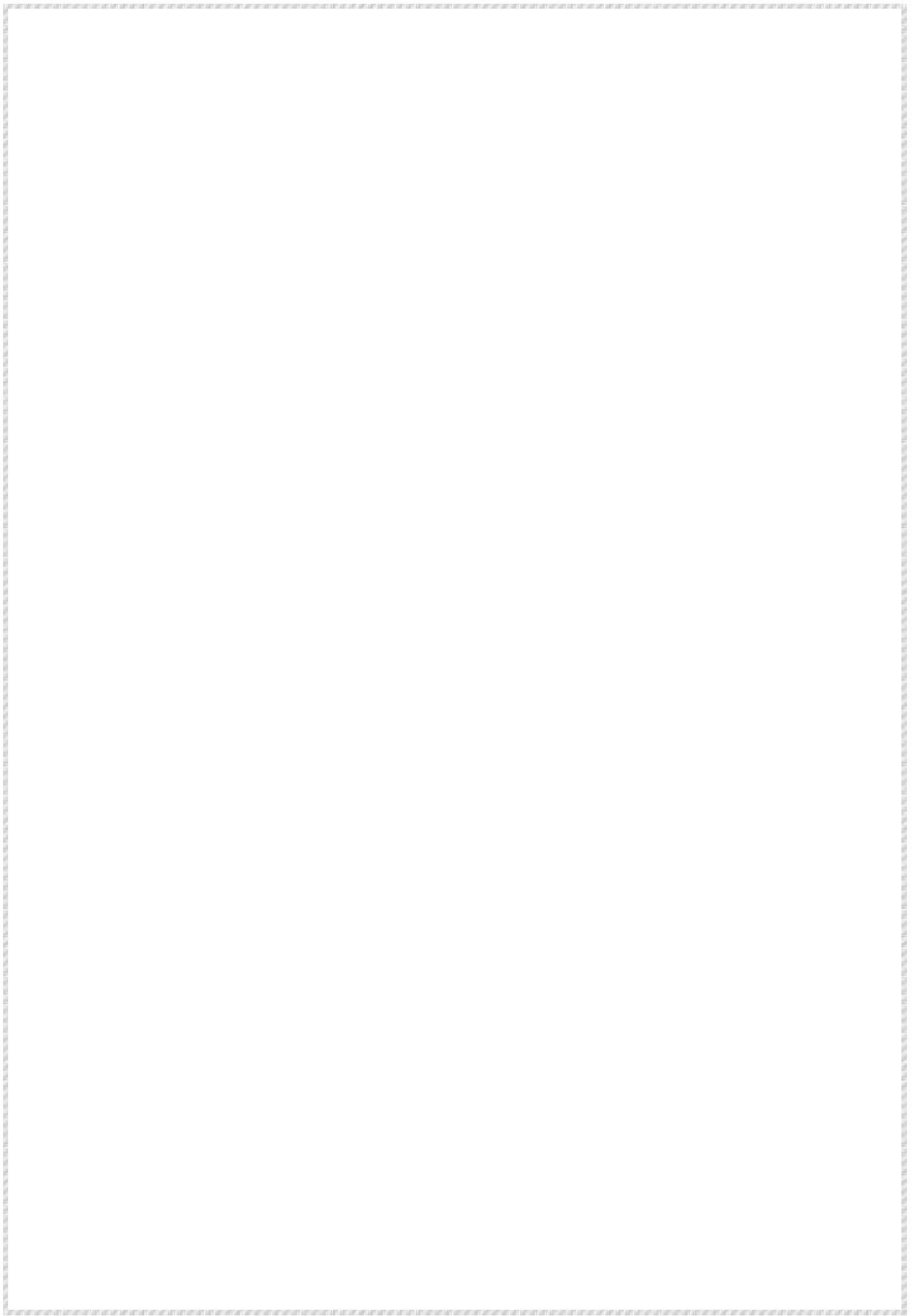
Président du jury : **ALATOU Djamel** (Professeur - UFM Constantine1).

Rapporteur : **BAZRI Kamel-eddine** (Maître de conférences - UFM Constantine1).

Examineurs : **BENDERRADJI M.H** (Professeur - UFM Constantine 1) .

Co – Encadreur : **KELLOU Kamel** (Maître de conférences - UFM Constantine 1).

Année universitaire
2016 - 2017



Dédicace

À la mémoire de mon père

A ma mère

*A mon mari « Adel » pour sa compréhension,
sa patience et son soutien moral*

*A mes chères enfants Alaa, Mohamed
Abderrahmane et Yahia abdelmouamen*

A tous ceux qui j'aime

Nadjet

Remerciements

*Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé
la patience, la puissance et la volonté d'accomplir ce humble travail.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères et mon profond respect à Mr **BAZRI
Kamel-eddine**, maitre-assistant à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour ses
orientations, ses conseils et son suivi permanent.*

*Au président du jury **Pr ALATOU Djamel**, Professeur à l'université Frères Mentouri
Constantine 1 qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements vont au **Pr BENDERRADJI M.H** Professeur à l'université Frères
Mentouri Constantine 1 pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Mes vifs remerciements sont adressés pareillement à tous mes enseignants et à toute l'équipe
Ecologie y compris mes amis de la promo.*

*Et sans oublier encore, toutes celles et tous ceux, qui de loin et de près ont participé :
directement ou indirectement à ce travail.*

*Mer **KELLOU. K**, maitre-assistant à l'université Frères Mentouri Constantine 1,
Mer **BELBEKRI.N**, rima et sadek.*

Nadjet

Sommaire

Introduction	1
<i>Chapitre I : Revue Bibliographie</i>	
1. Généralités sur les céréales	2
1.1. Importance des céréales	2
2. Les principales maladies des céréales	2
2.1. Maladies cryptogamiques de la Tige et des Feuilles	2
2.1.1. Tache bronzées ou helminthosporiose du blé	3
a) Symptômes	3
b) Biologie	3
2.1.2. Rayure réticulée ou Helminthosporiose de l'orge	4
a) Symptômes	4
b) Biologie	5
2.1.3. Striure foliaire ou helminthosporiose de l'orge	5
a) Symptômes	6
b) Biologie	6
2.1.4. Rhynchosporiose de l'orge	6
a) Symptômes	7
b) Biologie	7
2.1.5. Oïdium des céréales	8
a) Symptômes	8
b) Biologie	8
2.1.6. Septoriose foliaire du blé	9
a) Symptômes	9
b) Biologie	10
2.1.7. Rouille des feuilles (ou brune) du blé	11
a) Symptômes	11
b) Biologie	11
2.1.8. Charbon des feuilles du blé	12
a) Symptômes	12
b) Biologie	12
2.2. Maladie des racines et du pied	13
2.2.1. Piétin - échaudage des céréales	13

a) Symptômes	13
b) Biologie	13
2.2.2. Piétin verse des céréales	14
a) Symptômes	14
b) Biologie	15
2.2.3. Fusarioses des céréales	16
a) Symptômes	16
b) Biologie	16
2.3. Maladies cryptogamique de l'épi	17
3. Lutte contre les maladies fongiques	17
4. La lutte Biologique des maladies cryptogamiques chez les céréales	17

Chapitre II : Matériel et Méthode

1. Matériel végétal	19
2. Provocation de la maladie cryptogamique	19
2.1. Méthode de préparation de la solution fongique	19
3. Protocole expérimental	20
3.1. Préparation des milieux de cultures	20
4. Préparation des échantillons	20
4.1. Mise en expérimentation	21
4.2. Extraction des ARN totaux foliaires	21
4.3. Analyse quantitative et qualitative des ARN totaux extraits	21
4.3.1. Dosage des ARN au Nanodrop	21
4.3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose	21
5. Traitement à la DNaseI	23
6. Transcription inverse des ARNm en ADNc	23
7. Synthèse d'ADNc de premier brin	23
7.1 Dosage des ADN au Nanodrop	23
8. Amplification des ADNc par Polymérase Chain Réaction (PCR)	23
8.1 Recherche et mise au point d'amorces	24
8.2 Electrophorèse sur gel d'agarose	25

Chapitre III : Résultat et discussion

1. Provocation de la maladie cryptogamique	27
--	----

1.1. Le nombre des sports incité	27
2. Effet du fusarium sur la croissance de la plante	27
3. La réponse moléculaire de l'effet des verres de terre contre le Fusarium	30
3.1 Vérification de la quantité d'ARN extrait	30
3.2. Qualité d'extraction	32
4. Traitement DNaseI	33
5. Amplification des ADNc par Polymérase Chain Réaction (PCR)	34
<i>Conclusion et perspectives</i>	36
<i>Références bibliographiques</i>	38
<i>Annexes</i>	39

Liste des figures

Figure 01 : Cycle de développement de l'Helminthosporiose de blé.	4
Figure 02 : Cycle de développement de l'Helminthosporiose de l'orge	5
Figure 03 : Cycle de développement de Rhynchosporiose de l'orge	7
Figure 04 : Cycle de développement de l'agent pathogène : Erysiphe graminis	9
Figure 05 : Cycle de développement de la septoriose du blé	10
Figure 06 : Cycle de développement de la rouille brune	
Figure 07 : Dégâts causé par le piétin - échaudage des céréales	14
Figure 08 : Cycle de développement de piétin verse	15
Figure 09 : Cycle de développement de la fusariose	17
Figure 10 : Analyse de la qualité d'extraction de 1 µg d'ARN des échantillons étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%	32
Figure 11 : Vérification de l'amplification du <i>Locus APTI</i> sur gel d'agarose de 1.8 % chez les 17 géotypes étudiés	34
Figure 12 : Vérification de l'amplification du <i>Locus BGLU</i> sur gel d'agarose de 1.8 % chez les 17 géotypes étudiés	35

Liste des photos

Photo 01 : Préparation de la solution fongique	19
Photo 02 : Milieux de culture de blé tendre (<i>Triticum aestivum</i>)	20
Photo 03 : Nanodrop 2000 pour dosage de l'ARN	21
Photo 04 : Dépôt des échantillons dans la cuve d'électrophorèse	22
Photo 05 : Le système d'imagerie	23
Photo 06 : Thermocycleur	25
Photo 07 : Effet du fusarium sur la croissance de la plante.....	28

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition de mélange réactionnel de la PCR.....	24
Tableau 02 : Les programmes des PCR	25
Tableau 03 : Quantités d'ARN extraites chez les différents géotypes étudiés	31
Tableau 04 : Quantités d'ADN chez les différents géotypes étudiés	33

Liste des annexes

Annexe 1. Protocole d'extraction d'ARN totale méthode de Trizol	39
Annexe 2. Marqueur de taille 100 pb (GeneON, Germany)	40
Annexe 3. Protocole traitement à la DNaseI	40
Annexe 4. Protocole Transcription inverse des ARNm en ADNc	41
Annexe 5. Synthèse d'ADNc de premier brin	42
Annexe 6. Fiche de préparation des amorces utilisées	42

Liste des abréviations

ARN : acide ribonucléique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : acide ribonucléique messenger

BET : bromure d'éthidium

DNTP : quatre désoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP, dTTP

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

G et C : bases nucléiques cytosine et guanine

H2O DEPC : Le pyrocarbonate d'éthyle ou diéthyl pyrocarbonate

H2O up : eau ultra-pure

INPV : Institut National de la Protection des Végétaux

μl : microlitre

μM : micro molaire

mM : Mili molaire

Min : minute

ONFAA : Observatoire National des filières Agricoles et Agroalimentaires

(P) : champignon pathogène

PCR : Polymérase Chain Réaction

PV : champignon pathogène +verre de terre

RT: room temperature

T : turricules

TBE : tris borate EDTA

TP 10X : Tampon 10X

TP : turricules + champignon pathogène

UV : ultra-violet

(V) : Verre de terre

100 pb : marqueur de taille a 100 paires de base

100 V: 100volte

A blue textured rectangular area with a drop shadow, containing the title text.

Introduction générale

Introduction

La recherche d'une agrosylviculture limitant le recours aux intrants chimiques nécessite de mobiliser au mieux les régulations biologiques qui existent dans le milieu cultivé, afin de limiter la pression des ravageurs des cultures. Dans le sol, certains champignons qui provoquent des maladies des plantes sont ainsi en relation avec d'autres organismes, qu'il s'agisse d'organismes microscopiques ou d'organismes de plus grande taille comme les vers de terre.

L'impact des vers de terre sur la croissance des plantes, généralement positif, a été attribué à des modifications physiques, chimiques ou biochimiques du sol, souvent sans démonstration rigoureuse. En plus d'un impact direct sur le sol, toutes les structures biogéniques (galeries et turricules) laissées par les vers de terre vont continuer à être actives bien après avoir été produites (**Brown et al 2000**)

Des chercheurs ont montré que la présence des lombriciens dans les sols favorise la croissance des cultures et diminue la sensibilité aux différents agents pathogènes telluriques. Telles que les maladies fongiques

La présente problématique se donne donc pour objectifs à la bio stimulation des sols par les lombriciens et leur utilisation dans la lutte biologique contre les champignons pathogènes. Nous comptons à la fois apporter des informations sur la façon dont la plante s'adapte à la présence de vers de terre et confirmer nos hypothèses sur la nature des mécanismes écologiques impliqués dans l'effet des vers sur les plantes.

Cette étude comporte trois chapitres, le premier donne un aperçu général sur les Maladies cryptogamiques des céréales, le deuxième expose la partie matériel et méthodes et le dernier chapitre aborde les résultats et discussion.



Chapitre I :
Revue Bibliographique

Chapitre I : Revue Bibliographie

1. Généralités sur les céréales

1.1. Importance des céréales

Les céréales désignent l'ensemble des plantes cultivées en vue d'obtention de graines à albumen (**Belaid 1986**).

La culture des céréales est très ancienne. On trouve des traces de blé, de seigle, d'avoine, d'orge à 6 rangs dès le Néolithique. Elle a joué d'autre part un rôle capital dans le développement de l'humanité. La plupart des civilisations se sont développées autour d'une céréale : les civilisations asiatiques autour de la culture du riz, les pré-colombiennes, autour du maïs et les babyloniennes et égyptiennes, autour du blé (**Moule 1971**).

En Algérie, la production de blé se répartit entre blé dur, blé tendre et l'orge, avec des variétés généralement bien adaptées aux conditions locales. (**Rastoin et Benabderrazik 2014**).

La production de céréales a connu une progression ces dernières années. Mais l'augmentation de la production céréalière locale restera une œuvre de longue haleine ; vu la consommation de notre population basée sur cette de source alimentaire (**Djermoun 2009 ; BELAIED 2014**). Le total de la production nationale des céréales est de 3,6 millions de tonnes, soit 2 millions de tonnes de blé dur, 1 million de tonnes d'orge et 6361849 tonnes de blé tendre (**ONFAA 2015**).

