

RAPPORT DE STAGE

1998

Maymouna Sy NDIR

Recherche de diversité au sein d'une population d'isolats de *Stemphylium solani* Weber au Sénégal.

Stage effectué au laboratoire de Phytopathologie Tropicale
De l'ORSTOM - Montpellier.

Sous la direction de Komi ASSIGBETSE

Dans le cadre d'un Contrat-Formation-Insertion (CFI) de l'ORSTOM

Durée du stage 3 mois (mi-Septembre à mi-Décembre)

SOMMAIRE

page

I	INTRODUCTION	1
11	L'agent pathogène	
12	Symptomatologie	
II	MATERIELS ET METHODES	3
21	Echantillonnage	
22	Culture du champignon	
23	Etude du pouvoir pathogene Mode d'inoculation de la plante	
24	Techniques moléculaires	4
241	Technique d'extraction de l'ADN au NaOH Protocole	
242	Extraction de l'ADN par la technique au Phenol/ Chloroforme/Alcool isoamylique a - Culture de Stemphylium solani b - Extraction de l'ADN c - Vérification de l'état de pureté des ADN	
243	L'amplification par PCR a - Principes b - Les ITS c - Protocole d'amplification d - Les cycles de température	5 7
244	La technique PCR-RFLP a - Principes b - Protocole	8 8
245	La technique RAPD ou AP-PCR a - Principes b - Protocole c - Cycles de température d - Choix des amorces Electrophorèse sur gel d'agarose	9 10 10
246	Séquençage	11
III	RESULTATS - DISCUSSION	12
31	Le pouvoir pathogène	
32	Amplification des ITS	
33	PCR-RFLP	
34	RAPD	13
35	Séquençage	14
IV	CONCLUSION - PERSPECTIVES	15
V	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
VI	ANNEXES	

**RECHERCHE DE DIVERSITE GENETIQUE AU SEIN D'UNE
POPULATION DE *STEMPHYLIUM SOLANI* Weber
AU SENEGAL**

I - INTRODUCTION

La stemphyliose est une maladie foliaire de l'aubergine africaine (*Solanum aethiopicum* L.) causée par un champignon Ascomycète imparfait (*Stemphylium solani*). Cette maladie est probablement, parmi les pressions parasitaires affectant cette culture, la plus sévère de plus, au Sénégal, elle est présente sur toutes les surfaces de culture de cette Aubergine. Elle est responsable de plus de 80% de pertes de récoltes. L'infection se produit à tous les stades végétatifs de la plante. Beaucoup de variétés d'Aubergines et des variétés d'espèces voisines de l'Aubergine présentent les symptômes de la maladie.

Les programmes d'amélioration s'intéressent plus à des besoins de productivité qui malheureusement débouchent sur une sensibilité accrue de la plante à divers parasites notamment au *Stemphylium*.

11 - L'agent pathogène

Stemphylium solani Weber est l'agent responsable de cette maladie foliaire de l'Aubergine africaine (Ndir et Lacoste, 1996). Le pathogène est un champignon Ascomycète Imparfait appartenant au groupe des Adélomycetes. Sa reproduction asexuée se fait par l'intermédiaire de conidies, sa culture *in vitro* est obtenue sur les milieux synthétiques usuels. La forme parfaite *Pleospora* n'a pas été décrite pour l'espèce *S. solani*.

12 - Symptomatologie

Les premiers signes de la maladie sont des tâches sur les feuilles et les pétioles. Ces tâches sont d'abord brunes, arrondies ou anguleuses de 1 à 2 mm de diamètre, puis elles confluent pour atteindre des dimensions plus importantes. Une marge noire borde ces zones de nécrose tandis que leur centre se fissure. Les feuilles ainsi recouvertes se chlorosent et tombent laissant des plantes dénudées.

Pour contrôler cette maladie, des mesures prophylactiques simples telles que l'utilisation de semences saines sont préconisées. L'utilisation de molécules chimiques (telles que le Thiram, le Manèbe et le Captafol) permet de contrôler la maladie.

Pour apporter un complément important au programme d'amélioration variétale de l'Aubergine africaine, il est indispensable de bien cerner la diversité génétique qui règne au sein des populations pathogènes. C'est dans ce cadre que nous nous intéressons à la structure génétique de la population de 30 isolats du Sénégal.

Tableau 1 : Quelques données sur les souches de *Stemphylium solani* Weber

N°	Souches	Localité	Année	Hôte d'origine
1	S0	kourouna	1993	S.aethiopic
2	S1	jard.bot	1995	-
3	S2	thiaroye	1995	-
4	S2'	thiaroye	1995	-
5	S3	thiaroye	1995	-
6	S4	pik.can.	1995	-
7	S5	pikine	1995	-
8	S6	gorom	1995	-
9	S8	kayar	1995	-
10	S9	pout	1995	-
11	S10	thies	1996	-
12	11	malika	1997	S.melongena
13	K1	kourouna	1998	S.aethiopic
14	K2	kourouna	1998	S.aethiopic
15	SL1	s.louis	1996	S.melongena
16	SL2	s.louis	1996	S.melongena
17	III	s.louis	1998	S.aethiopic
18	MBJ	mbao	1997	S.aethiopic
19	MBA	mbao	1997	S.melongena
20	PJ2	pikine	1996	S.aethiopic
21	PJ1	pikine	1996	S.aethiopic
22	I	s.louis	1998	lycopersic
23	12	malika	1997	S.aethiopic
24	V	s.louis	1998	S.melongena
25	V'	s.louis	1998	S.melongena
26	Sip2	sips	1998	S.aethiopic
27	Sip2'	sips	1998	S.aethiopic
28	Sip3	sips	1998	lycopersic
29	Sip3'	sips	1998	lycopersic
30	T5inra	avignon	?	lycopersic

II - MATERIELS ET METHODES

21 - Echantillonnage

Des feuilles de différentes espèces maraîchères présentant les symptômes de la stemphyliose ont été récoltées dans différents sites de la zone maraîchère des Niayes (large bande côtière, s'étendant de Dakar à Saint Louis). Au niveau de cette bande la nappe phréatique affleure presque et permet le maraîchage en toute saison.

30 souches de *Stemphylium solani* dont une provenant de la collection de l'INRA d'Avignon Montfavet ont fait l'objet de cette étude. Les souches appartenant à un même site d'isolement sont notées X1 et X2 ou X et X'.

Les provenances géographiques, l'année d'isolement et l'hôte d'origine des souches sont répertoriés dans le tableau 1.

22 - Culture du champignon

Les isollements ont été faits sur milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar) (annexe 1). Toutes les cultures dérivent de clones monospores, issus de la germination d'une conidie. Elles sont conservées sur PDA incliné en tubes à 4°C. Suivant les besoins, ces cultures seront par la suite reprises sur l'un des milieux suivants:

- V8 agar en boîte de Pétri (jus de légumes V8-Agar) (annexe 1)
- PDA agar en boîte de Pétri
- PDB liquide en fiole de Roux (Potato-Dextrose-Broth) (annexe 1).

Ces cultures ont été reprises sur milieu V8 agar, pour la production d'inoculum (en effet *Stemphylium* cultivé sur ce milieu sporule abondamment). Ce travail a été réalisé à Dakar en vue des inoculations expérimentales visant à analyser le pouvoir pathogène.

Quant aux cultures sur PDA un petit fragment de mycélium prélevé des tubes est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant du PDA. Après une semaine d'incubation à 27°C le mycélium s'est suffisamment développé.

23 - Etude du pouvoir pathogène

Mode d'inoculation de la plante

Les graines des différentes accessions sont semées dans des bacs en terre contenant un mélange 50% de terreau, 50% de sable, le tout stérilisé à l'autoclave 1 heure à 120°C. Les plantes au stade 2 à 3 vraies feuilles sont inoculées par pulvérisation de leur feuillage avec une suspension de spores titrant 5.10^5 spores/ml. L'inoculum a été préparé en raclant la surface des cultures et en suspendant les spores recueillies dans de l'eau stérile. Après comptage des spores à l'aide d'une cellule de Malassez, le titre de la suspension est ajusté à 5.10^5 spores/ ml.

Les plantes ainsi inoculées sont recouvertes d'une poche en plastique pendant 4 jours pour créer une humidité suffisante à la germination des spores. Un arrosage quotidien est assuré. Des observations sont effectuées à partir du 6ème jour et sont notées tous les jours.

*les tests de pathogénie ont été réalisés sur un lot de 10 plantes, chaque test a été repris 3 fois. Les plantes témoins sont pulvérisées avec de l'eau stérile et sont recouvertes pendant 4 jours.

24 - Techniques moléculaires

241 -Technique d'extraction de l'ADN au NaOH

C'est une méthode d'extraction rapide de l'ADN. L'extraction se fait à partir de culture sur PDA en boîte de Pétri.

Protocole:

1- Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, il est mis une petite quantité de mycélium prélevée à la surface de la culture.

2- 500 µl de NaOH (0,5 M) fraîchement préparé sont ajoutés au mycélium, et l'ensemble est bien homogénéisé à l'aide d'un petit mixeur.

3- Le mélange est centrifugé 5 minutes à 10000 g, le surnageant (environ 400 µl) est repris dans un nouveau tube.

4- 10 µl de ce surnageant sont dilués dans 190 µl de TE (annexe 1). Cette dilution d'ADN est prête à l'emploi.

