

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة امحمد بوقرة بومرداس
Université M'hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master 2

Domaine : science de la nature et de la vie

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Génétique

Etude des populations pathogènes du champignon *Pyrenophora.teres* : Approche génétique et moléculaire

Présenté par:

ZAMOUM Wissem
OUERD Abderrahmane Yanis
CHANAA Nassima

Soutenu le : 08/11/2020

Devant le jury:

Présidente : Dr. KHEMILI S.	MCA	Université M'hamed Bougara de Boumerdès
Promotrice : Dr. BENSLIMANE H.	MCA	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
Co-promotrice : Dr. AIT-IDIR D.	MCA	Université M'hamed Bougara de Boumerdès
Examinatrice : Dr. HELADJ F.	MCB	Université M'hamed Bougara de Boumerdès
Examinatrice : Dr. BENHABYLES N.	MCB	Université M'hamed Bougara de Boumerdès

Promotion 2019/2020

Remerciements

Nous voudrions dans un premier temps remercier et rendre grâce à Dieu le tout puissant pour nous avoir donné le courage et la volonté de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à notre promotrice Docteur Hamida Benslimane, pour avoir été présente depuis le début de notre travail, pour sa patience, sa disponibilité, et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter nos réflexions, nous la remercions aussi pour le temps et la supervision éclairée qu'elle nous a consacrés tout au long de la rédaction de ce mémoire.

Nous remercions également notre Co-promotrice Docteur Ait Idir ainsi que tous nos professeurs de l'université de Boumerdès qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Nous voudrions aussi remercier la présidente du jury Docteur khemeli ainsi que les examinatrices Docteur Heladj et Docteur Benhabyles pour nous avoir accordé leurs temps et accepté de nous examiner.

Nous tenons enfin à remercier nos parents qui nous ont aidés, soutenus et encouragés dans cette démarche.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À mes très chers parents pour leur soutien et leur conseils. Aucun mot ne peut exprimer ce qu'ils méritent pour tous les sacrifices qu'ils ont fait depuis ma naissance à ce jour. Merci maman et papa et que dieu vous garde et vous protège.

À mon chère époux je le remercie pour son aide et son soutien moral.

A mes chères enfants Aymen, Ihcene, Inesse et Imad-eddine que dieu les protège.

A toute ma famille et mes amies.

Nassima

Je dédie ce travail a :

Mes chers parents pour exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes frères Fares et Chakib,

A mes grands parents, ma tante et tous mes proches

A mes amies qui m'ont toujours encouragé et a qui je souhaite plus de succès.

Wissem

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre I : <i>Pyrenophora teres</i> et la maladie de la rayure réticulée de l'orge	5
1. La rayure réticulée de l'orge	6
1.1. Symptômes de la maladie	6
1.2. Cycle de la maladie	6
1.3. Méthodes de lutte	7
2. Le champignon <i>Pyrenophora teres</i>	8
2.1. Position taxonomique du champignon	8
2.2. Cirières morphologiques d'identification de l'espèce <i>P. teres</i>	8
2.3. Processus de la reproduction sexuée	9
2.3.1. Le type sexué (mating type) définition et rôle biologique	9
2.3.2. Les différentes mating types chez <i>P. teres</i>	9
2.4. Génétique de la résistance de l'orge à l'égard du champignon	10
Chapitre II : Domaines d'application de l'approche génétique et moléculaire	14
1. Identification de l'espèce <i>P. teres</i>	15
2. Identification moléculaire du mating type chez <i>P. teres</i>	15
3. Analyse de la diversité génétique chez <i>P. teres</i>	16
4. Etude du génome de <i>P. teres</i>	20
Chapitre III : Méthodes moléculaires appliquées	22
1. Polymérase Chain-réaction	23
1.1. Principe de la PCR	23
1.2. Etapes de la PCR et conditions réactionnelles	23
1.2.1. Etapes de la PCR	23
1.2.1.1. La dénaturation initiale	23
1.2.1.2. La phase de dénaturation	24
1.2.1.3. La phase d'hybridation	24
1.2.1.4. Phase d'élongation	24
1.2.1.5. L'élongation finale	24
1.2.2 Composition du milieu réactionnel	24
2. Quelques séquences ciblées par la PCR	24
2.1. Les séquences ITS	25
2.2. Les séquences GAPDH (Glyceradehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)	25
2.3. Les séquences SNPs (single nucleotide polymorphism)	26

3. La PCR en temps réel.....	28
4. Marqueur moléculaire basé sur la restriction enzymatique (RFLP)	31
5. Marqueurs moléculaires basés sur la PCR.....	33
5.1. La technique RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	34
5.2. La technique AFLP (Amplified fragment length polymorphism)	36
5.3. La technique SSR (simple sequence repeats)	38
5.4. La technique ISSR (Inter-simple sequence repeats)	40
6. Le séquençage	42
6.1. Séquençage classique (méthode de Sanger).....	42
6.2. Séquençage nouvelle génération	44
6.3. La technologie DArT (Diversity Array Technology)	46
7. La cartographie optique	47
8. La bioinformatique.....	50
8.1. Les banques de données utilisées.....	50
8.2. Les comparaisons de séquences et l'identification de l'espèce	50
8.3. Prédiction de fonctions des gènes	51
8.4. Les études de phylogénie	53
Conclusion	54
Références bibliographiques.....	56

Liste des abréviations

ABI PRISM: Applied Biosystems

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur de fragment amplifié)

ARMS: Amplification Refractory Mutation System (Système de mutation réfractaire d'amplification)

AS: Acide Salicylique

BSA : Bulk Segregant Analysis (Analyse de ségrégant regroupés)

CHEF: Contour-clamped Electric Field

CM: Centi Morgane

DArT : Diversity Arrays Technology (Technologie des baies de diversité)

ddATP : didésoxyriboadenine triphosphate

ddCTP : didésoxyribocytosine triphosphate

ddGTP : didésoxyriboguanine triphosphate

ddNTP : didésoxyribonucléotides triphosphates

ddRAD : Double digest restriction-site associated DNA

ddTTP : didésoxyriboadémine triphosphate

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

ET : Elément Transposable

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GBS: Genotyping by sequencing (Génotypage par séquençage)

GD: Diversité Génotypique

GO: Gene Ontology (Ontologie des gènes)

GWAS :Genome Wide Association Studies (Études d'association à l'échelle du génome)

HD: Haploïdes Doubles

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat (Répétition de séquence inter simple)

ITS: Internal Transcribed Spacers (Espaceurs transcrits internes)

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MAT :*locus* qui détermine le Mating Type.

Mbp : Méga Paire de base

MLG : Multilocus Genotypes (Génotypes Multi-Locus)

MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (Amplification de sonde dépendante de la ligature multiplex)

NBS-LRR: Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat (Site de liaison aux nucléotides - Répétition riche en leucine)

NCBI: Centre National d'Information sur les Biotechnologies

NFNB : Net form of Net Blotch (la forme type de la rayure réticulée de l'orge)

NGS : Next generation sequencing (Séquençage de nouvelle génération)

ORF: Open Read Frame (cadre de lecture ouvert)

PCR :polymerase chain reaction

PFG: Pulsed-Field Gel Electrophoresis(l'électrophorèse sur gel en champ pulsé)

PTK1 : Protéine Kinase

Ptt: Pyrenophorateres f .teres

Ptm: Pyrenophorateres f. maculata

QoI: Quinone outside Inhibitors

qRT-PCR: Quantitative PCR real team (quantitative PCR en temps réel)

QTL: Quantitative Trait Loci

RADP : Random Amplified Polymorphic DNA (ADN polymorphe amplifié aléatoire)

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur de fragment de restriction)

RIP: Repeat Induced Point mutation (mutation ponctuelle induite par répétitions)

RT-PCR: Real-Time PCR (PCR en temps réel)

SFNB : Spot Form of Net Blotch (la forme ponctuée de la rayure réticulée de l'orge)

SNP : Single-Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme Nucléotidique Séquence)

SSH: Suppression Subtractive Hybridization (Hybridation Soustractive de Suppression)

SSR : Simple Sequence Repetitions

STM: Sequence Tagged Microsatellite

TRs: Tandem Repeat (Repetition en Tandem)

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Méthode de groupe de paires non pondérées avec moyenne arithmétique).

Introduction

Pyrenophora teres (Died) Drechs, est l'agent causal de la rayure réticulée, l'une des maladies foliaires les plus redoutables, touchant les cultures d'orge à travers le monde, notamment en Algérie. Cet agent pathogène est caractérisé par un polymorphisme symptomatologique et par un cycle biologique complexe. Il possède deux formes, *P. teres* f. *teres* et *P. teres* f. *maculata* ; séparées sur la base des types de symptômes provoqués, *Ptt* cause la forme réticulée et *Ptm* cause la forme tachetée.

L'intérêt de connaître cet agent pathogène vise à élaborer des méthodes de lutte et à minimiser et retarder le développement des maladies qu'il provoque afin d'éviter qu'elles n'atteignent les feuilles supérieures qui contribuent à plus de 50 % au remplissage du grain (Lacroix, 2002). Cette maladie est en effet, à l'origine de pertes de rendements et de la réduction de la qualité du grain (Agrios, 2005). En particulier dans les régions tempérées et humides, des zones de production en Europe du Nord et dans les pays méditerranéens, cette maladie provoque des pertes de rendement qui atteignent jusqu'à 40% (Shipton *et al.*, 1973), et des pertes de 35% aux Etats-Unis en moyenne (Wu *et al.*, 2003). Au Maroc, ces pertes varient de 14 à 29% et atteignent 39 % sur les cultivars sensibles (El Yousfi et Ezzahiri, 2001). En Algérie, son incidence varie entre 11 et 80%; des prospections organisées ont permis de recenser cette maladie parmi les plus fréquentes (Sayoud et Benbelkacem, 1996).

Il est à rappeler que l'orge (*Hordeumvulgare* L.) a toujours occupé une place importante parmi les autres céréales cultivées (blés dur et tendre) en Algérie. Elle est à la tête des cultures et est destinée à l'autoconsommation humaine (Bouzian, 2015). Elle représente actuellement, l'aliment essentiel des ovins en Algérie (Benmahammed, 2004). Sa culture s'étend sur les zones marginales des plaines intérieures et des hauts plateaux (Bouzerzour et Benmahammed, 1993), les wilayas agro-pastorales de Batna, Khenchela, Tebessa et M'Sila représentent actuellement les principales zones de production d'orge en Algérie (Malki et Hamadache, 2002).

La population est un ensemble d'organismes, de cellules ou de molécules qui ont une certaine qualité ou caractéristique en commun (Stenesh, 1989). La structure des populations chez les champignons est définie principalement par, la caractérisation des variations génétiques existantes entre les individus d'une même population. L'évolution de ces variations dans l'espace et le temps, la structure des populations et leur dynamique peuvent avoir une grande influence sur le développement des maladies (Savary, 1994 *in* : Laurd, 1995). La variabilité existante peut être générée par différents mécanismes. D'une part, les mécanismes biologiques propres à ces microorganismes (tels que la reproduction sexuée) et la mutation qui sont à l'origine de recombinaisons génétiques et d'autre part, la pression de sélection extérieure induite par la plante-hôte, le milieu, ou résultant de flux de gènes entre populations (Savary, 1994 *in* : Laurd, 1995). La reproduction sexuée est un moyen important d'amélioration du taux global d'adaptation de l'espèce (Moore et Frazer, 2002).

Ainsi, la structure de la population pathogène est contrôlée par plusieurs facteurs tels que sa forme de vie, son système de reproduction et les conditions de l'environnement qui doivent être favorables. Ces conditions peuvent affecter plus ou moins la croissance, la sensibilité et la résistance de la plante hôte (Moore et Frazer, 2002).

Les approches génétiques et moléculaires sont les techniques de la biologie moléculaire appliquée à la génétique; elles ont mises au point pour analyser l'ADN (Moore et Frazer, 2002) et ont pour but l'étude d'une région du génome ou la recherche d'un gène. La génétique des populations et la biologie moléculaire ont été combinées dans le domaine connu sous le nom d'évolution moléculaire ; l'ADN étant l'unité fondamentale de l'évolution moléculaire, les taux et les modèles de changement dans les séquences d'ADN et des protéines, nous permettent de déduire l'histoire évolutive des organismes (Moore et Frazer, 2002).

Les approches génétiques et moléculaires et en particulier, celles utilisant des marqueurs moléculaires, sont devenues essentielles dans l'étude de la structure génétique des populations. L'analyse à l'aide de ces marqueurs peut détecter des polymorphismes à plusieurs *loci*, elle fournit une empreinte ADN qui identifie l'ensemble du génome sur la base de la détection simultanée de ces multiples polymorphismes (Moore et Frazer, 2002). Les approches génétiques et moléculaires ont permis l'identification des espèces, l'étude de leurs génomes, l'identification du mating type, et l'analyse de la diversité génétique (Moore et Frazer, 2002).

L'étude génétique et moléculaire de la structure de la population ont permis d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.) (Verschuere *et al.*, 2002). Elles permettent d'explorer l'énorme variabilité naturelle existant au niveau de l'ADN (Xu, 2010). Ceci s'est révélé très important dans la mesure où la connaissance des relations génétiques dans une population pathogène est indispensable pour le développement de nouvelles variétés résistantes et la mise au point de stratégies de contrôle des épidémies. En effet, malgré l'intérêt des marqueurs de virulence qui sont mis en évidence via les tests du pouvoir pathogène, ceux-ci ne révèlent qu'une petite portion de la diversité génétique présente dans une population pathogène. Par contre, il est admis que les marqueurs moléculaires, qu'ils soient de type protéines ou ADN sont indépendants de la sélection de l'hôte et permettent une étude de la biodiversité directement au niveau du génome. Cependant, les marqueurs moléculaires basés sur l'analyse de l'ADN sont actuellement préférés à ceux basés sur l'analyse des protéines lors de la caractérisation des différents champignons phytopathogènes (Benslimane, 2016).

Ce travail est une rétrospective bibliographique qui s'est intéressée à l'approche génétique et moléculaire appliquée pour l'étude de la structure des populations pathogènes de *Pyrenophora teres*, responsable de la rayure réticulée de l'orge. A cet effet, 3 volets différents ont été traités.

Le premier concerne la description du champignon sur le plan morphologique et taxonomique ainsi que, quelques aspects relatifs à la maladie qu'il provoque.

Le deuxième présente les domaines d'application des approches génétiques et moléculaires dans l'étude de la structure des populations de l'espèce *P.terres* à savoir, l'identification des mating type, ainsi que l'analyse de la diversité génétique de *P.terres* et du génome.

Le troisième volet porte sur les différentes techniques moléculaires utilisées pour l'étude de la population pathogène. A cet effet, pour chacune des méthodes traitées, nous nous sommes focalisés sur la présentation du principe et des étapes de son déroulement, suivie par des exemples d'applications de la méthode dans l'étude de la structure des populations de *P.terres*. A travers ce volet, nous nous sommes aussi intéressés à l'apport de la bioinformatique, un outil précieux dans plusieurs travaux focalisés sur l'étude de la diversité génétique, l'identification plus précise des *loci* QTL, l'analyse et l'assemblage de génome de ce pathogène.

Chapitre I :

**Le champignon *Pyrenophora teres* agent de la maladie de la
rayure réticulée de l'orge**

1. La rayure réticulée de l'orge

1.1. Symptômes de la maladie: ils sont observés sur les feuilles, les gaines foliaires et les glumes ;au début de l'infection, les taches sont minuscules, d'un vert clair à brun(Bailey et al., 2004). Elles s'agrandissent rapidement en stries longitudinales brunes de plusieurs centimètres de long(Bailey et al.,2004).À l'intérieur de ces stries, des lignes longitudinales et/ou horizontales plus foncées se forment pour donner un aspect réticulé en réseau (Liu *et al.*, 2011). Parfois, un jaunissement entourant les stries est observé. Lorsque les stries sont nombreuses, il y a un dessèchement du limbe et de l'apex puis la mort prématurée de la feuille(Bailey *et al.*, 2004).Il convient de préciser que l'action primaire du parasite se caractérise par une légère transparence du limbe « water Soaking » suivie d'une nécrose(Bailey *et al.*,2004).

P. teres présente un polymorphisme des symptômes qu'il induit sur l'hôte : deux formes de la maladie sont ainsi connues. La forme réticulée qui est causée par *P. teres f. teres*, et la forme en taches brunes causées par *P.teres f. maculata* (Manninen *et al.*, 2006) (Figure1).La première se caractérise parde petites taches nécrotiques sur les feuilles, qui s'allongent en bandes longitudinales et transversales et forment plus tard des filets sur la feuille infectée, souvent entourées de zones chlorotiques (forme nette, tache nette; NFNB), les symptômes peuvent couvrir toute la feuille (Figure1). A moindre mesure, des symptômes peuvent également apparaître sur les gaines foliaires et les graines (Liu *et al.*, 2011).La deuxième forme, provoque des lésions elliptiques ou circulaires, souvent entourées d'un halo chlorotique (sous forme de tache nette; SFNB)(McLean *et al.*, 2009).

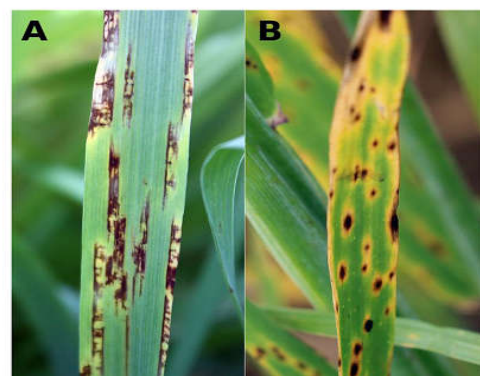


Figure 1 : Les deux formes de la rayure réticulée de l'orge. A : Forme nette, (NFNB) causée par *P. teres f. teres*. B : Forme tache (SFNB) causée par *P. teres f. maculata* (Syme *et al.*, 2018)

1.2. Cycle de la maladie : l'infection primaire au moment de la germination ne peut avoir lieu, que si la température du sol se situe en dessous de 8°C (Bailey *et al.*, 2004).L'optimum du développement de la maladie a lieu entre 12°C et 16°C (Morvan, 2006).

Le mycélium du champignon est conservé à l'état latent dans les enveloppes du grain ; il peut rester vivant plusieurs années (Aouali et Douici-Khalfi, 2013). A la levée, le parasite est réactivé, il va progresser vers les ébauches foliaires puis l'épi(Bailey *et al.*,2004).Des conidies apparaissent alors, et peuvent contaminer des plantules du proche voisinage (Figure2).

Les variations brutales d'humidité, les précipitations et le vent libèrent les ascospores et détachement des conidies qui contaminent les épis (Bailey *et al.*, 2004). Ces facteurs peuvent ainsi, se révéler favorables à la propagation de la maladie en relation avec la quantité d'inoculum libérée (Bendahmane, 1992).

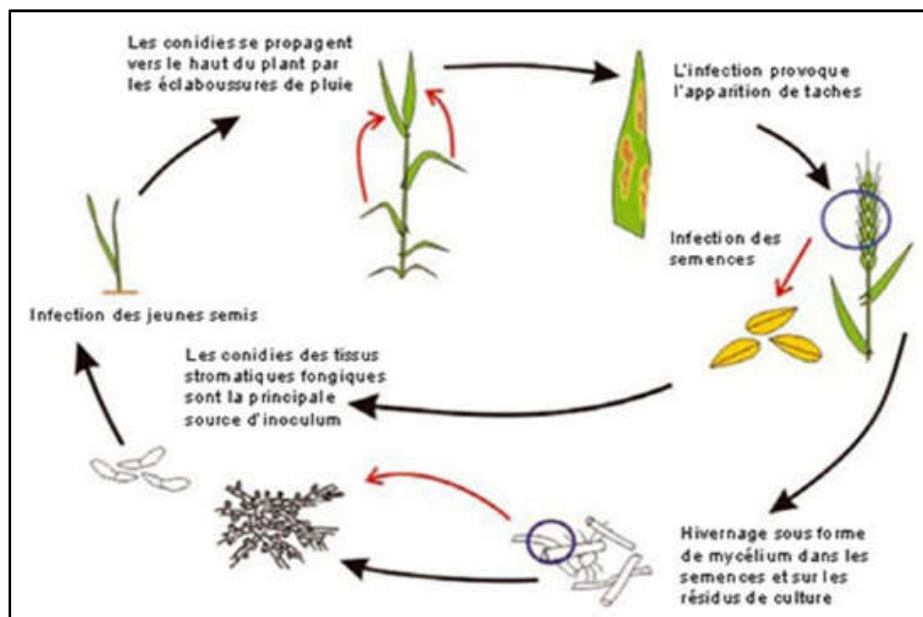


Figure 2 : Cycle de développement de la rayure réticulée de l'orge (Morvan, 2006)

1.3. Méthodes de lutte : il existe différentes méthodes de lutte utilisées pour le contrôle de la maladie de la rayure réticulée de l'orge. Toutefois une lutte intégrée est toujours recommandée lors du processus visant le contrôle des maladies phytopathogènes ; elle combine les outils biologiques, physiques et chimiques de façon à minimiser les risques économiques, sanitaires et environnementaux (Nasraoui, 2006).

- ✓ La lutte chimique : le pathogène réagit différemment à la majorité des produits chimiques selon la forme de celui-ci (*Ptt* et *Ptm*). La forme *Ptt* semble être moins sensible que la forme *Ptm* à la plupart des fongicides (Imazalil, Prochloraz, Diniconazole...) (Bailey *et al.*, 2004), ainsi qu'à une inhibition par des fongicides de contact comme Anizaline, Cholorothalonil, et Oxyquinoléate de cuivre (Bendahmane, 1992).
- ✓ La lutte biologique : le principe se base sur l'utilisation d'organismes vivants antagonistes (Milaire, 1995).
- ✓ La lutte culturale : l'agriculteur peut également limiter le développement des maladies en pratiquant des rotations de cultures sur ses parcelles (Ezzahiri, 2001).
- ✓ La lutte génétique : La méthode de lutte la plus économique et la plus pratique est l'utilisation en culture des génotypes résistants à la maladie. Ceux-ci peuvent être obtenus notamment, par

l'introduction des gènes de résistance d'espèces sauvages dans des lignées cultivées, pour but principal la réduction de l'utilisation des pesticides (Barrault, 1989).

Par ailleurs, l'utilisation du génie génétique peut agir à différents niveaux : cumul des gènes de résistance, reconnaissance, amplification des réactions de défense, suppression des fonctions indispensables au pathogène, etc. (Durand-Tardif et Pelletier, 2003).

2. Le champignon *Pyrenophora teres*: l'agent responsable de la rayure réticulée de l'orge est *P.teres*(anamorphe *Drechslera teres*(Sacc.) Shoemaker, syn.*Helmintho sporium teres*)(Barrault, 1982).

2.1. Position taxonomique du champignon : *Pyrenophora teres* appartient au règne des Fungi, Phylum des Ascomycota, sous phylum des Pezizomycotina, classe des Dothideomycetes, sous classe des Pleosporomycetidae, ordre des Pleosporales, famille des Pleosporaceae, genre *Pyrenophora* (MycoBank, 2020) .

2.2. Critères morphologiques d'identification de l'espèce *P. teres*: ils sont basés sur l'observation des fructifications sexuées et asexuées, produites par le champignon (Figure3).*P. teres* se caractérise par la production sur l'orge: des pseudothèces foncées, de forme globuleuse d'environ 1 à 2 mm de diamètre, ceci est observés vers la fin de la saison de croissance (Rau *et al.*, 2007).

Les ascospores mesurent $18-28\mu\text{m} \times 43-61\mu\text{m}$, elles sont brun clair et ellipsoïdes, ont souvent trois à quatre septas transversaux et un ou deux septas longitudinaux dans les cellules médianes (Liu *et al.*, 2011) .