Et même à l'échelle mondiale, la consommation de céréales est importantes, elle dépasse 2 milliards de tonnes, sous l'effet aussi de leur l'utilisation dans l'alimentation animale (**ONFAA 2016**).

Les produits à base de céréales représentaient, 25% des dépenses alimentaires des ménages. Le blé dur demeure la base de l'alimentation en Algérie (semoule, principalement, et pâtes). Mais une progression rapide du blé tendre (pain, biscuiterie, pâtisserie) est également notée. L'orge et le maïs sont destinés principalement à l'alimentation animale (**Belaid 1986**).

Les disponibilités en céréales s'élevaient en 2009 à 230 kg par habitant en Algérie (87% en blé) contre 206 en Tunisie et 175 au Maroc (**Rastoin et Benabderrazik 2014**).

2. Les principales maladies des céréales

2.1. Maladies cryptogamiques de la Tige et des Feuilles

2.1.1. Tache bronzées ou helminthosporiose du blé

Chapitre I : Revue Bibliographie

Les helminthosporioses sont largement répandues dans les zones de production des céréales, et les attaques sont importantes dans les régions à pluviométrie importante.

En Algérie cette maladie est sévère au niveau des zones littorales moyennes et les plaines intérieures, tandis que dans les hauts plateaux, elle est relativement faible (**Aouali et Douici-Khalfi 2013**).

a) Symptômes

Observée sur le blé, cette maladie se caractérise par l'apparition sur les feuilles de petites taches allongées qui sont d'abord brun jaunâtre puis de plus en plus bronzées en s'entourant d'une marge jaune clair. Ces taches évoluent ensuite en lésions qui deviennent coalescentes. Les feuilles prennent alors un aspect jaunâtre, se nécrosent progressivement du haut vers le bas et meurent (**Nasraoui 2008**).

D'après les travaux de Benslimane et al. (2011), ils ont identifié la distribution des races de la tache auréolée en Algérie.

b) Biologie

Le champignon se conserve dans les semences sous forme de mycélium et dans les débris infectés sous forme de mycélium et de pseudothèces. Ainsi, l'infection primaire peut avoir lieu à partir des semences infectées ou le plus souvent à partir des chaumes infectés au niveau desquels le champignon produit des conidies à partir du mycélium actif et/ou libère des ascospores à partir des pseudothèces.

En présence d'humidité, les périthèces libèrent les ascospores et le mycélium produit des conidies. Les deux types de spores sont disséminés pour initier l'infection primaire sur les plantules de blé en début de saison (**Ezzahiri 2001**).

Les infections secondaires sont assurées par les conidies produites par le champignon sur les plantes infectées et disséminées par le vent et la pluie. L'infection est favorisée par températures entre 18 et 28° C et des humidités élevées. La transmission du pathogène par les semences semble être insignifiante (**Nasraoui 2008**).

Chapitre I : Revue Bibliographique

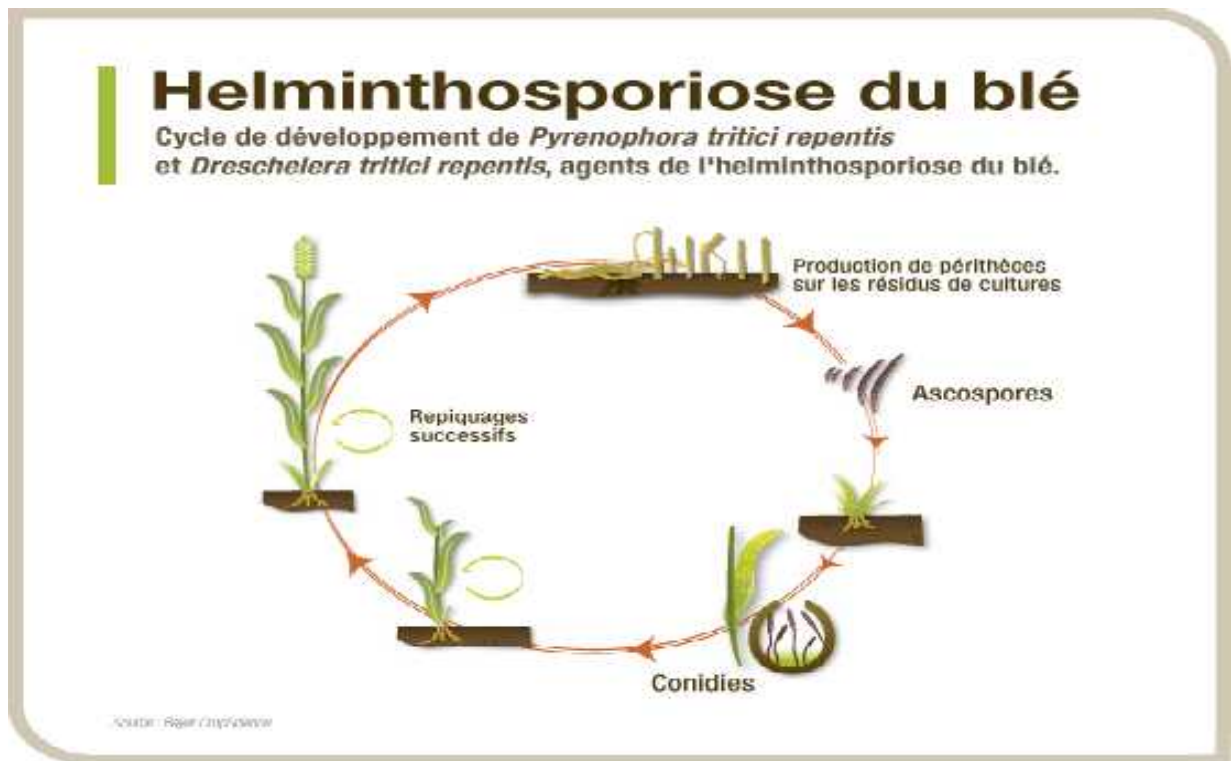


Figure 01 : Cycle de développement de l'Helminthosporiose de blé.

2.1.2. Rayure réticulée ou Helminthosporiose de l'orge

L'helminthosporiose de l'orge est causée par le champignon *Pyrenophora teres*.

L'helminthosporiose est une maladie favorisée par des températures plus élevées que la rhynchosporiose. Son développement sur le feuillage supérieur est de ce fait généralement plus tardif. Les variétés présentent des sensibilités assez contrastées vis-à-vis de cette maladie. Sur les variétés sensibles, l'helminthosporiose est généralement très bien contrôlée par une application de fongicide réalisée au stade dernière feuille (J-M Moreau 2008).

a) Symptômes

Cette maladie de l'orge touche le pied dont les symptômes deviennent plus visibles après l'épiaison. L'infection commence au stade plantule et provoque des lésions brun foncé sur les racines, le collet et les feuilles de base. Les attaques précoces des racines et du collet tuent généralement la plante. L'infection peut toucher également le premier entre-nœud et provoquer une réduction de la circulation de la sève. Extérieurement, l'entre-nœud devient gris noirâtre à cause de la sporulation dense du champignon. Plus tard, apparaissent sur les feuilles des taches

Chapitre I : Revue Bibliographique

allongées à ovales de couleur brun foncé. Des lésions peuvent se former et prendre un aspect gris (Nasraoui 2008).

b) Biologie

Ce champignon se transmet par les semences et se conserve dans le sol et les chaumes infectés sous forme de mycélium, de conidies et rarement de pseudothèces ce qui assure l'infection primaire. En cours de végétation de la céréale, les infections secondaires sont dues aux conidies produites par le champignon et disséminées par le vent et la pluie. Des humidités élevées et des températures supérieures à 20 °C (optimum 28 °C) sont favorables à cette infection (Nasraoui 2008).

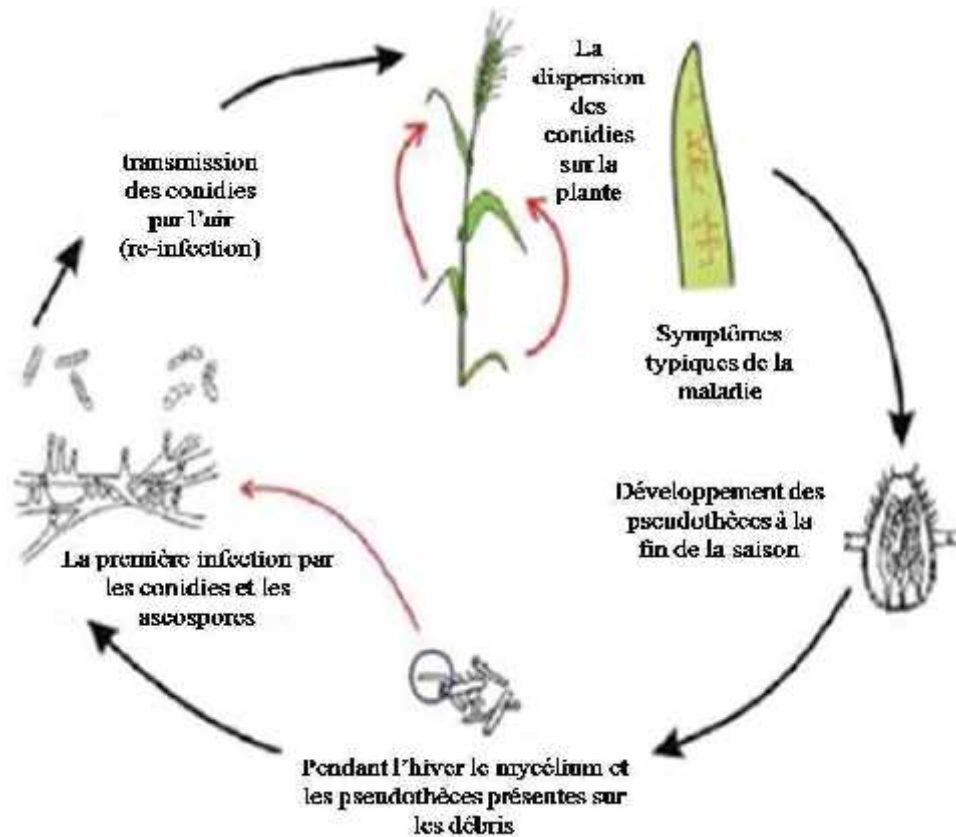


Figure 02 : Cycle de développement de l'Helminthosporiose de l'orge.

Source : (Morvan, 2006)

2.1.3. Striure foliaire ou helminthosporiose de l'orge

La maladie striée de l'orge causée par *Pyrenophora graminea* est une maladie largement répandue à travers les différentes zones de culture d'orge dans le monde.

Bien que la maladie ait été rapportée dans les différents étages climatiques), elle est

Chapitre I : Revue Bibliographie

Potentiellement plus importante dans les régions tempérées (**Benbelkacem et al 2000**).

La maladie striée de l'orge a un développement similaire à celui des charbons des blés et des orges. L'agent pathogène, *Pyrenophora graminea*, est véhiculé d'année en année sous forme de mycélium dormant dans le péricarpe et les téguments des Grains infecté. (**Benbelkacem et al 2000**).

b) Symptômes

Observée sur les cultures d'orge, cette maladie se manifeste par la formation de longues stries allongées sur les feuilles, isolées ou groupées, parallèles aux nervures foliaires. Ces stries sont d'abord jaunes puis tournent petit à petit au brun tandis que la feuille se déchire dans le sens de la longueur. Lorsque l'attaque est grave, les plantes restent rabougries et les épis n'émergent presque pas des gaines, mais lorsqu'ils s'émergent, ils donnent des grains bruns le plus souvent stériles (**Nasraoui 2008**).

a) Biologie

Au niveau des feuilles infectées de l'orge, le champignon forme extérieurement, pendant la saison de végétation, ses conidies qui sont transportées par le vent jusqu'aux inflorescences saines des autres plantes. Ces conidies germent et contaminent les grains qui gardent une apparence normale.

En dehors des grains, le champignon n'infecte généralement pas les autres organes des plantes pendant la végétation. Ainsi, le nombre de plantes infectées dès le départ dans une culture ne varie pas durant une campagne agricole. Lorsque les grains contaminés sont utilisés comme semences, le champignon reprend son activité et infecte l'orge dès les jeunes stades.

Il envahit alors systématiquement la plantule puis la plante en croissance en s'attaquant principalement aux feuilles. Ainsi, la transmission de cette maladie exclusivement par les semences fait que la lutte chimique se limite au traitement des semences.

En plus, la transmission du parasite à l'intérieur même de la semence nécessite l'utilisation de fongicides obligatoirement systémiques. Le temps frais (températures voisines de 12°C) et humide est favorable au développement de la maladie (**Nasraoui 2008**).

2.1.4. Rhynchosporiose de l'orge

La rhynchosporiose est très souvent présente sur les feuilles les plus anciennes à la sortie de l'hiver. Le repiquage de la maladie sur les feuilles supérieures sera d'autant plus efficace

Chapitre I : Revue Bibliographique

durant la montaison que l'inoculum est abondant et que les conditions climatiques sont fraîches et humides. Ce n'est que lorsque la maladie parvient sur le feuillage supérieur que les dégâts peuvent être sensibles. Les variétés présentent des sensibilités assez contrastées vis-à-vis de cette maladie mais aucune n'est totalement résistante. (J-M. Moreau 2008).

a) Symptômes

Observée sur la culture d'orge, cette maladie se caractérise par des lésions généralement losangiques plus ou moins allongées sur les limbes ou au niveau de l'insertion du limbe avec la gaine. Ces lésions sont d'abord vert pâle imbibées d'eau à l'intérieur, mais elles ne tardent à se dessécher et devenir blanchâtres entourées d'une marge brun foncé très nette. Elles deviennent par la suite confluentes et envahissent tout le limbe.

b) Biologie

Cette infection apparaît tôt, au milieu de l'hiver, car elle est favorisée par un temps frais (températures voisines de 15 °C) et humide. L'infection primaire est déclenchée à partir des semences contaminées par le mycélium fongique et à partir des chaumes infectés sur lesquels le champignon produit des conidies au niveau du mycélium actif.

Les infections secondaires sont assurées par les conidies produites sur l'orge en végétation et disséminées par la pluie et le vent.