242 - Extraction de l'ADN par la technique au Phénol/ Chloroforme /Alcool isoamylique

a) Culture de *Stemphylium solani*

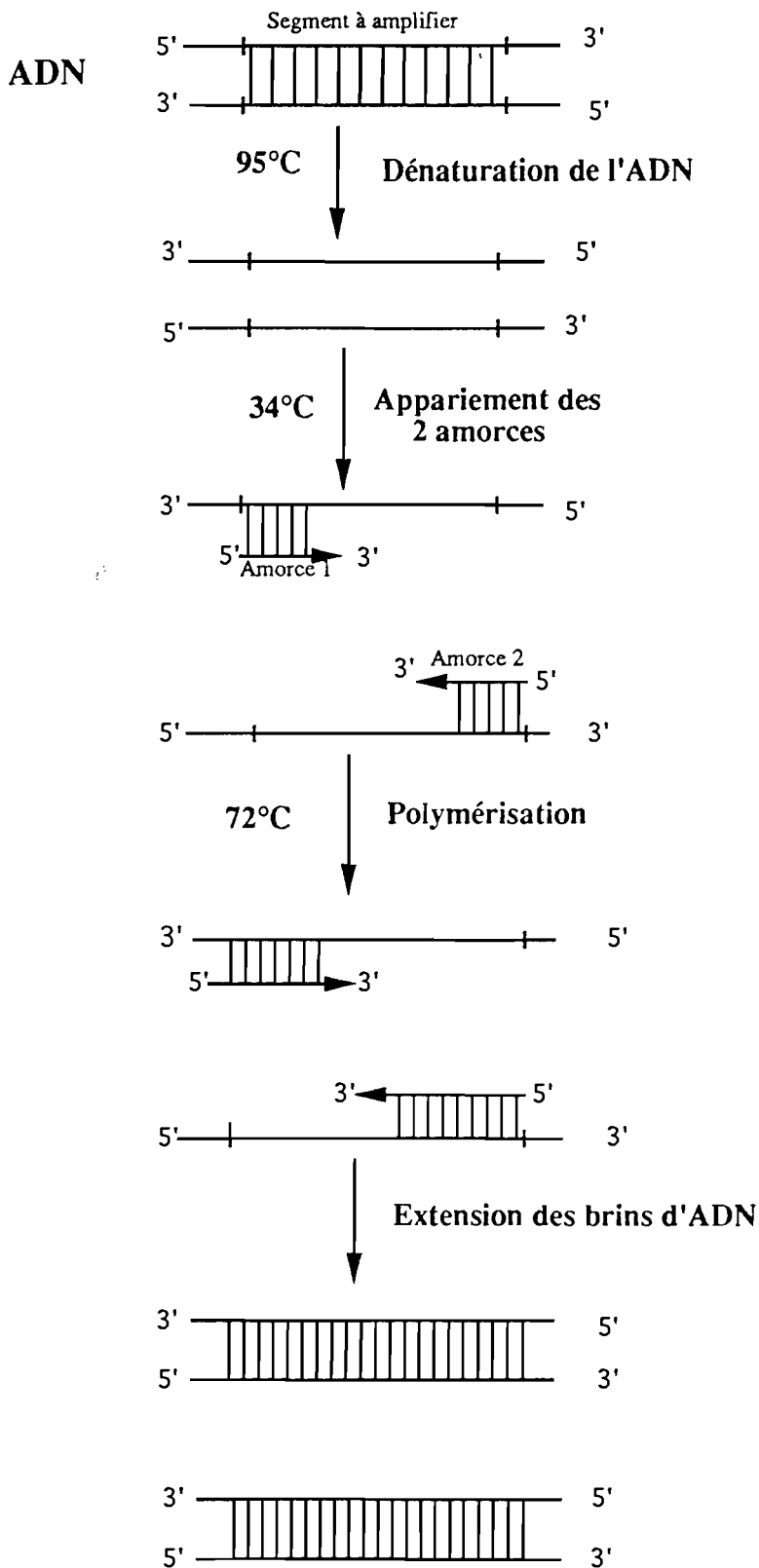
- Production de mycélium pour l'extraction de l'ADN

Un ou deux morceaux de cette culture sont découpés à l'aide d'un scalpel et sont utilisés pour ensemercer 200 ml de milieu PDB contenu dans des fioles de Roux. Ces fioles sont disposées à plat afin d'accroître la surface de milieu nutritif et incubées à la température du labo (25°C) pendant 7 jours.

Au bout de 7 jours, le mycélium envahit toute la surface du milieu; il est récupéré par filtration sur une toile à Butter en Nylon, (les fragments de mycélium ayant servi à l'ensemencement sont retirés à l'aide d'une spatule). Le mycélium est rincé à l'eau stérile, puis déposé sur plusieurs épaisseurs de papier filtre afin de bien le sécher. Il est ensuite enveloppé dans du papier aluminium avant d'être conservé à -20°C.

Les mycéliums aussitôt sortis du congélateur (-20°C) sont traités avec de l'azote liquide, pour éviter la décongélation, et lyophilisés pendant 48 heures. La lyophilisation est une méthode de dessiccation par sublimation à très basse température. Elle permet d'avoir du matériel sec, friable donc facile à broyer.

Figure 1 : Les étapes de la PCR pour 1 cycle d'amplification



b) Extraction de l'ADN

- Protocole de Lee *et al.* modifié

Des tubes Eppendorf de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium lyophilisé broyé (environ 0,1 g) dans du sable de Fontainebleau. 500 µl de tampon de lyse (annexe 1) sont ajoutés au broyat. Après homogénéisation du mélange avec une pince en bois, le mycélium est mis en incubation pendant 30 minutes à 1 heure au bain- marie à 65 °C.

Les protéines sont éliminées par un traitement au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (25/24/1) (volume égal à celui du tampon de lyse). Après homogénéisation du mélange et centrifugation (15 min à 13000 g), la phase supérieure aqueuse est récupérée (environ 400 µl) et l'ADN est précipité sélectivement en présence de 10 % (40 µl) d'acétate de sodium (3 M à pH 8) et avec 0,54 volume (216 µl) d'isopropanol pour ne pas précipiter les polysaccharides.

Après une nouvelle centrifugation (3 min à 12000 g), le surnageant est retiré et le culot d'ADN est rincé avec 300 µl d'éthanol 70 %. Après une nouvelle centrifugation le culot est repris dans 300 µl de tampon TE puis placé à 65 °C jusqu'à redissolution complète. L'ADN dissout est traité avec 3 µl de ribonucléase A (conc. finale: 100 µg/ml) (Boehringer Mannheim) pendant 1 heure à 37 °C. L'ADN est ensuite reprécipité avec 30 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 8) en présence de 600 µl d'éthanol pur (conservé à -20 °C), le culot rincé avec 300 µl d'éthanol 70 % puis séché au " Speed vac " pendant 15 à 20 min.

L'ADN est ensuite repris dans 100 µl de TE (annexe 1), maintenu une nuit à 4°C (pour dissoudre l'ADN) puis conservé à -20°C.

c) Vérification de l'état de pureté des ADN après l'extraction.

L'état de pureté de l'ADN est vérifié en déposant 5 µl sur gel d'agarose à 1,5%. Après cette étape, des dilutions sont réalisées au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème} dans de l'eau qui serviront pour l'amplification par PCR.

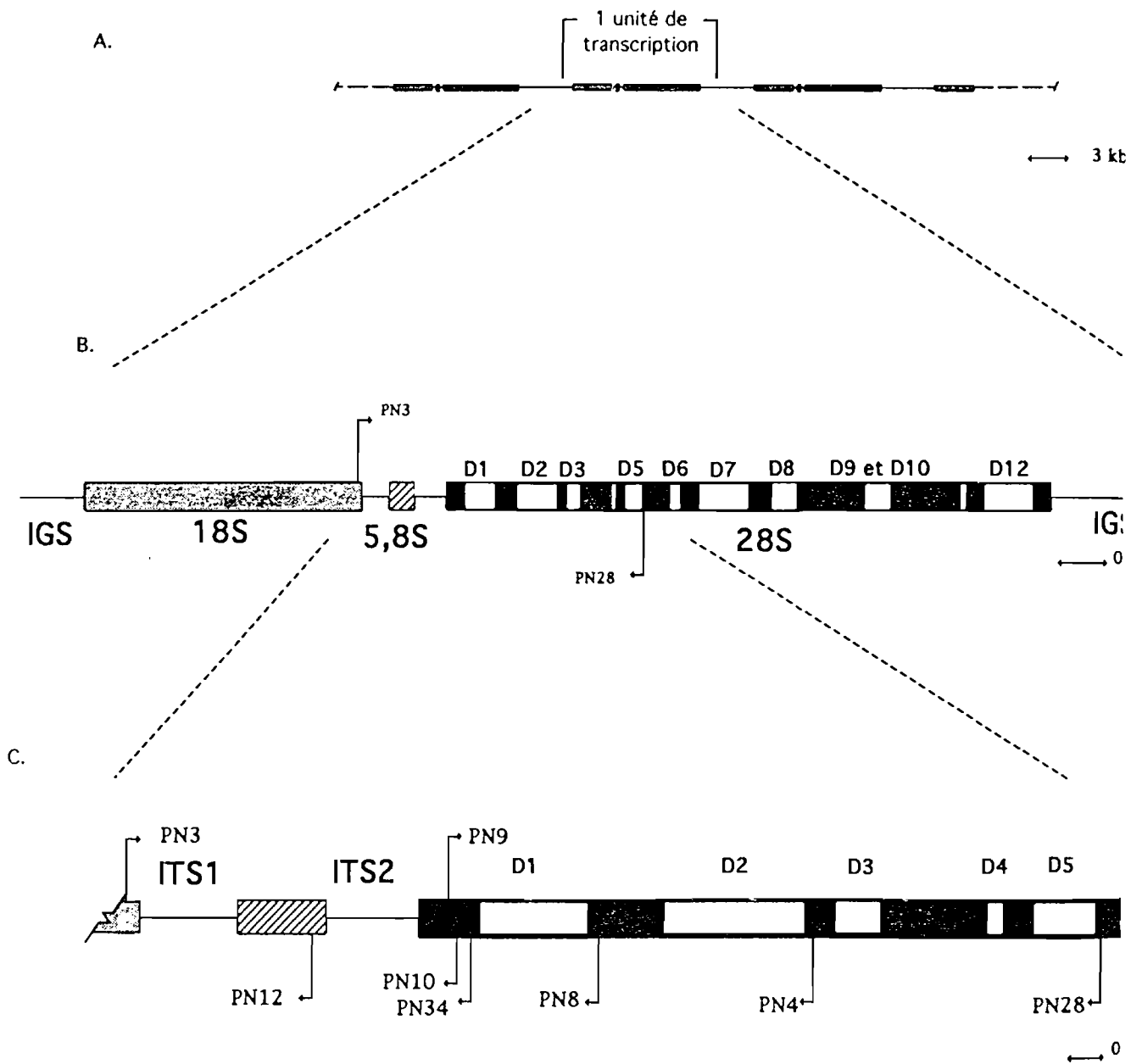
243 - L'amplification par PCR

(Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne)

a - Principes:

La technique de la PCR (Saiki *et al.*, 1985; Mullis et Faloona, 1987) consiste en une amplification enzymatique *in vitro* d'un segment d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques qui sont complémentaires des séquences en 5' et 3' du segment à amplifier (Fig.1). Ce segment est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives. Cette technique est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C.