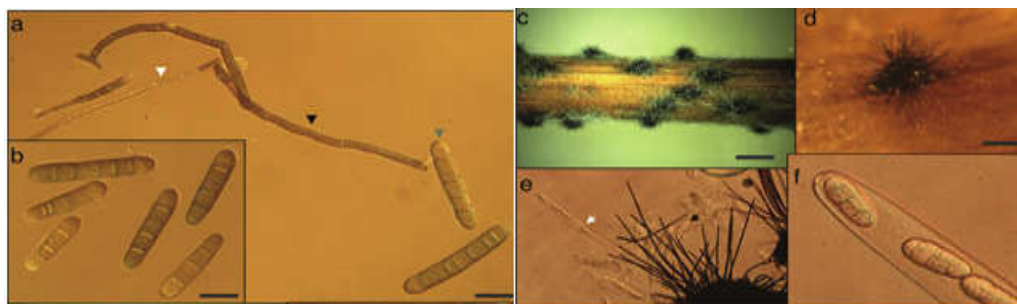


Figure 3 :Les fructifications asexuées et sexuées produites par *P. teres*. (a) Conidies, conidiophores et mycélium $40\mu\text{m}$, (b) Conidies contenant trois à cinq septas $40\mu\text{m}$, (c) Paille d'orge contenant des pseudothèces de couleur foncées 2.5mm , (d) Pseudothécies immatures 1mm , (e) Rupture d'un pseudothécie $80\mu\text{m}$, (f) Ascospores possédant trois ou quatre cloisons $20\mu\text{m}$ (Liu *et al.* , 2011).

Les conidiophores apparaissent généralement seuls, ou en groupes de deux ou trois et sont légèrement gonflés à la base (Liu *et al.*, 2011). Les conidies mesurent $30-174\mu\text{m} \times 15-23\mu\text{m}$, elles sont cylindriques et droites, arrondies aux deux extrémités, subhyalines à brun jaunâtre, souvent avec quatre à six pseudo-septas. Morphologiquement, les deux formes sont indiscernables (Liu *et al.*, 2011).

2.3.Processus de la reproduction sexuée : *P. teres* est un ascomycète hétérothallique de la classe des Dothideomycetes (Nasraoui,2015). Les espèces de ce phylum possèdent une particularité, qui est la formation d'un dicaryon suite à la plasmogamie ; ainsi, des noyaux différents se retrouveront dans une même cellule (Nasraoui, 2015). Ils se divisent pour former des hyphes dicaryotiques (chaque compartiment 1 à 2 noyaux haploïdes compatibles), ces noyaux entrent en fusion parfois après de longues périodes pour former un zygote (Nasraoui, 2015). Dans la plupart des champignons appartenant aux ascomycètes, les asques n'apparaissent pas seuls. Ils se forment en groupe et sont entourés d'hyphes. Ils sont enfermés dans des fructifications appelées ascocarpes (Lahmar *et al.*, 2015). Dans l'ensemble, les analyses de génétique des populations suggèrent que la reproduction sexuée, se produit à un niveau significatif au sein de la population mondiale de *P.teres*, mais sa contribution relative varie entre les régions, éventuellement sur la base de différences environnementales (Liu *et al.*, 2011).

2.3.1.Le type sexué (mating type) définition et rôle biologique : le locus de type matrimonial, ou MAT, est une région unique du génome qui régit l'établissement de l'identité du type cellulaire et orchestre le cycle sexuel (Fraser et Heitman, 2003). C'est une région de l'ADN, dont la séquence diffère entre les cellules de types matriciels opposés (Fraser et Heitman, 2003). Le locus MAT code les facteurs de transcription globaux, qui établissent l'identité du type de cellule en contrôlant l'expression des cascades de développement, ce qui implique généralement un homéodomaine ou d'autres classes d'éléments de régulation de la transcription (Fraser et Heitman, 2003).

2.3.2. Les différents mating types chez *P.teres*: comme *P. teres* est hétérothallique avec deux types sexuels désignés comme MAT1 et MAT2 (McDonald,1967 ;Rau *et al.*, 2005), le cycle sexuel n'est initié que lorsque deux souches fongiques de types différents interagissent (Kronstad et Staben, 1997).

Dans les différentes régions de culture à travers le monde, la présence des deux types et leurs fréquences peuvent différer. En Hongrie, les types sexuels de 68 isolats *Ptt* ont été déterminés : 29 étaient des MAT1 et 39 étaient des MAT2. Les deux souches MAT1 et MAT2 ont été trouvées en 2007, 2008 et 2009 avec un rapport de 6:10, 16:19 et 7:7 respectivement (Fiscor *et al.*, 2014).

En Finlande, les analyses de distribution des mating types, ont montré que 158 des isolats étaient MAT1 et 181 étaient MAT2, le rapport n'était pas significativement différent de 1:1(Wonneberguer, 2017).

La présence de ces deux types en quantités égales dans la plupart des sous-populations, indique que des échanges génétiques fréquents, peuvent avoir lieu entre elles par recombinaison sexuelle ; ceci est confirmé par la découverte, que chaque isolat représente un haplotype distinct (Wonneberguer, 2017).

Au Canada, l'analyse par PCR avec des amorces spécifiques aux MAT, a indiqué que les idiomorphes MAT1 et MAT2 de *Ptt* et *Ptm* pouvaient être identifiés dans le même champ, sur la même plante et sur la même feuille (Akhavan *et al.*, 2015). Il n'y a pas eu d'écart significatif par rapport au rapport 1:1 entre MAT1 et MAT2, pour les deux formes dans les trois provinces prospectées (Akhavan *et al.*, 2015).

En utilisant des centaines d'isolats provenant d'Italie, Rau *et al.* (2005) ont constaté que le rapport entre les deux types (MAT 1 et MAT2) était constamment de 1:1, ce qui suggère que la reproduction sexuée est une force majeure qui détermine la structure de la population dans la région d'étude. Cependant, Serenius *et al.* (2005) qui ont étudié la distribution des deux types dans plusieurs populations géographiquement distinctes, ont conclu que l'importance de la reproduction sexuée est très variable d'une région à une autre.

2.4. Génétique de la résistance de l'orge à l'égard du champignon : la résistance de l'orge à l'égard du champignon *P. teres* peut être sous le contrôle d'un gène, elle sera dite qualitative. Les gènes responsables de cette résistance sont appelés gènes majeurs de résistance (gènes R), ils s'expriment après une interaction directe entre deux partenaires plante hôte-agent pathogène (Lepoivre, 2003). Elle peut aussi être contrôlée par plusieurs gènes, elle sera dite alors quantitative (Schiff *et al.*, 2001). Les régions chromosomiques impliquées dans la résistance quantitative sont appelées « Quantitative Trait Loci » (QTL), chaque QTL étant supposé avoir un effet additif sur la résistance (Lindhout, 2002). Plusieurs travaux ont été publiés rapportant les deux modes de résistance, ils ont démontré que les facteurs génétiques contrôlant la résistance aux deux formes du pathogène *P. teres teres* et *P. teres maculata*, étaient indépendants et différents (Lindhout, 2002)..

Au Canada, des travaux ont révélé que la résistance pouvait être modulée par trois gènes récessifs, ou un gène dominant, elle peut être aussi contrôlée par un gène dominant, ou par deux gènes agissant de façon complémentaire (Graner *et al.*, 1996). Un des gènes de résistance serait porté sur le chromosome 2 (Graner *et al.*, 1996).

Différentes techniques moléculaires ont été utilisées pour l'identification des marqueurs ADN liés aux *loci* de résistance à l'égard de la forme NTNB, sur les différents chromosomes d'orge en utilisant des populations en ségrégation. Ainsi, un gène de résistance au NTNB chez les plantules d'orge sur le Chromosome 3H, a été rapporté par Graner *et al.* (1996) en utilisant des marqueurs RFLP. La même technique a été utilisée par Andreas Garner (1996), qui a détecté un seul gène dominant marqué par

une série de marqueurs RFLP étroitement liés. Ceux-ci étaient situés dans la partie proximale du long bras du chromosome 3, près du centromère. En raison de la relation allélique inconnue de ce gène avec un autre gène de résistance précédemment attribué au chromosome 3, la désignation préliminaire Pt a été proposée (Graner *et al.*, 1996).

Un gène majeur de résistance à l'égard de *P. teres f. teres* a été identifié sur le chromosome 6H, il a été désigné « *Rpt5* » (Manninen *et al.*, 2006). Ces auteurs rapportent également plusieurs gènes de résistance mineure, observés sur les chromosomes 1H, 2H, 3H, 5H et 7H. Par ailleurs un gène de résistance majeure à l'égard de *P. teres maculata* a été observé sur le chromosome 5H, à proximité du microsatellite HVLEU, il a été nommé Rpt6 (Manninen *et al.*, 2006).

De même, en utilisant une analyse mendélienne d'une descendance F2, Afanasenko *et al.* (1999), ont trouvé un gène dominant et 3 gènes récessifs. Dans ce même contexte, une étude réalisée au Maroc sur l'hérédité de la résistance de l'orge de printemps à la rayure réticulée, a révélé une transmission monogénique ; différents gènes indépendants (dominants et autres récessifs) conditionnant la résistance (Douiyssi *et al.*, 1996). Ces résultats vont dans le même sens que ceux rapportés par Liu et Friesen. (2010) qui ont rapporté les gènes de résistance Rpt1a, Rpt3d, Rpt1b et Rpt2c. Ces derniers sont localisés sur les chromosomes de l'orge 3H, 2H, et 5H, respectivement. Ils ont aussi identifié une résistance monogénique à l'égard de la forme NTNB, contrôlée par deux gènes indépendants dominant, situés au niveau du chromosome sur 6 H (Liu et Friesen., 2010).

Dans d'autres études, les chercheurs ont identifié une région génomique majeure (qPttCLS) conférant une résistance au *P. teres teres* (*Ptt*), localisée sur le chromosome 3H (Novakazi *et al.*, 2019). Plusieurs études précédentes avaient détecté des QTL pour la résistance au *Ptt* sur le chromosome 3H (Graner *et al.*, 1996; Steffenson *et al.*, 1996; Cakir *et al.*, 2003; Manninen *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2010; Akhavan *et al.*, 2015).

La résistance quantitative a été aussi rapportée par plusieurs travaux. En Australie, l'étude de 24 lignées résistantes à neuf isolats de *P. teres f. teres* par Gupta *et al.* (2003), a montré la présence de régions chromosomiques impliquées dans une résistance quantitative. Les QTL ont été cartographiés sur les chromosomes 3H et 6H en utilisant des marqueurs SSR (Cakir *et al.*, 2003). Dans le même but, l'étude de lignées haploïdes doublées, a permis d'identifier des QTL responsables de la résistance à l'égard de des isolats de *P. teres f. teres*, qui représentaient les profils de virulences présents à travers l'Australie (Gupta *et al.*, 2010). Les QTL ont été cartographiés sur les chromosomes 3H et 6H en utilisant des marqueurs SSR. Dans cette étude, le QTL localisé sur 6H était également un QTL à effet majeur au stade adulte, de la plante. De même, des QTL ont été identifiés sur les chromosomes 2H, 3H et 4H responsables de la résistance au stade plantule (Gupta *et al.*, 2010).

De même, Steffenson et al. (1996) ont rapporté deux *loci* QTL sur les chromosomes 4H et 6H, responsables de la résistance des plantules, alors que 7 autres QTL ont été trouvés sur différents chromosomes (1H, 2H, deux sur 3H, 4H, 6H et 5H) responsables de la résistance des plantes adultes (Steffenson et al., 1996).

Molnar et al. (2000) ont signalé deux régions génomiques sur le chromosome 2H associées à une résistance au SFNB dans une population d'orge d'haploïdes doublés. D'autres études sur des lignées haploïdes doublées ont révélé un QTL à effet majeur, associé à la résistance des plantules face au *P. teres f. teres* (forme NTNB), et un autre au *P. teres f. muculata* (forme STNB) (Friesen et al., 2006). Les QTL majeurs de résistance pour NTNB et STNB ont été situés sur le chromosome 6H et 4H respectivement (Friesen et al., 2006).

Des cartes génétiques de deux populations de lignées haploïdes doublées, ont été construites sur la base des résultats de génotypages, basées sur des marqueurs SNPs. L'analyse QTL a révélé un gène principal dans la région proche du centromère sur le bras court du chromosome 6H. Le marqueur de type SNP, en position 58 cM, était lié à la résistance à *P. teres f. teres* (Akhavan et al., 2015).

Pour déterminer le nombre et la localisation chromosomique des *loci* de caractères mendéliens et quantitatifs QTL contrôlant la résistance des maladies, une population d'haploïdes doublés a été évaluée au stade plantule en serre et au stade de la plante adulte au champ. Les chercheurs ont trouvé que, les allèles sur deux ou trois *loci* non liés, conféraient une résistance à l'agent pathogène de la rayure réticulée au stade de la plantule; ils ont été identifiés sur les chromosomes 4 et 6M. Par ailleurs un QTL a également été identifié sur le chromosome 6P et sept autres QTL cartographiés sur les chromosomes 1P, 2P, 3P, 3M, 4, 6P et 7P (Steffenson et al., 1996). La résistance est conférée par un seul gène au stade plantule; ce gène a été cartographié dans la région distale du chromosome 1P sur la base d'analyses de données qualitatives et quantitatives (Steffenson et al., 1996).

Dans des recherches similaires, récemment des régions génomiques associées à la résistance des plantules à plusieurs pathotypes du NFNB chez l'orge de printemps de Sibérie ont été identifiées. Pour cela, un génotypage par puce à SNP 50K, commercialisé par Illumina, a été réalisé (Novakazi et al., 2019). Au total, 40 SNPs dans sept régions génomiques associées à une résistance ont été révélées et identifiées; la région sur le chromosome 1H entre 57,3 et 62,8 cM, la région sur le chromosome 6H entre 52,6 et 55,4 cM, trois régions sur le chromosome 2H entre 71,0 et 74,1 cM et entre 12,1 et 17,4 cM sur le chromosome 3H.

En plus d'une région sur le chromosome 3H entre 50,9 et 54,8 cM, deux autres régions situées sur le chromosome 2H, entre 23,2 et 23,8 cM et 3 régions entre 135,6 et 137,5 cM ont été identifiées (Rozanova et al., 2019). Ces régions sont marquées par des SNPs, mais coïncident cependant avec des

locide traits quantitatifs (QTL) (Rozanova *et al.*, 2019). Des études d'association à l'échelle du génome utilisant 33 818 marqueurs et tenant compte de la structure de la population et de la parenté, ont révélé 254 marqueurs correspondant à 15 régions QTL distinctes. Quatre de ces régions étaient de nouveaux QTL, alors qu'un total de sept régions avait un effet sur la résistance, aussi bien chez les plantes juvéniles que les plantes adultes (Novakazi *et al.*, 2019).

Enfin, il est à rappeler que des études relatives à la famille des gènes NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat), ont aussi été un outil intéressant dans l'analyse de la nature de la résistance de l'orge à ce pathogène. En effet, ces gènes interviennent chez les plantes dans le mécanisme d'immunité, à l'égard d'une variété d'agents pathogènes et de ravageurs. À partir d'un ensemble préétabli de gènes candidats de résistance de type NBS, les chercheurs ont sélectionné trois gènes candidats, HvNBS10, HvNBS72 et HvNBS85 pour analyser leur implication possible dans la résistance à l'égard de *P. teres f. maculata* (Habachi *et al.*, 2019). Les gènes étudiés ont été cartographiés sur les chromosomes 5H et 7H. Les résultats de l'expression de ces gènes suggèrent que des réponses transcriptionnelles coordonnées de plusieurs gènes NBS chez l'orge, seraient nécessaires pour une réponse efficace contre *P. teres f. maculata*. Les gènes caractérisés dans la présente étude ont un potentiel pour élucider les voies moléculaires et développer de nouveaux marqueurs associés à la résistance au SFNB chez l'orge (Habachi *et al.*, 2019).

Chapitre II :

Domaines d'application de l'approche génétique et moléculaire

1. Identification de l'espèce *P. teres* : il existe plusieurs méthodes, certaines sont basées sur l'analyse du protéome de l'orge contaminé et plusieurs autres méthodes basées sur l'analyse de l'ADN (RFLP, RAPD, micro satellites ,..etc.) (Akhavan *et al.*, 2015).

Les isolats peuvent également être identifiés en tant que *P. teres f. teres* ou *P. teres f. maculata*, à l'aide d'amorces spécifiques moyennant une réaction en chaîne de la polymérase (PCR) (Akhavan *et al.*, 2015). Pour ce faire, un test basé sur la PCR dans lequel des amorces développées grâce à un marqueur RAPD est utilisé. Les étapes suivantes sont nécessaires : (i) Prélèvement d'échantillons d'orge malade et isolement du champignon, (ii) Extraction et analyse de l'ADN fongique obtenu, par PCR, tels que décrit par Taylor *et al.* (2001) et Williams *et al.* (2001). Cette analyse est réalisée simultanément avec de l'ADN d'espèces différentes et autres que les deux formes de *P. teres*.

2. Identification moléculaire de mating type chez *P. teres* : quatorze marqueurs de polymorphismes mono-nucléotidiques (SNPs) ont été identifiés aux *loci* MAT, déterminant le type sexué chez *P. teres f. teres* (agent de la « forme nette » de la maladie = NF) et *P. teres f. maculata* (agent de la « forme spot » de la maladie = SF) (Akhavan *et al.*, 2015). Ces SNPs limités au locus MAT sont suffisants pour distinguer ces ascomycètes hétérothalliques étroitement apparentés au niveau des sous-espèces, permettant de déterminer simultanément les caractéristiques de pathogénicité et de type sexué du champignon (Rau *et al.*, 2005).

En se basant sur les amorces SNPs découvertes, des amorces spécifiques au *loci* MAT ont été développées pour leur amplification par PCR. Ainsi et les deux formes ont été différenciées par des produits de PCR distincts ; chez *P. teres*, le locus MAT1 (PttMAT1-1) a été mis en évidence par un fragment de 1143 pb, alors que le locus MAT2 (PttMAT1-2), a été mis en évidence par un fragment de 1421 pb (Rau *et al.*, 2005). Chez les isolats de *P. teres f. maculata*, les deux *loci* MAT1 (PtmMAT1-1) et MAT2 (PtmMAT1-2), ont été mis en évidence par des fragments de 194 pb et 939 pb respectivement (Figure 4) (Rau *et al.*, 2005).

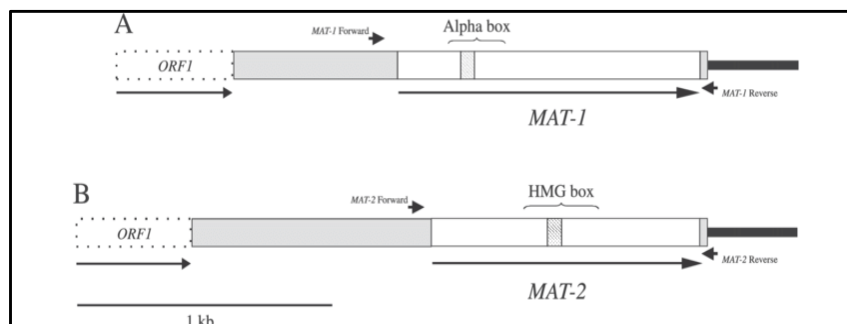


Figure 4 : Organisation des idiomorphes MAT-1 (A) et MAT-2 (B) de *P. teres*(Rau *et al.*,2005)

3. Analyse de la diversité génétique chez *P. teres* : il a été démontré que l'étude de la diversité et de la structure génétique des populations sont importantes pour la gestion des maladies fongiques, en particulier pour le déploiement réussi de la résistance de l'hôte et l'utilisation efficace des fongicides (Zahour, 1992). Des études ont été menées sur des populations de *P. teres* dans des lieux géographiques très variés, dans le monde entier. La plupart des études ont montré un niveau élevé de variabilité au sein des populations, même à petite échelle en terme de zones d'échantillonnage, par rapport à d'autres champignons (McDonald et Linde, 2002). La diversité génétique des populations pathogènes de *P. teres* a été rapportée par plusieurs travaux. Elle a été mise en évidence par différents marqueurs moléculaires (McDonald et Linde, 2002).

En utilisant les marqueurs moléculaire SSR (simple répétition de séquence), 75 isolats monospores *P. teres f. teres*, collectés sur une période de 4 ans dans le Dakota du Nord, ont été analysés. 40 génotypes multi *loci* ont été identifiés à partir de cet ensemble d'isolats par génotypage, moyennant 13 *loci* SSR (Liu *et al.*,2012).

Dans le même contexte, des études réalisées sur *P. teres f. teres* (*Ptt*) et *P. teres f. maculata* (*Ptm*) en Australie via des marqueurs microsatellites (SSR) ont été décrites par Bogacki *et al.* (2010). Trois populations *Ptt* (76 isolats au total) et deux populations *Ptm* (43 isolats au total) ont été échantillonnées. Les résultats ont montré une différence significative dans la distribution des allèles pour 91% des *loci* testés entre les deux formes du champignon. L'indice de diversité génétique de Nei (qui est la probabilité que deux gènes pris au hasard représentent des allèles différents : il est égal au taux d'hétérozygotes (*H*) attendu sous les hypothèses de Hardy-Weinber) (www.takween.com), mesuré dans chacune des populations *Ptt* et *Ptm* était de 0,38 et 0,40 respectivement. Ils ont aussi révélé que les isolats prélevés dans différentes zones étaient génétiquement similaires. En revanche, une différence génétique élevée et significative, a été observée dans chacune des populations et entre les populations de types différents. Cela fournit en outre, des preuves que les deux formes de *P. teres* sont génétiquement distinctes l'une de l'autre et suggère que, les deux types de populations semblent se recombiner par la voie sexuée (Bogacki *et al.*,2010).

Le même marqueur a été utilisé sur 44 isolats de *P.teres f. maculata* prélevés sur des cultures d'orge à Victoria, en Australie. Quinze amorces microsatellites ont révélé un polymorphisme important, avec deux à cinq allèles (moyenne 2,87 0,42) amplifiés à chaque locus ; chaque isolat présentait un génotype unique (McLean *et al.*, 2009).

D'autres chercheurs ont aussi mené une étude moyennant les marqueurs SSR sur 298 isolats de *Ptm* (9 populations) et 567 isolats de *Ptt* (18 populations) ; ils ont démontré que la diversité génétique des populations de *Ptt* était plus élevée que celle des populations de *Ptm* (Linde et Leon, 2019). Les populations de *Ptt* avaient également des niveaux de déséquilibre de liaison plus élevés, ce qui indique une reproduction sexuée moins fréquente. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle des hôtes génétiquement diversifiés devraient montrer des niveaux plus élevés de reproduction (Linde et Leon, 2019).

Dans le même but, la structure génétique de deux populations suédoises du *P.teres*, composée chacune de 64 isolats a été décrite, en utilisant la méthode RADP (Jonsson *et al.*, 2000). Elles ont été isolées à partir des deux cultivars distincts. Parmi les 70 amorces initialement évaluées, trois amorces révélant un polymorphisme avec un total de 19 *loci* reproductibles, ont été utilisées. La variation était grande dans les deux populations pathogènes, indiquée par des indices de diversité génétique moyens de 0,182 et 0,216. La variation dans les deux sites d'échantillonnage était aussi relativement importante. Le profil global de la structure génomique était celui d'une espèce à reproduction sexuée aléatoire (Jonsson *et al.*, 2000).

De même, l'agent causal de la rayure réticulée de l'orge a été étudié dans deux champs distant de 30 km en Afrique du Sud ; chaque champ représentait un type du pathogène (*Ptt* et *Ptm*), 36 isolats pour la population de *Ptt* et de 29 pour la population de type *Ptm* ont été isolés (Graham *et al.*, 2002). L'analyse génétique par les marqueurs RAPD a montré que la diversité génétique totale déterminée pour tous les *loci* a donné des moyennes d'indice de diversité de 0,063 et 0,082, respectivement pour les populations *Ptt* et *Ptm*. L'Analyse hiérarchique par la méthode UPGMA incluant les deux populations et six descendants résultant d'un croisement entre isolats de type différents a été menée. Elle a mis en évidence 3 groupes distincts ; deux groupes réunissant chaque population et un autre la progéniture du croisement. Certains résultats ont suggéré que la recombinaison sexuée peut se produire entre les isolats de type *Ptt* et *Ptm* dans la nature (Graham *et al.*, 2002).