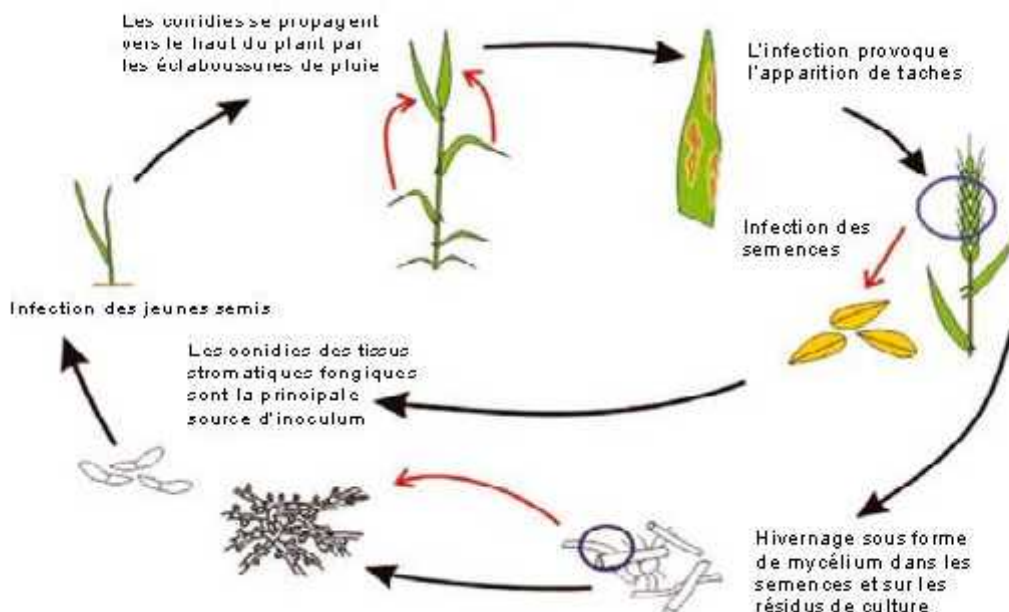


Figure 03 : Cycle de développement de Rhynchosporiose de l'orge

Chapitre I : Revue Bibliographie

2.1.5. Oïdium des céréales

Le champignon : *Blumeria graminis*
(Anamorphe : *Oidium monilioides*)

L'oïdium des céréales (*Blumeria graminis*) est la maladie la plus facile à diagnostiquer sur les céréales. Le développement d'un mycélium blanc et cotonneux à la surface des organes atteints ne permet aucune confusion avec d'autres pathogènes. On rencontre l'oïdium aussi bien sur blé que sur orge, dans des formes spécifiques à chacune d'entre elles.

L'oïdium des céréales est une maladie qui peut s'avérer dommageable si elle est présente sur les trois dernières feuilles. (INPV 2017).

a) Symptômes de l'oïdium

Observée sur blé, orge et avoine, cette maladie commence à apparaître en hiver sous forme de petites pustules blanches dispersées à la surface des feuilles. Elles sont formées par le mycélium et les chaînes conidifères de l'anamorphe qui est un ectoparasite. Au fur et à mesure que la plante hôte se développe, ces pustules s'étendent, deviennent confluentes et leur couleur tourne du blanc au blanc-jaunâtre puis au blanc-grisâtre. Une ponctuation noire alors à apparaître, elle correspond aux cléistothèces formés par le téléomorphe. (Nasraoui 2006).

b) Biologie

L'infection primaire est assurée par les ascospores et les fragments mycéliens du champignon qui se trouvent uniquement sur les chaumes infectés car les semences ne transmettent pas la maladie. Les infections secondaires sont provoquées par les conidies libérées par le champignon à partir des plantes infectées pendant la végétation. C'est une maladie qui se développe beaucoup lorsque l'humidité est moyenne et non en présence d'eau à l'état liquide car les conidies ne germent pas dedans. C'est ainsi que les hivers et printemps très pluvieux sont défavorables à cette maladie. Les températures favorables sont comprises entre 15 et 20 °C et ceci explique l'apparition de cette maladie tôt en hiver. Par temps sec, les conidies sont facilement emportées par le vent qui est le meilleur vecteur d'extension de l'oïdium. (Nasraoui 2006).

Chapitre I : Revue Bibliographique

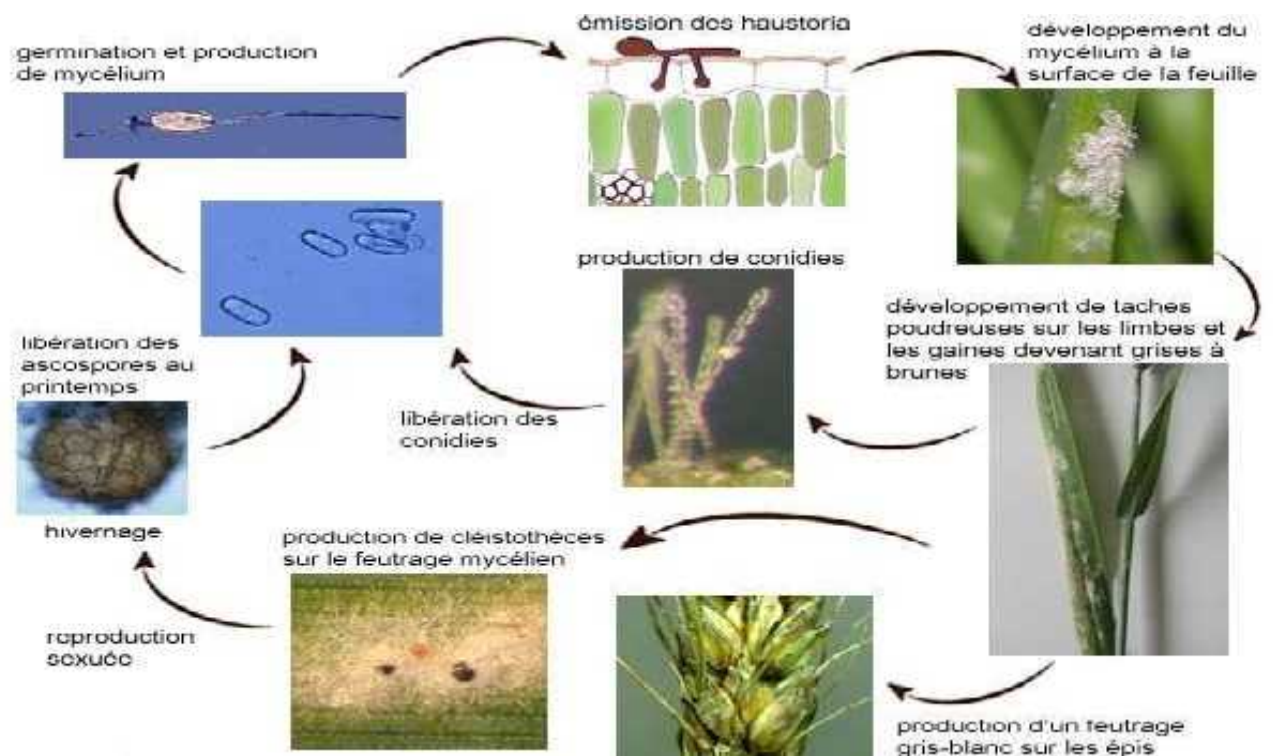


Figure 04 : Cycle de développement de l'agent pathogène : *Erysiphe graminis*.
Source : (Chamant, 2013).

2.1.6. Septoriose foliaire du blé

Deux espèces de *Septoria* s'attaquent au blé : *Septoria tritici* qui touche les feuilles et *Septoria nodorum*, responsable de septoriose des feuilles et des épis. (Ezzahiri 2001). Cette maladie cryptogamique foliaire rencontrée dans toutes les régions de production du Blé participe à la destruction d'environ 2 % du blé mondial et cause des millions de tonnes de grains et des milliards de dollars de pertes chaque année (Zahri et al 2008).

a) Symptôme

Observée non seulement sur le blé mais aussi sur l'avoine, cette maladie attaque principalement la partie foliaire. Elle provoque sur les feuilles du blé (principalement, le blé dur), des taches brunes, d'abord assez irrégulières plus ou moins allongées souvent limitées latéralement par les nervures foliaires et entourées par une bordure chlorotique mince. Puis, elles commencent à se dessécher et devenir de plus en plus clair blanchâtre par le centre. Ensuite, ces taches ne tardent pas à s'étendre pour couvrir de grandes étendues foliaires, voire même la totalité des feuilles si les conditions météorologiques sont favorables. Une multitude de petits

Chapitre I : Revue Bibliographique

points brun foncé à noirs se forment alors au niveau des taches et correspondent aux pycnides de l'anamorphe.

En conditions favorables, l'attaque atteint également les gaines avec l'apparition de taches comparables à celles des feuilles et peut atteindre les épis avec un brunissement des extrémités des glumes, les grains deviennent tachetés (Nasraoui 2008).

b) Biologie

Dès les jeunes stades, la céréale est susceptible d'être infectée par la septoriose. L'infection primaire est due aux conidies et/ou les ascospores libérées par les pluies à partir des pycnides et/ou des pseudothèces (respectivement) se trouvant dans les chaumes infectés des cultures précédentes. En cours de végétation, l'infection est favorisée par une humidité élevée et une température optimale entre 20 et 25 °C. Les infections secondaires sont assurées par les conidies libérées à partir des pycnides formées sur les plantes infectées.

Ces conidies exsudées à la surface des feuilles sont disséminées vers le haut et latéralement par les pluies ; leur dispersion est donc tributaire des précipitations reçues. Les semences ne semblent pas intervenir dans la transmission de la maladie (Nasraoui 2008).

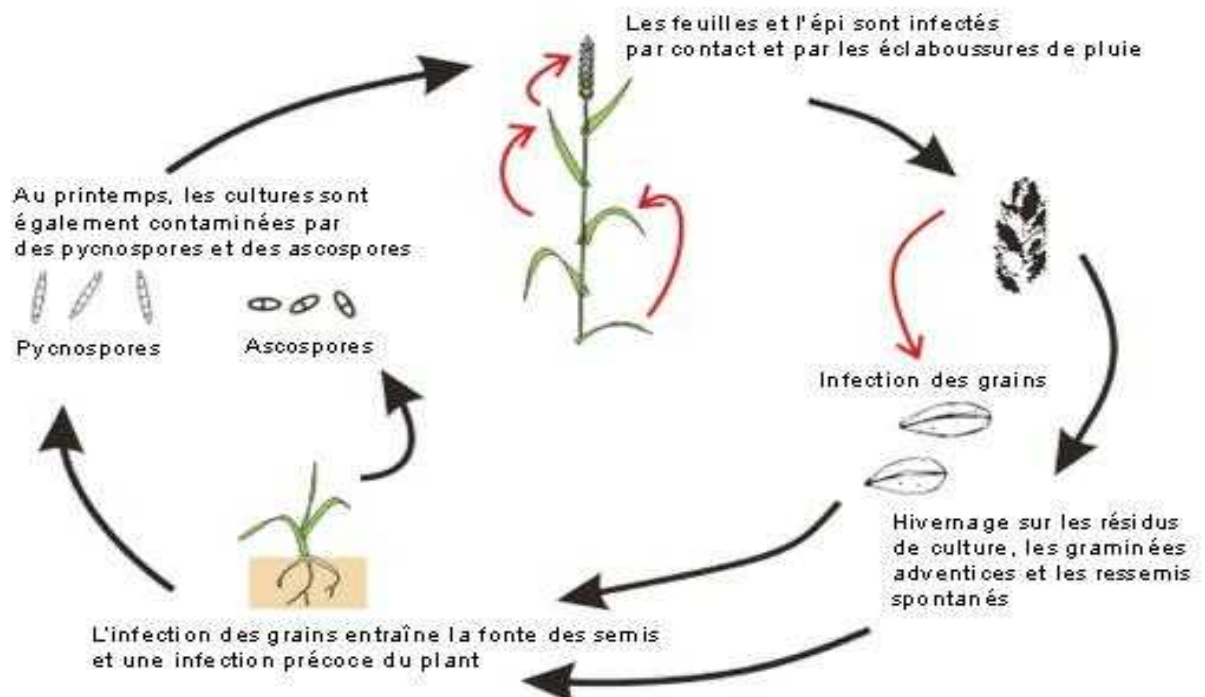


Figure 05 : Cycle de développement de la septoriose du blé

Chapitre I : Revue Bibliographie

2.1.7. Rouille des feuilles (ou brune) du blé

Des pustules orangées apparaissent sur les feuilles et les tiges. Ces pustules sont constituées des pores (urédospores). À la fin de la saison de croissance, ces pustules deviennent noires étant donné la formation des pores connues sous le nom de téléospores. Divers types de rouille affectent le blé et l'orge. Les trois types de rouille (**Amrani 2013**).

Les agents pathogènes responsables des rouilles du blé sont : *Puccinia recondita* f. sp. *Tritici* (agent de la rouille brune), *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (agent de la rouille noire) et *Puccinia striiformis* (agent de la rouille jaune). (**Ezzahiri 2001**).

b) Symptôme

L'identification des rouilles est facile du fait qu'elles forment des pustules caractéristiques. Les pustules correspondent à une déchirure de l'épiderme et l'apparition d'une poudre (orange, brunâtre, rouge brique marron foncé ou jaunâtre en fonction des espèces) composée uniquement de spores facilement transportées par le vent. Les symptômes spécifiques à chaque espèce de rouille sont les suivants :

- Rouille brune : pustules de petite taille, circulaires ou ovales, oranges ou brunâtres. Elles apparaissent de préférence sur la face supérieure des feuilles ;

- Rouille noire : Pustules plus longues que celles de la rouille brune et de couleur rouge-brique à marron foncé. Elle se développe sur les feuilles, sur les tiges et sur les épis ;

- Rouille jaune : Pustules jaunâtres, alignées le long des nervures des feuilles, sous forme de stries. Les pustules se développent aussi sur la face inférieure des feuilles et sur les épis (**Ezzahiri 2001**).

b) Biologie

Bien que la rouille brune du blé puisse infecter une plante hôte secondaire (principalement *Thalictrum* mais aussi *Anchusa*, *Anemonella*, *Clematis* et *Isopyrum*) qui transmet la maladie au blé par l'intermédiaire des écidiospores, il semble que le cycle biologique de *P. recondita* soit plutôt limité uniquement au blé comme hôte principal. Ainsi, il est possible que les régions méditerranéennes à hiver doux permettent la conservation du champignon sous forme d'urédospores ou de mycélium dans les chaumes infectés du blé d'une année à l'autre. Pendant la végétation du blé sous des conditions météorologiques favorables, les urédospores de l'année précédente seraient disséminées par le vent et seraient à l'origine de l'infection primaire du blé pendant fin hiver début-printemps. (**Nasraoui 2008**).