Figure 2 : L'unité de transcription ribosomique de champignon



- A. Organisation en tandem des unités ribosomiques;
- B. Structure d'une unité ribosomique
- C. Amorces utilisées dans les réactions de séquences et d'amplification

Domaines variables (D1 à D12)
 Régions très conservées du gène 28S
 ITS: séquence interne transcrite; IGS: séquence intergène

amorces: le sens de la flèche indique la direction de l'élongation, à partir de l'amorce

La réaction d'amplification nécessite, outre la présence de l'ADN utilisé comme matrice et la Taq polymérase, l'utilisation de deux oligonucléotides (amorces) qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier, et des déoxynucléotides triphosphates (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) nécessaires à la synthèse de nouveaux brins d'ADN. La réaction d'amplification s'opère au cours d'une succession de cycles de températures sur le mélange réactionnel adéquat.

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes (Fig. 1):

- dénaturation de l'ADN bicaténaire à amplifier (92 - 95°C)
- hybridation ou appariement des amorces sur la région complémentaire (varie selon les T_m des amorces).
- extension ou polymérisation à partir des amorces des brins d'ADN. On se place généralement à 72°C.

Un certain nombre de cycles d'amplification (en général 30) est effectué et chaque cycle permet de doubler la quantité d'ADN à amplifier, entraînant une accumulation exponentielle de l'ADN amplifié de 2^n , (n étant le nombre de cycles d'amplification).

La technique de la PCR a ainsi permis d'améliorer les possibilités de détection des variabilités génomiques en vue d'une meilleure caractérisation des entités biologiques. Cependant elle n'est applicable que si l'on dispose des informations sur les séquences du génome à étudier, ce qui n'est pratique que lorsque les genres ou les espèces de champignon sont bien caractérisés.

Récemment, pour palier à cette limitation de la PCR, Welsh et McClelland, (1990) et Williams *et al.* (1990), ont décrit une variante (RAPD) de la PCR permettant d'amplifier des fragments d'ADN sans aucune information préalable sur le génome généralisant ainsi l'application de cette technique. Il s'agit de la technique AP-PCR (Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction; Welsh et McClelland, 1990) ou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al.*, 1990).

Nous avons utilisé la PCR pour amplifier les ITS de l'unité ribosomique des différentes souches.

b - Les ITS (Internal Transcribed Spacer ou espaceurs internes transcrits)

Parmi les approches moléculaires disponibles en systématique fongique, nous avons utilisé celle basée sur l'analyse des séquences de l'ADN ribosomal. L'unité ribosomique (Fig. 2), présente dans le génome de tous les organismes, est répétée en tandem chez les champignons. Les séquences de cette unité contiennent à la fois des régions variables et des régions conservées. Ainsi, la région ITS (internal transcribed spacer, ou espaceurs transcrits internes) de l'ADN ribosomique est une zone assez bien conservée à l'intérieur d'une même espèce fongique mais elle est très variable d'une espèce à l'autre et constitue donc un bon indicateur taxonomique à l'échelle de l'espèce, chez bon nombre de champignons.

Nous avons choisi d'amplifier par PCR cette région ITS avec deux amorces universelles ITS1F et ITS4.

Séquences des amorces

ITS1F 5'- TCC-GTA-TAG-GTG-AAC-CTC-GG - 3'
ITS4 5'- TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC - 3'

c - Protocole d'amplification:

La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 25 µl du mélange suivant:

- Tampon de la réaction 10X	2.5 µl
- MgCl ₂	1.5 µl
- une solution des différents désoxyribonucléotides triphosphates notée: dNTPs (10 mM)	0.5 µl
- ITS1F (20 pmoles/µl)	2 µl
- ITS4 (20 pmoles/µl)	2 µl
- H ₂ O stérile filtrée	12.5 µl
- Taq polymérase	2 µl

Dans un premier temps un mélange ou mix est réalisé pour un nombre n de tubes, puis réparti à raison de 23 µl/tube. L'ADN (2 µl) est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

d- Les cycles de température

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de température réalisés sur un thermocycler (PT100, Labover).

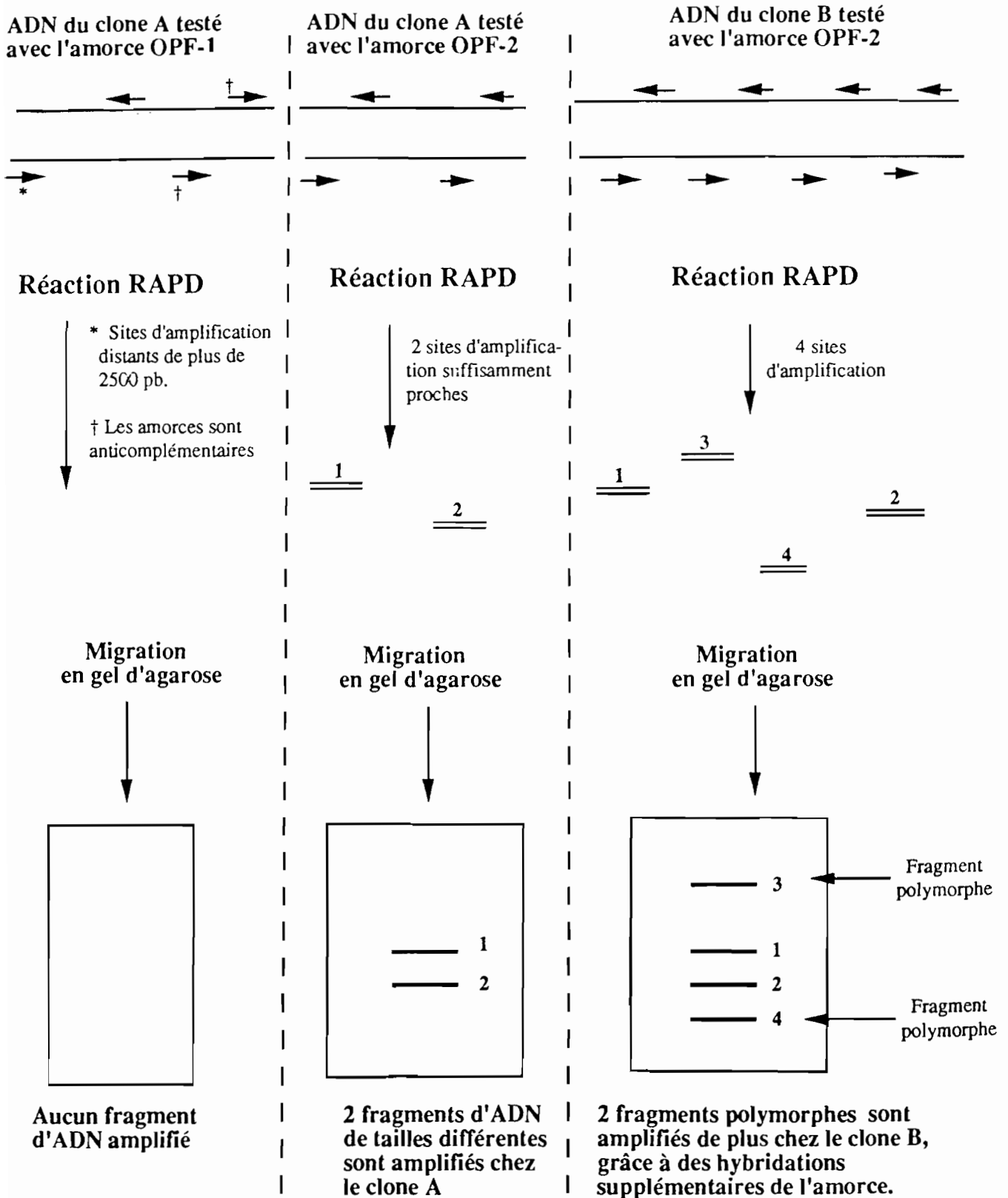
Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 95°C pendant 5 min

puis suit une série de 30 cycles, chaque cycle se déroulant comme suit:

95°C pendant 30 secondes	Dénaturation
55°C pendant 30 secondes	Hybridation des amorces (annealing)
72°C pendant 1 minute	Extension ou polymérisation

ensuite suit un dernier cycle de 72°C pendant 15 minutes pour achever la polymérisation.

Figure 3 : Détection du polymorphisme génomique par les marqueurs RAPD.



244 - La technique PCR - RFLP

Nous avons rechercher du polymorphisme dans notre population par restriction des ITS.

a- Principe

L'unité ribosomique est constituée de séquences contenant des domaines conservées, répétées en tandem et séparées par une séquence intergénique moins conservée : l'IGS (l'Inter Genic Spacer) (Fig. 2). Des mutations ponctuelles dans ces régions peuvent avoir pour effet l'apparition ou la disparition de sites de restriction. De plus, l'étude de cette unité permet d'établir des relations phylogénétiques et reflète bien l'évolution des organismes.