Un total de 68 isolats hongrois de *P.teres f. teres* ont été testés aussi en utilisant 30 amorces RAPD, les isolats provenaient de quatre régions géographiques (Fiscor *et al.*, 2014). Sur les 188 bandes RAPD révélées suite aux amplifications, 171 étaient polymorphes, tous les isolats présentaient des profils RAPD uniques. Aucune corrélation de la diversité avec le type sexué (MAT1 ou MAT2) ou

l'origine géographique des isolats n'a été détectée, de même qu'aucune différenciation génétique n'a été observée entre les isolats MAT1 et MAT2. Toutefois, la diversité a été observée entre les isolats échantillonnés au niveau du champ commercial ou expérimental. Certains des résultats ont soutenu l'idée que les changements saisonniers avaient le plus grand effet sur la divergence génétique des isolats (Fiscor *et al.*, 2014).

Par ailleurs, 23 isolats de *Ptt* et 8 isolats de *Ptm* provenant de 12 régions différentes à travers le monde (Canada, Danemark, Californie, U.S.A. North Dakota, Morocco, Australie) ont été analysés par Wu *et al.* (2003). Ils représentent une collection restreinte, mais diversifiée d'isolats de *P. teres*. La variation génétique a été étudiée par l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) ainsi que, par l'hybridation moléculaire. La sonde utilisée, est un fragment d'ADN de 0,46 kb généré par amplification d'une région génomique d'un isolat de référence. L'analyse typologique basée à la fois sur les phénotypes de virulence et les profils RFLP a montré que le *P. teres* possède un niveau élevé de diversité tant pour l'espèce que pour les deux types (Wu *et al.*, 2003).

Des chercheurs ont aussi analysé le polymorphisme de la longueur de fragments amplifiés (AFLP) pour étudier la diversité génétique et la structure de la population de 60 isolats *Ptt* et 64 *Ptm*, collectés en Australie (66 isolats) et en Afrique du Sud (58 isolats) (Lehmensieka *et al.*, 2010). Les analyses ont séparé les isolats *Ptt* et *Ptm* en deux groupes génétiques fortement divergents. Une variation significative a été observée à la fois, parmi les populations sud-africaine et australienne de *Ptt* et *Ptm*, et entre les sites d'échantillonnage. Les résultats suggèrent que la reproduction sexuée entre les deux formes est peu probable et que la reproduction au sein des groupes *Ptt* et *Ptm* se produit principalement de manière asexuée (Lehmensieka *et al.*, 2010).

En Finlande, le polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP) a été aussi un bon outil d'analyse. La similitude moyenne révélée était de 93% entre tous les isolats, elle était un peu plus élevée au sein de deux populations distinctes sur la base de 175 marqueurs AFLP. Malgré la similitude génétique élevée, 70 génotypes AFLP uniques ont été identifiés parmi 72 isolats. La majeure partie de la variation génétique (68,5%) a été observée au sein de la population et une plus petite partie (30,3%) entre elles. Par ailleurs, seulement 1,2% de la variation a été observée entre les types sexuels MAT1 et MAT2 (Serenius *et al.*, 2005).

Dans une étude similaire, une population de 118 isolats collectés dans le Nord du Dakota a été analysée. Les marqueurs SSR et AFLP ont été utilisés, puis la population pathogène a été analysée à nouveau, moyennant des marqueurs SNPs. Au total de 5783 *loci* uniques, contenant 16441 SNPs, ainsi que 2373 marqueurs de séquences exprimées (EST) contenant 9992, ont été identifiés et caractérisés à partir de populations de *P. teres f. mukulata* (Jared *et al.*, 2015).

Les marqueurs moléculaires tel que les RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphisms) et les SSR (simple sequence repeats) ont été utilisés par Poudel et al. en 2019. Les échantillons de *Ptt* collectés en 2014 et 2015 présentaient une diversité génotypique significative. Cette étude a montré que la recombinaison sexuelle s'est produite régulièrement sur le terrain, ce qui a entraîné une évolution rapide de la structure génétique de la population pendant les 3 ans. Certains de ces nouveaux génotypes pourraient provenir de mutations ou de migrations (Poudel *et al.*, 2019).

En Lituanie, des marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ont été utilisés pour étudier la diversité génétique de 24 des isolats de *P. teres* collectés dans 5 régions, entre 2006 et 2009 (Statkeviciute *et al.*, 2010). Les amorces sélectionnées ont amplifié 31 bandes au total entre 500 pb à 2500 pb, celles-ci ont montré que tous les isolats avaient des haplotypes uniques. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a détecté la majeure partie de la variation (78%) au sein des populations tandis que la variation entre les populations d'un même endroit au cours d'années différentes représentait 6,37%, et que la variation entre différents emplacements lors de la même année était la plus petite (4,85 % de la variation totale). Aucun regroupement clair selon l'origine ou l'année d'échantillonnage n'a été détecté (Statkeviciute *et al.*, 2010).

Par des approches différentes des précédentes, une étude réalisée par Syme et al. (2018) sur plusieurs isolats de *P. teres* a révélé l'effet des éléments transposables sur l'intégrité génomique de *P. teres* et de leurs impacts sur la différence génomique entre les différentes formes du champignon. Les résultats ont montré que la grande majorité des gènes de *P. teres* se trouvent dans des régions riches en GC. Ces gènes sont plus stables et mieux conservés que les gènes influencés par la présence d'éléments transposables (TE). L'importance de l'activité des TE chez les *Ptt* par rapport à *Ptm* semble avoir augmenté la fréquence d'interruption des gènes. De même cette analyse a révélé 122 gènes qui ont différencié les deux formes ; 114 étaient situés dans des régions de faible densité génique, à proximité ou sous forme d'îlots riches en GC alors que 9 autres, étaient non fonctionnelles après insertion de TE. Les auteurs ont conclu que la transposition est à la fois un mécanisme potentiel pour la génération de pseudogènes par interruption du codage et un mécanisme d'inactivation des gènes (Syme *et al.* 2018). Malgré l'isolement géographique de la région, une autre étude menée via séquençage du génome de *P. teres* a démontré une variation allélique élevée par rapport aux études similaires, avec une moyenne de 7,11 allèles par locus (Ellwood *et al.*, 2010). Enfin, le caryotypage électrophorétique a montré des polymorphismes chromosomiques distincts entre les isolats 0-1 et 15A, (Ellwood *et al.*, 2010).

Enfin, il est à noter que , de nombreuses études phylogénétiques ont montré que des isolats *P. teres f. maculata* et *P. teres f. teres* sont séparés en deux groupes génétiquement divergents, indiquant que

les deux formes de *P. teres* doivent être traitées séparément (McDonald et Linde, 2002). En outre, des études ont montré que la divergence génétique est légèrement plus élevée dans la population de *P. teres f. teres* que dans la population de *P. teres f. maculata* (McDonald et Linde, 2002). Comme *P. teres* est capable de se reproduire à la fois sexuellement et asexuellement, la structure de sa population serait largement dépendante de l'importance relative des deux modes de reproduction dans le cycle de vie du champignon (McDonald et Linde, 2002).

- 4. Etude du génome de *P. teres* :** pour étudier la taille du génome de *P. teres*, Aragona et al. (2000) ont utilisé l'électrophorèse sur gel à champ pulsé. Au total, six bandes ont été mises en valeur, allant de 2,0 à 6,0 Mb. Sur la base de l'intensité de la bande, les auteurs ont conclu que deux des bandes représentaient plusieurs chromosomes ; probablement neuf chromosomes présents chez *P. teres*, ce qui correspond à une taille du génome d'au moins 35 Mb. Une analyse cytologique du caryotype pour l'observation physique des chromosomes a également montré qu'au moins neuf chromosomes sont probablement présents chez *P. teres* (Liu et Friesen, données non publiées; in Liu *et al.*, 2011).

Les génomes des deux formes sont hautement colinéaires, chacun composé de 12 chromosomes (Syme *et al.*, 2018). Cependant, Ellwood *et al.*, (2010) moyennant un caryotypage cytologique ont confirmé la présence d'au moins neuf chromosomes. Ces mêmes auteurs, en utilisant un caryotypage électrophorétique, ont révélé aussi des polymorphismes chromosomiques distincts entre les isolats 0-1 et 15A.

Le séquençage du génome de *P. teres f. teres* de la souche 0-1 a révélé une taille de 41,95 Mbp, et a montré la présence de 11799 gènes codant pour des protéines (Ellwood *et al.*, 2010). La carte génétique s'étend sur 2477,7 cM et est composée de 243 marqueurs dans 25 groupes de liaison et incorpore des marqueurs de répétition de séquence simples. Parmi les gènes prédits, les peptides synthétases non ribosomales, et les pompes à efflux en particulier, semblent avoir subi une expansion spécifique chez *P. teres* des familles de gènes non orthologues. L'ensemble contient une pléthore de gènes prédits, qui ont été impliqués dans un mode de vie nécrotrophique (Ellwood *et al.*, 2010).

Le gène MAT sous sa forme biallélique (MAT1 et MAT2) contient un cadre de lecture ouvert ORF, une région promotrice de type « HMG box » pour la forme MAT2 et une région promotrice de type « alpha box » pour la forme allélique MAT1 (Rou *et al.*, 2015). L'évolution du génome chez *P. teres* est caractérisée par l'insertion et l'expansion d'éléments transposables (ET). Le phénomène est particulièrement prononcé chez *P. teres f. teres* qui possède un génome plus grand et plus répétitif que *P. teres f. maculata*, de même qu'une activité de transposition plus récente, mesurée par la fréquence et la taille du génome (Syme *et al.*, 2018).

Ces éléments transposables sont un facteur déterminant montrant un potentiel évolutif. En effet, les ET peuvent fournir une mobilité aux gènes effecteurs, soit au sein d'un génome vers des régions d'augmentation de l'activité transcriptionnelle (Grandaubert *et al.*, 2014), ou entre les génomes pour élargir la gamme d'hôtes (Friesen *et al.*, 2006). Les ET peuvent influencer les gènes voisins y compris les éléments de pathogénicité, en introduisant une variation de séquences, Ceci génère non seulement de nouveaux effecteurs fonctionnels, mais peuvent aussi inactiver un gène en introduisant des codons stop prématurés (Daboussi *et al.*, 1992).

Par ailleurs, il est à signaler que les travaux de Ellwood *et al.* (2010) ont permis la construction d'une carte génétique comportant 243 marqueurs AFLP, SSR (simple sequence repeat) et RAPD. D'une longueur génétique totale de 2477,7 cM, elle se compose de 25 groupes de liaison.

De même que suite à une autre population génotypée par ddRAD (Double digest restriction-site associated DNA), une nouvelle carte génétique a été produite, elle comporte 1393 marqueurs SNPs, marqueurs SSR, et AFLP, ancrés sur 15 groupes de liaison (Leboldus *et al.*, 2015).

Chapitre III : Méthodes moléculaires appliquées

1. Polymérase Chain réaction : depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. A partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée (Poitras et Alain., 2002).

1.1. Principe de la PCR : la PCR est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro* (Sambrook et Russel., 2001). Elle permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN ou d'ARN connue (Sambrook et Russel., 2001). Ceci est possible à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique, et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse, de 20 à 25 nucléotides (Rychlik *et al.*, 1990).

Selon Saiki et al. (1988), cette technique est fondée sur la combinaison de deux facteurs ; (i) les propriétés de synthèse enzymatique et d'initiation spécifique à l'ADN double brin des ADN polymérases dépendantes à l'ADN, qui sont thermostables, (ii) les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires d'ADN en fonction de la température. Ces éléments permettent de contrôler l'activité enzymatique grâce à des transitions de températures assurées par un thermocycleur.

1.2. Etapes de la PCR et conditions réactionnelles : les conditions de réaction d'une amplification PCR dépendent du nombre total de cycles à exécuter ainsi que, de la température et la durée de chaque étape de ces cycles (Kainz, 2000). La décision quant au nombre de cycles à exécuter est basée sur la quantité d'ADN initiale ainsi que le nombre de copies du produit PCR (amplicon) souhaité ; en général, 25 à 35 cycles est la norme pour une réaction PCR (Kainz, 2000). Cela donne environ 34 millions à 34 milliards de copies de la séquence souhaitée en utilisant 25 cycles et 35 cycles respectivement. Toutefois, des cycles supplémentaires peuvent être effectuées si on dispose d'une petite quantité d'ADN pour la réaction (Kainz, 2000).

1.2.1. Etapes de la PCR : chaque cycle d'amplification nécessite 4 étapes différentes. Les cycles d'amplification sont précédés d'une dénaturation initiale et sont suivis par une élongation finale.

1.2.1.1. La dénaturation initiale : avant de commencer les cycles de PCR proprement dits, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 °C) est réalisée. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu

réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start » et de dénaturer d'autres enzymes, qui pourraient être dans la solution (Rychlik *et al.*, 1990).

1.2.1.2. La phase de dénaturation : Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95 °C) permet de déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice, et d'homogénéiser le milieu réactionnel (Chien *et al.*, 1976).

1.2.1.3. La phase d'hybridation : cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56–64 °C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice, grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider (se lier) avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante (Chien *et al.*, 1976).

1.2.1.4. Phase d'élongation : cette étape (généralement de 4 à 120 secondes à 72 °C), permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon (Chien *et al.*, 1976).

1.2.1.5. L'élongation finale : étape optionnelle réalisée à 70-74°C pendant 5 à 15 minutes permet de s'assurer que tous les brins d'ADN monocaténaire s'hybrident et subissent une élongation correctement (Chien *et al.*, 1976).

1.2.2 Composition du milieu réactionnel : pour une PCR réussie, le milieu réactionnel doit contenir selon Sambrook *et al.* (2001) : la région d'ADN à amplifier recommandée à 1 ng/50 µL de volume réactionnel, 0,5 à 2,5 unités d'ADN polymérase par 50 µL de volume réactionnel, 20 à 50 pmol de chaque amorce complémentaire aux régions 3' des deux brins de l'ADN à amplifier, les dNTPs avec une concentration finale typique de 200 µM par nucléotide. En plus d'une solution tampon pour assurer le bon fonctionnement des enzymes, à concentration finale 1X, donc 5 µL pour un volume final standard de 50 µL (Powell *et al.*, 1987).

Des réactifs supplémentaires peuvent comprendre sel de magnésium Mg^{2+} (à une concentration finale de 0,5 à 5,0 mM), sel de potassium (à une concentration finale de 35 à 100 mM) (Lorenz, 2012), diméthylsulfoxyde (DMSO à une concentration finale de 1-10%) (Sun *et al.*, 1993) ou le formamide (à une concentration finale de 1,25 à 10%) (Sarkar *et al.*, 1990) pour permettre une amplification d'ADN cibles difficiles, généralement due à leur richesse en G-C.

2. Quelques séquences ciblées par la PCR : les marqueurs génétiques peuvent être de type biochimique, phénotypique ou moléculaire; ceux-ci sont directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN ; ils sont depuis quelques années majoritairement utilisés, car plus nombreux et plus facile à développer que les autres (Santoni *et al.*, 2000). Parmi ces marqueurs, des séquences correspondantes aux ITS au gène codant la GAPDH et aux SNPs sont souvent amplifiées par PCR.

2.1. Les séquences ITS : les séquences ITS (Internal transcribed spacers) sont une portion d'ADN ribosomique située entre les séquences codantes pour la petite et la grande sous unité ribosomique (Lafontaine et Tollevey, 2001). La figure 5 montre la structure de ce type de séquence.

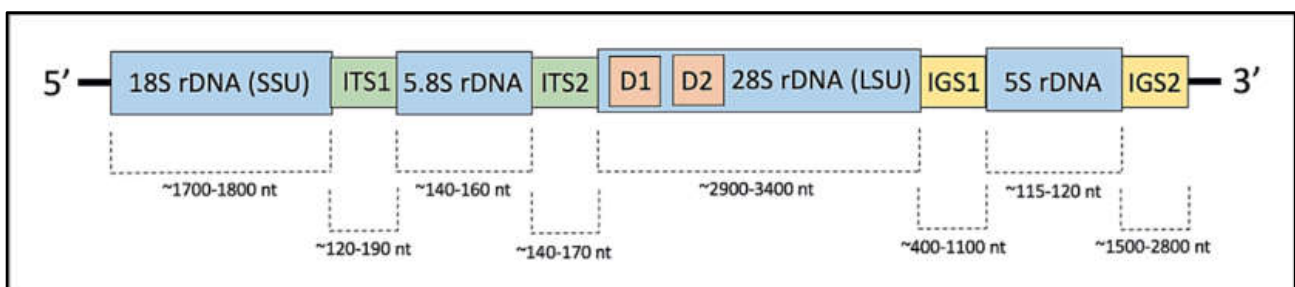


Figure 5: Structure du gène codant l'ADN ribosomique, montrant les portions codantes pour 18S, ITS1, 5.8S, 28S, IGS1, 5S et IGS2 (Kuzdraliński *et al.*, 2017)

Ces séquences ITS généralement utilisées dans la phylogénie moléculaire et la taxonomie, en raison de plusieurs propriétés favorables citées par Baldwin *et al.* (1995) : leur facilité d'amplification (petite séquences, flanquées par des séquences hautement conservées), leur facilité de détection (due à leur grand nombre) et un degré de variation élevé, même pour des espèces relativement proches, causé par le manque de pression évolutive (Sumida *et al.*, 2004). Elles possèdent toute fois, un taux de mutations sensiblement plus élevé sous l'effet d'insertions, de délétions et de mutations ponctuelles, ce qui rend impossible la comparaison de séquences d'ITS entre espèces très éloignées (Sumida *et al.*, 2004).

Les ITS sont des séquences qui ont été utilisées dans l'analyse phylogénique de *P. teres*, comme dans l'étude menée par Zhang et Berbee (2001), ou les ITS de 32 isolats de *P. teres* sont été utilisé pour déterminer que ce dernier est monophylétique. Ces séquences sont aussi souvent utilisées pour identifier *P. teres* ; elles ont été proposé comme séquences cibles spécifiques pour la différenciation entre *P. teres f. teres* et *P. teres f. maculata* dans une étude menée par Lu *et al.* (2010). Elles ont aussi été utilisé pour la première identification de ce pathogène dans plusieurs régions du monde comme par exemple l'identification de la forme *P. teres f. maculata* dans l'Idao, aux USA (Marshall *et al.*, 2015).

2.2. Les séquences GAPDH (Glyceradehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) : le glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) est une enzyme tétramérique d'environ 37Kda qui catalyse la

6^e étape de la glycolyse, en plus de quelques autres fonctions non métaboliques, comme l'activation de la transcription, l'apoptose ou le transport axoplasmique (Tristan *et al.*, 2011). La séquence qui code pour le GAPDH (Figure 6) fait partie d'un groupe de gènes appelés « housekeeping genes », des gènes constitutionnels requis pour le maintien de la vie cellulaire et exprimés dans toutes les cellules d'un organisme (Eisenberg *et al.*, 2003).



Figure 6 : Structure du gène GAPDH (Han *et al.*, 2019)

Leur intérêt réside dans le fait qu'elles présentent un très bas degré de mutations, ce qui en fait une cible PCR idéale, très souvent utilisée comme témoin lors de PCR spécifique à un gène (Butte *et al.*, 2001).

Le gène GAPDH est souvent utilisé comme témoin positif en analyse quantitative d'RT-PCR, due à son expression constante dans la majorité des espèces et dans les études d'expression génique (Rebouças *et al.*, 2013). Ceci a été le cas dans l'étude de Rau *et al.*, (2007), dans laquelle la séquence GAPDH a été utilisée comme témoin dans une comparaison de MAT1 et MAT2 chez *P. teres* via la RT-PCR ; la stabilité et constance d'expression en font un témoin relativement efficace.

Par ailleurs, Lu *et al.*, (2010), ont désigné deux amorces ; PtGPD1F et PtGPD1R pour le gène GAPDH chez *P. teres*, qu'ils ont ensuite utilisées en tant que témoins dans une PCR spécifique des gènes MAT1 et MAT2 dans le but d'identifier les idiomorphes de *P. teres*.

Dans une autre étude, cette séquence a été utilisée pour l'analyse de l'évolution de *P. teres*. A cet effet, une analyse de phylogénie multigénique a été réalisée et la relation entre 5 gènes orthologues a été recherchée (Ellwood *et al.*, 2012). Ceux-ci sont act1(actin), b-tubulin (tub2), cytochrome P450 14a-demethylase (cyp51A), translation elongation factor-1a (EF-1a) et glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PD); ils ont été choisis pour leurs degrés de conservation, souvent utilisés dans les études de la phylogénie des espèces (Ellwood *et al.*, 2012).

2.3. Les séquences SNPs (single nucleotide polymorphism): il s'agit de variations naturelles qui ne concernent qu'un seul nucléotide dans une séquence donnée (Rafalaski, 2002) tel que montré dans la figure 7.

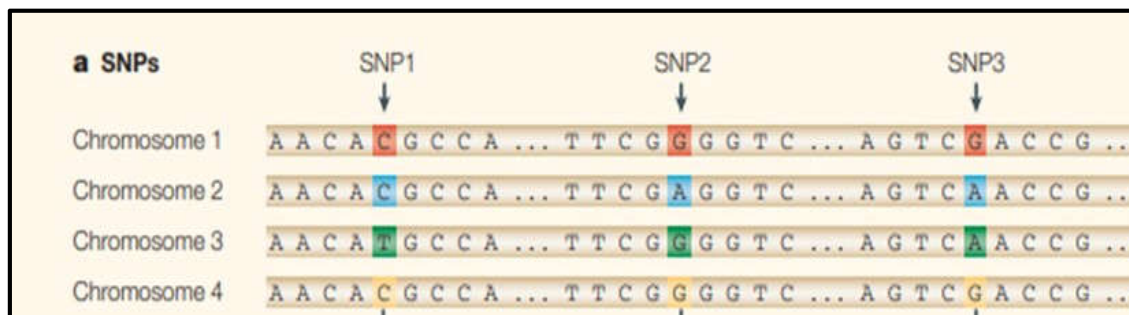


Figure7: Trois SNPs, sur quatre chromosomes (Hafler et Dejager, 2005)

Comparés aux autres marqueurs moléculaires, les SNPs présentent l'avantage d'une répartition homogène dans tout le génome et sont excessivement nombreux. Ce nombre élevé permet donc potentiellement la création de cartes génétiques et physiques à très haute densité (Rafalaski,2002). Ces séquences présentant un modèle de mutation simple, ont montré qu'une petite fraction des SNPs a un contenu d'information très élevé pour l'analyse de la structure de la population et la capacité d'examiner des génomes de grands échantillons chez les populations naturelles (Helyar *et al.*,2003).

Les SNPs présentent une source principale de polymorphisme dans un génome, ils sont présents dans les parties codantes et non codantes d'un génome et sont révélés par des techniques rapides de marquage moléculaire :PCR et spectrométrie de masse, PCR et puces à ADN ou PCR et électrophorèse rapide (Santoni *et al.*,2000).Ils ont été décrits en tant que marqueurs dominants pour étudier la phylogénie et la diversité génétique (Rafalaski,2002).Ainsi l'amplification de ces séquences a été un outil dans plusieurs travaux focalisés sur l'étude de la structure des populations du *P. teres*.

Pour l'évaluation des bases génétiques et pathologiques des interactions *P. teres f. maculata*– orge, une carte génétique a été construite en utilisant le séquençage(RAD-GBS), associé au développement des marqueurs SNP (Carlsen *et al.*,2017). A cet effet les chercheurs ont développé une population de 105 descendants en croisant deux isolats de référence ; les descendants ont été phénotypés sur un ensemble de quatre génotypes d'orge montrant une réaction différentielle aux isolats parentaux. Dans ce travail, 1034 marqueurs SNP ont été identifiés parmi lesquels 488 marqueurs SNP de haute qualité ont été utilisées pour l'identification des associations à la virulence / avirulence chez *P. teres f. maculata*. Les résultats ont permis d'identifier 6QTL sur 5 groupes de liaison différents qui représentaient 20 à 37% de la variation due à la maladie. Les données présentées avaient démontré la complexité de la virulence impliquée dans le pathosystème *Ptm* – orge (Steven *et al.*,2017).