Chapitre I : Revue Bibliographique

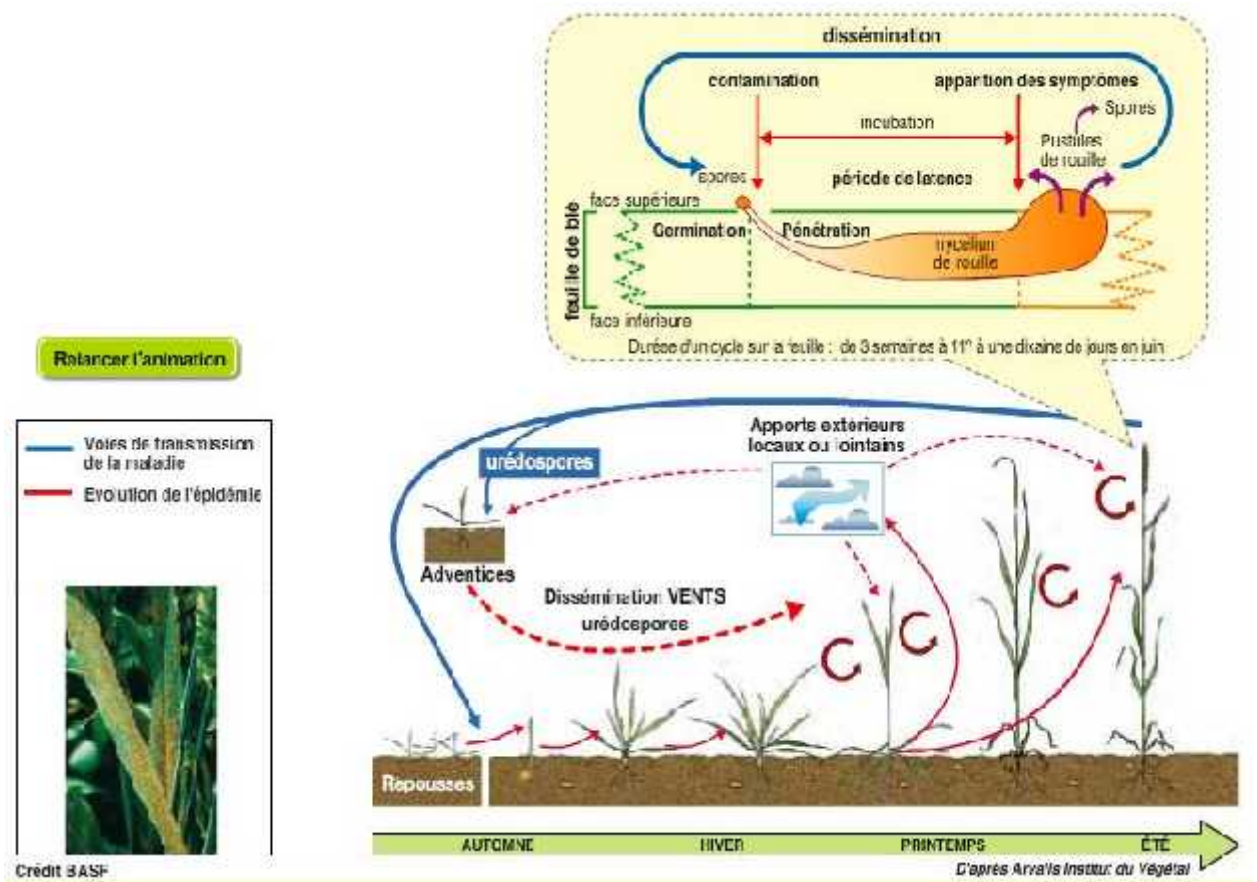


Figure 06 : Cycle de développement de la rouille brune

2.1.8. Charbon des feuilles du blé

L'agent causal est le champignon *Urocystis agropyri*. Il se développe plus particulièrement sur le blé dur. Cette maladie passe souvent inaperçue, malgré sa présence dans la plupart des régions céréalières du Maroc.

a) Symptôme

Observé sur le blé (principalement le blé dur), cette maladie se manifeste par de longues stries sporifères noires parallèles aux nervures foliaires au niveau desquelles l'épiderme éclate. Ce sont les sores qui libèrent les téliospores. Les plantes attaquées restent naines, ne forment généralement pas d'épis et leurs feuilles s'enroulent et se déchirent (Nasraoui 2008).

b) Biologie

Chapitre I : Revue Bibliographique

Les téliospores, qui se présentent sous forme de poussière noire, sont libérées au moment de la moisson et du battage. Elles polluent le sol et les semences saines et permettent ainsi au champignon d'attaquer les cultures de blé de l'année suivante (infection embryonnaire).

L'infection des plantules du blé s'effectue au niveau du coléoptile, en général, pendant la levée, à une température du sol entre 10 et 20 °C. Les téliospores germent en formant des basides qui produisent des basidiospores capables de fusionner pour donner un mycélium infectieux qui attaque les plantules du blé. Le champignon se développe par la suite systématiquement dans toute la plante, mais les symptômes n'apparaissent que sur les feuilles, généralement après le stade montaison. Pendant la végétation du blé, la maladie ne se transmet pas d'une plante à une autre.

Ils existent d'autres pathogènes cryptogamiques tels que l'antracnose du blé et l'antracnose de l'orge, identifiés en Tunisie. (Nasraoui 2008).

2.2. Maladie des racines et du pied

2.2.1. Piétin - échaudage des céréales

La maladie du piétin – échaudage des céréales est causée par le Champignon *Gaeumannomyces graminis tritici*. C'est un champignon du sol qui contamine les racines. Son pouvoir de dissémination est limité (quelques mm). Il peut être dispersé par le travail du sol. En fin de cycle, il conduit à un échaudage des plantes atteintes. Spécifique des graminées.

Le piétin échaudage est une maladie complexe dont le développement est dépendant de multiples interactions. Il n'existe malheureusement pas de solutions miracles. Il est donc impératif de ne pas le laisser s'installer en utilisant toutes les possibilités pour limiter son développement (Arvalis 2017).

a) Symptômes

Observée sur le blé, cette maladie se caractérise par une pourriture sèche au niveau des racines et de la base des tiges qui prennent une couleur brun foncé à noire. Les racines fortement infectées sont en majorité détruites. Au stade épisaison, les épis des plantes infectées mûrissent prématurément et deviennent blancs donnant un aspect de foyers blancs dispersés dans la culture au champ. Ces épis sont stériles ou produisent des grains échaudés de faible pouvoir germinatif (Nasraoui 2008).

b) Biologie

Chapitre I : Revue Bibliographie

Le champignon se conserve dans les chaumes infectés sous forme de mycélium et de périthèces. Les ascospores libérées à partir de ces périthèces ainsi que le mycélium actif sont à l'origine de l'infection primaire. Les infections secondaires pendant la végétation de la céréale sont assurées par les hyphes envahissants qui se développent au niveau des racines d'une plante à une autre.

Les ascospores produites pendant la végétation et disséminées par la pluie et le vent peuvent aussi jouer un rôle dans la réalisation des infections secondaires. Un temps humide et des températures entre 10 et 20 °C sont favorables à cette maladie. Du fait que l'infection se réalise dès les jeunes stades de la plante, il est recommandé de traiter les semences avec des fongicides systémiques pour empêcher l'attaque par le champignon à partir du sol malgré qu'il ne soit pas transmis par les semences.



Figure 07 : Dégâts causé par le piétin - échaudage des céréales

2.2.2. Piétin verse des céréales

Cette maladie de piétin verse des céréales est causée par le champignon : *Mollesia yallundae* (Anamorphe : *Pseudo cercospora herpotrichoides*)

a) Symptôme

Observée sur le blé, cette maladie se caractérise par l'apparition, sur la gaine, de taches elliptiques souvent diffuses avec la formation sur la face interne de cette gaine de points noirs

Chapitre I : Revue Bibliographique

correspondant aux stromes du champignon. C'est avec la formation de ces stromes qu'on différencie l'attaque de *P.herpotrichoides* de celle de *Fusarium* spp.

L'infection continue à évoluer jusqu'à atteindre la tige au niveau du premier entre-nœud et provoque une tache elliptique avec une bordure floue de couleur brune. Les lésions provoquées par cette maladie peuvent entraîner enfin de végétation la verse.

Cette verse parasitaire est différenciée de la verse physiologique par son orientation quelconque et son apparition sous forme de foyers au niveau du champ. Par contre, la verse physiologique est généralement homogène dans le champ et est orientée le plus souvent dans une seule direction correspondant à celle du vent responsable (Nasraoui 2008).

b) Biologie

Le champignon qui se conserve dans les chaumes infectés sous forme de mycélium, attaque la céréale dès le stade levée (infection primaire) directement avec le mycélium actif ou par les conidies qu'il produit sur ces chaumes. Les infections secondaires sont assurées par les conidies formées par le champignon sur la céréale en cours de végétation et disséminées par le vent et la pluie. La production des conidies est maximale lorsque la température est aux environs de 10°C. Un temps frais et humide est favorable à l'extension de la maladie. Au de là de 25°C, l'infection ne semble plus se développer (Nasraoui 2008).

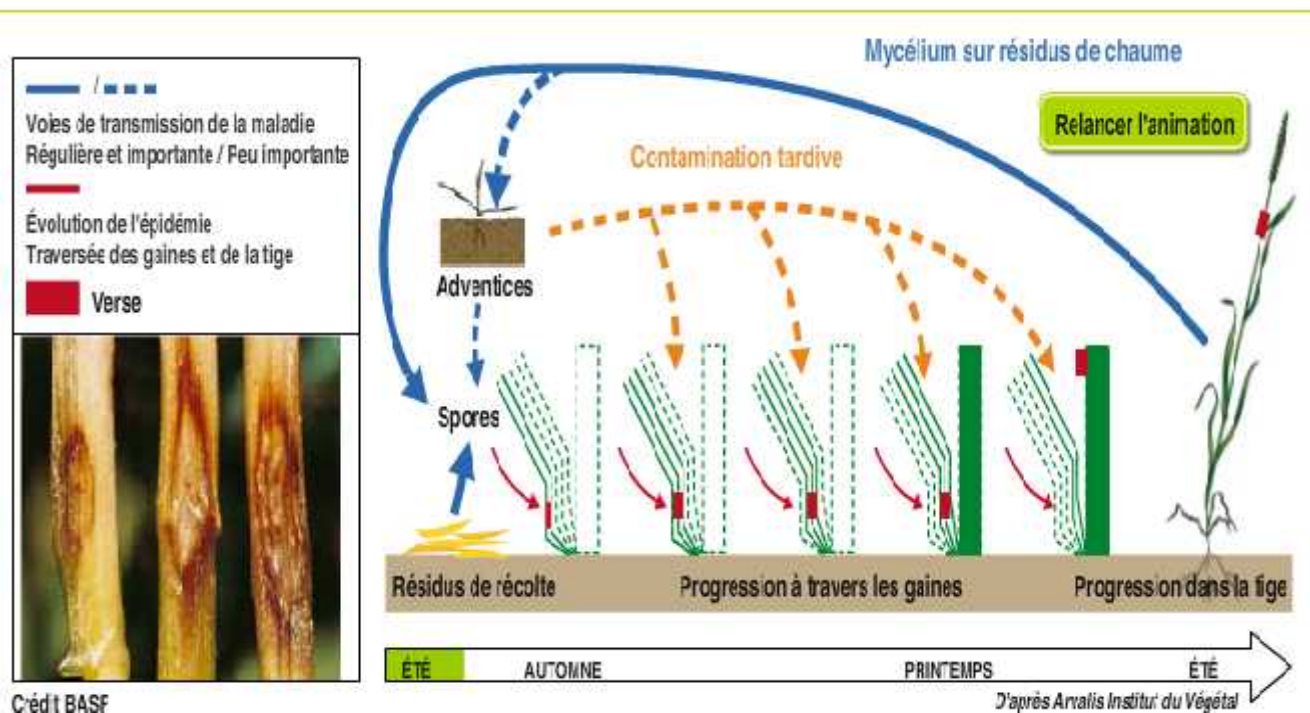


Figure 08 : Cycle de développement de piétin verse

Chapitre I : Revue Bibliographie

2.2.3. Fusarioses des céréales

La maladie affecte le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le triticale et les graminées. Il existe de nombreuses espèces du genre *Fusarium* qui affectent les céréales. Ces champignons forment un complexe de maladies qui infectent les grains, les semis et les plants adultes. Généralement, l'agent pathogène transmis par les semences, *Microdochium nivale* (autrefois appelé *Fusarium nivale*) est également inclus dans ce groupe de champignons. *M.nivale* est le principal agent pathogène du groupe ; il provoque une fonte des semis, qui entraîne la mort des pousses et un éclaircissage. D'autres espèces causent une série de symptômes, notamment des lésions brunes à la base des tiges, souvent confinées à la gaine supérieure de la feuille (**Bazef 2017**).

a) Symptôme

Les plantes atteintes montrent des épis blancs non remplis. Pour s'assurer de la nature exacte de la maladie, on doit arracher quelques plantes atteintes et observer le système racinaire. Des taches brunes sont observées sur le collet, le sous-collet et les racines. (**Ezzahiri 2001**).

b) Biologie

Certaines espèces du genre *Fusarium* sont transmises par les semences et toutes les espèces de ce genre sont des champignons du sol capables de s'y conserver sous forme de mycélium et de périthèces dans les débris infectés et sous forme de chlamydospores. L'infection commence à partir du sol ou des chaumes infectés et concerne les racines et/ou le collet et peut, par la suite, remonter jusqu'aux tiges.

Sur les plantes infectées, le champignon forme son mycélium et libère ses conidies qui seront, pour certaines espèces, transportées par le vent et la pluie jusqu'aux épis dont l'infection peut avoir lieu dès l'épiaison. Il est également probable que le champignon se développe systématiquement à partir du pied de la plante jusqu'à atteindre l'épi intérieurement, mais cette voie d'infection des épis semble être rare. Les épis attaqués donnent des semences infectées capables de transmettre la maladie aux jeunes plantules.

Les conditions optimales pour le développement des fusarioses dépendent des espèces de *Fusarium*, mais souvent l'humidité faible et les températures autour de 20°C sont des conditions favorables pour ces maladies.

Les céréales peuvent être, aussi, attaqués par le piétin-helminthosporiose des céréales (**Nasraoui 2008**).