Nous avons utilisé des enzymes de restriction qui reconnaissent 4 paires de bases (*Alu* I, *Hae* III, *Nde* II, *Msp* I, *Bsp* 143) ou 6 (*Bam*H I, *Eco* RI) (annexe 2)

b - Protocole

La réaction de digestion s'effectue dans un mélange réactionnel de 20 µl:

Tampon de l'enzyme 10X	2 µl
Eau filtrée stérile	11 µl
Enzyme (20 unités/µl)	2 µl
Produit PCR	5 µl

Incubation au bain - marie à 37 °C minimum 3 heures.

Une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée avec les produits de digestion suivie d'une visualisation sous lampes UV.

245 - La technique RAPD ou AP-PCR

a- Principes:

La technique RAPD décrite par Williams et *al.* (1990), consiste comme la PCR, en une amplification de séquences d'ADN, mais a l'aide d'une seule amorce de séquence aléatoire et en l'absence de toute information concernant les séquences nucléotidiques de l'ADN à amplifier (Fig. 3).

L'hybridation de l'amorce se fait à basse température (34-36°C) pour permettre une hybridation peu spécifique favorisant la fixation au maximum de sites. La température d'hybridation est déterminée par la relation: $T^{\circ} = 22.3 + 1.45 [(A+T)+0.5 (G+C)]$ (Maniatis et *al.*, 1989), qui tient compte du pourcentage en guanine et en cytosine de l'amorce utilisée.

L'amorce pourra s'hybrider à différents endroits sur l'ADN; lorsque les deux amorces se seront hybridées de façon anti-complémentaire sur les 2 brins d'ADN et à une distance suffisamment proche (2500 pb maximum), l'amplification se réalise. En revanche, si les 2 amorces ne trouvent pas de séquence qui leur est complémentaire sur l'ADN ou s'hybrident trop loin l'une de l'autre, aucun fragment d'ADN ne sera amplifié.

Les fragments d'ADN amplifiés permettent de mettre en évidence d'importants polymorphismes génomiques au sein des organismes étudiés. Ces polymorphismes peuvent être expliqués par des mutations qui correspondent à:

- la délétion d'un site d'hybridation, entraînant l'absence de fragment amplifié;
- une trop grande distance séparant les deux sites d'hybridation des amorces anti-complémentaires, ce qui conduit à l'absence de fragment amplifié;
- des insertions ou des délétions au voisinage ou dans le site d'hybridation conduisant à des différences dans la taille des fragments d'ADN amplifiés.

La technique RAPD a une résolution potentiellement illimitée, car le nombre de marqueurs (amorces) possibles est lui même virtuellement illimité.

Au vu de ces données, la technique RAPD apparaît comme une méthode rapide et efficace d'étude de la structure génétique de la population surtout des champignons phytopathogènes. Nous l'avons donc appliquée à l'étude de la diversité génétique de nos souches de *Stemphylium solani*.

b - Protocole:

La réaction d'amplification a lieu dans un volume réactionnel de 25 µl avec le protocole suivant:

- Tampon de réaction de la Taq DNA polymérase 10X	2.5 µl
- MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.25 µl
- Amorce	4 µl
- H ₂ O stérile filtrée	14.25 µl
- Taq	0.5 µl

c -Cycles de température

95°C.....4 min. Dénaturation
suivi de 35 cycles d'amplification; chaque cycle étant constitué de:

92°C.....1 min. Dénaturation de l'ADN
36°C.....1 min. Fixation des amorces
72°C.....1 min.30 sec. Elongation

puis 1 dernier cycle de:

72°C.....15 min

d - Choix des amorces

Des essais préliminaires ont été effectués sur 2 souches (S1 et S2) avec 14 amorces OPF (Opéron Technology, kit F) afin de déterminer celles qui mettent en évidence le maximum de polymorphisme.

Au vu des profils obtenus, nous avons testé toutes les amorces disponibles.

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées:

Noms	5'	3'
OPF - 4	GGTGATCAGG	
OPF - 5	CCGAATTCCC	
OPF - 6	GGGAATTCGG	
OPF - 7	CCGATATCCC	
OPF - 8	GGGATATCGG	
OPF - 10	GGAAGCTTGG	
OPF - 11	TTGGTACCCC	
OPF - 12	ACGGTACCAG	
OPF - 13	GGCTGCAGAA	
OPF - 14	TGCTGCAGGT	
OPF - 15	CCAGTACTCC	
OPF - 17	AACCCGGGAA	
OPF - 18	TTCCCGGGTT	
OPF - 19	CCTCTAGACC	
OPF - 20	GGTCTAGAGG	

- électrophorèse sur gel d'agarose

***préparation du gel**

Suivant la consistance du gel (x% d'agarose- x variable), l'agarose est pesé et mis dans la quantité adéquate de tampon TAE. L'agarose est fondu au four micro-ondes jusqu'à ce que le mélange devienne limpide; puis il est refroidi jusqu'à environ 60°C. Il est alors coloré avec du bromure d'éthidium (BET) à raison de 1 µl /20 ml de gel (10 mg/ml), puis coulé dans un petit porte gel où un peigne a été soigneusement placé. Il est laissé jusqu'à polymérisation complète. Le peigne sera soigneusement ôté.

*** dépôt des amplifiats**

Le gel solidifié est déposé dans une cuve puis recouvert par le tampon TAE. Dans chaque puits, une quantité d'amplifiat préalablement mélangée avec du tampon de charge (annexe 1) sera déposée. Le premier et le dernier puits sont réservés au marqueur de poids moléculaire (5 µl) marqueur 1 ou marqueur 2 (annexe 3).

NB: dans ce mélange, le tampon de charge doit être le 1/5ème de l'amplifiat.

*migration de l'ADN

La migration de l'ADN est réalisée à 100 volts; elle se fait du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode). En effet, les acides nucléiques en solution sont chargés négativement à cause de l'ionisation de leurs groupements phosphates; ils se déplacent donc vers l'électrode positive. La vitesse de déplacement des molécules à travers le gel est limitée par la dimension des pores: les acides nucléiques ayant le même rapport charge/masse seront séparés d'après leur longueur car les molécules plus longues migrent plus difficilement à travers les pores du gel (Darnell J., Lodish H & Baltimore D. 1988. La Cellule: Biologie Moléculaire).

*visualisation de l'ADN sur le gel

Lorsque le front de migration, identifié au bleu de charge, se situe à 2 cm de la partie inférieure du gel, l'alimentation électrique est arrêtée, le gel retiré du porte gel et déposé sur une plaque de lumière ultraviolette. Le BET étant un cation qui s'intercale entre les bases de l'ADN, le complexe ion éthidium/ADN est fluorescent sous UV. Ainsi il est possible de visualiser les fragments d'ADN dans le gel et de prendre des photos polaroid en noir et blanc (voir photos).

Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose (230 ml à 1,4 % dans du tampon TAE) contenant du BET dans des plaques (21cm /20). Chaque gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE. La migration a été faite sous une tension de 120 Volts pendant 2 heures 30 minutes. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous UV et photographiés.

246 - Le Séquençage

Dans le but de comparer les séquences ITS des souches nous avons procédé au séquençage des ITS d'une des souches du Sénégal (S3) et de la souche de l'INRA (T5). Deux options de préparation des produits à séquencer sont possibles: soit faire séquencer directement les produits PCR ou cloner ces derniers dans un vecteur (voir expérimentation clonage en annexe 5).

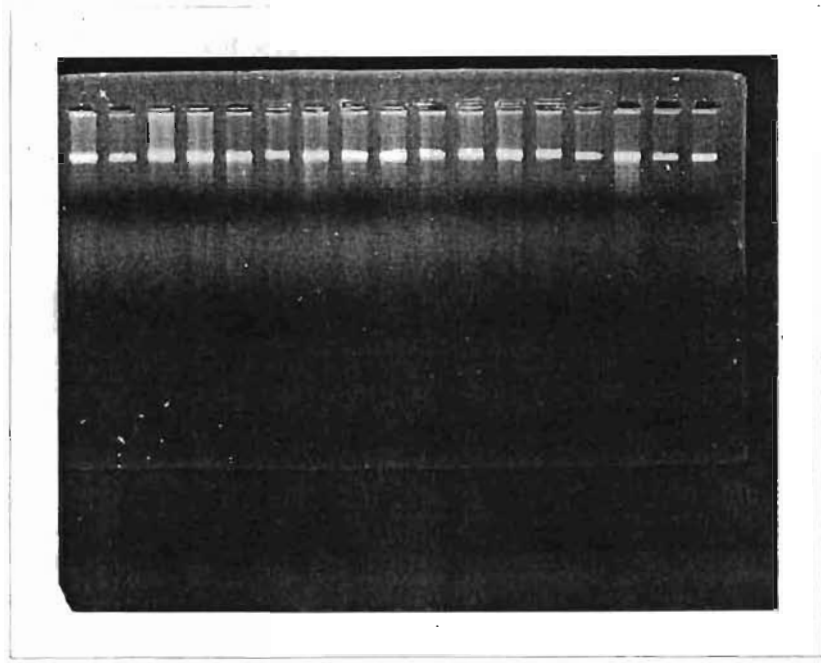
Les tentatives de clonage des produits PCR dans un vecteur plasmidique pGEMt (Promega, France) ayant échoué, nous avons fait séquencer directement les produits d'amplification.

Les produits PCR (ITS amplifiés) sont mis à migrer sur un gel LMP (Low Melting Point). Les bandes sont découpées et purifiées à l'aide du Kit de purification Wizard PCR Prep (Promega) (Protocole annexe 4). Les produits purifiés sont dosés au spectrophotomètre et envoyés à séquencer à la société Génome Express.