Dans le même but est pour comprendre la structure de la population et la diversité génétique chez *P. teres f. maculata*, les SNPs chez 140 isolats ont été générés suite à un génotypage par séquençage (Kinzer, 2015). La cartographie d'association a détecté parmi ces SNPs, la présence de 45

marqueurs chez 19 isolats provenant de différentes régions aux USA. Ces associations sont liées à la virulence ou l'avirulence des isolats. Cette recherche a permis de comprendre la variabilité phénotypique et génétique des populations de *P. teres f. maculata* et d'identifier les associations de marqueurs à des caractères liés au pouvoir pathogène (Kinzer, 2015).

Par ailleurs, lors de la recherche de la résistance aux fongicides du groupe QoI (Quinone outside inhibitors), un polymorphisme mononucléotidique a été retrouvé au niveau du gène qui code le cytochrome b chez *P. teres* (Sierotzki *et al.*, 2007). Cette recherche a été réalisée par une analyse moléculaire basée sur la PCR quantitative, en utilisant la méthode d'extension d'amorces spécifiques d'allèles (amplification refractory mutation system = ARMS) pour amplifier puis séquencer des fragments du gène du cytochrome b. L'analyse a révélé deux mutations différentes responsables de la résistance qualitative au QoI : G143A et F129L. La première entraîne un changement à la position de l'acide aminé 143, de la glycine par l'alanine. La seconde (F129L), est une substitution de la phénylalanine par la leucine en position 129 ; trois polymorphismes mononucléotidiques (SNP) différents, TTA, TTG et CTC, peuvent coder pour la L (leucine) chez *P. teres*. Par conséquent, 4 paires d'amorces différentes, (une pour l'allèle sauvage et 3 pour les allèles mutants) ont été développées pour être utilisées dans une qPCR. Ce système a permis de diminuer les limites dans la détection de la mutation F129L responsable de la résistance au fongicides QoI (Sierotzki *et al.*, 2007).

3. La PCR en temps réel : la PCR en temps réel est une amplification durant laquelle est réalisée la collecte continue de signaux fluorescents d'une ou plusieurs réactions en chaîne de la polymérase sur une série de cycles (Tevfik, 2006). Elle est quantitative si les signaux fluorescents provenant de chaque réaction sont convertis en une valeur numérique pour chaque échantillon (Tevfik, 2006). Sa technologie est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent (Tevfik, 2006). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR, comme indiqué dans la figure 8 ; en observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR (www.Généthon.fr). Les appareils développés pour cette technologie utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction PCR et réduit le temps d'analyse (Bustin, 2000).

Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi, cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle (high-throughput) (Martell *et al.*, 1999).

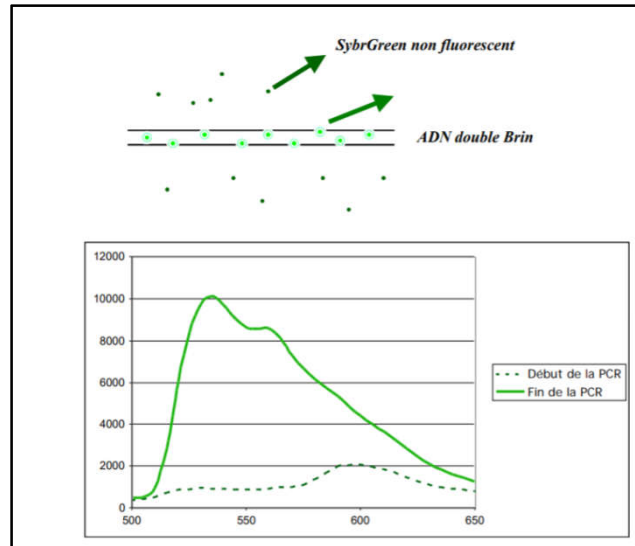


Figure 8 : Principe et suivi d'une PCR en temps réel par SybrGreen (Tevfik , 2006)

Selon Tevfik (2006), la PCR en temps réel nécessite les étapes suivantes ; la première consiste à distribuer la solution mère de la PCR dans les puits nécessaires à l'expérience, les échantillons sont pipetés dans les puits d'une plaque contenant le mélange réactionnel de la PCR. Une fois que la plaque PCR, le tube ou les jeux de capillaires ont été remplis avec tous les composants nécessaires, ils sont prêts à être utilisés sur un instrument en temps réel. Les étapes qui suivent sont les mêmes que les étapes d'une PCR normale, sauf pour la collecte de données qui nécessite un cycle spécifique.

Pour ce programme, un cycle en trois étapes est généralement utilisé. Ici, le cycle commence par passer à la température d'hybridation (95°C) pendant 15 secondes, passe ensuite à 60°C pour 2 secondes et passe en suite jusqu'à 72°C pour 30 secondes, répété à chaque cycle. La collecte de données à la température la plus élevée permet des résultats plus précis (Tevfik, 2006).

En raison de sa simplicité, la PCR en temps réel est utilisée pour le suivi des épidémies de *P. teres* et pour l'évaluation de l'efficacité des fongicides (Kianianmomeni *et al.*, 2007). La sensibilité de la méthode permettrait aussi de quantifier la croissance fongique dans différents tissus végétaux au cours de la progression de l'infection (Leisova *et al.*, 2006).

Des études ont été menées sur des populations de *P. teres* pour l'étude de la sensibilité aux fongicides tel que les strobilurines. Une PCR en temps réel a été établie pour la détection quantitative du SNP analogues dans le gène du cytochrome b chez *P. teres*, qui confère une résistance aux fongicides du groupe des strobilurines (Kianianmomeni *et al.*, 2007). Les résultats obtenus ont permis de détecter la présence de la mutation G143A dans le gène du cytochrome b chez les isolats analysés, responsable de la résistance aux strobilurines. La mutation est la conséquence d'un changement à la position de l'acide aminé 143 de la glycine en alanine (Kianianmomeni *et al.*, 2007).

Dans une autre recherche, consacrée à la caractérisation des gènes impliqués dans les processus biochimiques lors de la germination des conidies, la PCR en temps réel a été utilisée (Dilger *et al.*, 2003). En plus de 2 techniques de criblage différentiel, basées sur L'ADNc-AFLP et l'hybridation soustractive de suppression (SSH), elle a été utilisée pour isoler les gènes qui sont régulés à la hausse pendant la germination des spores chez *P. teres*. En effet, la surexpression des gènes candidats lors de la germination a été confirmée par la transcription inverse en temps réel (RT) PCR (Dilger *et al.*, 2003). Des séquences nucléotidiques de 35 transcrits ont été analysées, et les séquences d'acides aminés de leurs produits prédits ont été comparées aux bases de données. Un changement maximal d'expression par rapport aux conidies non germées variant entre 2,6 et 6 fois a été noté. Toutes les transcriptions ont montré une augmentation significative de l'expression au cours des premiers stades de germination. Ce type d'étude pourrait être utile pour le développement ciblé de nouveaux agents antifongiques (Dilger *et al.*, 2003).

Dans une autre étude consacrée au rôle de l'AS (Acide Salicylique) dans la résistance de l'orge à l'égard de *P.terres*, la PCR en temps réel a été aussi une approche très efficace (Al-Daoude *et al.*, 2018). Les niveaux de SA ainsi que l'expression du gène PR2 ont été explorées à différents moments de l'infection, dans les feuilles infectées de deux génotypes d'orge, l'un résistant et l'autre sensible. Pour ce faire, un isolat monospore de *P. teres* (NB4) a été testé; après incubation, les valeurs de SA ont été quantifiées en utilisant une PCR quantitative en temps réel comme décrite par Derveaux *et al.* (2010). Les résultats de la RT-PCR suggèrent que l'expression de PR2 augmente aussi bien chez le génotype résistant que sensible au cours des périodes d'inoculation (Al-Daoude *et al.*, 2018).

Par ailleurs, un protocole basé sur la PCR en temps réel a été développé pour surveiller et quantifier la maladie de la rayure réticulée de l'orge causée par les deux formes de *P. teres* pendant une saison de croissance (Leisova *et al.*, 2006). Cette méthode a été appliquée sur des échantillons de feuilles prélevées sur 20 variétés d'orge de la région Kromeriz pendant la saison de croissance 2003 et 2004. A cet effet, 13 isolats *Ptt* et 36 isolats *Ptm*, ont été évalués pour la variabilité génétique en utilisant l'AFLP et une PCR en temps réel spécifique à l'espèce. La quantification a été réalisée en comparant les valeurs Ct (seuil de cycle) des échantillons inconnus avec celles obtenues à partir de dilutions standard de plasmides. L'étude a révélé que *Ptt* a prédominé au cours de ces 2 années. Donc la méthode développée permet une quantification rapide et spécifique de l'espèce *P. teres* dans les plantes infectées (Leisova *et al.*, 2006).

La PCR quantitative en temps réel a été utilisée également pour développer un test rapide et sensible pour analyser la contamination des graines d'orge par *Pyrenophora spp.* Des scientifiques ont développé une méthode de détection quantitative par PCR qui peut être utilisée pour déterminer les niveaux d'infection des semences par *P. teres* (Habachi-Houimli *et al.*, 2019). Cette méthode utilise la

technologie du système de mutation réfractaire par amplification (ARMS = amplification-refractory mutation system) Scorpion, avec détection par PCR en temps réel. Les amorces Scorpion ARMS ont été conçues et optimisées de manière à ce qu'une discordance de base nucléotidique unique dans la séquence d'amorces puisse distinguer *P. teres* de *P. graminea*, un autre pathogène de l'orge transmis par les graines (Habachi-Houimli *et al.*, 2019). L'amorce Scorpion ARMS a été développée pour la détection de *P. teres* en exploitant la différence de pair de bases uniques en position 42 de la séquence ITS1 (Stevens *et al.*, 1998). Il est en effet nécessaire de faire la distinction entre ces deux agents pathogènes, pour la gestion adéquate de l'infection évaluée pour chacun d'eux (Habachi-Houimli *et al.*, 2019). Les progrès réalisés dans le développement de sondes fluorescentes sensibles et spécifiques ont permis au test PCR actuel de détecter spécifiquement *P. teres* en une seule réaction alors qu'auparavant, deux réactions étaient nécessaires pour distinguer *P. teres* de *P. graminea* (Habachi-Houimli *et al.*, 2019). La précision du test développé, est montré par le fait, qu'un échantillon de semences devrait être fortement infecté ($\geq 70\%$) par *P. graminea* pour provoquer un faux résultat positif (Habachi-Houimli *et al.*, 2019). Selon les auteurs, cette situation est très peu susceptible de se produire, car les niveaux d'infection par *P. graminea* ont chuté énormément.

L'éventuelle implication de gènes candidats, HvNBS10, HvNBS72 et HvNBS85 dans la résistance à *P. teres f. maculata*, a été aussi étudiée grâce à la PCR en temps réel. Les profils d'expression utilisant qRT-PCR 48 heures après l'infection par *P. teres f. maculata* a révélé que, la transcription de tous les gènes agissait dans le même sens (régulation à la baisse) chez les cultivars résistants et sensibles, bien qu'ils aient montré une variation dans le dosage du transcrit. Ce résultat suggère que des réponses transcriptionnelles coordonnées de plusieurs gènes NBS chez l'orge seraient nécessaires pour une réponse efficace contre *P. teres f. maculata* (Habachi-Houimli *et al.*, 2019)

4. Marqueurs moléculaires basés sur la restriction enzymatique (RFLP): il s'agit d'une technique à travers laquelle les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP= *restriction fragment length polymorphism*), sont identifiés en utilisant les enzymes de restriction qui coupent l'ADN uniquement sur des «sites de restriction» déterminés (Rasmussen, 2012). A présent, l'utilisation la plus courante des RFLP est en aval de PCR (PCR-RFLP) pour détecter les allèles qui diffèrent en séquence à un site de restriction donné (Rasmussen, 2012).

Selon Grivet et Noyer (2003), la mise en œuvre de la technique RFLP (figure 9) implique de réaliser les manipulations suivantes : (i) l'ADN génomique total extrait est purifié en quantité assez importante à partir de chaque génotype est soumis à une digestion par une enzyme de restriction, (ii) les fragments générés sont séparés selon leur taille par une électrophorèse sur gel, (iii) L'ADN est ensuite transféré du gel sur une membrane (Southern-blot).

La dernière étape consiste en la réalisation de l'hybridation moléculaire avec une sonde d'ADN marquée préalablement soit par la radioactivité, soit chimiquement ; la sonde va alors s'hybrider avec le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente des homologies (Hamon *et al.*, 2003 in: Grivet et Noyer, 2003). Le résultat est présenté sous forme d'autoradiographie. Les bandes observées matérialisent les différents allèles d'un locus cible ; chaque allèle correspond à une configuration particulière du sites de restriction autour de la région homologue de la sonde (Hamon *et al.*, 2003 in: Grivet et Noyer, 2003).

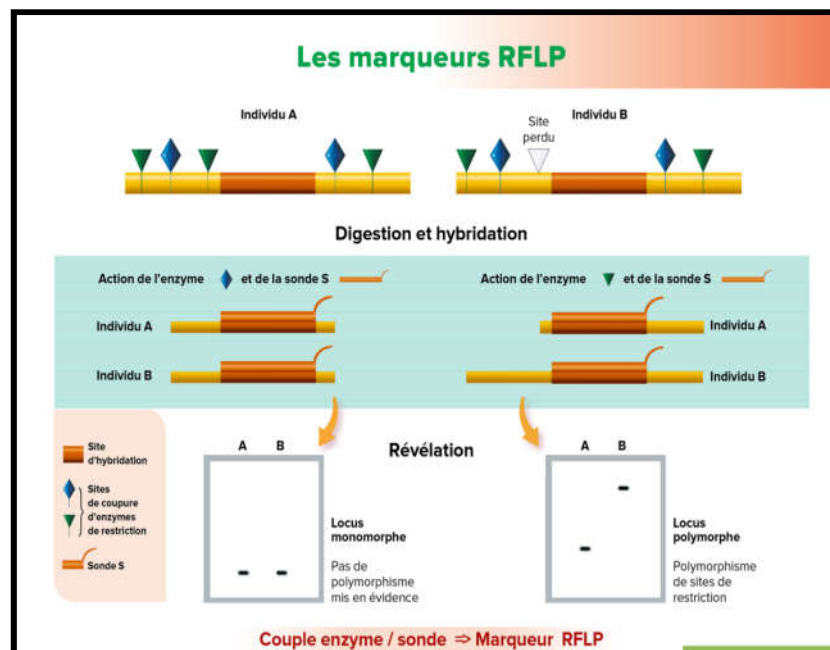


Figure9: Les polymorphismes de longueur des fragments de restriction RFLP (Gnis-pedagogie.org, on line : <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/marqueurs-moleculaires/>)

Un RFLP peut être détecté en examinant le profil des fragments de restriction générés lors de la digestion d'une manière classique sans utilisation des sondes. Les fragments résultants sont séparés selon leurs taille par électrophorèse sur gel (d'agarose ou polyacrylamide) et visualisés après révélation par du bromure d'éthidium (Walker et Rapley, 2000). Même les grands fragments d'ADN tels que des chromosomes peuvent être séparés par l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) (Walker et Rapley, 2000).

Les avantages importants de la technique comprennent le faible coût et l'absence d'exigence d'instruments avancés. L'avantage par rapport aux *loci* polymorphes traditionnels, le fait qu'elle représente une technologie relativement uniforme qui peut être appliquée à n'importe quel chromosome, que ce soit dans une bactérie, un humain, un végétal ou un animal (Williams, 1989). Les inconvénients comprennent la nécessité d'endonucléases spécifiques et des difficultés à identifier la

variation exacte dans le cas où plusieurs SNP affectent le même site de reconnaissance de l'enzymes de restriction (Williams,1989).

Le RFLP a été employé pour plusieurs applications d'analyse génétique depuis son invention, notamment pour évaluer la variation génétique d'une population *P. teres* géographiquement variée. En effet, 15 isolats de *P. teres f. teres* et 5 de *P. teres. f. maculata* ont été sélectionnés en fonction de leur origine géographique pour l'analyse RFLP. L'ADN des 20 isolats ont subi une digestion enzymatique par HindIII. Un produit d'amplification de 0,46 kb issu de la réaction en chaîne de la polymérase appliquée sur l'ADN d'un isolat de référence (ND218) a été cloné et marqué pour fournir une sonde d'hybridation radioactive. L'analyse de Southern et d'autres manipulations d'ADN ont été effectuées selon les méthodes de Sambrook et al. (1989). Un degré élevé de polymorphisme de l'ADN a été détecté chez *Ptt* et *Pt* (Wu et al.,2003).

5. Marqueurs moléculaires basés sur la PCR: les marqueurs moléculaires correspondent au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN; l'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines et de façon indépendante des conditions de l'environnement (Najimi et al.,2003). Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), et les marqueurs basés sur la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Najimi et al.,2003).

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser des marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN (Najimi et al.,2003). Pour que ces produits deviennent des marqueurs moléculaires, il faut explorer le polymorphisme à l'intérieur du fragment (Santoni et al.,2000). De nombreuses techniques de marquage moléculaire basées sur l'amplification par PCR sont largement utilisées dans l'étude de diversité génétique (Santoni et al.,2000). Parmi celles-ci ; les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat), l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), les ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) et la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Santoni et al.,2000).

4.1. La technique RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA): la technique de l'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD) basée sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été l'une des techniques moléculaires les plus couramment utilisées pour développer des marqueurs d'ADN (Senthil et Gurusubramanian, 2011). La RAPD est une modification de la PCR dans laquelle une amorce oligonucléotidique unique, courte (10 bases de long) et arbitraire est utilisée. Cette dernière est capable de s'hybrider et de s'amorcer à plusieurs endroits du génome peut produire ainsi un spectre

de produits d'amplification qui sont des caractéristiques de l'ADN matrice(Senthil et Gurusubramanian, 2011).

Les marqueurs RAPD ont trouvé une large gamme d'applications dans la cartographie génétique, la génétique des populations, la génétique évolutionnaire moléculaire et la sélection végétale et animale(Senthil et Gurusubramanian, 2011).Ceci est principalement dû à la rapidité au coût et à l'efficacité de la technique pour générer un grand nombre de marqueurs sur une courte période (Senthil et Gurusubramanian, 2011). Par conséquent la technique RAPD peut être réalisée dans un laboratoire de moyens modérés pour la plupart de ses applications, l'avantage de cette technique sont, qu'aucune connaissance préalable du génome à l'étude n'est nécessaire (Senthil et Gurusubramanian, 2011).

Les chercheurs supposent que l'amplification se produit lorsqu'une séquence d'ADN adéquate dans le génome est rencontrée. Celle-ci doit être complémentaire de celle de l'amorce et située sur des brins d'ADN opposés, dans une orientation opposée à une distance facilement amplifiable par PCR(Senthil et Gurusubramanian, 2011). Les produits amplifiés (jusqu'à 3,0 kb) sont généralement séparés sur des gels d'agarose (1,5-2,0%) et visualisés par bromure d'éthidium(Senthil et Gurusubramanian, 2011).

Les polymorphismes résultent de mutations ou de réarrangements au niveau ou entre les sites de liaison des amorces et sont détectés par la présence ou l'absence d'une bande RAPD particulière (figure 10).

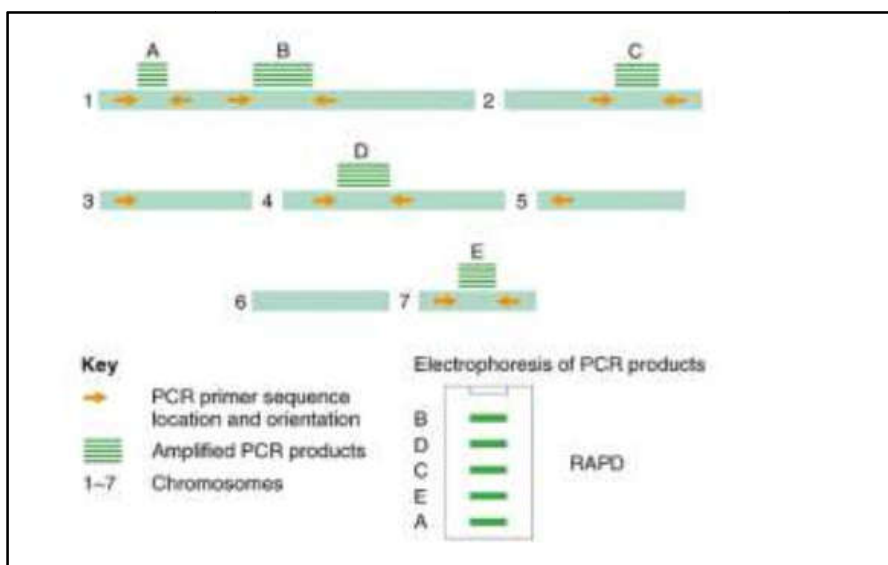


Figure 10 : Modèle d'analyse générale par RAPD(Senthil et Gurusubramanian, 2011)

Les produits d'amplification des mêmes allèles chez un hétérozygote diffèrent en longueur et sont détectés comme présence et absence de bandes dans le profil RAPD, en moyenne, chaque amorce

dirige l'amplification de plusieurs *loci* dans le génome de sorte que l'allélisme ne se distingue pas dans les profils RAPD (Senthil et Gurusubramanian, 2011).

Dans le cadre de l'étude des gènes responsables de la résistance aux populations de *P.teres*, l'agent causal de la rayure réticulée, la RAPD a été utilisée. Une population de lignées d'orge haploïdes doublées (HD), produites à partir d'un croisement entre les cultivars 'Léger' et 'CI 9831' a été caractérisée à l'aide de marqueurs RAPD, pour identifier des gènes conférant la résistance à *P.teres f. maculata* (Molnar *et al.*, 2000). La résistance semblait initialement être due à un seul gène en raison d'une ségrégation d'environ 1:1 (résistant : sensible) parmi la progéniture HD. Suite à l'analyse RAPD, elle s'est avérée être associée à trois régions génomiques (Molnar *et al.*, 2000). Parmi les 500 amorces RAPD aléatoires qui ont été testées chez les parents, 195 ont révélé des bandes polymorphes, sept ont montré une association à la résistance parmi des groupes de ségrégant, ces sept marqueurs étaient situés sur trois régions génomiques non liées (Molnar *et al.*, 2000). Deux de ces régions, dont l'une située sur le chromosome 2, porte des gènes de résistance majeurs. La troisième région montre une homologie avec la région du chromosome 2. Cette étude montre la localisation simultanée de marqueurs pour plus d'un gène gouvernant un caractère, démontrée à l'aide de marqueurs RAPD et d'analyse de ségrégant regroupés (BSA)(Molnar *et al.*, 2000).

Dans une autre étude sur la résistance à cette maladie causée réalisée sur des variétés locales d'orge égyptienne et des génotypes d'orge allemands, la RAPD a été utilisée, associée à l'AFLP(Saker, 2005). Les résultats indiquent que la plupart des variétés locales d'orge égyptiennes sont extrêmement résistantes à la maladie. Un total de sept amorces RAPD aléatoires présélectionnées, ont été utilisées pour détecter des marqueurs génotypiques spécifiques pour les dix génotypes d'orge égyptien et allemand sélectionnés. Sur les soixante bandes amplifiées, 13 étaient polymorphes, c'est-à-dire que le pourcentage de polymorphisme était de 21,6%. Le nombre moyen de produits d'amplification par amorce était de 8,5 bandes(Saker, 2005). L'analyse moléculaire utilisant RAPD a montré des profils de bandes uniques pour les différents génotypes, montrant ainsi son efficacité pour identifier différents génotypes d'orge d'origines différentes, et avec différentes réactions à l'égard de *P. teres*(Saker, 2005).