Chapitre I : Revue Bibliographique

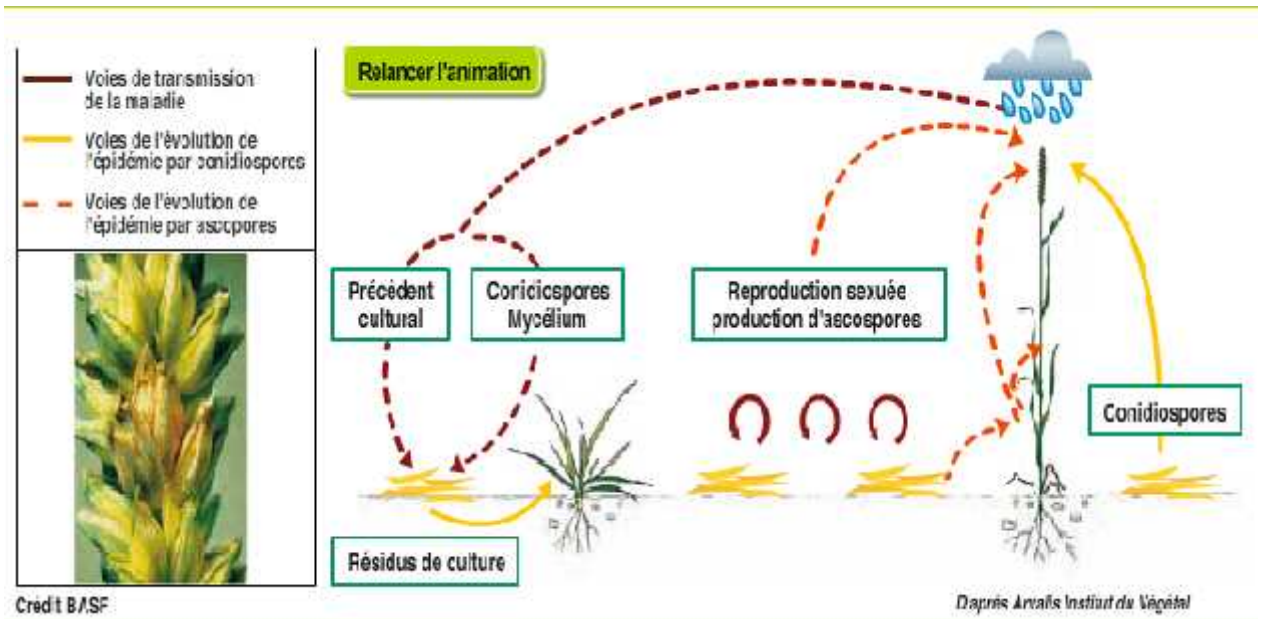


Figure 09 : Cycle de développement de la fusariose

2.3. Maladies cryptogamiques de l'épi

La phase d'épiaison est essentiellement exposée aux maladies de la carie (commune) du blé, le Charbon couvert de l'orge et de l'avoine, charbon nu des céréales et la cladosporiose du blé.

3. Lutte contre les maladies fongiques

L'un des grands problèmes que rencontre la céréaliculture est la lutte contre les pathogènes cryptogamiques qui sont dangereux pour les récoltes mais aussi ils provoquent des intoxications pour les consommateurs. Le développement des méthodes de lutte contre les maladies fongiques accroît la quantité et améliore la qualité de la production des plantes. Elles varient considérablement d'une maladie à une autre en fonction du pathogène, de la plante hôte, de leur interaction et des conditions de l'environnement. Elles peuvent être des méthodes culturales, biologiques, génétiques, physiques et chimiques (Nasraoui 2008).

4. La lutte Biologique des maladies cryptogamiques chez les céréales

La lutte biologique, qui est le contrôle d'un ravageur par un ennemi naturel, est naturellement présente dans la plupart des écosystèmes. Elle peut être utilisée volontairement, en agriculture, entre autres, en remplacement des pesticides conventionnels. En comparaison à ces derniers, la lutte biologique est beaucoup plus écologique mais a également des coûts

Chapitre I : Revue Bibliographie

d'application substantiellement plus élevés. De nombreuses applications de la lutte biologique ont eu lieu dans le passé, avec succès ou non.

Les principaux avantages de la lutte biologique sont son innocuité, sa spécificité, son acceptabilité sociale potentielle, l'absence de développement de résistance chez les ravageurs, son adaptabilité aux cultures québécoises et la potentielle valeur ajoutée aux produits ainsi cultivés.

Les principaux inconvénients sont le risque d'effet sur des organismes non dirigés, son irréversibilité, les appréhensions de certains consommateurs, son coût actuel élevé, la complexité de production de certains auxiliaires et son effet restreint. Il est important de préciser qu'autant ces avantages que ces inconvénients sont variables selon l'auxiliaire, le ravageur et les conditions d'utilisation. **(Noémie Lambert 2010).**



Chapitre II : Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'Ecologie et le laboratoire de Biologie Moléculaire, université des frères Mentouri Constantine 1.

1. Matériel végétal

Dans le but de tester l'effet des lombriciens sur les maladies cryptogamiques du végétal, nous avons utilisé une variété de blé tendre (*Triticum aestivum*) en présence et en absence d'un champignon pathogène.

2. Provocation de la maladie cryptogamique

2.1. Méthode de préparation de la solution fongique

À l'aide d'une spatule stérile, nous avons prélevé des petits fragments du champignon (*Fusarium*) en fructification dans une boîte de Pétri par grattage de la surface de la boîte. Le prélevât est ensuite introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée et 5% de Tween 80. La solution ainsi obtenue (solution mère) a été mise en agitation pendant 10 minutes pour une libération maximale des spores. La concentration de la solution fongique a été évaluée à l'aide d'une cellule hématimétrique « Cellule de Thoma ou malassez ».

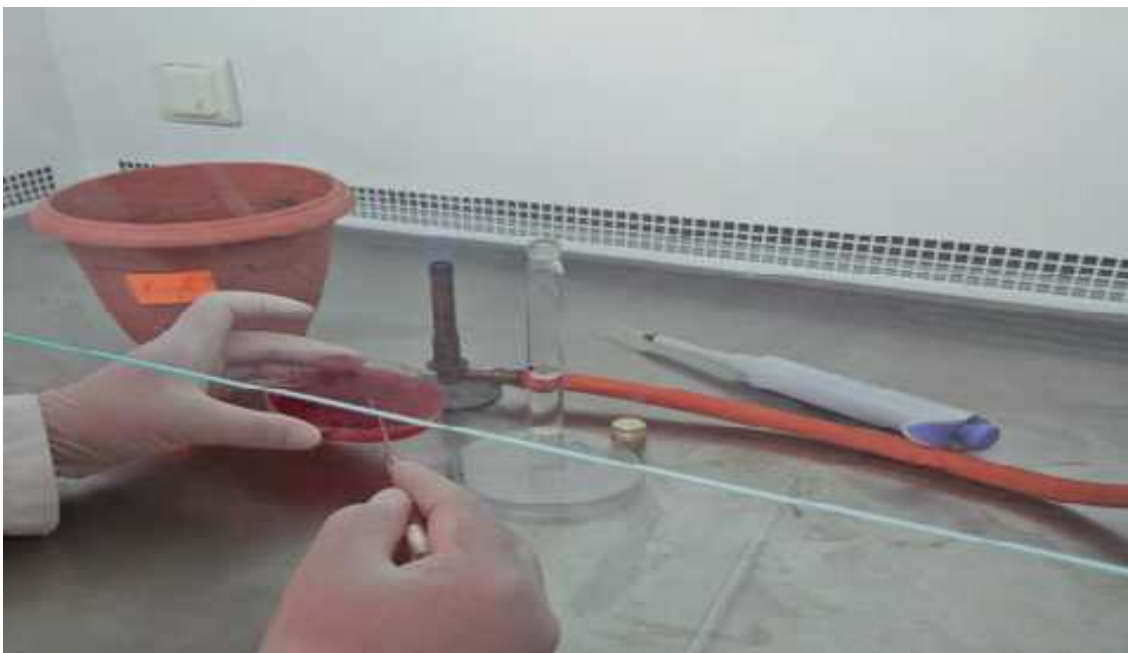


Photo 01 : Préparation de la solution fongique

Chapitre II : Matériel et méthodes

3. Protocole expérimental

Pour réaliser notre test sur la réponse de la plante au pathogène cryptogamique en absence et en présence des vers de terre, nous avons préparé les milieux de culture suivants :

- A. un traitement témoin présence des vers de terre (V)
- B. Présence de champignon pathogène (*fusarium*) (P)
- C. Présence de champignon pathogène et les vers de terre (PV)
- D. Présence des turricules des lombriciens (T)
- E. Présence des turricules des lombriciens et le champignon pathogène (TP)

3.1. Préparation des milieux de cultures

L'expérimentation est réalisée au laboratoire dans des conditions expérimentales semi contrôlée. Des graines de blé tendre sont semés dans des pots en plastique remplis du sol et d'autres graines sont germées dans des pots contenant des turricules des vers de terre (6 graines /pot).



Photo 02 : Milieux de culture de blé tendre (*Triticum aestivum*)

4. Préparation des échantillons

Après germination et au stade 3^{ème} feuilles, l'avant dernière feuille de chaque génotype est coupée avec un ciseau stérile, puis placée dans des mortiers stérile pour le broyage dans l'Azote liquide. La poudre obtenue est récupérée dans un tube Eppendorf stérile de 2 ml, ensuite nous procédons à l'extraction d'ARN selon la méthode de TRIZOL.

Chapitre II : Matériel et méthodes

4.1. Mise en expérimentation

L'analyse du transcriptome est une technique à grande échelle permettant d'étudier l'expression simultanée d'un gène. Pour réaliser cette validation on procède de la façon suivante :

- extraction des ARN totaux foliaires ;
- rétrotranscription des ARNm en ADN complémentaire (ADNc) ;
- analyse de l'expression des gènes en qPCR

4.2. Extraction des ARN totaux foliaires

Le protocole d'extraction est décrit dans l'annexe 01.

4.3. Analyse quantitative et qualitative des ARN totaux extraits

4.3.1. Dosage des ARN au Nanodrop

Les ARN sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND-2000) en déposant 1,5 μ l d'échantillon. Les deux principaux avantages du dosage au Nanodrop sont :

- le faible volume d'échantillon nécessaire ;
- Non besoin de dilué l'échantillon.



Photo 03 : Nanodrop 2000 pour dosage de l'ARN

4.3.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Chapitre II : Matériel et méthodes

Les Rnase étant présentes par tout, il est nécessaire d'en débarrasser tout le matériel d'électrophorèse (cuve, moules et peignes) pendant 20 mn de trempage dans une solution de NaOH 0.4M. Il faut rincer abondamment le matériel d'électrophorèse à l'eau distillée avant de remplir la cuve de tampon TBE et de commencer la préparation du gel.

Le principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose repose sur la migration des molécules d'acides nucléiques et de leurs séparation selon leur taille. A potentiel Hydrogène (pH) basique, l'ADN (ou l'ARN) est chargé négativement de part les charges négatives portées par les groupements phosphates. Dans du tampon Tris, Borate, EDTA (TBE) 0.5X (pH 8) et sous l'impulsion d'un champ électrique, l'ARN va migrer vers l'anode en fonction de sa taille.

Le gel contient 1,5% d'agarose et est coulé avec du bromure d'éthidium (BET) dilué au 1/20 000. Le BET, agent intercalant de l'ADN, est une molécule qui va s'intercaler entre les bases des nucléotides de l'ADN et émettre une fluorescence une fois excitée par les rayons UV. Le marqueur moléculaire Benchtop100bp DNA Ladder (GeneON, Germany) est déposé afin de contrôler la taille des fragments d'ARN (**annexe 2**). La migration s'effectue dans du tampon TBE 0.5X sous un champ électrique de 100 Volts pendant 45 minutes. Le gel est ensuite photographié sous UV (Transilluminator, Fisher) et analysé à l'aide d'un système d'imagerie avec une imprimante (Sony).

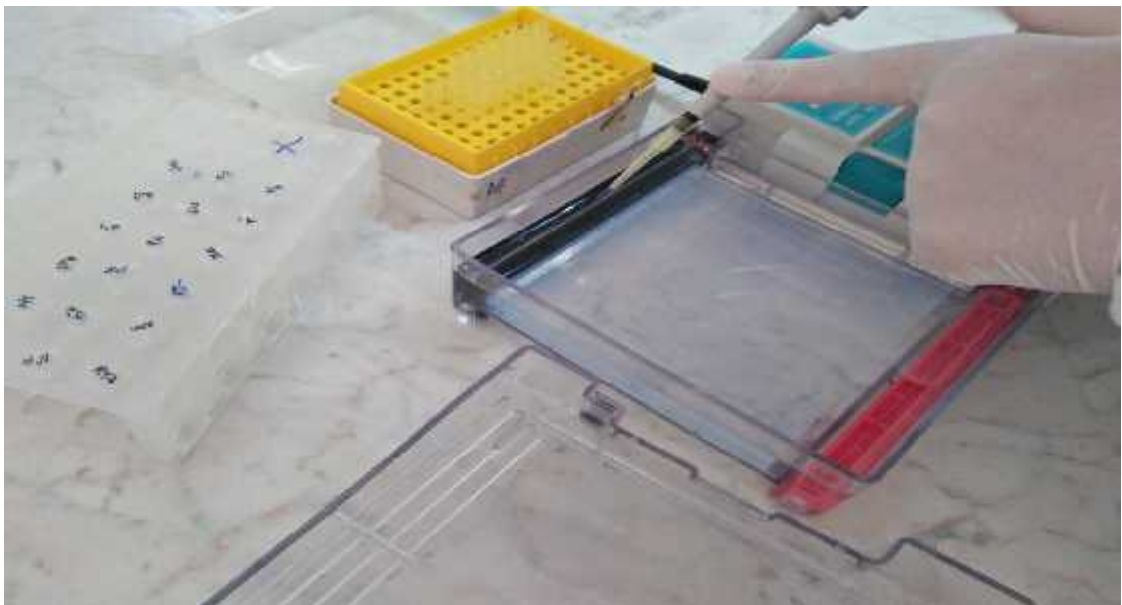


Photo 04 : Dépôt des échantillons dans la cuve d'électrophorèse

Chapitre II : Matériel et méthodes



Photo 05. Le système d'imagerie

5. Traitement à la DNaseI

Le protocole de traitement à la DNaseI est décrit dans l'**annexe 03**.

6. Transcription inverse des ARNm en ADNc

Le principe de la transcription inverse est de synthétiser un ADNc à partir d'une Matrice d'ARN messenger. Ceci est rendu possible grâce à une enzyme appelée communément transcriptase inverse. Cette technique permet de rétrotranscrire les ARNm en ADNc. Ce dernier peut être utilisé comme matrice en PCR.

Le protocole de transcription inverse des ARNm en ADNc est décrit dans l'**annexe 04**.

7. Synthèse d'ADNc de premier brin

Le protocole de synthèse d'ADNc de premier brin est décrit dans l'**annexe 05**.

7.1 Dosage des ADN au Nanodrop

8. Amplification des ADNc par Polymérase Chain Réaction (PCR)

Cette technique fut imaginée par le scientifique américain **Karry Bank Mullis** et développée par le Dr **H.A. Herlich** en 1985. Elle consiste à amplifier in vitro, à l'aide d'une

Chapitre II : Matériel et méthodes

réaction enzymatique, un segment d'ADN connu en un très grand nombre de copies à partir d'une faible quantité dans le but de permettre sa détection. Elle est également utilisée afin de détecter la présence d'un gène dans le milieu d'étude.