Tableau 3 : Résultats partiels du test de pouvoir pathogène

(test sur 10 plantes, avec 3 répétitions)

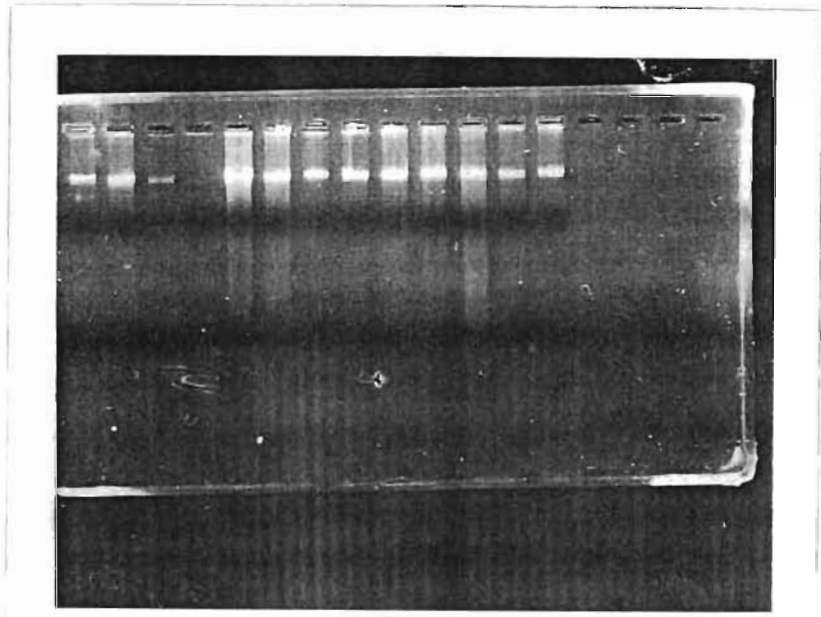
Isolat ⇒	S0	S1	S2	S2'	S3	S4	S5	SL1	SL2	PJ1	PJ2
variété↓											
Soxna S.aethi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
k.B.ND. S.aethi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rossol lycoper	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
Romitel lycoper	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Xina lycoper	R	R	R	R	S	R		S	S	S	S
Bot3 S.aethi	S		R	R		S		S	S	S	S
Bot18 S.aethi	R	?	S	S		S		S	S	S	S



Puits

Souches

1	S0
2	S1
3	S2
4	S2'
5	S3
6	S4
7	S5
8	S6
9	S8
10	S9
11	S10
12	11
13	K1
14	K2
15	SL1
16	SL2
17	III



Puits

Souches

1	MBJ
2	MBA
3	PJ1
4	PJ2
5	T5
6	I
7	12
8	V
9	V'
10	SIP2
11	SIP2'
12	SIP3
13	SIP3'

Photos 1 et 2 : Gels d'électrophorèse montrant l'ADN extrait des différentes souches de *S. solani*. On remarque qu'au niveau de certains puits il part des trainées d'impuretés.

14 TER.

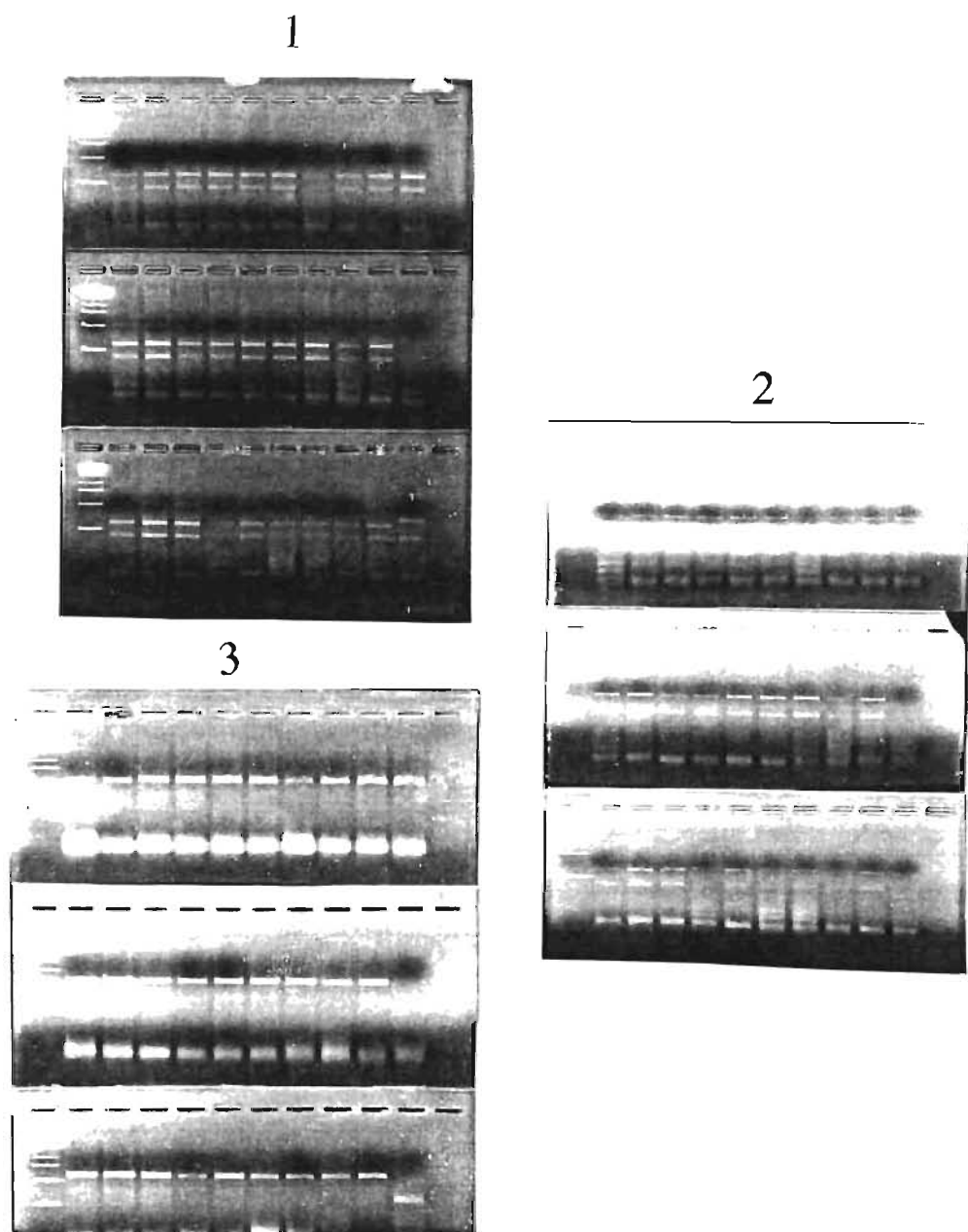
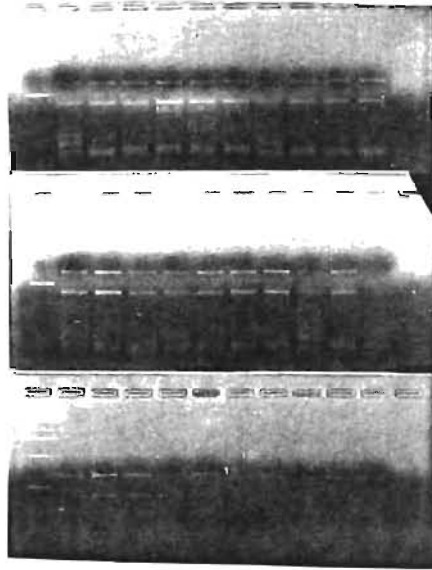


Planche 1: Profils de restriction de l'ITS des différentes souches digéré avec ALu I (1ère photo) et Bsp I (2e photo) et Msp I (3e photo), analysé sur un gel d'agarose 1,5 %.

1



2

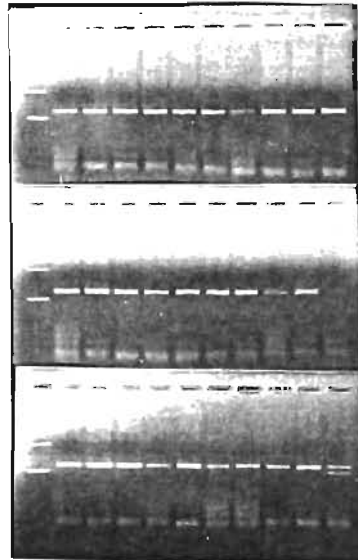
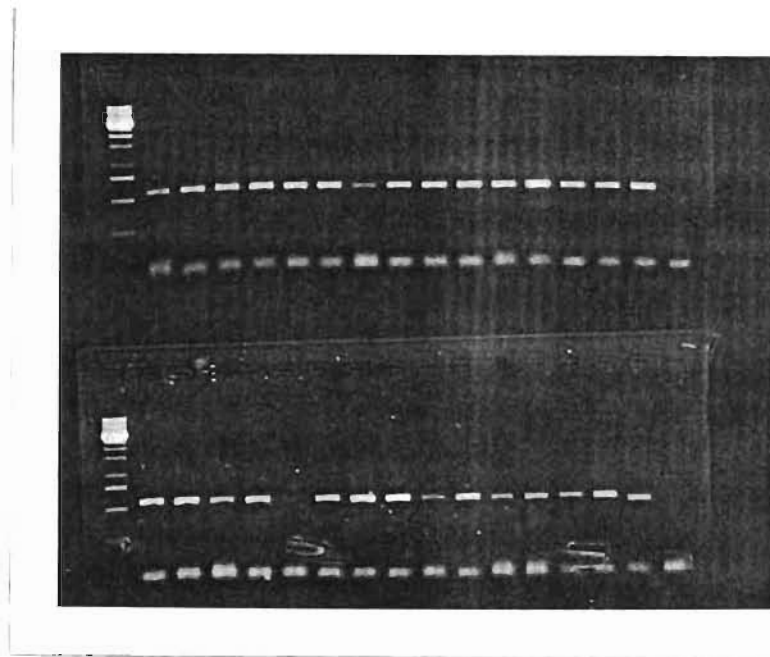


Planche 2 : Profils de restriction de l'ITS des différentes souches digéré avec Nde II (1ère photo) et EcoR I (2e photo), et analysé sur un gel d'agarose 1,5 %.



premier gel

<u>Puits</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<u>Souche</u>	M	S0	S1	S2	S'2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	S10	11	K1	K2	SL1	SL2	III

deuxième gel

<u>Puits</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<u>Souche</u>	M	MBJ	MBA	PJ2	PJ1	I	12	V	V'	SIP2	SIP2'	SIP3	SIP3'	T5

Photo 3 : Gels d'électrophorèse montrant l'amplification des ITS des 30 souches de *S. solani* à partir de l'ADN extrait par la méthode classique.