Par ailleurs, cette technique a été employée pour déterminer l'hérédité de la virulence chez *P. teres* par Weiland *et al.*(1998). Deux isolats de *P. teres f. teres*, l'un possédant une virulence élevée, et l'autre possédant une faible virulence ont été croisés et la descendance a été isolée. Des conidies provenant de cultures des isolats parents et descendants ont été utilisées comme inoculum pour déterminer l'hérédité de la virulence chez l'agent pathogène. Sur les 82 descendants testés, 42 présentaient une virulence élevée et 40 une faible virulence sur l'orge «Harbin»(Weiland *et al.*, 1998). Les données soutiennent un modèle dans lequel un seul gène majeur contrôle la virulence chez *P. teres f. teres* sur ce cultivar d'orge (Weiland *et al.*, 1998). Afin de rechercher des marqueurs génétiques

moléculaires associés au phénotype de virulence, les ADN ont été extraits à partir des isolats parentaux et de ceux de la descendance, et ont été analysés par RAPD ; 5 marqueurs associés à une faible virulence, ont été obtenus. Les données ont indiqué que la technique RAPD peut être utilisée pour marquer les déterminants génétiques de la virulence chez *P. teres f. teres* (Weiland *et al.*, 1998).

5.2. La technique AFLP (Amplified fragment length polymorphism): la technique est basée sur l'amplification sélective par PCR de fragments de restriction à partir d'une digestion totale de l'ADN génomique (de Vicente et Fulton, 2003). La prise d'empreintes ADN implique l'affichage d'un ensemble de fragments d'ADN provenant d'un échantillon d'ADN spécifique (Vos *et al.*, 1995). L'amplification sélective est réalisée par l'utilisation d'amorces qui s'étendent dans les fragments de restriction, amplifiant uniquement les fragments dans lesquels les extensions d'amorces correspondent aux nucléotides flanquant les sites de restriction (Vos *et al.*, 1995). La méthode permet la co-amplification spécifique d'un grand nombre de fragments de restriction. Cependant le nombre de fragments qui peuvent être analysés simultanément dépend de la résolution du système de détection. En règle générale, 50 à 100 fragments de restriction sont amplifiés et détectés sur des gels de polyacrylamide dénaturant (Vos *et al.*, 1995).

L'AFLP tel que montré dans la figure 11, est donc basée sur l'amplification d'un sous-ensemble de fragments de restriction génomique par PCR, selon les étapes suivantes: (i) L'ADN est digéré par deux enzymes de restriction différentes, (ii) Des adaptateurs oligonucléotidiques sont liés aux extrémités des fragments d'ADN. (iii) Des sous-ensembles spécifiques des produits de digestion de l'ADN sont amplifiés, en utilisant des combinaisons d'amorces sélectives. En effet, la PCR peut être réalisée en plusieurs étapes : une première avec des amorces dont la séquence est identique à celle des adaptateurs et qui amplifie ainsi tous les fragments, la seconde avec des amorces possédant de 1 à 3 nucléotides supplémentaires en extrémité 3' de l'amorce, sélectionnant ainsi un plus petit nombre de fragments étant donné que ceux-ci peuvent être très nombreux (Huybens *et al.*, 2009). (iv) Enfin, la détection du polymorphisme se fait avec des radioisotopes, des sondes fluorescentes ou une coloration au nitrate d'argent (de Vicente et Fulton, 2003 ; Huybens *et al.*, 2009).

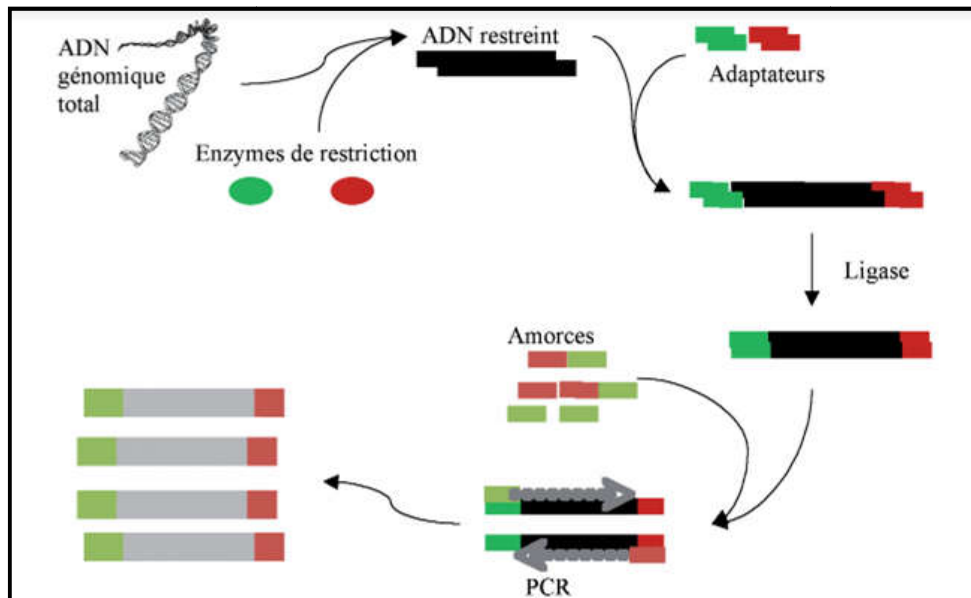


Figure 11: Principe général de l'Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)
(Huybens *et al.*, 2009)

L'AFLP a été souvent utilisée pour l'étude de la diversité génétique chez les populations de *P. teres*. Dans le but d'étudier le niveau de différenciation génétique et la diversité des populations provenant de différentes zones agro-écologiques de Syrie et de Tunisie, elle a été employée par Bouajila *et al.* (2013). Les auteurs l'ont appliqué pour identifier la structure de la population et la variation génétique au sein et entre les populations de *P. teres f. teres* (94 isolats provenant de 20 localités ; 17 populations de Tunisie et 3 populations de Syrie). La procédure AFLP a été réalisée avec un protocole qui impliquait une digestion de l'ADN génomique par les enzymes de restriction EcoRI et MseI, suivie par la ligature des adaptateurs EcoRI et MseI pour générer l'ADN matrice pour l'amplification PCR, une amplification sélective des produits de PCR dilués de la pré-amplification et enfin une visualisation des bandes AFLP par coloration au nitrate d'argent. Un total de 401 bandes AFLP polymorphes ont été générés avec six combinaisons d'amorces sélectionnées. Les analyses de variance ont indiqué que, la plupart de la variation était réparties au sein des populations plutôt qu'entre les populations. La diversité génotypique était élevée pour les populations prélevées de la variété Rihane et pour celles des différentes zones agro-écologiques. L'analyse a aussi montré une forte différenciation génétique entre les populations provenant des différentes populations d'hôtes en Syrie et en Tunisie, ce qui peut s'expliquer en partie par le faible flux de gènes autour des zones échantillonnées. L'étude a conclu au fait que le profilage AFLP est une méthode efficace pour typer le pathogène *P. teres f. teres*. (Bouajila *et al.*, 2013).

Dans une autre étude et à des fins différentes de l'étude précédente, des amorces spécifiques pour PCR ont été développées à partir de polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP) chez *P. teres* (Leisava *et al.*, 2005). Les amorces ont été conçues spécifiquement pour permettre la différenciation entre *P.teresf. teres* et de *P. teres f. maculata* ; les deux formes sont en effet morphologiquement très similaires. Les analyses de polymorphisme ont été appliquées selon un protocole dans lequel MseI et EcoRI ont été utilisés comme nucléases de restriction. L'amplification sélective, avec des amorces adaptées aux extrémités générées par MseI et EcoRI et marquées par des fluorescents a été réalisée sous forme de PCR multiplex. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse capillaire. En utilisant 33 paires d'amorces, 27 à 50 fragments d'ADN polymorphes de 50 à 500 pb ont été détectés. Un total de 1247 bandes polymorphes AFLP a été enregistré dans tous les isolats étudiés. Les profils AFLP étaient distincts parmi les différentes espèces, même entre les deux formes de *P. teres* (Leisava *et al.*, 2005). L'amplification avec les quatre paires d'amorces PCR conçues par la suite, a fourni des produits spécifiques à la forme *P. teres*, aucune réaction croisée n'a été observée avec l'ADN de plusieurs autres espèces, telles que *P. tritici-repentis*, *P. graminea* et *Helminthosporium sativum*. Le test PCR avait été validé avec 60 échantillons d'espèces du genre *Pyrenophora* ; la fiabilité de ces amorces avait donc été validée via le test réalisé sur différents isolats de plusieurs espèces et de différentes origines.

5.3. La technique SSR(simple sequence repeats) : les SSR (simple sequence repeats), sont des catégories de répétitions en tandem (TRs), appelé microsatellites si leurs motifs sont court (1 à 10 nucléotides) ou minisatellites (>10 nucléotides) (Vieira *et al.*, 2016). On trouve les SSR largement distribués dans le génome des eucaryotes et procaryotes, et leurs taux de mutations élevés leur donnent une importance évolutive (Kashi *et al.*, 1997). La figure 12 montre la structure d'un motif SSR.

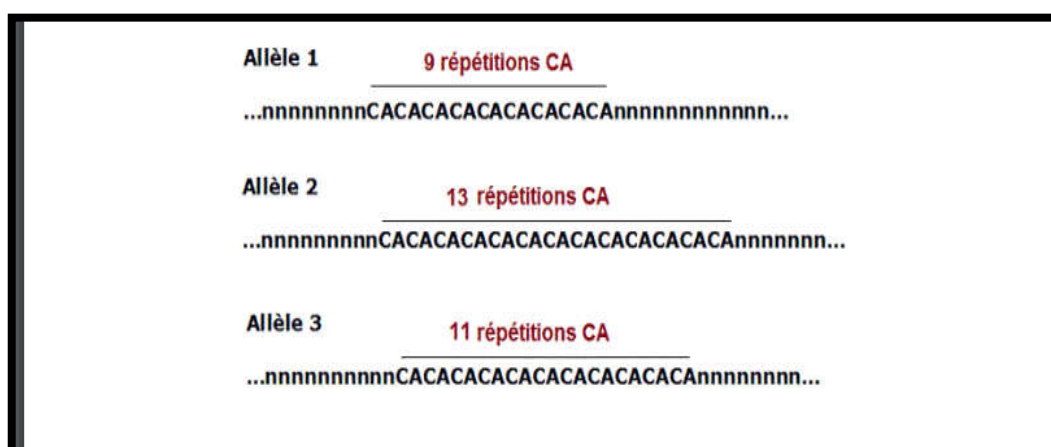


Figure 12 : Marqueur moléculaire de type SSR(www.takween.com)

Les SSR ont été les marqueurs les plus utilisés pour le génotypage les dernières années, parce qu'ils sont très informatifs, multi-allèles, qui sont expérimentalement reproductibles et transférables entre espèces apparentées, sont développés comme indiqué dans la figure 13.

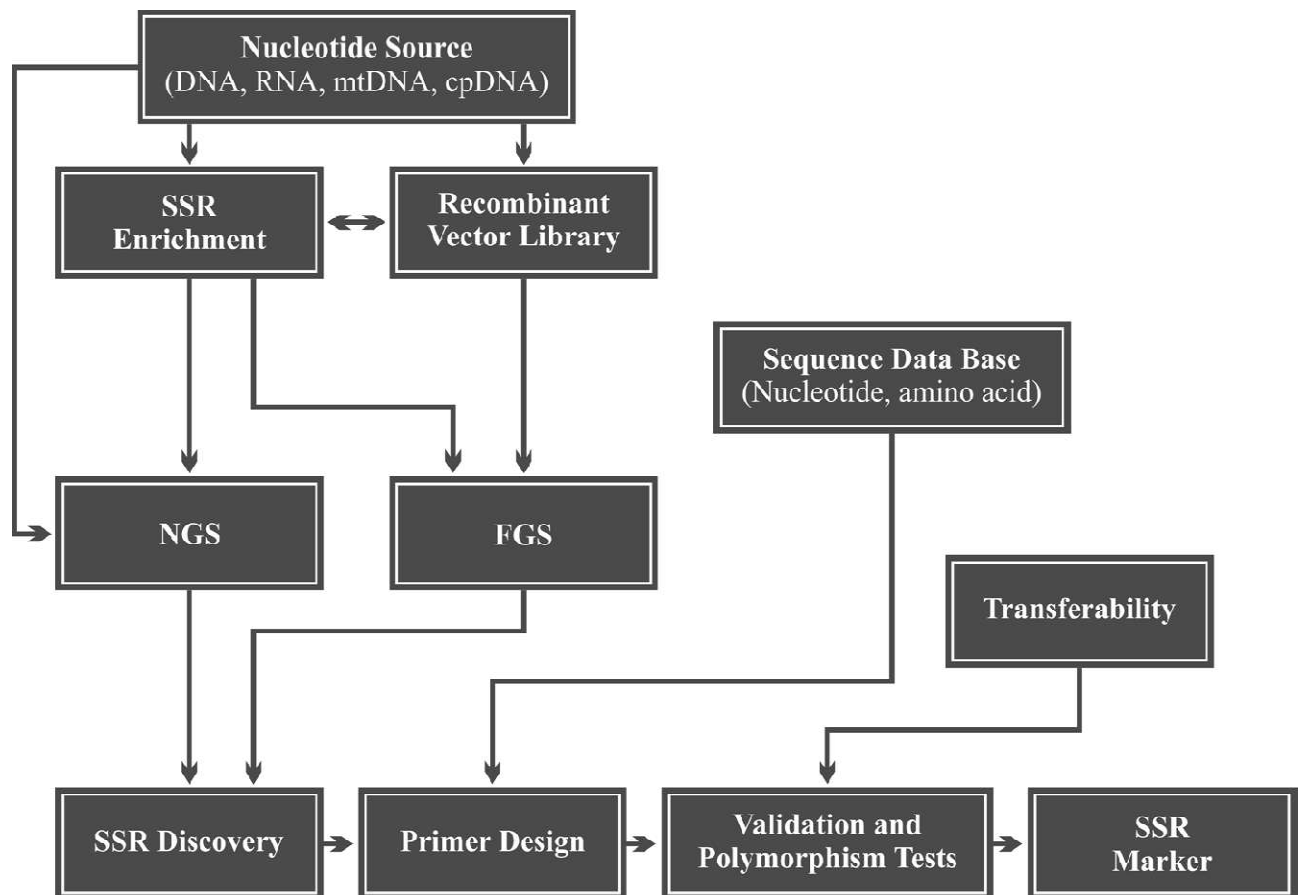


Figure 13 : Etapes du développement de marqueurs SSR (Vieira *et al.*, 2016)

Les SSR sont utiles dans les études de la diversité mesurée sur la base de la distance génétique pour estimer le flux de gènes et les taux de croisement et dans les études évolutives, surtout pour déduire les relations génétiques infraspécifiques (Mason, 2015). D'autre part, pour les plantes cultivées, les SSR sont couramment utilisés pour établir des cartes de liens, cartographier les *loci* impliqués dans les caractères quantitatifs (QTL), estimer le degré de parenté entre les génotypes, utiliser la sélection assistée par marqueurs et définir les empreintes génétiques des cultivars. Les SSR ont été particulièrement utiles pour générer des cartes intégrées pour les espèces végétales dans lesquelles les familles entières sont utilisées pour construire des cartes de liens et pour combiner les cartes génétiques, physiques et séquentielles, fournissant aux sélectionneurs et aux généticiens un outil pour relier les variations phénotypiques et génotypiques (Vieira *et al.*, 2016).

sont utiles pour les études sur la diversité génétique, la phylogénie, le marquage des gènes, la cartographie du génome et la biologie de l'évolution, la méthode de leur utilisation est détaillée dans la figure 15 (Reddy et al., 2002).

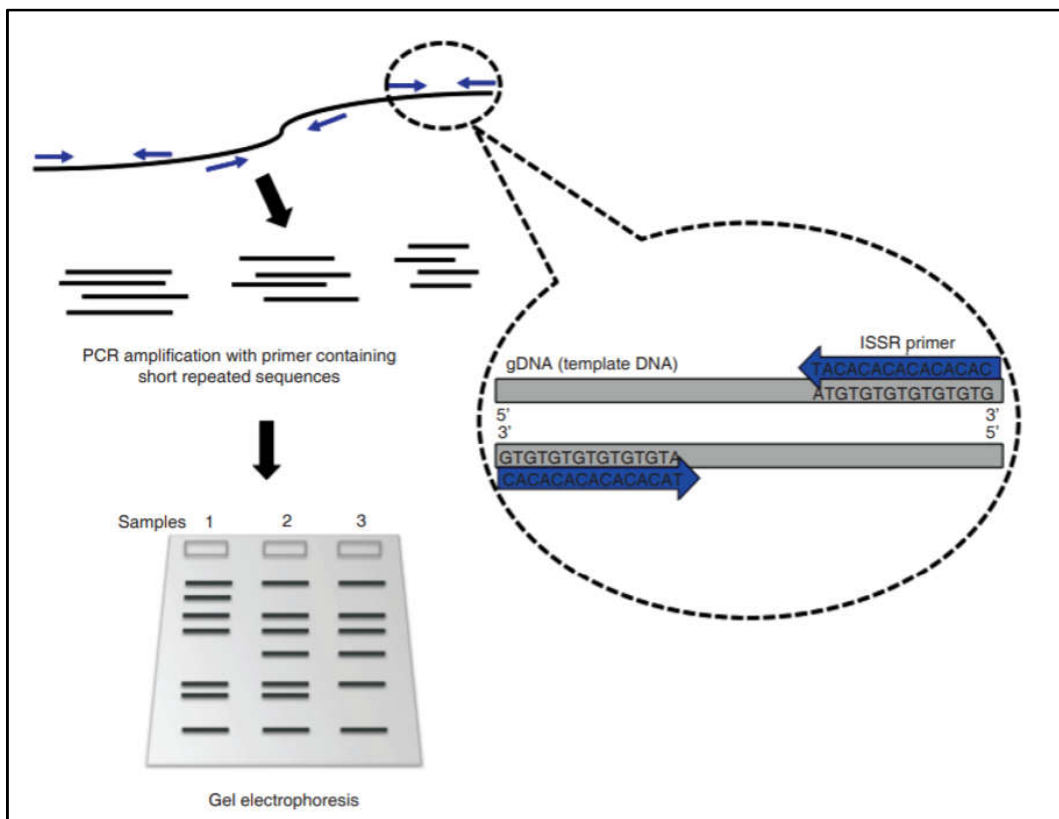


Figure 15 : Amplification par PCR utilisant les primers ISSR (Ng et Tan, 2016).

L'étude de Statkeviciute et al. (2010) est un très bon exemple de l'utilisation des ISSR pour démontrer la diversité génique de *P. teres*. 12 Amorces microsatellites ont été testées s pour l'analyse ISSR, deux parmi ces dernières ont été utilisées pour l'étude de la diversité génique. Les amorces G11 et UBC807 ont été sélectionnées comme étant les meilleurs, car elles amplifiaient 31 bandes au total dans la gamme de 500 à 2500 pb. Tous les isolats avaient des haplotypes ISSR uniques, indiquant que les deux populations de *P. teres* sont très hétérogènes.

Une étude plus récente a été menée par Oğuz et al. (2019) avec pour but d'évaluer la diversité génétique des isolats de *P. teres f. maculata* et de *P. teres f. teres* en Turquie en utilisant les marqueurs ISSR. 10 amorces ont été sélectionné pour cette étude, 7 ont donné des bandes optimales avec une intensité adéquate dans la gamme de 200 à 1400 pb. Le nombre d'haplotypes ISSR a varié entre 5 et 100 pour chaque Amorce. L'étude a permis de démontrer que le taux de similarité observée chez les isolats de *Ptm* était plus bas que celui de *Ptt* alors que, le taux de similarité observée entre les isolats collectés sur les orges sauvages a été faible (Oğuz et al., 2019).

6. Le séquençage :le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné et dont les technologies ont beaucoup évoluées ces dernières années. Nous traiterons dans ce qui suit la méthode de base développée par Sanger , puis le séquençage nouvelle génération.

6.1. Séquençage classique (méthode de Sanger):le séquençage est une technique d'analyse de l'ADN dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN; la lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci(Lamoril *et al.*,2008). Actuellement, la technique de séquençage repose majoritairement sur la méthode enzymatique de Sanger, dite "didésoxynucléosides triphosphate"(Lamoril *et al.*,2008).

Le principe de la technique de Sanger (Figure 16) selon Lamoril et al. (2008)est le suivant: Dans un premier temps, il est nécessaire d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié, une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce. La réaction enzymatique s'effectue en traitant en parallèle quatre tubes contenant chacune l'ADN inséré dans le vecteur, trois désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) non radioactifs, et un désoxyribonucléotides radioactif, et un didésoxyribonucléotides triphosphates(ddNTP) (analogue structurale d'un dNTP, mais ne possède pas de groupement OH en 3' ni en 2'). L'enzyme ajoute les (dNTP) complémentaires de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de manière aléatoire, et inconstante des (ddNTP).

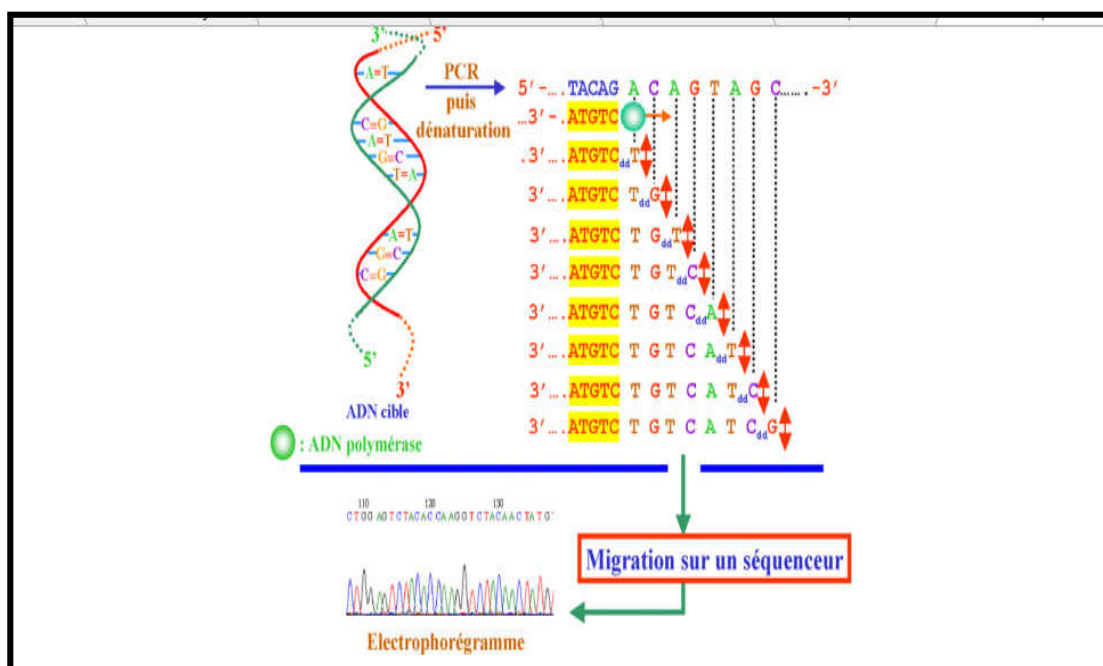


Figure 16: La méthode de séquençage de Sanger (Lamoril *et al.*,2008)

La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués à l'aide de fluorophores différents. Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation, la réaction d'extension s'arrête alors. À la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de tailles différentes, l'analyse de la réaction est ensuite effectuée. Ces fragments sont soumis à migration le plus souvent par une électrophorèse capillaire. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, un signal lumineux sera généré, spécifique de la base didéoxy incorporée. Les signaux lumineux sont analysés par un logiciel spécifique, les résultats d'analyse peuvent être lus sous forme d'un électrophorégramme. Des logiciels d'interprétation des séquences sont également disponibles pour confirmer un résultat (Lamoril *et al.*, 2008). En général, des séquences de 15 à environ 200 nucléotides provenant du site d'amorçage peuvent être déterminées avec une précision raisonnable en utilisant une seule amorce (Sanger *et al.*, 1977).