8.1 Recherche et mise au point d'amorces

Des séquences nucléotidiques spécifiques correspondantes aux gènes d'intérêt et de référence sont identifiées chez *Triticum aestivum* dans la banque de données du « National Center for Biothechnology Information » (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les amorces sont ensuite dessinés via le programme Primer3 dans la région codante (CDS : «Coding DNA Sequence») de la séquence d'intérêt selon plusieurs critères permettant une meilleure spécificité des amorces :

- température de fusion (Tm) : 55°C à 60°C ;
- taux en G et C : 40 à 70% ;
- longueur des amorces : 16 à 24 nucléotides.

Pour la réalisation de la PCR, le volume réactionnel utilisé est de 25 µl on a procédé à réaliser l'amplification de l'ADN dans des tubes eppendorf de 0.2 µl. La composition du mélange réactionnel est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Composition de mélange réactionnel de la PCR

Réactif	[Finale]	1 réaction (25µl)	Qté X Nb totale des réactios (40)
TP 10X	1	2.5µL	100 µL
D'NTP 2.5mM	0.25mM	2.5µL	100 µL
Mgcl2 25mM	0.25mM	4.0µL	160 µL
Amorce sens 10 µM	0.1mM	5µL	5 µL
Amorce anti-sens 10 µM	0.1mM	5µL	5µL
Taq DNA polymerase 5U/µl	0.02U/µl	0.3µL	15µL
H2O up	Qsp vol. final	3.2µL	125µL

Le tableau 5 résume les programmes des PCR utilisés pour l'amplification del'ADNc étudiés qui dépend de la température d'hybridation (Ta) des couples d'amorces, ainsi que le temps dépend de la taille des fragments à amplifier.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Tableau 02 : Les programmes des PCR

Nombre de cycles	Température	Durée
Dénaturation	94°	5 min
Dénaturation	94°	30 sec
Hybridation x35	56°C	30 sec
Élongation	72°C	40 sec
Élongation finale	72°C	10 min



Photo 06. Thermocycleur

8.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour la lecture des résultats on a préparé un gel d'agarose de 1.8% (P/V) soit 1.8g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE (tris borate EDTA).

Le gel est amené doucement à ébullition dans un four à microonde, ainsi il est refroidi avant de verser le gel dans le support de la cuve. Lorsque le gel d'agarose est solidifié, le support contenant le gel est placé dans l'appareil de l'électrophorèse rempli par le tampon.

Aux produits de PCR on a déposé 10 μ l dans chacun des puits du gel submergé de tampon d'électrophorèse. Dans l'un des puits de chaque gel on a déposé 5 μ l de marqueur de taille (ladder) de 100 pb (biomatik) qui permet de vérifier la taille des fragments amplifiés.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Une fois, la migration des échantillons effectuée sous 100 V pendant 45 min est terminée nous passerons à la lecture des résultats.

Le traitement des images des gels après électrophorèse et la taille des bandes a été réalisé par le système d'imagerie.



Chapitre III : **Résultas et Discussion**

Chapitre III : Résultat et discussion

1. Provocation de la maladie cryptogamique

1.1. Le nombre des sports incité

D'après le **schéma 1**, le résultat de nombre de spore provoqué est satisfaisant pour voir les signes de la maladie cryptogamique ($=10^7$), calculé ainsi :

3.2 Spores / (0.2 x 0.0025) par rapport au volume de la cellule 1 μ l

$$3.2 / 5 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 = 0.64/10^{-4} \text{ mm}^3$$

$$10^{-4} \text{ mm}^3 = 10^{-7} \text{ ml} \text{ donc } 0.64/10^{-7} \text{ ml} = 0.64 \times 10^7 \text{ spores /ml} = 10^7 \text{ spores/ml}$$

5	4	3	2	1
2	3	2	9	18
3	1	1	3	5
0	1	2	1	0
1	2	4	4	2
Totale = 64/20				
Moy = 3.2 spores				



Schéma N°1. Le nombre des sports provoqué

Ces résultats nous permettent d'entamer la deuxième phase et la préparation des milieux de culture permettant l'apparition de la maladie cryptogamique chez le matériel végétale utilisé (blé).

2. Effet du fusarium sur la croissance de la plante

Après la germination et la croissance des plants au laboratoire, nous avons observés des signes de l'effet négatif du fusarium sur la ramification des racines fasciculés du blé, elle est dense chez les plantes du milieu de culture riche en turricules des lombriciens en présence du champignon et nul chez les plantes cultivées en absence des turricules et en présence de champignon.

Chapitre III : Résultat et discussion



Photo N°08. Effet du fusarium sur la croissance de la plante

En effet, dans le sol, les relations entre organismes sont susceptibles d'influencer le développement de maladies provoquées par les agents pathogènes telluriques. Des chercheurs de l'Inra et leurs collègues ont ainsi montré que la présence de vers de terre permet de réduire l'incidence d'une maladie fongique, le piétin verse, sur le blé.

Des chercheurs de l'Inra et leurs collègues ont analysé la réponse de deux variétés de blé tendre d'hiver à la présence du champignon pathogène responsable, *Oculimacula yallundae* et de vers de terre de l'espèce anécique *Lumbricus terrestris*. Ils ont ainsi mis en évidence que la présence de *L. terrestris* agit soit directement sur le champignon pathogène, en favorisant sa destruction soit indirectement en augmentant la résistance des plantes à l'infection.

En effet, Les plantes se développent et évoluent en interaction avec les organismes du sol. L'impact des vers de terre sur la croissance des plantes, généralement positif, a été attribué à des modifications physiques, chimiques ou biochimiques du sol, souvent sans démonstration rigoureuse.

Chapitre III : Résultat et discussion

La production de molécules-signal à l'intérieur des déjections de vers de terre a un impact significatif sur la croissance d'*Oryza sativa* et *Lolium perenne*. Ces molécules agissent sur la voie de signalisation fortement liée à l'auxine. L'abondance de ces molécules-signal en présence de vers de terre pourrait être liée à la stimulation de certaines populations bactériennes capables de synthétiser de l'auxine.

Les recherches de Puga-Freitas R. et al., (2012), révèlent que le ver de terre induit une accumulation de transcrits pour des gènes sous contrôle de l'acide jasmonique et de l'éthylène. Ces hormones sont notamment impliquées dans un mécanisme de résistance systémique induite (ISR), connu pour être induit par certaines rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Ils ont montré que le piétin échaudage, maladie due à un champignon pathogène, déclenche chez le blé (*Triticum aestivum*) une réaction d'hypersensibilité et une modification de la signalisation hormonale, qui sont considérées comme des mécanismes de contrôle du métabolisme de la plante qui facilitent l'infection du pathogène. La sévérité de cette maladie est réduite en présence de vers de terre. La synthèse de ces résultats indique que les vers de terre, comme d'autres organismes du sol, modifient l'équilibre hormonal de la plante. L'homéostasie hormonale apparaît comme un élément incontournable pour prédire l'issue des interactions multiples que les plantes entretiennent avec les organismes du sol.

En outre, les travaux de Persello-Cartieaux et al., (2003) ; Spaepen et al., (2007) ont dévoilé que les bactéries du sol sont connues pour être capables de produire un large spectre de molécules actives sur la physiologie des plantes. Ces molécules vont agir notamment au niveau de la morphogenèse racinaire (production de poils absorbants et de racines latérales), pouvant conduire à une optimisation du prélèvement des nutriments et de la synthèse d'exsudats par la plante.

Ces rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) synthétisent et excrètent des hormones végétales, qui sont des substances organiques interagissant avec la physiologie de la plante à des doses très faibles (Frankenberger & Arshad, 1995 ; Persello-Cartieaux et al., 2003., Hayat et al., 2010).

Il faut noter aussi que la capacité à produire des phytohormones de la famille des auxines, des cytokinines ou encore de l'éthylène, semble largement répandue au sein des microorganismes de la rhizosphère (Frankenberger & Arshad, 1995., Persello-Cartieaux et al., 2003., Hayat et al., 2010).

Chapitre III : Résultat et discussion

En ce qui concerne l'effet sur les mécanismes de défense de la plante, les études de Persello-Cartieaux et al., (2003) ; Ryu et al., (2004) ; Bakker et al., (2007) ; van Wees et al., (2008) ; Hayat et al., (2010) montrent que certaines PGPR, sont capables d'améliorer la performance des plantes en activant des résistances systémiques chez ces dernières, leur conférant ainsi un large spectre de résistance face à de nombreux pathogènes et insectes.

Selon (Elmer, 2009), l'interaction des vers de terre avec ces populations de PGPR, capables de promouvoir la croissance des plantes, via la synthèse de nombreux composés proches des hormones végétales reste à démontrer. Cependant, l'effet des vers de terre, sur la réduction de la sévérité de nombreuses maladies, a été démontré à de nombreuses reprises (Stephens et al., 1993., Stephens et al., 1994; Stephens & Davoren, 1995; 1997; Clapperton et al., 2001; Wolfarth et al., 2011). Leurs effets sur la réduction de certaines maladies chez les plantes sont souvent associés à une meilleure nutrition des plantes ou encore à un effet de prédation par le vers de terre.

Ces hypothèses ne suffisent pas dans certains cas à expliquer l'effet observé des vers sur la réduction de la maladie (Blouin et al., 2005., Elmer, 2009).

L'hypothèse d'une action combinée avec certains microorganismes du sol afin de produire des composés antibiotiques et/ ou d'induire des réponses systémiques de défense chez la plante est une hypothèse parcimonieuse pour expliquer l'effet des vers.

3. La réponse moléculaire de l'effet des vers de terre contre le *Fusarium*

3.1 Vérification de la quantité d'ARN extrait

Pour vérifier la performance, la qualité et la quantité de l'ARN extrait le Nanodrop révèle les résultats suivant :

On note que les concentrations obtenues sont largement suffisantes pour un bon déroulement d'une amplification d'ADN, les concentrations de nos échantillons varient entre 15540.5 ng/μl et 1008.3 ng/μl, pour Plante et champignon pathogène, Plante et turricules 2 (Tableau 3).

Les protéines absorbent majoritairement à 280 nm, les composés humiques et phénoliques majoritairement à 230 nm, et l'ADN majoritairement à 260 nm.

Chapitre III : Résultat et discussion

Les rapports A^{260}/A^{280} et A^{260}/A^{230} permettent d'évaluer la pureté des acides ribosomique présents dans chaque échantillon.

Pour considérer un échantillon pur en ARN, le rapport A^{260}/A^{280} doit être supérieur à 2,0 (pour de l'ADN pur, le rapport doit être compris entre 1,8 et 2,0). Si ce rapport est inférieur à 1,8 la contamination en protéines est considérée comme importante.

L'analyse de rapport 260/280 est en moyenne de 1.99 ng/ μ l (valeurs varient entre 2.08 et 1,85). Ce qui nous permet de dire que nos extraits d'ARN sont purs des contaminations protéiques ou ADN.

L'analyse de rapport 260/230 est en moyenne de 0.99 (valeurs varient entre 1.48 et 0.37). Ce qui nous permet de dire que dans nos extraits d'ARN il existe des traces des produits phénoliques.

L'analyse des rapports $R_1 = 260/280$ et $R_2 = 260/230$ montrent que la pureté d'ARN pour les contaminations en protéine et en ADN respectivement est assurée ($R = R_1/R_2 = 2.01$) ; pour cette évaluation les normes utilisées selon **Nolan et al., (2006)** sont :

- $1,8 < R < 2$ ADN est pur
- $R < 1,8$ Contamination par les protéines
- $R \geq 2$ Présence d'ARN

Tableau 3 Quantités d'ARN extraites chez les différents génotypes étudiés.

Génotypes étudiés		Concentration d'ARN (ng/ μ l)	260/280	260/230
1	Plante + verre de terre	13057.6	2	1.48
2	Plante + verre de terre	8034	2.04	1.08
3	Plante + verre de terre	4160.1	2.04	1.21
4	Plante +champignon pathogène	15540.5	1.85	1.5
5	Plante +champignon pathogène	2645.4	2.08	0.9
6	Plante +champignon pathogène	1703.1	2.05	0.73
7	Plante +champignon pathogène+ verre de terre	2539.3	2.08	0.63
8	Plante +champignon pathogène+ verre de terre	1096.7	1.96	1.11
9	Plante +champignon pathogène+ verre de terre	5013.8	1.97	1.23

Chapitre III : Résultat et discussion

10	Plante + turricules 1	3950	1.95	0.81
11	Plante + turricules 2	1008.3	1.88	0.37
12	Plante + turricules 3	8961.9	2.04	0.99
13	Plante + turricules + champignon 1	1448.4	2.03	0.57
14	Plante + turricules + champignon 2	3275	2.04	0.77
15	Plante + turricules + champignon 3	13859.9	1.97	1.4
			Moy = 1.99	Moy = 0.99

Donc le contrôle au Nanodrop (Tableau 3) Rapport $R_1/R_2 = 2.01$ confirme que le degré de pureté de l'ARN des échantillons est bon.

3.2. Qualité d'extraction

A partir des résultats d'électrophorèse effectuée sur les extraits d'ARN des différents génotypes étudiés, on note que la qualité des extraits d'ARN est bonne et ceci se rapporte à l'obtention de deux bandes qui nous indiquent sur la qualité de l'extraction. Ces deux bandes représentent les sous unité de ARNr 28S (grande sous unité 4700 pb) et 18S (petite sous unité 1900 pb). Si les deux bandes sont intactes et bien visualisées cela veut dire que le reste des ARN dans l'extrait sont bonne.