III - RESULTATS - DISCUSSION

31 - Le pouvoir pathogène

Les premiers résultats des tests d'infection sont consignés dans le tableau 3. Ils donnent pour l'instant les conclusions suivantes:

- 1 - Toutes les souches sont pathogènes sur les deux variétés d'aubergine du Sénégal.
- 2 - Elles présentent une interaction différentielle avec les deux variétés d'aubergine du Burkina.
- 3 - Le même constat est fait quand on analyse les variétés de tomate.

L'analyse de ces premiers résultats révèle 5 pathotypes lorsqu'on considère les variétés de tomate, alors que 3 pathotypes sont identifiés quand on considère les variétés d'aubergine.

Etat des ADN extraits par la méthode classique

Les photos 1 et 2 montrent que les ADN obtenus par la méthode classique sont d'une pureté assez bonne, cependant il subsiste au niveau de certains puits une traînée blanchâtre due à des résidus de polysaccharides.

32 - Amplification des ITS

La photo 3 présente les ITS amplifiés par PCR. Une seule bande d'environ 600 paires de bases a été amplifiée chez les souches de *Stemphylium solani* du Sénégal. La souche T5 de l'INRA présente quant à elle une bande d'environ 500 pb.

Il ressort de ce résultat que toutes les souches étudiées du Sénégal appartiennent à l'espèce *Stemphylium solani* contrairement à la souche T5 de l'INRA.

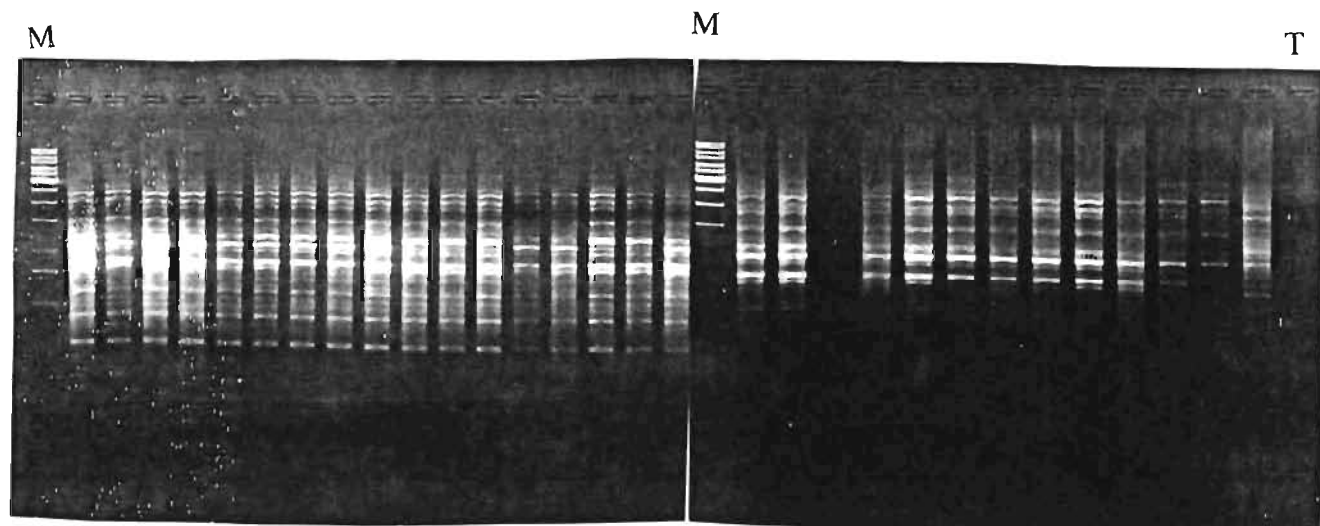
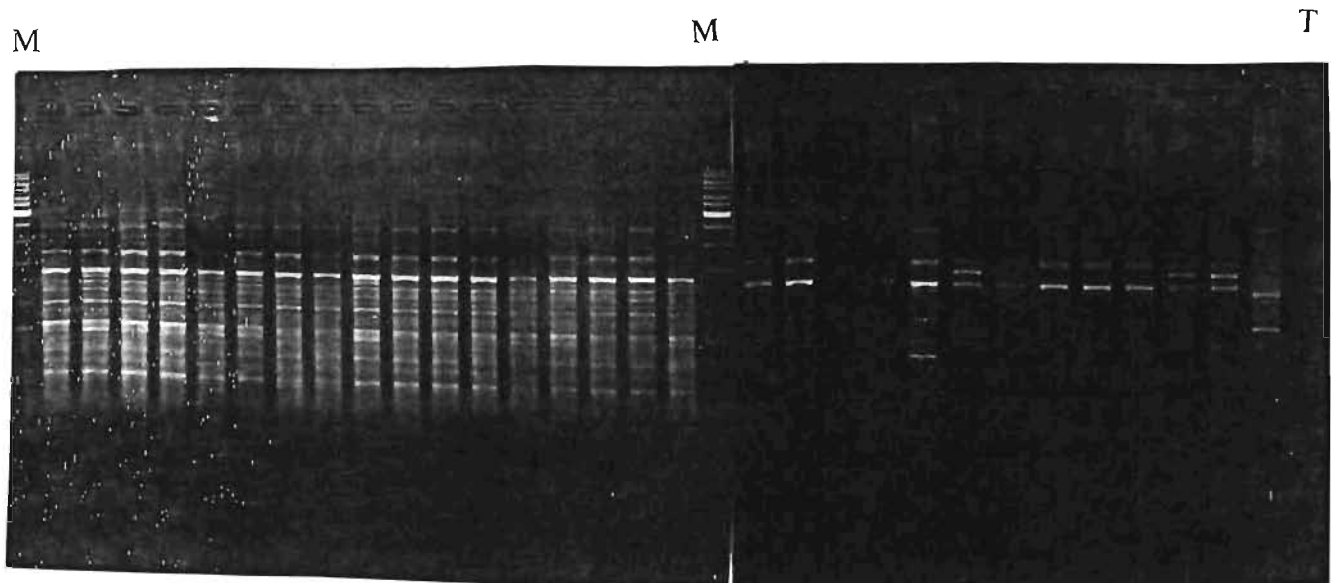
33 - PCR-RFLP

La recherche du polymorphisme nous a amené à digérer les ITS avec des enzymes de restriction. Les planches 1 et 2 présentent les profils obtenus après les différentes digestions.

- On remarque que les profils RFLP obtenus avec la souche T5 diffèrent de ceux obtenus avec les souches de *Stemphylium solani*. Ceci confirme la différence déjà notée avec l'amplification des ITS.