La méthode Sanger basée sur l'électrophorèse est actuellement la technologie de séquençage la plus populaire et a été la pierre angulaire du projet du génome humain. Avec cette technique il est devenu possible de séquencer non seulement des génomes complets, mais aussi des fragments de génomes, par exemple pour la vérification de clones ou pour la détection de mutations dans le génome (Ziebolz *et al.*, 2007).

Le séquençage classique a été utilisé dans l'analyse génétique et moléculaire de plusieurs pathogènes fongiques; un exemple de ces analyse est l'étude de Ruiz-Roldán *et al.* (2001) sur l'impact des voies MAPK-PTK1 sur le cycle de vie, chez *P. teres*. Pour cela, le gène PKT1 a été étudié par clonage et séquençage. A cet effet, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) avec des amorces dégénérées basées sur des régions conservées de MAPK connues, a été utilisée pour cloner le gène MAPK-PTK1 à partir du pathogène *P.teres*.

Quatre amorces dégénérées ont été conçues sur la base de régions d'acides aminés conservées parmi différentes MAPK. L'ADN génomique de *P.teres* a été amplifié par 2 PCR successives, ceci a généré un fragment PCR de 478 pb qui a été cloné dans le vecteur pCR 2.1-TOPO, le sous-clonage et d'autres procédures de routine ont été effectuées par des protocoles standards. Suite au séquençage, il a été possible de constater que le gène est présent dans le génome en une seule copie, la séquence d'acides aminés prédite a montré une homologie élevée avec MAPKs chez d'autres champignons phytopathogènes (Ruiz-Roldán *et al.*, 2001). Il a été démontré par une RT-PCR, que PTK1 est exprimée *in vitro* lors de la sporulation et de l'infection de l'orge. Son rôle dans le cycle de vie du pathogène a été confirmé par la méthode de « la disruption génique » ; des mutants porteurs d'une

copie du gène dont la séquence a été interrompue ont été générés. Ces derniers sont devenus incapables de sporuler et de former l'appressorium ; ils ont ainsi perdu leur habilité à infecter et coloniser les tissus de l'hôte (Ruiz-Roldán *et al.*, 2001).

Les auteurs ont démontré que les voies de transduction du signal de la protéine kinase MAPK activée par un mitogène PTK1 jouaient un rôle important dans la pathogenèse de *P. teres* sur l'orge. Ainsi, les MAPK s'est révélée être une protéine kinase qui jouait divers rôles dans les voies de transduction du signal cellulaire tels que l'osmorégulation, la biosynthèse de la paroi cellulaire, la croissance et la différenciation (Ruiz-Roldán *et al.*, 2001).

6.2. Séquençage nouvelle génération : le séquençage nouvelle génération (NGS), massivement parallèle, ou profond séquençage sont des termes apparentés qui décrivent une technologie de séquençage d'ADN qui a révolutionné la recherche génomique. En utilisant NGS, un génome humain entier peut être séquencé en une seule journée (Behjati et Tarpey, 2015). En effet les méthodes NGS sont hautement parallélisées, ce qui permet de séquencer des milliers à des millions de molécules simultanément (Raza et Sabahuddin, 2016).

Le principe de base sur lequel le NGS fonctionne est similaire aux méthodes de séquençage Sanger traditionnelles impliquant l'électrophorèse capillaire, mais la plupart du temps, différentes plates-formes NGS adoptent leur propre protocole spécifique (Raza *et al.*, 2016). Généralement, l'ADN double brin est considéré comme le matériau de départ, cependant, la source à partir de laquelle ce matériau est dérivé peut varier, les sources peuvent être de l'ADN génomique, de l'ADN immuno-précipité, de l'ARN transcrit en sens inverse ou de l'ADNc (Rizzo et Buck, 2012).

La prochaine étape implique la préparation d'une banque d'ADN en conséquence. Si l'ADN génomique a été envisagé à l'étape précédente, il doit être fragmenté en molécules d'ADN linéaires. Si l'ARN a été considéré à l'étape précédente par la transcription inverse, l'ADNc est obtenu pour la préparation de molécules d'ADN linéaires. De plus, la fragmentation de ces molécules d'ADN en fragments plus petits est impliquée avec des étapes de sélection de taille spécifique, qui servent à briser la matrice d'ADN considérée en fragments plus petits, mais séquençables en fonction de la plate-forme requise (Raza et Sabahuddin, 2016).

De plus, la ligature de l'adaptateur est également impliquée dans ce processus, qui ajoute des ADN synthétiques spécifiques à la plate-forme à la fin des fragments d'ADN présents dans cette banque pour faciliter les réactions de séquençage. Ainsi, la préparation de la base de données de séquences implique certaines étapes courantes de fragmentation, de sélection de taille et de ligature de l'adaptateur. L'étape suivante implique l'amplification de la base de données, pour produire un signal significatif pour l'ajout de nucléotides.

Cette étape implique, soit l'attachement du fragment d'ADN à la microbille, soit l'attachement de celui-ci à la lame de verre, lorsque certaines techniques de PCR sont suivies. L'amplification d'une banque d'ADN conduit finalement à la réaction de séquençage et au processus d'imagerie (Raza et Sabahuddin, 2016).

L'analyse des données NGS est une tâche complexe et cruciale, Pour ce faire il existe plusieurs outils disponibles qui peuvent être téléchargés sur une machine locale, ou utilisés sur le web (Raza et Sabahuddin, 2016). Une brève description du flux de travail pour NGS est illustrée dans la figure 17.

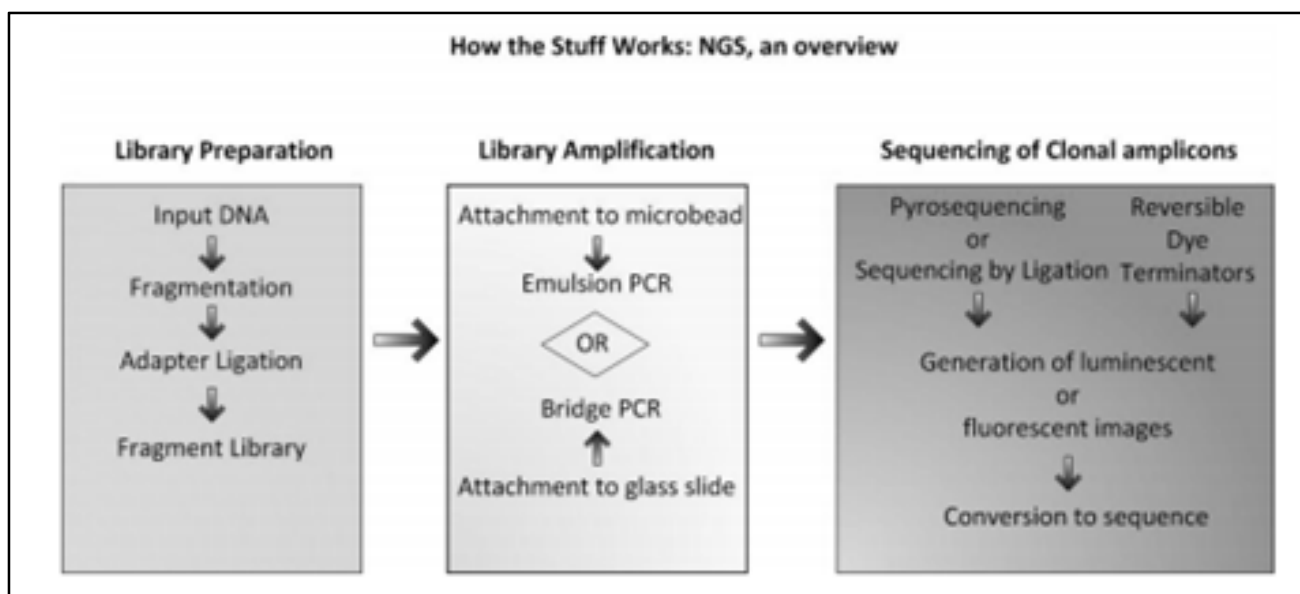


Figure 17 : Un aperçu du séquençage de nouvelle génération (Raza et Sabahuddin, 2016).

Le séquençage NGS est de plus en plus utilisé dans l'étude des populations pathogènes fongiques, notamment chez *P. teres*, tel que le montre les exemples de recherches rapportées dans ce qui suit et réalisées grâce à l'utilisation de cette technologie.

Dans une étude, un total de 5783 et 2373 *loci* uniques «Étiquettes de séquence», contenant 16 441 et 9992 SNP ont été identifiés et caractérisés à partir de populations de *P. teres f. maculata* et *Sphaerulina musiva*, nt. Les données générées à partir de *P. teres f. maculata* ont été utilisées dans l'analyse de cartographie d'associations, pour cartographier le gène MAT (mating type), responsable de la reproduction sexué (Jared *et al.*, 2015). Une carte génétique robuste contenant 1393 SNP sur 997 étiquettes de séquences, répartis sur 15 groupes de liaisons, a été générée pour *P. teres f. teres* (Jared *et al.*, 2015)

Par ailleurs, le premier assemblage du génome chez *P. teres* a été basé sur de courtes lectures de séquençage Solexa de l'isolat 0-1 (Elloowd *et al.*, 2010). L'assemblage total a permis de réunir 41,95 Mbp, qui représente 11 799 modèles de gènes (Elloowd *et al.*, 2010). Selon les auteurs, cette étude a

démontré aussi que le séquençage de Solexa à deux extrémités peut capturer avec succès les régions codantes d'un génome fongique filamentueux.

6.3. La technologie DArT (Diversity Array Technology) : la technologie DArT est une méthode à haut débit indépendante des séquences et capable de découvrir des centaines de marqueurs en une seule expérience, à l'aide de plateformes à haut débit, avec un faible coût par point de données (Huttner *et al.*, 2005).

Le développement de DArT commence par la définition d'un "métagénome", un groupe d'échantillons d'ADN représentatifs de l'espèce que l'on prévoit d'analyser avec cette technologie (Kilian *et al.*, 2012). Ce groupe d'échantillons correspond généralement au pool génétique primaire d'une espèce; toutes les matrices DArT sont développées en mettant l'accent sur la capture de la diversité allélique de l'organisme d'intérêt afin, de limiter le risque de biais de constatation (le biais introduit par l'utilisation de marqueurs développés à partir d'un petit échantillon des génotypes étudiés), le principe de la DArT est résumé dans la figure 18 (Kilian *et al.*, 2012).

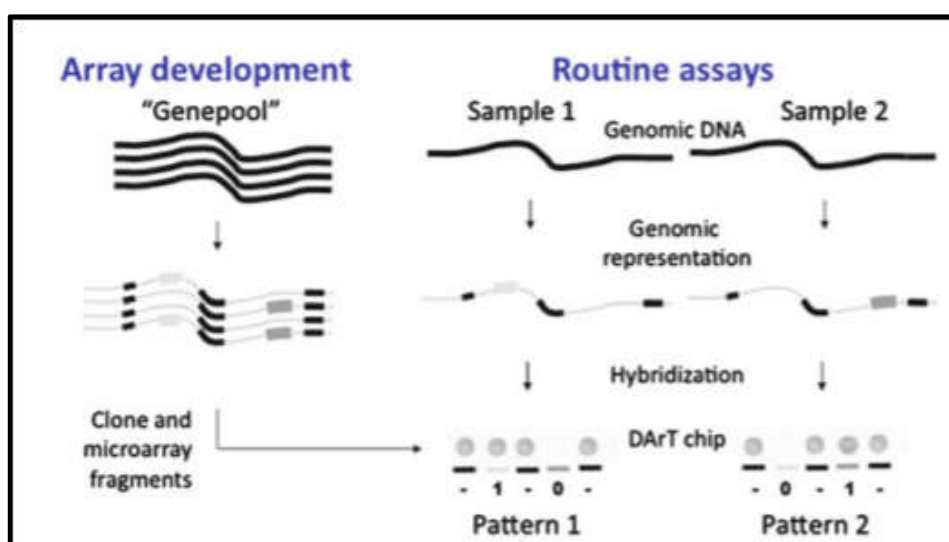


Figure 18 : Développement et utilisation d'une matrice DArT (Kilian *et al.*, 2012).

La plupart des tests DArT sont réalisés en hybridant des cibles (représentations génomiques marquées par fluorescence) dérivées d'échantillons spécifiques, à des matrices contenant une grande collection de sondes amplifiées à partir de clones bactériens d'une représentation du pool de gènes d'intérêt (Fig. 19). Chaque cible est hybridée avec un fragment d'ADN de référence à la puce, les lames sont lavées et scannées avec un système d'imagerie qui mesure l'intensité de la fluorescence des colorants utilisés dans le test (Kilian *et al.*, 2012).

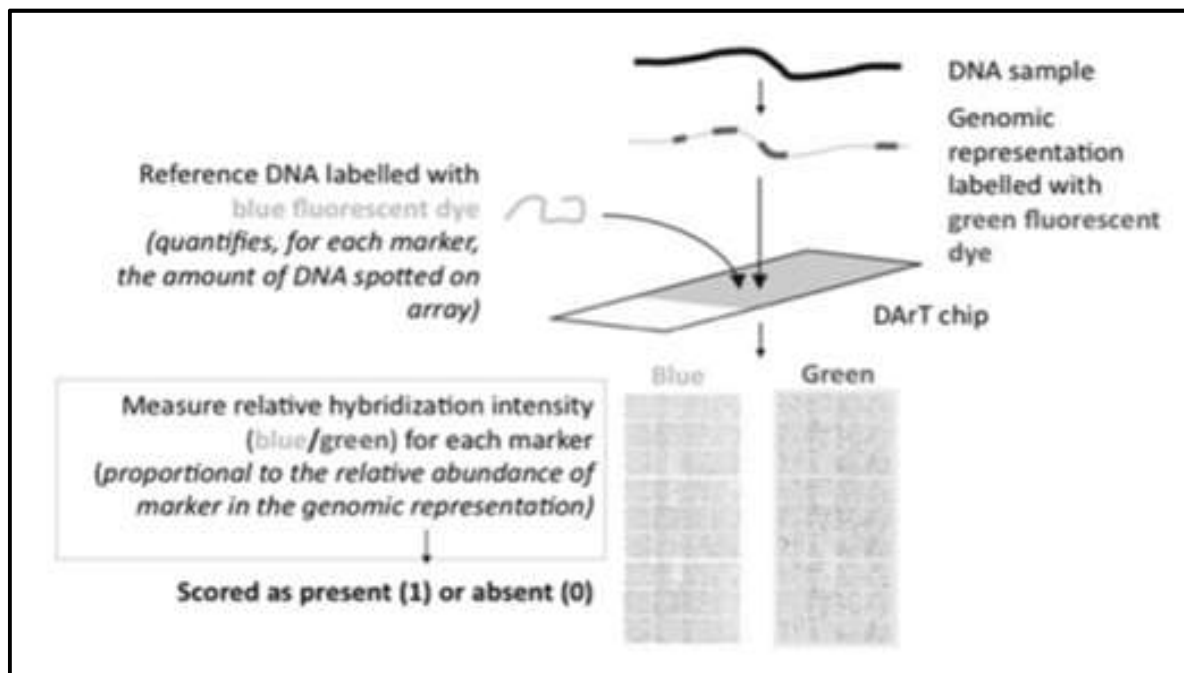


Figure 19 : Schéma représentatif d'un test DArT (Kilian *et al.*, 2012).

La DArT a été utilisée par Poudel *et al.* (2019) pour étudier la structure génétique de *P. teres*, en Australie. Les tests ont démontré que 25% des isolats étaient des clones de l'isolat inoculé, et 75% des isolats étaient des génotypes multilocus (MLG) différents du génotype inoculé original. L'évolution rapide de la composition génotypique de la population de *Ptt* révélée dans cette étude a suggéré le potentiel d'adaptation des nouveaux génotypes et a démontré la nécessité pour les sélectionneurs d'orge d'utiliser de multiples sources de résistance chez l'hôte pour se prémunir (Poudel *et al.*, 2019).

7. La cartographie optique: depuis la démonstration initiale de ce système chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la cartographie optique a été utilisée pour la reconstruction de plusieurs génomes allant des bactéries au génome humain (Mendelowitz *et al.*, 2014). Cette technologie s'est également avérée être un outil puissant pour la génomique comparative, permettant la détection de variantes structurales au sein des génomes (Mendelowitz *et al.*, 2014).

La cartographie de restriction optique est la plus établie des plates-formes de cartographie d'ADN à molécule unique (Neely *et al.*, 2010). L'ADN est immobilisé sur une surface fonctionnalisée puis recouvert d'une fine couche d'agarose pour piéger le plus d'ADN possible en surface. Une enzyme de restriction est ajoutée à l'échantillon et l'ADN est coupé spécifiquement au niveau des séquences cibles de six ou huit bases de longueur. L'ADN est ensuite coloré avec un colorant intercalant l'ADN (typiquement YOYO-1), imagé et analysé. L'identification de l'ADN des sites coupés et le dimensionnement des fragments peuvent être automatisés. L'alignement ultérieur des molécules individuelles et le raffinement de cartes optiques complètes sont effectués d'une manière similaire à

celle de l'assemblage de séquences d'ADN(Neely *et al.*,2010). Ces étapes sont illustrées dans la figure 20.

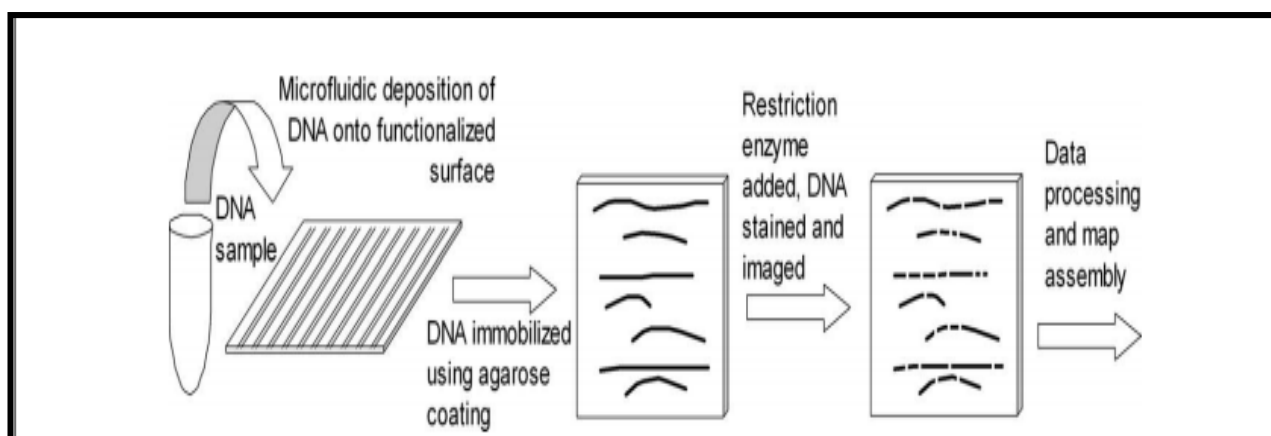


Figure 20: Représentation schématique des étapes nécessaires pour créer une carte optique (Neely *et al.*, 2010).

Il existe plusieurs types de plates-formes de cartographie optique d'ADN, mais toutes reposent sur la modification spécifique de la séquence (soit le clivage, soit le marquage fluorescent) de l'ADN sur des sites cibles courts, généralement de huit bases ou moins de longueur (Neely *et al.*,2010). Ceci est suivi par l'imagerie et l'analyse de l'ADN modifié de telle sorte que les distances entre les sites de coupe ou les fluorophores sont déterminés. Selon Neely et al. (2010), trois techniques enzymatiques existent pour modifier l'ADN au niveau de ces sites spécifiques ; ceci peut être possible en utilisant des enzymes de restriction pour cliver l'ADN de manière spécifique à la séquence qui est immobilisée sur une surface. Plus récemment, des enzymes de coupure ont trouvé une application dans le marquage fluorescent spécifique de la séquence de l'ADN. Une telle modification covalente permet d'imager l'ADN en solution et ceci en combinaison avec le développement nano-fluidique. Enfin, l'utilisation des enzymes méthyl-transférases pour marquer l'ADN avec une densité ultra-haute afin de cibler la modification est aussi possible. Chaque stratégie de modification de l'ADN, nécessite une approche expérimentale distincte pour permettre la génération d'une carte optique (Neely *et al.*,2010).

Des informations complémentaires sont dérivées du séquençage et de la cartographie optique (Figure21). La carte optique donne des informations sur la distance entre les sites séparés par plusieurs kilobases, qui peuvent être utilisées pour définir la taille et l'emplacement des lacunes dans l'assemblage génomique. La carte optique agit également comme un échafaudage pour l'assemblage génomique, permettant le positionnement et l'orientation corrects des contigs (séquences contiguës) (Neely *et al.*,2010).

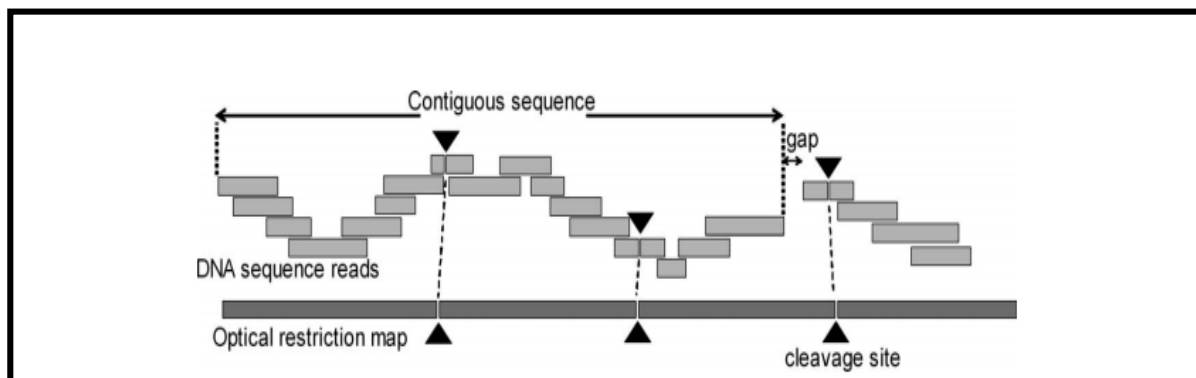


Figure21: Des informations complémentaires sont dérivées du séquençage et de la cartographie optique(Neely *et al.*,2010).

Ainsi, la technique de cartographie optique a été utilisée avec succès pour évaluer la qualité des assemblages génomiques et pour détecter des variantes structurales à grande échelle et des réarrangements qui ne peuvent pas être détectés en utilisant les protocoles de séquençage (Mendelowitz et Pop, 2014). Donc l'objectif primordial de la carte optique est de compléter l'informations dérivées du séquençage de l'ADN(Neely *et al.*, 2010).

Plus récemment, le développement de technologies nanofluidiques, permet de nouvelles approches de cartographie à haut débit, les algorithmes et les outils pour traiter les données de cartographies optiques (alignement et assemblage) , ont été utilisées pour identifier les variantes structurales et pour guider ou valider les assemblages du génome (Mendelowitz et Pop,2014).

Cette méthode a aussi été utilisée pour l'analyse de la structure des populations pathogènes de l'agent causal de la rayure réticulée de l'orge. L'ADN de taille mégabase d'un isolat de *P. tere f.teres* a été préparé pour la cartographie optique en adaptant un protocole pour l'obtention des protoplastes chez *P. teres* (Liu et Friesen, 2012). Le mycélium a été gratté de la surface d'un milieu V8-PDA et homogénéisé (Syme *et al.*, 2018), et pour préparer des blocs d'agarose, les protoplastes ont été combinés avec un volume égal d'agarose à 1,5% . L'enzyme de restriction (RE) KpnI a été choisie comme la plus appropriée pour créer une carte de restriction du génome entier sur la base de la taille et de la composition moyenne des fragments. Une méthode standard de l'électrophorèse en champ pulsé de type CHEF (Contour-clamped electric field) a aussi été utilisée. Une cartographie optique du génome entier de *novo* a été réalisée par OpGen. Le logiciel propriétaire Argus MapSolver™ v. 3.2.0 a été utilisé pour créer les contigs optiques(Syme *et al.*, 2018).