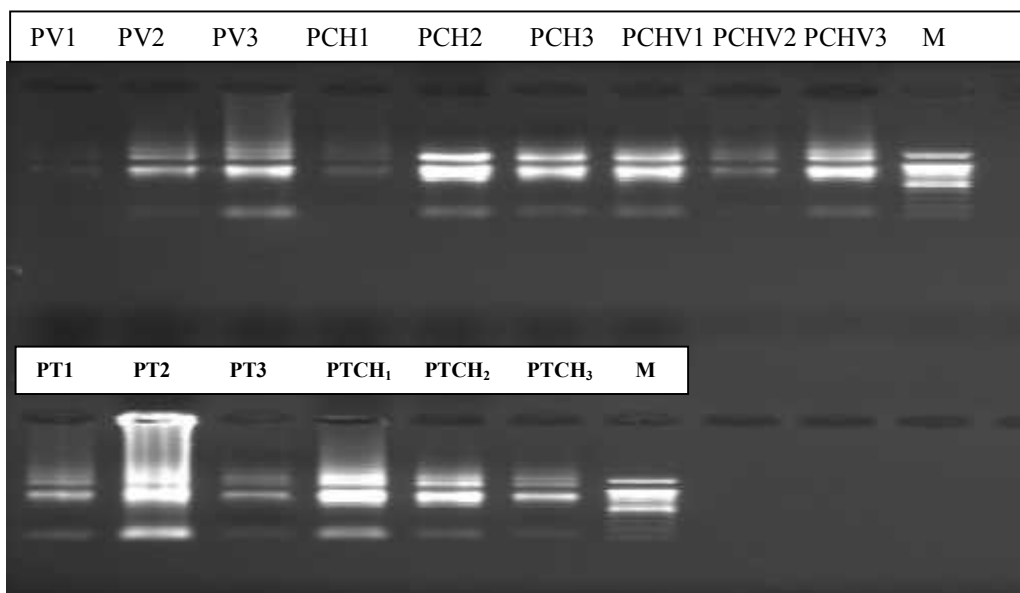


Figure 10 : Analyse de la qualité d'extraction de 1 µg d'ARN des échantillons étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

Chapitre III : Résultat et discussion

4. Traitement DNaseI

Le traitement des échantillons à la DNase permet la digestion des ADN génomiques et la stabilité des ARN. Pour vérifier la quantité d'ADN produit, le Nanodrop visualise les résultats suivant :

Tableau 04 Quantités d'ADN chez les différents géotypes étudiés.				
Géotypes étudiés		Concentration d'ARN (ng/μl)	260/280	260/230
1	Plante + verre de terre	988,1	1,81	1,34
2	Plante + verre de terre	1009,3	1,8	1,27
3	Plante + verre de terre	1132,6	1,8	1,01
4	Plante +champignon pathogène	946,9	1,81	0,88
5	Plante +champignon pathogène	753,7	1,81	0,74
6	Plante +champignon pathogène	947	1,82	0,89
7	Plante +champignon pathogène+ verre de terre	894,4	2.01	0,89
8	Plante +champignon pathogène+ verre de terre	881,9	1,81	0,94
9	Plante +champignon pathogène+ verre de terre	998,1	1,81	0,89
10	Plante + turricules 1	966,6	1,81	0,94
11	Plante + turricules 2	1063,2	1,82	1,87
12	Plante + turricules 3	841,7	1,83	0,91
13	Plante + turricules + champignon 1	335,7	2.02	0,54
14	Plante + turricules + champignon 2	428,1	2.00	0,51
15	Plante + turricules + champignon 3	790,7	1,82	0,7
16	RT+	812,3	2.01	2,1
17	RT-	736,2	1,83	2,13
			Moy=1.87	Moy= 1.10

Chapitre III : Résultat et discussion

Le contrôle au Nanodrop (Rapport $R_1 / R_2 = 1.7$) confirme que le degré de pureté des ADNc de nos échantillons est bon ce qui nous permet de passer à la PCR.

5. Amplification des ADNc par Polymérase Chain Réaction (PCR)

Les résultats d'électrophorèse de l'amplifiat APT1 (gène de référence) de ces génotypes montrent l'absence d'une amplification pour ce gène sachant que les résultats attendus de l'amplification est de 124 pb selon Olivier Saulnie (2012). Ceci est peut-être dû à la qualité des ADNc synthétisés ou probablement aux DNTP utilisés qui peuvent influe directement sur la PCR car on a remarqué que l'excès d'amorces est très concentré sur le gel obtenu, ce que explique que la PCR n'a pas déroulé du tous. Ainsi pour le témoin (produit pcr) on a enregistré une amplification d'une bande.

Cependant pour l'électrophorèse de gène BGLU (gène d'intérêt) de ces génotypes aucune amplification n'a été enregistré, sachant que les résultats attendus de l'amplification est de 161 pb selon Olivier Saulnie (2012). Ceci est peut-être dû à la qualité des ADNc synthétisés ou probablement aux DNTP utilisés qui peuvent influe directement sur la PCR car on a remarqué que l'excès d'amorces est très concentré sur le gel obtenu, ce que explique que la PCR n'a pas déroulé du tous. Ainsi pour le témoin (T^+) on a enregistré une amplification d'une bande.

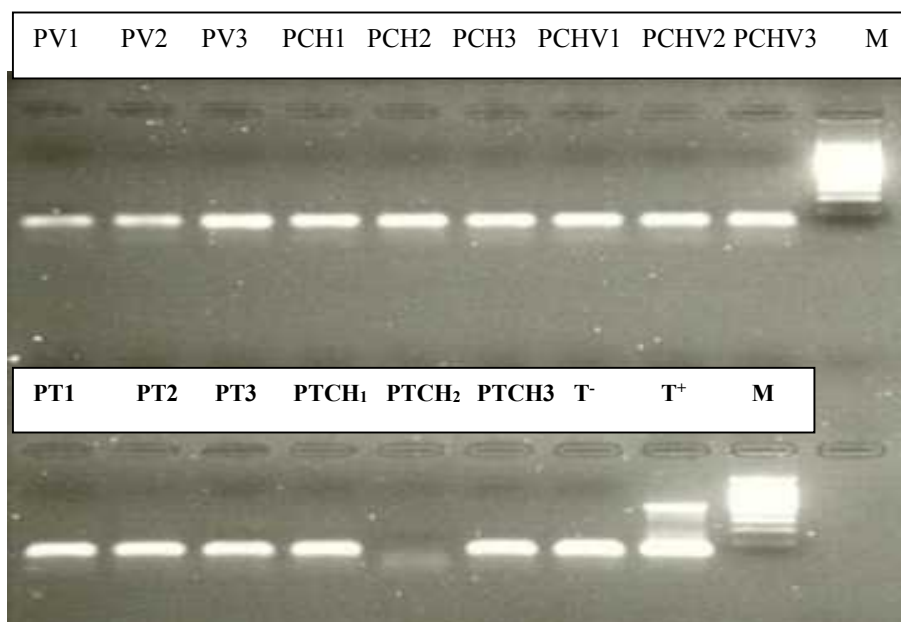


Figure 11 : Vérification de l'amplification du *Locus APT1* sur gel d'agarose de 1.8 % chez les 17 génotypes étudiés

Chapitre III : Résultat et discussion

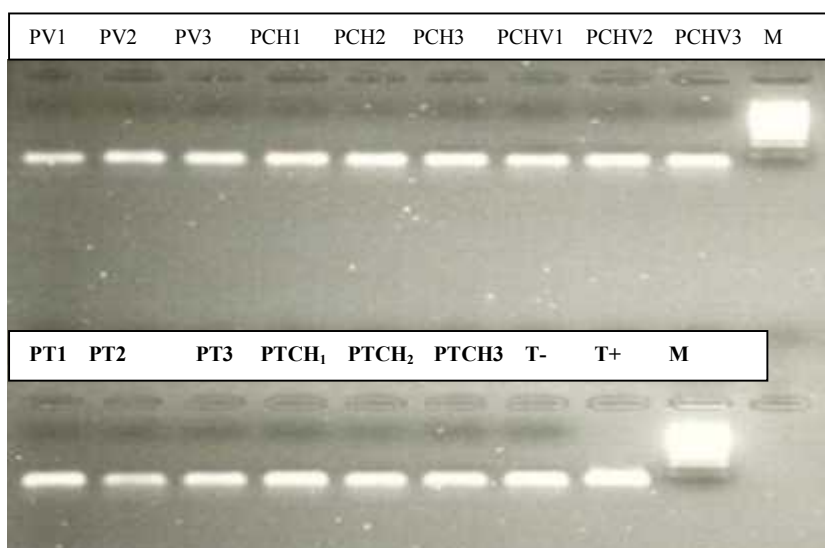


Figure 12 : Vérification de l'amplification du **Locus BGLU** sur gel d'agarose de 1.8 % chez les 17 génotypes étudiés

Van Loon et al., (2006), a observé en présence de vers de terre au niveau des feuilles une accumulation des transcrits pour certains gènes induits lors de stress biotiques ou abiotiques, Certains de ces gènes sont sous contrôle de certaines hormones végétales comme les jasmonates (JA) et l'éthylène.

Pour notre cas, l'absence de différence au niveau de l'accumulation des transcrits pour des gènes semble indiquer que le vers de terre n'exercent pas un stress sur le système racinaire de la plante comme celui que l'on pourrait rencontrer avec l'attaque de certains insectes herbivores (Engelberth et al 2012).

Mais vu les résultats observés sur la ramification des racines des plantules en présence / et ou en absence des turricules des lombriciens, nous pouvons conclure que la PCR n'a pas déroulé du tous.



Conclusion générale

Conclusion

L'impact des vers de terre et des microorganismes du sol sur la modification des propriétés physiques et chimiques du sol a été déjà largement étudié.

Dès que le sol rentre en contact avec le tube digestif du vers de terre, il va subir de profonds changements physico-chimiques et biologiques qui affectent l'ensemble du profil du sol. Ces changements sont les facteurs déterminants pour expliquer l'effet des vers de terre sur les plantes et sont fortement dépendants de la classe écologique du vers de terre étudié.

De l'interaction entre les vers de terre, les microorganismes du sol et la plante va résulter des bénéfices mutualistes pour chacun des organismes.

De cette relation tripartite découle de nombreux services et modifications de l'environnement pouvant influencer la croissance des plantes. Ces modifications étant tant d'ordre physique (modification de la porosité et de l'agrégation), chimique (enrichissement en minéraux et matière organique) que biochimique (via la synthèse de molécules agissant directement sur la physiologie de la plante).

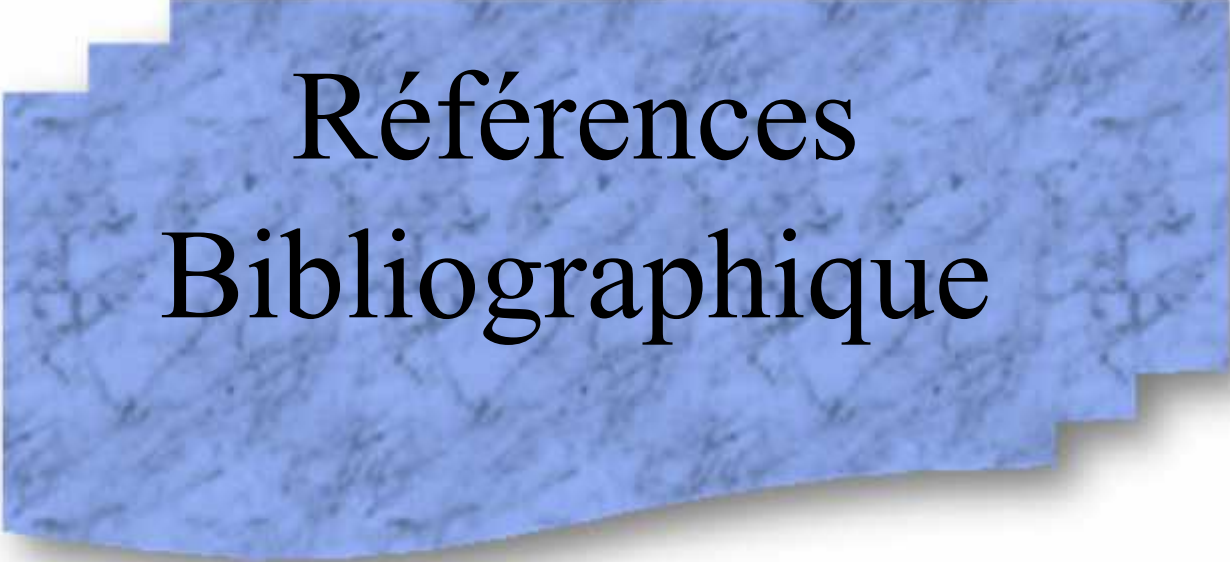
Dans notre travail, nous avons observé un effet négatif du fusarium sur la ramification de racines fasciculées du blé en absence des vers de terre : Le chevelu racinaire est nul chez les plantes cultivées en absence des turricules, en présence de fusarium. Contrairement dans les milieux de culture riches en turricules des lombriciens, en présence de champignon.

En ce qui concerne le test de la réponse moléculaire de l'effet des vers de terre contre le Fusarium, l'étape d'ADNc n'a pas montré des résultats fiables pour l'amplification d'ADN. Ceci est peut-être dû à la qualité des ADNc synthétisés ou probablement aux DNTP utilisés qui peuvent influe directement sur la PCR car on a remarqué que l'excès d'amorces est très concentré sur le gel obtenu, ce que explique que la PCR n'a pas déroulé du tous. Ainsi pour le témoin (T⁺) on a enregistré une amplification d'une bande.

Nous recommandons pour une future étude :

- de caractériser les molécules signal dans les sols.
- étudier le lien évolutif entre les microorganismes du sol, les vers de terre et les plantes.
- caractériser les changements induis par les vers de terre au niveau des populations microbiennes du sol.

- Comprendre le fonctionnement des voies métaboliques impliquées dans la réponse de la plante au pathogène ainsi que d'identifier par quelles voies métaboliques l'agent de bio-contrôle agit afin de conférer une résistance à la plante.



Références Bibliographique

Référence bibliographique

Amrani B., (2013) : Maladie : Méthode et échelle de notation des maladies et accidents divers. Bulletin des grandes cultures. ITGC. 02. p5.

Aouali et Douici- Khalfi (2013). Aouali S. et Douici-Khalfi A., (2013) : Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie : symptômes, développement et moyens de lutte. ITGC.

Arvalis 2017 : Piétin - échaudage des céréales [En ligne]
www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche_accident/fiches_accidents.php?mode...

BASF, 2017 : Parasite : Fusarioses. [En ligne]
http://www.agro.basf.fr/agroportal/fr/fr/services_et_outils/outils/lexique_des_parasites/pest_information_detailpage_43657.html (consulté le 08/03/2017).

Belaid D., (1986) : Aspect de la céréaliculture algérienne. Collection le cours d'agronomie office des publications universitaires. 207p.

Benbelkacem., A. Boubekour R., Boulif M. (2000) Les pertes de rendement causées par la maladie striée (Pyrenophoragraminea) de l'orge en Algérie. Al Awamia 101. p53-55

Benslimane H., Lamari L., Benbelkacem A., Sayoud R. et Bouznad Z., (2011) : Distribution of races of Pyrenophora tritici-repentis in Algeria and identification of a new virulence type. Phytopathol. Mediterr. 208p.

Bertrand M. et al. 2015. Biocontrol of eyespot disease on two winter wheat cultivars by an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Applied Soil Ecology* 96 : 33. DOI : 10.1016/j.apsoil.2015.07.006.

Chamant S., (2013) : Blumeria graminis Biologie, épidémiologie. INRA [En ligne] :
<http://ephytia.inra.fr/fr/C/16203/hypp-biologie-epidimiologie>. (Consulté le 09/06/2017)

Djermoun. , 2009 La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques
Revue Nature et Technologie. 1 P 45

Ezzahiri B., (2001) : Les maladies du blé : identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. Bulletin de transfert de technologie en agriculture. 77. 4p

INPV (2017)., L'oïdium des céréales. **01. P 1**

Moule C., (1971) : Céréales. La maison Rustique-Paris .Chapitre 1. P1

Moreau J.M., (2008) : Lutte contre les maladies. Livre Blanc « Céréales » ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W.