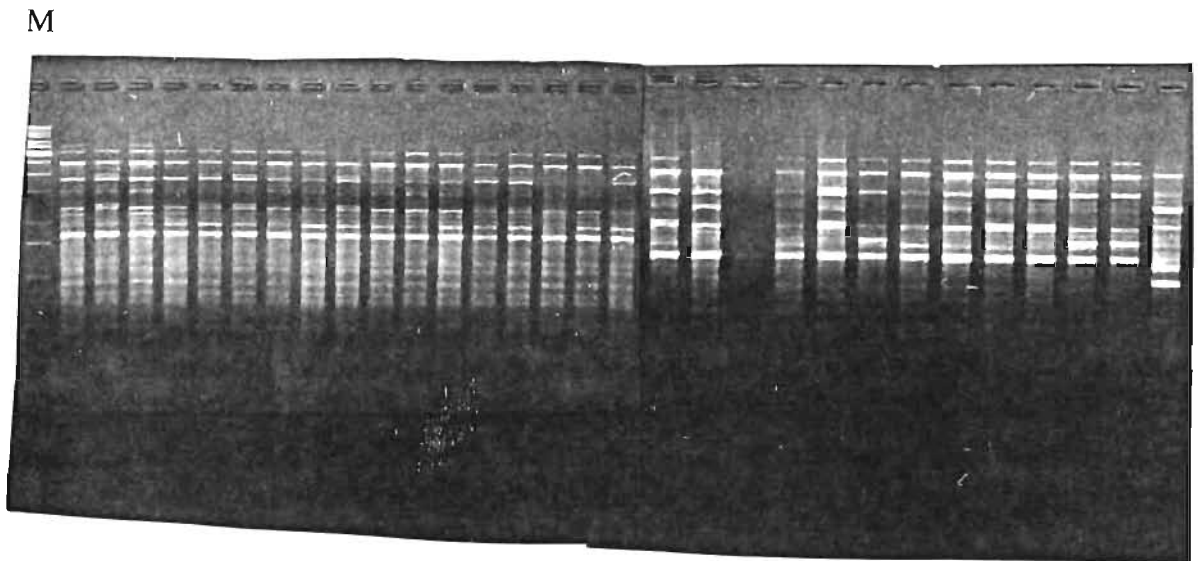
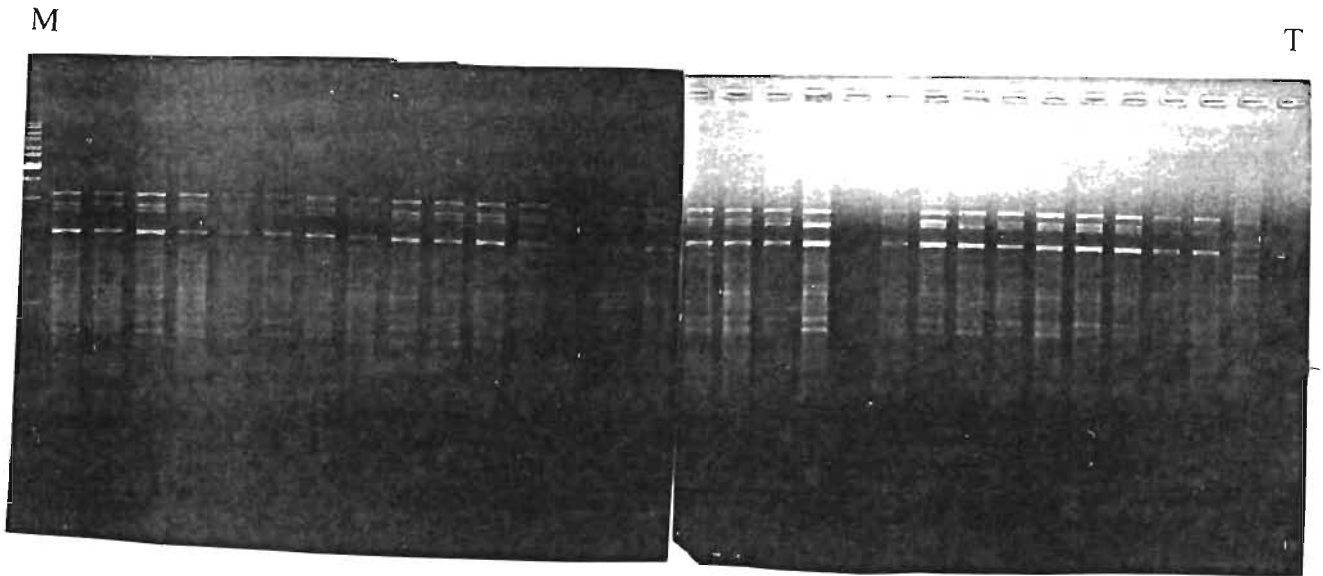
- D'autre part, toutes les autres souches présentent le même profil pour les enzymes de restriction utilisées. Ce profil montre deux bandes majeures sauf pour l'endonucléase *EcoRI* qui donne une bande majeure.

Ce résultat veut dire que les digestions jusqu'ici effectuées ne génèrent pas de polymorphisme au sein de nos souches.



S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 11 K1 K2 SL1 SL2 III MJB MBA PJ2 PJ1 I 12 V V' SIP2 SIP24 SIP3 SIP3' T5

Planche 4 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce OPF14 et OPF17. Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,4 % dans du tampon T.A.E).



S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 11 K1 K2 SL1 SL2 III M MBJ MBA P.J2 P.J1 I 12 V V' SIP2 SIP24 SIP3 SIP3' T5

Planche 3 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce OPF 6 et OPF13. Les fragments d'ADN amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,4 % dans du tampon T.A.E).

34 - RAPD

L'analyse des profils RAPD montre que :

- Pour toutes les amorces testées, la souche T5 de l'INRA donne un profil qui diffère totalement de ceux obtenus avec les souches du Sénégal.
 - Les amorces OPF 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 15 et 19 n'ont pas révélé de polymorphisme au sein des souches du Sénégal.
 - Les amorces OPF 6, 13, 14, 17, 18 et 20 ont donné pour chacune d'elles des bandes polymorphes. Parmi ces amorces nous avons choisi et retenu les amorces **OPF 6, 13, 14 et 17** pour le rapprochement des souches.
- Ce rapprochement s'est fait sur la base de la similitude des profils (pour une même amorce).

Les planches 3 et 4 montrent les profils d'amplification choisis pour regrouper les souches dans les trois ensembles suivants:

Premier ensemble: S0, S1, S2, S2', S3, S4, S4, S5, S6, S8, S9, S10, 11, k1, k2, SL1, SL2, III, MBJ, PJ2, I, V, V', SIPS1, SIPS2.

Deuxième ensemble: MBA, 12, SIPS3, SIPS3'.

Troisième ensemble: T5.

Pour l'instant les regroupements effectués ne peuvent pas être corrélés aux résultats des tests du pouvoir pathogène.

35 - Séquençage

Les résultats du séquençage des ITS sont ci-dessous. Nous avons pu séquencer 556 paires de bases de l'ITS de la souche S3 et 505pb de la souche T5. Des interrogations ont été effectuées dans la banque de données GenBank (Blast NCBI).

Les résultats de l'alignement des séquences de l'ITS de la souche S3 révèlent 96 % d'homologie avec les ITS de *Pleospora herbarum* et de *Stemphylium botryosum*. Alors que l'alignement avec l'ITS de la souche T5 donne 97% d'homologie avec les ITS de *Ampelomyces* sp.

Ces résultats viennent confirmer une fois de plus l'appartenance de nos souches à l'espèce *Stemphylium solani*.

Séquences de l'ITS des souches S3 (Seq1) de *Stemphylium solani* du Sénégal et T5 (Seq 2).

Seq1

GTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAGTTAAAAAAATAGGGTCTTG
ATGGATGCTCAACCAAGGCTGATTCAAAGTGCAAGAATTGTGCTGCGCTCCGAAACC
AGTAGGTCGGCTGCCAATGATTTTAAGGCGAGTCTCGTGAGAGACAAGACGCCAAC
ACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATAC
CAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACAC
TACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG
AAAGTTGTAATAATTACATTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATG
GTTTGGTCCTGGTGGCCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAAGAAGTGCGCAAAAGACA
TGGGTGAATAATTCAGACAAGCTGGAGCCCTACCGAAGTAAGGTCCCAGCCCGCTT
TCATATTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCTTTCCGG.

Seq 2

TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAGAGTGTA AAAAATGTACTTT
GTGGACGTCGTCGTTGTGAGTGCAAAGCGCGAGATGTA CTGCGCTCCGAAATCAATA
CGCCGGCTGCCAATCGTTTTGAGGCGAGTCTGCGCGCAGAGGCGAGACAAACACCCA
ACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAAT
ACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC
ACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT
TGAAAGTTGTA ACTATTAAGTTTTTTTCAGACGCTGATTTCAATTACAAAGGGTTTAAG
TGTTGTCCAGCCGGTGGGCGAACCCACCGAGGAAACGAAGGTA CTCAAAGACATGG
GTAAGAGATGGCAGGCAAAGCCCGCAACTCTAGGTAATGATCCTT.

Alignement : Les alignements des séquences sont présentés en annexe 6.

IV CONCLUSION - PERSPECTIVES

Les résultats de séquençage de l'ITS des souches étudiées a permis de conclure que toutes les souches du Sénégal étudiées appartiennent à l'espèce *Stemphylium solani* et que la souche T5 de l'INRA n'appartient pas à cette espèce.

Compte tenu du peu de travaux portant sur l'étude génétique du champignon (*Stemphylium solani*) et de l'aspect préliminaire de l'étude que nous avons entreprise et décrit dans le présent document, les approches utilisées telles que la technique RAPD et le pouvoir pathogène n'ont pas permis pour l'instant d'établir un même classement des souches de notre collection.

Sous réserve d'une analyse plus approfondie portant sur un échantillonnage plus étendu couvrant la totalité du Sénégal, un certain nombre de conclusions provisoires peuvent être tirées:

- l'étude de la diversité portant sur une trentaine de souches, toutes provenant de la maraîchère des Niayes (Dakar à St Louis), montre que toutes les souches semblent très proches génétiquement à quelques variantes près,
- La fin des tests de pouvoir pathogène permettra d'établir ou non une corrélation avec les résultats de biologie moléculaire.

Ces résultats préliminaires doivent être approfondis:

- en augmentant le nombre d'individus et en diversifiant les aires géographiques de prélèvement,
- en reprenant et en affinant les techniques d'analyse moléculaire déjà utilisées,
- en complétant et en étendant les tests de pouvoir pathogène à toutes les souches déjà en collection et à venir.

Prochainement, les résultats RAPD pourront être analysés par construction de matrices sur le critère présence/absence de bande.

V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Darnell J, Lodish H. et Baltimore D. La Cellule: Biologie Moléculaire.

Gardes M., Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes : application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.* 2 113 - 118.

Maiatis , T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. 1989. *Molecular cloning: laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Mullis K. B. et Faloona F., 1987. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51, 263 - 273.

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G.T., Erlich H.A., and Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350 - 1354.

Sy-Ndir, M. et Lacoste L. 1994. Morphological and physiological aspects of *Stemphylium* leafspot of scarlet eggplant, *Solanum aethiopicum* L. from Sénégal. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire. Serie A, Sciences Naturelles* 47, 33 - 41.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531 -6535.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990a. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531 - 6535.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990b. Genetic analysis with RAPD markers. In: *More Gene Manipulations in Fungi*. J.W. Bennet and L.L. Lasure ed. Academic Press FL. P 429 - 439.

White T.J., Bruns T.D., Lee S., and Taylor J. W. 1990 - Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to Methods and Applications* (ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.S. Sninsky and T.J. White), pp. 315-322. Ac. Press: San Diego, California.

VI - ANNEXES

ANNEXE 1

• Milieux de culture

Potato-Dextrose-Agar (PDA): 200 g de pommes de terre bouillie dans 1 l d'eau, 15 g d'agarose et 10 g de dextrose.