8. La bioinformatique : le Centre National d'Information sur les Biotechnologies (NCBI) définit la bioinformatique comme "le domaine scientifique dans lequel la biologie, l'informatique et les technologies de l'information fusionnent en une seule discipline".

8.1. Les banques de données utilisées: une base de données peut être définie comme un entrepôt informatisé et organisé d'informations connexes, qui fournit un moyen normalisé de recherche, d'insertion et de mise à jour des données (Khandelwal *et al.*, 2016). Dans sa forme la plus simple, la bioinformatique organise les données de manière à permettre aux chercheurs d'accéder aux informations existantes et de soumettre de nouvelles entrées au fur et à mesure qu'elles sont produites, avec pour but le développement de moyens d'analyses des données collectées (Luscombe , 2001).

Selon Khandelwal et al. (2016), les différentes bases de données utilisées généralement par les chercheurs sont organisé comme suit :

a. Générale: Entrez, PubMed et PubMed Central, Taxonomy, etProtein.

b. Séquences génétiques : Gene, GenBank, Unigene, Homologene, et Reference Sequences.

c. Analyses génomiques : Entrez Genome.

d. Analyses de l'expression génique : Gene Expression Omnibus, Online Mendelian Inheritance in Animals.

f. Protéomique et structures moléculaires : Structure Databases, Molecular Modeling Database, et PubChem.

Les différents outils de la bioinformatique ainsi que, les bases de données sont devenus indispensables dans plusieurs domaines ; leurs utilités respectives sont retrouvées dans plusieurs applications. Nous aborderons dans ce qui suit de façon succincte, trois domaines d'applications retrouvés, notamment dans les analyses de la structure des populations de *P. teres*.

8.2. Les comparaisons de séquences et l'identification de l'espèce: La comparaison des séquences d'ADN de différentes espèces est une méthode puissante pour décoder les informations génomiques, car les séquences fonctionnelles ont tendance à évoluer à un rythme plus lent que les séquences non fonctionnelles (Frazer *et al.*, 2003). En comparant les séquences génomiques d'espèces à différentes distances d'évolution, on peut identifier les séquences codantes et les séquences non codantes conservées ayant des fonctions régulatrices, et déterminer quelles sont les séquences uniques pour une espèce donnée (Frazer, 2003).

La comparaison de séquences nécessite au moins deux séquences d'ADN évolutives proches. Elle repose sur l'alignement des séquences ADN, pour rechercher des régions de similarité qui peuvent être

la conséquence de relations fonctionnelles, structurelles ou évolutives entre les séquences (Mount *et al.*, 2004). Les étapes de la génomique comparative sont détaillées dans la figure 22.

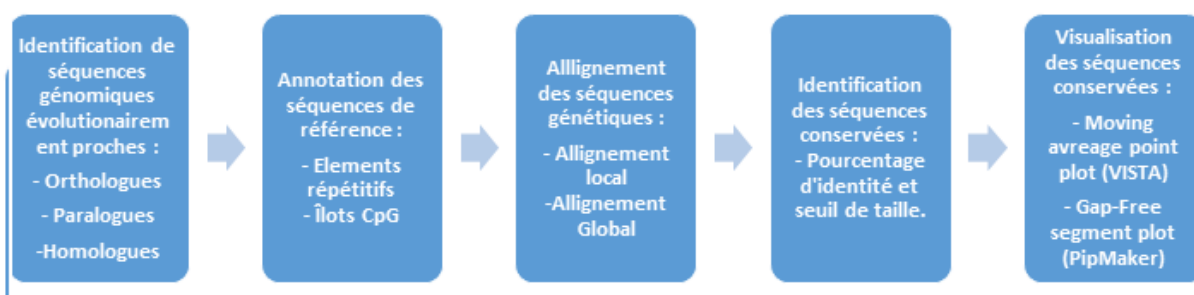


Figure 22 : Schéma représentant les étapes de la comparaison de séquences (Frazer, 2003).

Sierotzki *et al.* (2007), dans leur étude ont comparé les séquences ARN de deux espèces de *Pyrenophora*, *P. teres* et *P. tritici-repentis* dans le but d'étudier la mutation G143A qui confère des résistances aux fongicides Qoi (quinone outsid inhibitors). L'analyse a démontré que *P. tritici-repentis* est différent de *P. teres* ; un intron a été détecté chez *P. teres* directement après l'acide aminé 143, qui n'est pas présent chez *P. tritici-repentis*. Cette structure génétique suggère que la résistance basée sur la mutation G143A pourrait ne pas se produire chez *P. teres* car, elle est létale (Sierotzki *et al.*, 2007).

8.3. Prédiction de fonctions de gènes : les progrès de la biotechnologie permettent de réaliser des expériences à haut débit, qui fournissent des informations fonctionnelles diverses sur les produits des gènes à des coûts décroissants. La tâche principale est passée de la collecte de ces données à l'analyse des données à l'aide d'un schéma unifié de description fonctionnelle (Zhao *et al.*, 2020).

Les méthodes de prédiction de la fonction des gènes utilisent principalement la structure de l'ontologie des gènes (GO) et les caractéristiques biologiques (y compris les séquences de nucléotides/acides aminés, l'expression des gènes et les données d'interaction, etc) (Zhao *et al.*, 2020). Le protocole d'évaluation pour la prédiction de la fonction des gènes est généralement réalisé utilisant une méthode appelée « history to recent » qui tire parti des annotations GO précédemment archivées pour former un modèle et évaluer les prédictions du modèle en se référant à des annotations GO plus récentes (Zhao *et al.*, 2020).

Afin d'identifier des gènes effecteurs de virulence candidats chez *P. teres*, les outils de la bioinformatique sont indispensables dans l'étude de Martin *et al.* (2020). Pour se faire ils ont commencé par utiliser la technologie DArT pour séquencer le génome d'une population de *P. teres* leur permettant d'associer plus de 20 génotypes à des phénotypes de *P. teres* différents. La cartographie d'association a été utilisée pour ensuite identifier quatorze régions génomiques différentes associées à

la virulence; la majorité étant située sur les chromosomes 3 et 5 et une étant présente sur les chromosomes 1, 6 et 9. Ces données ont été utilisées pour réaliser une analyse du génome complet (Genome wide analysis) sur le logiciel TASSEL ainsi qu'une analyse du déséquilibre de liaison (linkage disequilibrium) en utilisant le logiciel STRUCTURE. Les travaux de cette étude ont permis d'identifier des gènes candidats et a permis de prédire 20 gènes comme étant potentiellement des gènes de virulence(Martin *et al.*, 2020).

8.4. Les études de phylogénie: la phylogénie est une reconstruction de l'histoire évolutive des êtres vivants (Lopez *et al.*, 2002). La phylogénie moléculaire a pour but de reconstruire les relations de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'acides aminés ; elle permet d'étudier les relations de parenté entre les espèces qui les portent et aussi l'évolution du génome (Lopez *et al.*, 2002).

Les résultats d'une analyse de phylogénie moléculaire sont généralement révélés sous forme d'arbre phylogénétique. Pour construire une arbre phylogénétique, il faut disposer de caractères comparables entre tous les objets (c'est-à-dire gènes ou espèces) que l'on veut analyser. Les objets analysés doivent être suffisamment similaires pour être comparés (Lopez *et al.*, 2002). Si c'est le cas, on dit de ces caractères qu'ils sont homologues et que la similitude observée est due au fait que les caractères sont issus d'un ancêtre commun et qu'ils se sont progressivement modifiés au fil des générations. Pour les séquences de protéines ou d'ADN, cette étape de comparaison est généralement celle de l'alignement à l'aide d'un programme informatique (Lopez *et al.*, 2002).

Pour l'étude de l'évolution de trois agents pathogènes fongiques des céréales, *Pyrenophora tritici-repentis*, agent de la tache bronzée sur le blé, *Pyrenophora teres f. teres* et *Pyrenophora teres f. maculata*, agents de la rayure réticulée sur l'orge, respectivement, l'analyse phylogénétique a été utilisée (Ellwood *et al.*, 2012). Des régions intergéniques orthologues ont été utilisées pour examiner les relations génétiques et les périodes de divergence entre ces agents pathogènes.

Les régions intergéniques ont montré un modèle cohérent de co-divergence de la formes de *P. teres* à partir de *P. tritici-repentis*(figure 23), avec un profil confirmé par l'analyse phylogénétique des gènes conservés. Les différences dans les temps de divergence calculés entre les régions inter-géniques, ont suggéré

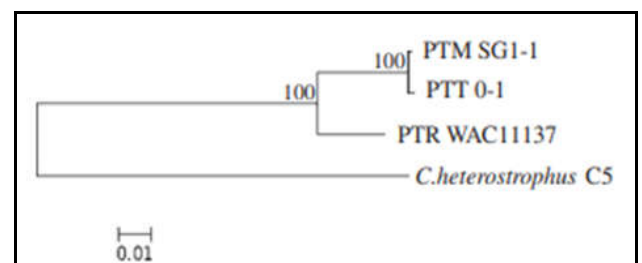


Figure 23 : Phylogramme entre *Ptm*, *Ptt* et *Ptr* avec *Cochliobolushetero strophus* comme outgroup(Ellwood *et al.*, 2012)

qu'elles n'étaient pas soumises à une sélection neutre ; un phénomène partagé avec les autres eucaryotes.

Les régions de *P tritic-repentis* ont montré un temps de divergence qui a varié entre 5 et 12 Millions d'années comparées à *P. terestandis* que la divergence entre *P. teres f. teres* et *P. teres f. maculata*, c'est produit à l'époque du Pléistocène moyen (Figure 24) (Ellwood *et al.*, 2012).

Les résultats ont suggéré qu'il n'y a pas de corrélation entre la divergence de ces pathogènes et la domestication du blé et de l'orge et ont montré que *P. teres f. teres* et *P. teres f. maculata* sont étroitement apparentés mais autonomes dans leur évolution (Ellwood *et al.*, 2012).

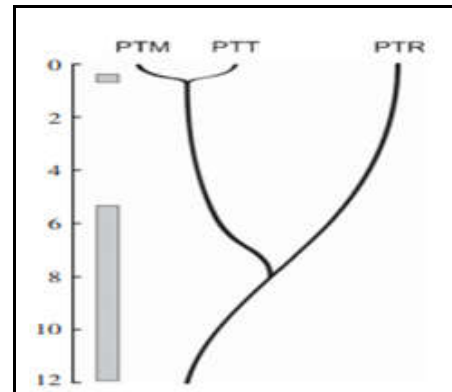


Figure 24: Modèle de divergence entre Ptm, Ptt, et Ptr (Ellwood *et al.*, 2012).

Conclusion

Au terme de la rétrospective réalisée et à travers laquelle nous nous sommes intéressés aux approches génétiques et moléculaires, poursuivies lors de l'étude de la structure des populations pathogènes de *Pyrenophorateres*, agent causal de la rayure réticulée de l'orge, il nous a été possible de constater l'intérêt et l'importance de ces méthodes.

En effet, elles se sont révélées très utiles pour l'étude du génome et l'identification des mating types, permettant de confirmer le mode de reproduction sexuée et son importance dans l'analyse de la diversité génétique de *P. teres*. Cette utilité est aussi évidente dans l'étude de la relation entre des composants du pouvoir pathogène et des régions du génome.

A cet effet, plusieurs techniques ont été utilisées, en particulier les marqueurs moléculaires basés sur la restriction enzymatique (RFLP), et d'autres basées sur l'amplification par PCR ; comme l'AFLP, la RAPD, les SSR, ISSR, les méthodes de séquençage, et les outils de la bioinformatique. Ces dernières, ont été développées pour l'alignement des séquences génomiques et ont été utilisées dans les études évolutives.

Ainsi, l'apparition des techniques de génétique moléculaire a permis de faire progresser nos connaissances sur la structure de ces populations. Il est maintenant possible d'évaluer avec plus de précision les aptitudes de l'agent pathogène, et de mieux apprécier le polymorphisme qui existe chez les populations qu'il compose. C'est un progrès important qui permettra de mieux gérer les gènes de résistance des plantes en fonction d'une évolution prévisible des populations pathogènes dans le temps et dans l'espace.

Cette étude bibliographique nous a permis de constater que les connaissances sur la structure de la population de cette espèce pathogène et l'évaluation de sa diversité, sont très importantes pour une meilleure gestion des cultures d'orge, ainsi que pour un programme de sélection des variétés d'orge résistantes à la maladie, et enfin pour élaborer des méthodes de lutte efficaces contre ce pathogène.

Références Bibliographiques

- Afanasenko, O. S., Makarova, I. G., and. Zubkovich, A. A, 1999. The number of genes controlling resistance to *Pyrenophorateres Drechs.* strains in barley. *Russian J. Genet*, 35: 274-283.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth edition. *Elsevier Academic Press*, San Diego, CA. 902p.
- Al-Daoude, A., Jawhar, M., Al-Shehadah, E., Shoaib, A., Orfi, M., and Arabi, M. I. E. 2018. Changes in Salicylic Acid Content and Pathogenesis - Related (PR2) Gene Expression during Barley - *Pyrenophorateres* Interaction. *Hellenic Plant Protection Journal*, 11: 71-77
- Akhavan, A., Kelly, T., Turkington, Berisso, Kebede, and Tekauz., Randy, H., Kutcher., Colleen., Kirkham., Kequan., Xi., Krishan., Kumar., James, R., Tucker., and Stephen, E., Strelkov. 2015. prevalence of mating type idiomorphs in *pyrenophorateres f. teres* and *p. teres f. maculata* populations from the canadian prairies. *canadian journal of plant pathology*. 37(1): 52-60
- Aouali, S., et Douici-Khalifi, A. 2013. Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie : symptômes, développement et moyens de lutte. ITGC, Alger, 836PP
- Aragona, M., Montigiani, M., and Porta-Puglia, A. 2000. Electrophoretic karyotypes of the phytopathogenic *Pyrenophora graminea* and *P. teres*. *Mycol. Res*, 104: 853-857.
- Bekkevold, D., M. I. Taylor, R. Ogden, M. T. Limborg, A. Cariani, G. E. Maes, E. Diopere, G., Carvalho, R., and Nielsen, E. E. 2011. Application of SNPs for Population Genetics of Non model Organisms: New Opportunities and Challenges: analytical approaches. *Molecular Ecology Resources*, 11: 123-136.
- Babu, K., Rajesh, K. R., Samsudeen, K., Minoo, D., Suraby, E. J., Anupama, K and Ritto, P. 2014. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived Techniques. *Methods in Molecular Biology*, 1115: 191-209.
- Bailey, K. L., Couture, L., Gossen, B. D., Gugel, R. K., et Morral, R. A. 2004. Rayures réticulées de l'orge. Dans *Maladies des grandes cultures au Canada*. 1ère éd. La Société Canadienne de Phytopathologie, Saskatoon. 37p.
- Baldwin, Bruce G., Michael, J., Sanderson, J., Porter, M., Martin, F., Wojciechowski, C., Campbell, S., and Michael, J., Donoghue. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82(2): 247-277.
- Barrault, G., 1982. Les symptômes et la biologie de *Helminthosporium teres*. *Perspectives agricole*, 28: 24-30.
- Barrault G. 1989. *L'Helminthosporiose. Perspectives agricoles*, 58: 28-29.

- Bates, J. A., Taylor, E. J. A., Kenyon, D. M., and Thomas, J. E. 2001. The Application of Real Time PCR to the identification, Detection and Quantification of *Pyrenophora* Species in Barley Seed. *Molecular Plant Pathology*, 2(1): 49–57
- Bates, J. A., and Taylor, E. J. A. 2001. Scorpion ARMS Primers for SNP Real Time PCR Detection and Quantification of *Pyrenophorateres*. *Molecular Plant Pathology*, 2(5): 275–80.
- Behjati, S., and Tarpey, P. S. 2013. What Is next Generation Sequencing? *Archives of Disease in Childhood Education Practice*, 98(6): 236–238.
- Bena, G., Jubier, M. F., Olivieri I., and Lejeune, B. 1998. Ribosomal External and Internal Transcribed Spacers: Combined Use in the Phylogenetic Analysis of *Medicago* (*Leguminosae*) *Journal of Molecular Evolution*, 46: 299–306
- Bendahmane, B. S. 1992. Contribution à la lutte chimique contre *Drechslerateres* (Sacc.) Shoem. agent de l'*helminthosporiose* de l'orge. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, France, 111p.
- Benmahammed, A. 2004. La production de l'orge et possibilités de développement en Algérie. *Céréaliculture*. ITGC El Harrach. 41: 34–38.
- Benslimane, H. 2016. Les Méthodes Moléculaires Pour La Caractérisation Des champignons Phytopathogènes. *European Scientific Journal*, 12: 234–241.
- Bogacki, P., Keiper J. F., and Oldach, K. 2010. Genetic Structure of South Australian *Pyrenophorateres* Populations as Revealed by Microsatellite Analyses. *Fungal Biology*, 114(10): 834–841.
- Bouajila, A., Zoghalmi, N., Murad, S., Baum, M., Ghorbel, A., Nazari, K. 2013. Genetic differentiation in *Pyrenophorateres f. teres* populations from Syria and Tunisia as assessed by AFLP markers. *Letters in Applied Microbiology*, 56: 389–400
- Bouzerzour, H. et Benmahammed, A. 1993. Environmental factors limiting barley yield in the high plateau of Eastern Algeria. *Rachis*, 12 (1): 14–19.
- Bouzian, H. 2015. L'orge en Algérie: passe, présent et importance pour la sécurité alimentaire, face aux nouveaux défis. *recherche agronomique*, (27): 19–56
- Bouzid, H. 1979. Généralité. Revue trimestrielle scientifique et technique d'information, Institut de développement des grandes cultures, Alger. 32 p.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169–193.
- Butte, A. J., Dzau, V. J., and Glueck, S. B. 2001. Further Defining Housekeeping, or Maintenance, Genes Focus on A Compendium of Gene Expression in Normal Human Tissues. *Physiol Genomics*, 7: 95–96

- Cakir, M., Gupta, S., Platz, G.J., Ablett, G.A., Loughman, R., Emebiri, L.C., et al. 2003. Mapping and validation of the genes for resistance to *Pyrenophorateres f. teres* in barley (*Hordeumvulgare*).*Australian Journal of Agricultural Research*,54: 1369-1377
- Carlsen, S A., Neupane,A., Nathan, A., Wyatt., Richards, J.K., Faris,J.D.,Xu, S.S., Brueggeman, R.S., Friesen, T. L .2017.Characterizing the *Pyrenophora teres f. maculata*–Barley interaction using pathogen genetics.*G3/Genes/Genomes/Genetics*,7:2615-2626
- Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermusaquaticus*. *journal of Bacteriology*, 127 (3): 1550–1557
- Daboussi, M.J., Langin, T., and Brygoo, Y. 1992. Fot1, a new family of fungal transposable elements. *Mol. Gen. Genet*, 232: 12–16.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., et Hellemans, J., 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 50: 227–230.
- De Vicente, M.C., Fulton T. 2003. Using Molecular Marker Technology inStudies on Plant Genetic Diversity Studies.ed. DeBOOCK, Italy,375P.
- Dilger, M ., Felsenstein, F. G., Schwarz, G. 2003 .Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophorateres* 270: 147–155. DOI 10.1007/s0043800309107
- Douiyssi, A., Rasmusson, D.C., Wilcoxson, R.D. 1996.Inheritance ofresistance to net blotch in barley in Morocco. *Plant Disease*,80:1269-1272.
- Durand-Tardif, M., et Pelletier, G. 2003. Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes. *Comptes Rendus Biologie*, 326 : 23–35.
- El Yousfi, B., Ezzahiri., B. 2001. Net blotch in semi-arid regions of Morocco I.*Epidemiology. Field Crops Research*, 73:35–46.
- Eisenberg ,E., Levanon ,E.Y. 2003.Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet*, 19(7): 362-365.
- Ellwood,S.R.,SymeR.A., Moffat C.S., Oliver R.P.2012. Evolution of three *Pyrenophora* cereal pathogens: Recent divergence, speciation and evolution of noncoding DNA .*FungalGenetics and Biology*,49 :825–829
- Ellwood, S.R, Liu,Z.,Syme,R.A ., Lai, Z ., Hane,J. K ., Keiper ,F., Moffat,C. S., Oliver, R .P.,andFriesen,T.L.2010. A First Genome Assembly of the Barley Fungal Pathogen *Pyrenophorateres f. teres*. *Genome Biology*,11 :R109.
- Ezzahiri, B.2001.Les maladies du blé : identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. *Bulletin de transfert de technologie en agriculture*. 77. 4P.

- Ficsor, A., Tóth, B., Varga, J., Tomcsányi, A., Mészáros, K., Kótai, É., and Bakonyi, J. 2014. Variability of *Pyrenophorateres f. teres* in Hungary as revealed by mating type and RAPD analysis. *Journal of Plant Pathology*, 96 (3): 515-523
- Fraser, J. A., and Heitman, J. 2003. Fungal Mating-Type Loci. *Current Biology*, 13(20): 792-795.
- Frazer, K. A. 2003. Cross-Species Sequence Comparisons: A Review of Methods and Available Resources. *Genome Research*, 13(1): 1-12.
- Friesen, T.L., Faris, J.D., Lai, Z., and Steffenson, B.J., 2006. Identification and chromosomal location of major genes for resistance to *Pyrenophorateres* in a doubled-haploid barley population. *Genome*, 49(7): 855-859,
- Graham, F. Campbell, John, A. Lucas., and Pedro, W. Crous. 2002. Evidence of recombination between net- and spot-type populations of *Pyrenophora teres* as determined by RAPD analysis. *Mycological*, 106 (5): 602-608
- Grandaubert, J., Lowe, R. G. T., Soyer, J. L., Schoch, C. L., Van de Wouw, A. P., Fudal, I., et al. 2014. Transposable element assisted evolution and adaptation to host plant within the *leptosphaeria maculans leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics*, 15:891. doi: 10.1186/1471216415891
- Graner, A., Foroughi-Wehr, B. and Tekauz, A. 1996. RFLP mapping of a gene in barley conferring resistance to net blotch (*Pyrenophorateres*). *Euphytica*, 91: 229-234
- Grivet, L. and Noyer, J.L. 2003. Biochemical and Molecular Markers. in: Genetic diversity of cultivated tropical plants. eds. De BOOCK, Montpellier, pp 43-76
- Gupta, S., Li, C. D., Loughman, R., Cakir, M., Platz, G., Westcott, S., Bradley, J., Broughton, S., Lance, R. 2010. Quantitative trait loci and epistatic interactions in barley conferring resistance to net type net blotch (*Pyrenophorateres f. teres*) isolates. *Plant Breeding*, 129: 362-368
- Gupta, S., Loughman, R., Platz, G.L. and Lance, R.C.M. 2003. Resistance in cultivated barleys to *Pyrenophorateres f. teres* and prospects of its utilization in marker identification and breeding. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54: 1379-1386.
- Habachi-Houimli, Y., Cherif, Y.M., Gharsallah, C., Sébéli, A., Makni, M., Bouktila, D. 2019. Expression Analysis of *Pyrenophora teres f. Maculata* Responsive Loci in *Hordeum Vulgare*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62:1-8
- Hafler, D. A., DeJager, P. L. 2005. Applying a new generation of genetic maps to understand human inflammatory disease. *nature reviews immunology*, 5: 83-91
- Helyar, S. J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M. I., Ogden, R., Limborg, M. T., Cariani, A. et al. 2003. Application of SNPs for Population Genetics of Nonmodel Organisms: New Opportunities and Challenges: analytical approaches. *Molecular Ecology Resources*, 11: 123-136.