Morvan Y., (2006) : Les maladies fongiques de l'orge Helminthosporiose de l'orge (*Drechslera teres* = *Helminthosporium teres* = *Pyrenophora teres*) [En ligne]
<http://www.terre-net.fr/observatoire-technique-culturale/fiches-maladie-/article/maladieorge-helminthosporiose-977-32803.html>.(Consulté le 10/06/2014)

Nasraoui B., (2006) : Principales Maladies Fongiques des Céréales et des Légumineuses en Tunisie. 35-84. Centre de Publication Universitaire, Tunis.

Noémie Lambert., (2010) : Lutte Biologique aux ravageurs : Applicabilité au Québec. Maitre en environnement (M.ANV). Centre universitaire de formation en ENVIRONNEMENT. Université de Sherbrooke. 103 p.

Olivier Saulnie., (2012).Etude de l'expression de gènes chez le blé (*Triticum aestivum*) en repense à la maladie du piétin échaudage. Université Paris-Est Créteil (UPEC). 49p

ONFAA., (2015) : Bilan de la campagne céréalière 2014/2015.p5

ONFAA., (2016) : Le commerce international des céréales. 9 P1

Puga-Freitas, R., Abbad, S., Gigon, A., Garnier-Zarli, E. & Blouin, M. (2012) Control of Cultivable IAA-Producing Bacteria by the Plant *Arabidopsis thaliana* and the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Appl. Env. Soil Sci.*, 2012, 4.

Rastoin J.I. et Benabderrazik E.H., (2014) : Céréales et oléagineuse au Maghreb- Institut de perspective économique du monde méditerranéen. 4-6.

Ruben Puga Freitas (2012). Effet du ver de terre *Aporrectodea caliginosa* sur la croissance des plantes, leur développement et leur résistance aux pathogènes : réponse physiologique et moléculaire de la plante à l'émission de molécules-signal
Sciences de la Terre. Université Paris-Est, 2012. Français. <NNT: 2012PEST1158>

Zahri S., AFARIH., A DOUIRA., A BADOUC., (2008). Importance des septoriose dans les champs de blés Marocaines.

A blue textured graphic with a marbled pattern, resembling crumpled paper, is centered on the page. The word "Annexes" is written in a bold, black, serif font across the middle of the graphic. The graphic has a layered, overlapping effect on its left side.

Annexes

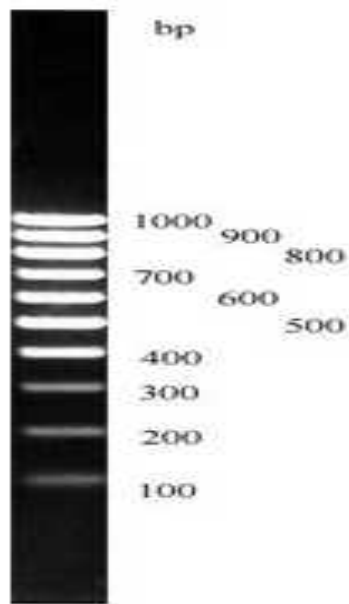
Annexes

Annexe 1. Protocole d'extraction d'ARN totale méthode de Trizol

Toutes les opérations doivent être effectuées en conditions « Rnase-free » : gants, et toutes les solutions doivent être traités en conséquence.

- Broyer 100mg d'échantillon dans de l'Azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon
- Mettre de broyat dans de tubes de 2 ml
- Ajouter 1ml de TRIZOL stocké à 4°C
- Vortexer 30 sec
- Incuber les échantillons 5 min à température ambiante
- Ajoutez 0.2ml de chloroforme
- Agitez vigoureusement par inversion pendant 15sec
- Incubez à température ambiante 5 min
- Centrifugez le tube à 12000 tr/min 15 min 4°C
 - Après centrifugation on obtient 2 phases :
 - Rouge = Phénol chloroforme en bas
 - Phase aqueuse translucide = ARN (environ 0.6 ml)
- Pipetez la phase aqueuse dans un tube Eppendorf neuf (1.5 ml) sans prendre ni toucher le disque présent à l'interface (il est préférable d'en récupérer moins)
- Sur 0.5 ml d'isopropanol rajoutez les 600µl de la phase aqueuse
- Incubez à RT 10 min
- Centrifugez le tube à 12000 tr/min 15 min 4°C
- Enlevez le surnageant
- Lavez le culot avec 75% éthanol en H2O DEPC (1ml pour 1 ml de trizol)
- Centrifugez 12000 tr/min
- Enlevez le surnageant par inversion et laissez sécher à RT
- Reprendre le culot dans 10 à 20µl d'H2O DEPC
- Incubez 10 min à 55-60°C
- L'ARN peut maintenant être congelé à -20°C ou -80°C.

Annexe 2. Marqueur de taille 100 pb (GeneON, Germany)



Annexe 3. Protocole traitement à la DNaseI

- Calculez les volumes de solution d'ARN nécessaire pour prélever l'équivalent de 1 µg d'ARN.
- Préparez 15 microtubes Eppendorf de 0.2ml stériles dans la glace et annotez- les.
- Ajoutez les réactifs suivant dans l'ordre indiqué dans le tableau 2

Traitement à la DNaseI

	ARN (V) + (P) + (P+V) + (T) + (T+ P)	Plasmide + DNaseI	Plasmide sans DNaseI
Solution d'ARN	4 µl (=1µg)	-	-
Solution d'ADN (20ng/µl)	-	5µl (100ng)	5µl (100ng)
H2O(RNaseI-free)qsp 20µl	12.5	11.5 µl	11.5 µl
Mix buffer 10x Ribolock 40u/µL	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
DNaseI (1u/µl)	µl	1 µl	-

- Mélangez en tapotant l'extrémité du tube avec votre index.
- Centrifugez 10 sec pour rassembler le volume au fond des tubes.
- Incubez 30min à 37°C (dans le thermocycleur).

- Les deux solutions de plasmides, utilisée pour vérifier le bon fonctionnement de la DNaseI, seront déposées sur un gel d'agarose, avec les produits des réactions de PCR pilotes.

Conservez- les dans la glace.

- Ajoutez 2µl d'EDTA 50Mm dans chaque tube d'ARN traité à la DNaseI.

-Mélangez en tapotant l'extrémité du tube avec votre index.

- Centrifugez 10 sec pour rassembler le volume au fond des tubes.

- Dénaturez la DNaseI pendant 10min à 70°C (dans le thermocycleur).

- les ARN ainsi traité seront soit immédiatement utilisés pour la réaction de RT, soit stockés à (-20°C)

Annexe 4. Protocole Transcription inverse des ARNm en ADNc

- Ajouter 10 µl de mélange de réaction à 10 µl de modèle d'ARN / mélange d'amorces pour compléter le mélange de réaction de 20 µl. Pipett sur glace et mélange

En pipétant doucement vers le haut et vers le bas.

Préparation du dosage

Composition de mélange réactionnel de la RT

Réactif	[initiale]	1 réaction (20µl)	[finale]
Eau sans RNase		Qsp à 20µl	
Modèle d'ARN	ARN total : 10pg	8 µl	10 pg
Apprêt	100µM	0.1-	Oligo (dt) ₂₀
SCRIPT RT Buffer complet	5X	4µl	1x
DNTP Mix	100 Mm each	1µl	50 nM each
<i>Solution stock TDT</i>	100 Mm	1µl	5 mM
RNase Inhibitor	40 unités/ µl	1µl	40 unités
SCRIPT Reverse Transcriptase	200 unités/µl	0.5 µl	200 unités
200 unités /µl			


Annexe 5. Synthèse d'ADNc de premier brin

- Incuber le mélange réactionnel à 42 ° C pendant 10 minutes, puis on incube à 50 ° C pendant 30-60 minutes.

-L'ADNc peut maintenant être utilisé comme matrice en PCR.

Annexe 6. Fiche de préparation des amorces utilisées

eurofins		Rapport de Synthèse Oligonucléotide											Page 1/1		
Genomics															
Mr. MOHAMED KEFKOUD DIAG-GENE, ANGERS TECHNOPOLE		N° de Cde: 6144436		Date de Cde: 06/12/17		Eurofins Genomics Anzingerstraße 7a D- 85560 Ebersberg		N° Client: 1012641		N° Labo: 5561					
		Ref Interne Cde: DG0017-01.01		N° d'Oligos: 4/4											
N°	Nom de l'Oligo	Séquence (5'→3')	Qté (OD)	Cte (µg)	Cte (nmol)	Concentration (pmol/µl)	Vol. pour 100(pmol/µl)	Tm (°C)	MP (g/mol)	Taux de GC	Echelle de Synthèse	Purification	Modification	Barcode ID	Rapport QC
1	FAPT1	TATTGAGCGTGTGGAGC AA (20)	4,87	132	27,3	-	213	55,3	6212	45 %	0.01 µmol	HPSF	-	322957417	-
2	RAPT1	TACTGATCGTCTGCCCTG C (19)	5,22	160	27,9	-	275	59,7	5746	52,3 %	0.01 µmol	HPSF	-	322957418	-
3	FBG.U	CTCCAGCGCCACATCFCA (*)8	4,38	130	24,3	-	243	58,2	5364	61,1 %	0.01 µmol	HPSF	-	322957419	-
4	RBGLU	TTGCGCTTGTTGCCGTCC (*)8	4,8	130	23,8	-	238	58,2	5448	61,1 %	0.01 µmol	HPSF	-	322957420	-



Résumé

Résumé

Fusarium est un champignon pathogène responsable de la maladie du Fusarioses chez différents types de céréales, comme le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le triticales et les graminées.

La fusariose est une maladie des grains, des semis et des plants adultes qui provoque d'importantes pertes de rendement, en particulier chez *Triticum aestivum* qui est l'espèce de blé la plus cultivée au monde.

L'absence de cultivar résistant vis-à-vis de ce pathogène et de fongicides efficaces ont amené à développer d'autres moyens de lutte plus écologique, plus sécuritaire et plus spécifique la lutte biologique qui semble une alternative écologique aux pesticides chimique.

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Ecologie et le laboratoire de Biologie Moléculaire, université des Frères Mentouri Constantine-1.

Les résultats obtenus de notre analyse a montré un effet négatif du fusarium sur la ramification de racines fasciculées du blé en absence des vers de terre : Le chevelu racinaire est nul chez les plantes cultivées en absence des turricules, en présence de fusarium. Contrairement dans les milieux de culture riches en turricules des lombriciens, en présence de champignon.

Mots clés : *Triticum aestivum*, maladies cryptogamiques, fusarium, les céréales, lutte biologique, étude moléculaire.

Abstract

Fusarium is a pathogenic fungus responsible for Fusarium disease in different types of cereals, such as wheat, barley, oats, rye, triticale and grasses

Fusarium wilt is a disease of grains, seedlings and adult plants that causes significant yield losses, particularly in *Triticum aestivum*, which is the most widely grown wheat species in the world

The absence of a resistant cultivar against this pathogen and effective fungicides has led to the development of other means of ecological, safer and more specific control of biological control, which seems an ecological alternative to chemical pesticides.

This work was carried out in the laboratory of Ecology and the laboratory of Molecular Biology, university of the Brothers Mentouri Constantine-1.

The results obtained from our analysis showed a negative effect of fusarium on the branching of fasciculate roots of wheat in the absence of the earthworms: The root hair is null in the plants grown in the absence of the turnings in the presence of fusarium. Unlike in culture media rich in earthworms, in the presence of fungus.

Key words: *Triticum aestivum*, cryptogrammic diseases, fusarium, cereals, biological control, molecular study.

ملخص

الفيوزاريوم هو مرض فطري مسؤول عن مرض الفيوزاريوم في أنواع مختلفة من الحبوب مثل القمح والشعير والشوفان والجاودار وفول الصويا والأعشاب.

الفيوزاريوم الذبول هو مرض شتلات الحبوب والنباتات الناضجة والذي يسبب خسائر كبيرة العائد، ولا سيما في ايسنتيفوم الحنطة والذي هو أكثر الأنواع المزروعة من القمح في العالم.

غياب أصناف مقاومة اتجاه هذا المرض ومبيدات الفطريات الفعالة أدى لتطوير وسائل أخرى لمحاربة المرض أكثر أمنا وأكثر تحديدا لمكافحة البيولوجية التي تبدو بديل صديق للبيئة عوض المبيدات الحشرية الكيميائية.

تم تنفيذ هذا العمل في مختبر البيئة ومختبر البيولوجيا الجزيئية في جامعة منتوري قسنطينة -1.

اظهرت نتائج تحليلنا تأثير سلبي للفيوزاريوم على تفرع جذور القمح في غياب ديدان الأرض: اذ ان هذا التفرع الجذري منعدم في النباتات في غياب مخلفات الديدان وفي وجود الفيوزاريوم. في حين ان هذا التفرع الجذري موجود في النباتات المزروعة في مخلفات الديدان ووجود الفطر.

كلمات البحث: ايسنتيفوم الحنطة، الأمراض الفطرية، الفيوزاريوم، الحبوب، مكافحة الحيوية والدراسة الجزيئية.

Contribution à l'étude de l'effet des lombriciens sur la résistance du blé (*Triticum aestivum*) tendre aux maladies cryptogamiques

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie et Environnement

Résumé :

Fusarium est un champignon pathogène responsable de la maladie du Fusarioses chez différents types de céréales, comme le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le triticales et les graminées.

La fusariose est une maladie des grains, des semis et des plants adultes qui provoque d'importantes pertes de rendement, en particulier chez *Triticum aestivum* qui est l'espèce de blé la plus cultivée au monde.

L'absence de cultivar résistant vis-à-vis de ce pathogène et de fongicides efficaces ont amené à développer d'autres moyens de lutte plus écologique, plus sécuritaire et plus spécifique la lutte biologique qui semble une alternative écologique aux pesticides chimique.

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Ecologie et le laboratoire de Biologie Moléculaire, université des Frères Mentouri Constantine-1.

Les résultats obtenus de notre analyse a montré un effet négatif du fusarium sur la ramification de racines fasciculées du blé en absence des vers de terre : Le chevelu racinaire est nul chez les plantes cultivées en absence des turricules, en présence de fusarium. Contrairement dans les milieux de culture riches en turricules des lombriciens, en présence de champignon.

Mots clés : *Triticum aestivum*, maladies cryptogamiques, fusarium, les céréales, lutte biologique, étude moléculaire.

Laboratoire de recherche : Ecologie et environnement

Jury d'évaluation :

Président du jury : *ALATOU Djamel* (Professeur - UFM Constantine1).

Rapporteur : *BAZRI Kamel-eddine* (Maître de conférences - UFM Constantine1).

Examineurs : *BENDERRADJI M.H* (Professeur - UFM Constantine1).

Co – Encadreur : *KELLOU Kamel* (Maître de conférences - UFM Constantine1).

Date de soutenance : 28/06/2017