- Han, X.,Xiong, Y, Zhao, C.,Xie, S.,Li, C., Li, X., Liu, X., Li, K., Zhao, S.,Ruan, J.,2019. Identification of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene as an Alternative Safe Harbor Locus in Pig Genome. *Genes* , 10(6):660.
- Ho, K.M., Tekauz, A., Choo, T.M., and Martin, R.A. 1996. Genetic studies on net blotch resistance in a barley cross. *Can. J. Plant Sci*, 76: 715–719.
- <https://www.généthon.fr/>
- <https://www.gnispedagogie.org/sujet/marqueursmoleculaires>.
- <http://www1.montpellier.inra.fr/biochimie/td/UB/TD/VMJ-taqman.pdf>
- <https://www.mycobank.org/>
- <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>
- Huttner, E., Wenzl, P.,Akbari, M.,Caig, V., Carling, J.,Cayla, C.,Evers ,M, et al. 2005. Diversity Arrays Technology: A Novel Tool for Harnessing the Genetic Potential of Orphan Crops.In:Discovery to Delivery: BioVision. Conference of The World Biological Forum, Egypt .2004.ed.CABI.pp.145-155
- Huybens, N.,Mainil,J.,Marlier,D.2009 .Les techniques de biologie moléculaire d’analyse des populations bactériennes complexes.*Ann. Méd. Vét*, 153: 112-128
- Jared,M., leboldus. , kinzer.k., richardsj., zhu ya.,changhui yan., timothy, l. friese., and brueggeman ,R. 2015. Genotype-by-sequencing of the plant-pathogenic fungi *pyrenophora teres* and *sphaerulina musiva* utilizing ion torrent sequence technology. *molecular plant pathology*.16(6):623-632
- Jonsson,R., Torbjörn, S. and Bryngelsson, T.2000.Genetic Diversity for Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Two Swedish Populations of *PyrenophoraTeres*.*Canadian Journal of Plant Pathology*,22(3): 258–264.
- Kainz, P. 2000.The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations. *Biochim. Biophys. Acta*,1494: 23-27
- Kashi, Y., King,D., and Soller,M.1997 .Simple Sequence Repeats as a Source of Quantitative Genetic Variation. *Trends in Genetics*,13(2) :74–78.
- Khandelwal I., Sharma A., Agrawal P., and Shrivastava R. Eds. 2016.Bioinformatics Database Resources.
- Kianianmomeni, A., Schwarz G., Friedrich, G .,Felsenstein., and Wenzel,G.2007.Validation of a real-time PCR for the quantitative estimation of a G143A mutation in the cytochrome bcl gene of *Pyrenophorateres*. Society of Chemical Industry. *Pest ManagSci*,63:1526–498· doi: 10.1002/ps.1290.

- Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., Caig, V., et al. 2012. Diversity Arrays Technology: A Generic Genome Profiling Technology on Open Platforms. In Data Production and Analysis in Population Genomics, in Pompanon, F. and Bonin, A. 2012. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 888: 67–89.
- Kinzer, K.M.D. 2015. Characterizing *Pyrenophora teres f. maculata* in the northern United States and impact of spot form net blotch on yield of barley. p. 89–107. p. 181
- Kuzdraliński, A., Kot, A., Szczerba, H., Nowak, M., and Muszyńska, M. 2017. A Review of Conventional PCR Assays for the Detection of Selected Phytopathogens of Wheat. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27 (3): 175–189.
- Kronstad, J. W., Staben, C. Mating type in filamentous fungi. *Annu. Rev. Genet.* 31: 245–276
- Lacroix, M., 2002. Maladies des céréales et de la luzerne. 26P
- Lafontaine, D.L.J., Tollervey, D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(7): 514–520.
- Lahmar, A., Zerbita, O., Djallel, E. 2015. Identification des différentes maladies cryptogamiques rencontrées chez les céréales durant la campagne agricole dans la région de Constantine, 102 : 22–23.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarène, P. and Bogard, M. 2008. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immunoanalyse et Biologie Spécialisée*, 23(5) : 260–279.
- Leboldus, J.M., Kinzer, K., Richards, J., Ya, Z., Yan, C., Friesen, T.L., and Brueggeman, R. 2015. Genotype by Sequencing of the Plant Pathogenic Fungi *Pyrenophora teres* and *Sphaerulina musiva* Utilizing Ion Torrent Sequence Technology: Genotype by Sequencing of Pathogenic Fungi. *Molecular Plant Pathology*, 16(6): 623–632.
- Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L. and Ovesna, J. 2005. AFLP-based PCR markers that differentiate spot and Net forms of *Pyrenophora teres*. *Seed Pathol*, 54: 66–73.
- Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L., and Ovesna, J. 2006. Quantification of *Pyrenophora teres* in Infected Barley Leaves Using Real-Time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3): 446–455.
- Lepoivre, P. 2003. Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire. In Phytopathologie. (Ed.), De Boeck Univ, Bruxelles. pp. 161–191
- Lehmensiek, A., Bester-van der Merwe, A.E., Sutherland, M.W., Platz, G., Kriel, W.M., Potgieter, G.F. and Prins, R. (2010), Population structure of South African and Australian *Pyrenophora teres* isolates. *Plant Pathology*, 59: 504–515.
- Linde, C.C., and Leon, M.S. 2019. Host Specialisation and Disparate Evolution of *Pyrenophora teres f. teres* on Barley and Barley Grass. *BMC Evolutionary Biology*, 19: 139.

- Lindhout, P. 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, 124: 217–226
- Liu, Z., Holmes, D.J., Faris, J.D., Chao, S., Brueggeman, R.S., Edwards, M.C. 2015. Necrotrophic effector triggered susceptibility (NETS) underlies the barley–*Pyrenophorateres f. teres* interaction specific to chromosome 6H. *Mol Plant Pathol.*, 16(2) :188–200.
- Liu, Z. H., and Friesen, T.L. 2010. Identification of *Pyrenophorateres f. Maculata*, Causal Agent of Spot Type Net Blotch of Barley in North Dakota. *Plant Disease*, 94(4): 480–480.
- Liu, Z., Ellwood, S.R., Oliver, R. P., and Friesen, T. L. 2011. *Pyrenophorateres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 12 (1) :1–19.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.*, 63: 39-98.
- Lourd, M. 1995. Diversité génétique des populations de parasites des plantes : structure des populations et analyse de la diversité. In: Modélisation en protection des cultures. Symposium du Séminaire International, Montpellier, 1995, ed. ORSTOM, Paris, pp 171-186
- Lopez, P., Casane, D., et Philippe, H. 2002. Phylogénie et évolution moléculaires-Bio-informatique (5). *médecine/sciences*, 18(11), 1146-1154
- Lu, S., Platz, G. J., Edwards, M. C., et Friesen, T. L. 2010. Mating type locus-specific polymerase chain reaction markers for differentiation of *Pyrenophora teres f. teres* and *P. teres f. maculata*, the causal agents of barley net blotch. *Phytopathology*, 100:1298-1306.
- Luscombe, N. M., 2001. Qu'est-ce que la bioinformatique? Une proposition de définition et un aperçu du domaine. *Greenbaum. Methods of Information in Medicine* 40(4) : 346–358.
- Malki, M., Hamadache, A. 2002. Pratique céréalière et savoir traditionnel en Algérie : analyse du proverbe populaire relatif à la pratique céréalière à la lumière des sciences agronomiques modernes. I.T.G.C. 65 p.
- Manninen, O., Jalli M., Kalender, R., Schulman, A., Afanasenko, O., and Robinson, J. 2006: Mapping of major spot type and net type net blotch resistance genes in the Ethiopian barley line CI9819. *Genome*, 49:1564-1571.
- Martell, M. Gomez, J., Esteban, J. I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R. and Guardia, J. 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 327-332.
- Martin, A., Moolhuijzen, P., Tao, Y., McIlroy, J., Simon, R., Ellwood, S., Fowler, R.A., Greg, J., Platz, G., Kilian, A., and Snyman, L. 2020. Genomic Regions Associated with Virulence in *Pyrenophora teres f. teres* Identified by Genome Wide Association Analysis and Biparental Mapping. *Phytopathology*, 110(4) :1–55.

- Marshall, J.M., Kinzer, K., Brueggeman, R.S., 2015. First report of *Pyrenophora teres* f. *maculata* the cause of spot form net blotch of barley in Idaho. *Plant Dis*, 99:18-60.
- Mason, A.S. 2015. SSR Genotyping. In: Batley J (ed) Plant Genotyping. Springer, New York, NY, pp 77-89.
- McDonald, B.A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349-379
- McDonald, W.C. 1967. Variability and the inheritance of morphological mutants in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*, 57: 747-755.
- McLean, MS., Howlett, B.J., Hollaway, G.J. 2009. Epidemiology and control of spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) of barley: a review. *Crop Pasture Sci*, 60(5):46-99.
- Mendelowitz, L., and Pop, M. 2014. Computational Methods for Optical Mapping. *GigaScience* 3(1): 3- 33.
- Milaire, H. 1995. à propos de quelques définitions. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, 474 : 7-9
- Molnar, S. J., James L. E, and Kasha K. J. 2000. Inheritance and RAPD Tagging of Multiple Genes for Resistance to Net Blotch in Barley. *genome*. 43(2): 224-231
- Moore, D., Frazer, L. 2002. Essential Fungal Genetics. ed. DeBOOCK, USA, 370P.
- Mount, D.M. 2004. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Morvan, Y. 2006. Les maladies fongiques de l'orge *Helminthosporiose* de l'orge (*Drechslera teres* = *Helminthosporium teres* = *Pyrenophora teres*). <http://www.terrenet.fr/observatoiretechniqueculturelle/fichesmaladie/article/maladieorgehelminthosporiose97732803.html>.
- Nasraoui, B. 2006. Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, systématique, pathologie, maladies. Ed. Centre de publication universitaire. 456p.
- Nasraoui, B. 2015. Les champignons et pseudo champignons pathogènes des plantes Biologie, Nouvelle Systématique, Interaction Pathologique. 180p.
- Najimi, B., El Jaafari, S., Jlibène, M., Jacquemin, J. 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 7 (1): 17-35
- Neely, R.K., Deen, J., and Hofkens, J. 2011. Optical Mapping of DNA: Single Molecule Based Methods for Mapping Genomes. *Biopolymers* 95: 298-311.
- Ng, W.N., and Tan, S.G. 2015. Inter- Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*, 9: 30-39.

- Novakazi,F., Afanasenko, O., Anisimova,A., Platz, G.J., Snowdon, R., Kovaleva,O., Zubkovich A., and Ordon, F. 2019.Genetic Analysis of a Worldwide Barley Collection for Resistance to Net Form of Net Blotch Disease (*PyrenophoraTeres f. teres*). *Theoretical and Applied Genetics*,132 (9) :2633–2650.
- Oğuz, A. Ç., Ölmez, F., et Karakaya, A. 2019. Genetic Diversity of Net Blotch Pathogens of Barley in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*,21(5):1089-1096
- Poitras, E., et Alain, H. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications . *Biology and Biotechnology (Canada)*, 2(2): 2-11
- Poudel, B., N. Vaghefi, M. S. McLean, G. J. Platz, M. W. Sutherland, and A. Martin.2019.Genetic Structure of a *Pyrenophorateres f. teres* Population over Time in an Australian Barley Field as Revealed by Diversity Arrays Technology Markers.*Plant Pathology* 68(7) :1331–1336.
- Powell, L. M.,et al.1987.A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine.*Cell* ,50(6):831-840
- Rafalski, A. 2002.Applications of Single Nucleotide Polymorphisms in Crop Genetics. *Current Opinion in Plant Biology*,5(2): 94–100.
- Rasmussen, H.B.2012. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR Amplified Fragments(PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis– Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting18-21.doi: 10.5772/37724
- Rau, D., Attene, G., Brown, A.H.D., Nanni, L., Maier, F.J., Balmas, V., Saba, E., Schäfer, W. and Papa, R.2007. Phylogeny and evolution of matingtype genes from *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley “net blotch” disease. *Current Genetics*, 51: 377–392.
- Rau, D. ,Maier F. J. , Papa R. , Brown A. H. D., Balmas V., Saba E. , .Schaefer W. , and Attene, G. 2005. Isolation and characterization of the matingtype locus of the barley pathogen *Pyrenophorateres* and frequencies of matingtypeidiomorphs within and among fungal populations collected from barley landraces.*Genome*, 48(5): 855–869
- Raza, K., and Sabahuddin, A .2016.principle, analysis, application and challenges of next generation sequencing:a review.30P
- Rebouças, E,L., Costa, J.J.N.,Passos, M.J, Passos JRS., Hurk, R.V.D, Silva, J.R.V.2013.Real Time PCR and Importance of Housekeepings Genes for Normalization and Quantification of MRNA Expression in Different Tissues.*Brazilian Archives of Biology and Technology* ,56(1):143–154.
- Reddy, M.P., Sarla,N, and Siddiq,E .A.2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism and Its Application in Plant Breeding,n *Euphytica*,128:9-17

- Rizzo, J.M., Buck, M.J. 2012. Key Principles and Clinical Applications of "Next-Generation DNA Sequencing; *Cancer Prev Res (Phila)*,5(7):887-900.
- Rozanova, I .V.,Lashina, N.M., Mustafin, Z. S., Gorobets, S .A., Efimov, V. M., Afanasenko O,S and Khlestkina, E.K.2019. SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophorateres f. teres*. . *BMC Genomics* ,20(3):292
- Ruiz-Roldán, M.C., Frank,J.,Maier and Wilhelm Schäfer. 2001.PTK , a MitogenActivatedProtein Kinase Gene, Is Required for Conidiation, *Appressorium* Formation, and Pathogenicity of *Pyrenophorateres* on Barley. *Molecular PlantMicrobe Interactions* 14(2) :25-116.
- Rychlik,W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E .1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro *Nucleic Acids Res*, 18 (21): 6409–6412.
- Saiki, R.,Gelfand, D.,Stoffel, S.,Scharf, S.,Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K.,Erich, H. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 :487–491.
- Saker, M.2005.A biological and molecular characterization of some egyptian barley genotypes which are resistant to net blotch disease.*cell Mol boil let*,10(2).80-265
- Samad, A., Huff,E.F.,Cai,W and Schwartz,D. C.1995. Optical Mapping: A Novel, SingleMolecule Approach to Genomic Analysis. *Genome Research* ,5(1): 1–4.
- Sambrook,J.F.and. Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A laboratory .3ed.De Boock,USA,154P .
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977.DNA Sequencing with ChainTerminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12): 5463–5467.
- Santoni, S., Faivre-Rampant, P., Prado, E., Prat, D.2000. Marqueurs moléculaires pour l’analyse des ressources génétiques et l’amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 17(9) : 31-127
- Sarkar, G., Kapelner, S., Sommer, S.S. 1990.Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res*, 18:65-74
- Sayoud, R., et Benbelkacem, K., 1996. Situation des maladies des céréales en Algérie. In : Proceeding du Symposium Régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires, 1114 Nov 1996, Rabat (Maroc), pp 69-70
- Schiff, C.L., Wilson, I.W. and Somerville, S.C. 2001. Polygenic powdery mildew disease resistance in *Arabidopsis thaliana*: quantitative trait analysis of the accession Warschau1. *Plant Pathology*,50: 69-70.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G .2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*,30(12): 57–57.

- Senthil, N.K., Gurusubramanian, G., .2011.Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers and Its Applications. *Science Vision*,11 (3) : 116-124
- Serenius, M.,Mironenko,N., and Manninen,O.2005.Genetic Variation, Occurrence of Mating Types and Different Forms of *Pyrenophorateres* Causing Net Blotch of Barley in Finland. *Mycological Research* 109(7): 809–17.
- Shipton, W.A., Khan ,T.N. and Boyd W.J.R. 1973.Net blotch of barley. *Plant Pathology*, 52: 269–290
- Sierotzki, H., Frey, R, Wullschleger, J, ., Palermo, S.,Karlin, S,Godwin, J, and Gis,H.2007.Cytochrome b Gene Sequence and Structure of *Pyrenophorateres* and *P. triticirepentis* and Implications for QoI Resistance. *Pest Management Science*, 633(3) : 225–233.
- Smith, P.J.2005. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Stock Identification Methods*, 371–387
- Statkeviciute, G.,Brazauskas, G.,Semaskiene,R, Leistrumaite, A and Dabkevičius Z.2010.*Pyrenophora Teres* Genetic Diversity as Detected by ISSR Analysis.*Zemdirbyste*,97 :91–98.
- Steffenson J., Hayes P. and kleinhofs A., 1996. Genetics of seedlings and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophorateres f. teres*) and spot blotch (*Cochliobolussativus*) barley.*Theoretical and Applied Genetics*,92: 552-558.
- Stenesh J. 1989.dictionary of biochemistry andmolecularbiology.2ed.De BOOCK,Canada.533P.
- Stevens EA, Blakemore EJA, Reeves JC. 1998. Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora spp.* based on sequences of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1111stevens>.
- Sumida, M., Kato Y, and Kurabayashi, A.2004.Sequencing and Analysis of the Internal Transcribed Spacers (ITSs) and Coding Regions in the EcoR I Fragment of the Ribosomal DNA of the Japanese Pond Frog *RanaNigromaculata*. *Genes et Genetic Systems* ,79(2) : 105–18.
- Sun Y., HegamyG., Colburn N.H. 1993.PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun., *Biotechniques*,15 :372-374
- Syme, R.A.,Martin,A., Wyatt,N. A., Julie,A.,Lawrence.,Gonzalez,M. J., Timothy., Friesen., and Ellwood,S.R. 2018. Transposable element genomic fissuring in *pyrenophorateres* is associated with genome expansion and dynamics of host–pathogen genetic interactions. *frontiers in genetics*, 9 :1-15
- Tevfik,D. 2006. Real-Time PCR.ed.De BOOCK,London,333P

- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T.W and Sawa, A. 2011. The Diverse Functions of GAPDH: Views from Different Subcellular Compartments. *Cellular Signalling*, 23(2): 317–323.
- Verscheure, M., Lognay, G. et Marlier, M. 2002.: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Revue bibliographique. B.A.S.E*, 6 : 131-142.
- Vieira, C.M.L., Santini, L., Diniz, A.L., and de Freitas, C. Munhoz. 2016. Microsatellite Markers: What They Mean and Why They Are so Useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3): 312-328
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., et al. 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21) : 4407–4414.
- Walker, J. M and Rapley, R. 2000. Molecular Biology and Biotechnology. ed. DeBOOCK, chapitre 2. p30-32. 592p
- Weiland, J. J., Steffenson, B.J., Cartwright, R. D., and Webster, R.K. 1998. Identification of Molecular Genetic Markers in *Pyrenophorateres f. teres* Associated with Low Virulence on Harbin Barley. *Phytopathology*, 89(2) : 176–181..
- Weitz, H.G., Köhler, W., and Leonard, K. 1993. Isozyme variation within and among pathogenic races of *Cochliobolus carbonum* on Corn in North California. *Molecular Ecology. Phytopathology*, 84: 31-38
- Williams, K.J., Smyl, C., Lichon, A., Wong, K.Y., Wallwork, H. 2001. Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australas Plant Pathol*, 30:37–44
- Williams, R. C. 1989. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). *yearbook of physical anthropology*. 32:159-184
- Wonneberger, R. 2017. Resistance studies and genetic characterization of the barley – *Pyrenophora teres*. these de doctorat, Norwegian University. 210P
- Wu, H. L., Steffenson, B.J., Li Y., Oleson, A.E., and Zhong, S. 2003. Genetic variation for virulence and RFLP markers in *Pyrenophora teres*. *Can J Plant Pathol*, 25:82–90
- Xu J. 2010. Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analysis. *Curr. Issues Mol.* 8: 75-90.
- Zahour A. 1992. Elément d'amélioration génétique des plantes. Manuel scientifique et technique. Actes. Ed. Rabat, Maroc, 223p
- Zhang, Guojuan., and Mary, L., Berbee. 2001. *Pyrenophora* Phylogenetics Inferred from ITS and Glycerate dehydrogenase Gene Sequences. *Mycologia*, 93(6): 10-48.

- Zhao, Y., Wang, J., Chen, J., Zhang, X., Guo, M., & Yu, G. 2020. A Literature Review of Gene Function Prediction by Modeling Gene Ontology. *Frontiers in Genetics*, 11 : 400.
- Zhong, Hua, and Jonathan W. Simons.1999.Direct Comparison of GAPDH, β Actin, Cyclophilin, and 28S RRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia.”*Biochemical and Biophysical Research Communications* ,259(3) : 523–526.
- Ziebolz.,Burkhard, and Marcus Droege. 2007. Toward a New Era in Sequencing. *Biotechnology Annual Review*, 13:1–26.

ملخص

يعتبر الفطر *Pyrenophora teres* المسبب لمرض التبقع الشبكي للشعير الذي يكون مجموعات فطرية ممرضة شديدة التنوع مما يزيد من خطورتها. يمكن أن يكون لبنية و ديناميكية هاته المجموعات تأثير كبير على تطور المرض، لهذا السبب تعتبر دراستها مهمة جدا. تم التطرق في خلال هته الأطروحة للأساليب الوراثية والجزيئية التي تركز على استعمال مختلف التقنيات لفحص الحمض النوويADN لغرض دراسة تركيبة المجموعة الممرضة لهذا الفطر. الجزء الأول يصف الفطر من الجانب الشكلي و التصنيفي بالإضافة إلى بعض الجوانب المتعلقة بالمرض الذي يسببه. يليه الجزء الخاص بميادين البحوث حيث طبقت الأساليب الوراثية و الجزيئية التي سمحت بتحديد الأنواع ، دراسة الجينوم، تحديد نمط التزاوج وتحليل التنوع الجيني. وفي النهاية تطرق القسم الأخير الى مختلف التقنيات الجزيئية المستخدمة في دراسة المجموعات الممرضة ، كما تم النظر بإيجاز في مساهمة المعلوماتية الحيوية ،في تحليل بنية المجموعات الممرضة.

Résumé

Pyrenophora teres est un champignon pathogène qui cause la rayure réticulée de l'orge. La diversité observée dans les populations de ce pathogène est considérée comme redoutable. La structure des populations et leur dynamique peuvent avoir une grande influence sur le développement de la maladie, d'ou' l'importance de son étude. Les approches génétiques et moléculaires, qui représentent l'utilisation des différentes techniques mises au point pour analyser l'ADN dans le but d'étudier la structure des populations pathogènes de ce champignon ont été abordées dans ce mémoire. Le premier volet décrit le champignon sur le plan morphologique et taxonomique, ainsi que quelques aspects relatifs à la maladie qu'il provoque. Ensuite viennent les domaines où les approches génétiques et moléculaires ont été utilisées ; permettant l'identification de l'espèce, l'étude de leurs génomes, l'identification des mating type, et l'analyse de la diversité génétique. Le dernier volet traite enfin les différentes techniques moléculaires utilisées pour l'étude de la structure des populations pathogènes. L'apport de la bioinformatique dans l'approche génétique et moléculaire dans l'analyse de la structure de la population pathogène a aussi été considéré de façon succincte.

Abstract

Pyrenophora teres is a pathogenic fungus that causes net blotch in barley, the diversity observed in populations of this pathogen is considered daunting. The structure of populations and their dynamics can have a great influence on disease development, for this purpose, their analysis is important. Genetic and molecular approaches, using several techniques developed to analyze DNA, allowing studying populations' structure of this fungus, have been reported in this thesis. The first part describes fungus morphology and taxonomy, as well as some aspects related to the disease caused. Then followed by research fields where the genetic and molecular approaches applied, and have allowed species identification, genome analysis, mating type identification, and genetic diversity analysis. The last part deals with the different molecular techniques used to pathogen population's structure analysis. The contribution of bioinformatics in the genetic and molecular approach in the analysis of the structure of the pathogenic population was also briefly considered.

Mots-clés: La rayure réticulé, *Pyrenophora teres*, l'orge, Mating type, reproduction sexuée , structure de la population , méthodes moléculaires, rétrospective bibliographique.