Jus de légumes-agar (V8 agar) : 200 ml de jus de légumes-V8, 800 ml d'eau, 18 g de CaCo₃ et 15 g d'agarose.

Potato-Dextrose Broth (PDB) : décoction de 125 g de purée de pommes de terre et 10 g de Dextrose pour 1 l d'eau.

* Tampons

Tampon T.E.

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

Tampon de lyse

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	50 mM, pH8,0
SDS	3 %
β-mercaptoéthanol	1 %

Tampon de réaction d'amplification

Tris-HCl	750 mM, pH 9,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM

Tampon d'électrophorèse

T.A.E. :

Tris-Acétate	40 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

Tampon de charge :

Saccharose dans H ₂ O	40 %
Colorant Orange G	

ANNEXE 2

Enzymes de restriction utilisées et leurs sites de restriction

(sites à 4 paires de bases)

Alu I 5' ...AG↓ CT ...3'
 3' ...TC↑ GA ...5'

Bsp 143 I 5' ... ↓ GATC ...3'
 3' ...CTAG ↑ ...5'

Hae III 5' ...GG ↓ CC ...3'
 3' ...CC↑ GG ...5'

Msp I 5' ...C↓ CGG ...3'
 3' ...GGC↑ C ...5'

Nde II 5' ... ↓ GATC ...3'
 3' ...CTAG ↑ ...5'

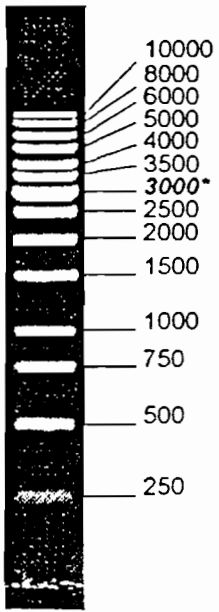
(sites à 6 paires de bases)

Bam H I 5' ...G↓ GATCC ...3'
 3' ...CCTAG ↑G ...5'

EcoR I 5' ...G↓ AATTC ...3'
 3' ...CTTAA ↑G ...5'

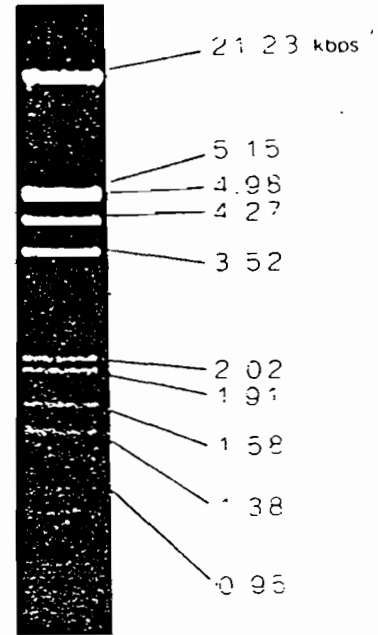
ANNEXE 3

- marqueur 1Kb



1.0% agarose

- marqueur 2



1% agarose gel

ANNEXE 4

Protocole purification produits PCR, suivant le Kit de purification Wizard PCR Prep (Promega)

(pour chaque produit PCR préparer une Mini-colonne Wizard)

- les tubes contenant le gel LMP +les fragments d'ADN sont incubés à 65 degrés, jusqu'à dissolution complète du gel.
- Numéroter des tubes, introduire 300µl du mélange gel/ADN dans chaque tube, ajouter 500µl de la résine disponible dans le kit, mélanger soigneusement.
- Séparer les 2 éléments d'une seringue de 5 ml, fixer la mini-colonne sur la seringue, introduire le mélange dans la seringue et à l'aide du piston pousser délicatement le mélange dans la colonne.
- Mettre 2 ml d'isopropanol 80% dans la seringue, pousser comme précédemment.
- Mettre 30 µl d'eau dans la colonne pour l'éluer, détacher la colonne l'introduire dans un nouveau tube et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
- Conserver cette élution car elle contient l'ADN.
- Remettre la colonne dans un autre tube, ajouter 20 µl d'eau recentrifuger 20 sec. à 10 000g, conserver cette deuxième élution.

Pour vérifier la qualité de l'ADN purifié, faire un petit gel et déposer 5 µl de la solution d'ADN, faire migrer et visualiser aux UV.

Dosage de l'ADN au spectrophotomètre:

- diluer 20 µl de la solution d'ADN dans 180 µl d'eau stérile
- lire la DO au spectrophotomètre et à l'aide de la formule: $DO=1$ correspond à 50 ng/µl, calculer la quantité d'ADN contenue dans notre extrait.

Annexe 5

Protocole clonage

Les produits PCR ainsi purifiés constituent notre insert .

Cet ADN est introduit dans un vecteur, ici on a utilise le plasmide pGEMt comme vecteur.

*Ligation:

Elle a lieu dans le mélange suivant a un volume final de 10/ μ l :

T4 DNA ligase.....	1 μ l
Tampon de la réaction.....	1 μ l
Vecteur pGEMt.....	1 μ l
Produits PCR.....	4 μ l
Eau filtrée stérile...qsp	10 μ l

Incubation à 4 degrés toute une nuit.

*Transformation

Elle se fait en introduisant les plasmides par choc électro-thermique dans des bactéries compétentes (bactéries dont la paroi à été perméabilisée), ce sont des E coli X L 1 Blue.

*Mise en culture sur milieu LB ampicilline/IPTG/Xgal

On isole les clones d'intérêt (ceux qui ont intégré le plasmide et qui sont de couleur blanche) on les multiplie sur milieu LB ampicilline.

A partir de cette culture on ressort notre insert à l'aide d'exonucléases et on le purifie comme précédemment.

Annexe 6

Alignement de séquences des rDNA ITS de *Pleospora herbarum* DAOM 150679
et de *Stemphylium solani* S3 du Sénégal.

Stemp: 1 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttnnnnnnntagggtcttgatg 60
|||||
Pleos:549 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtccaaagtgaaaaaat-gtggcttgatg 490

Stemp: 61 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtgaagaattgtgctgcgctccgaaccagtagg 120
|||||
Pleos: 489 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtgaagaattgtgctgcgctccgaaccagtagg 430

Stemp: 121 tcggctgccaatgattttaaggcgagtctcgtgagagacaa-gacgcccaacaccaagca 179
|||||
Pleos: 429 tcggctgccaatcattttaaggcgagtctcgtgagagacaaagacgcccaacaccaagca 370

Stemp: 180 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgcccttggaatacceaagggcgca 239
|||||
Pleos: 369 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgcccttggaatacceaagggcgca 310

Stemp: 240 atgtgcttcaaagattcgtgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 299
|||||
Pleos: 309 atgtgcttcaaagattcgtgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 250

Stemp: 300 tcgctgcttcttcatcgatgccagaaccaagagatccgtgtgaaagttgtaataatt 359
|||||
Pleos: 249 tcgctgcttcttcatcgatgccagaaccaagagatccgtgtgaaagttgtaataatt 190

Stemp: 360 acattgttactgacgctgattgcaattcaaaaaggttatggttggtcctggtggcc 419
|||||
Pleos: 189 acattgttactgacgctgattgcaattcaaaaaggttatggttggtcctggtgg-c 131

Stemp: 420 gggcgaaccgcccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 479
|||||
Pleos: 130 gggcgaaccgcccaggaaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 71

Stemp: 480 gctggagccctcaccgaagtaagggtcccagcccgttcatattgtgtaatgatccctcc 539
|||||
Pleos: 70 gctggagccctcaccgaggtgaggtccaaccgcttcatattgtgtaatgatccctcc 11

Stemp: 540 g-aggttcac 548
|
Pleos: 10 gcaggttcac 1

Identities = (96%), Positives = 532/550 (96%), Gaps = 3/550 (0%)

**Alignement de séquences des rDNA ITS de *Stemphylium botryosum* SBY17068
et de *Stemphylium solani* S3 du Sénégal.**

St. so: 1 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttnnnnnnntagggtcttgatg 60

|||||
|||||

*St. bo:*525 gttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaaaagttgaaaaaatgtggtcttgatg 466

St. so: 61 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtgaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 120

|||||
|||||

*St. bo:*465 gatgctcaaccaaggctgattcaaagtgaagaattgtgctgcgctccgaaaccagtagg 406

St. so: 121 tcggctgccaatgattttaaggcgagtctcgtgagagaaa-gacgccaacaccaagca 179

|||||
|||||

St. bo: 405 tcggctgccaatcattttaaggcgagtctcgtgagagaaaagacgccaacaccaagca 346

St. so: 180 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgcccttggaatacacaagggcgca 239

|||||
|||||

St. bo: 345 aagcttgagggtacaaatgacgctcgaacaggcatgcccttggaatacacaagggcgca 286

St. so: 240 atgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 299

|||||
|||||

St. bo: 285 atgtgcgttcaaagattcgatgattcactgaattctgcaattcactacgtatcgatt 226

St. so: 300 tcgctgcgttcttcatcgatgccagaaccaagagatccgttggtgaaagttgtaataatt 359

|||||
|||||

St. bo: 225 tcgctgcgttcttcatcgatgccagaaccaagagatccgttggtgaaagttgtaataatt 166

St. so: 360 acattggttactgacgctgattgcaattacaaaagggttatggttggtcctggtggcc 419

|||||
|||||

St. bo: 165 acattggttactgacgctgattgcaattacaaaagggttatggttggtcctggtggcc- 107

St. so: 420 gggcgaaccgcccaggaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 479

|||||
|||||

St. bo: 106 ggcgaaccgcccaggaacaagaagtgcgcaaaagacatgggtgaataattcagacaa 48

St. so: 480 gctggagccctcaccgaagtaagggtcccagcccgtttcatattgtg 526

|||||
|||||

St. bo: 47 gctggagccctcaccgaggtgaggtccaaccgctttcatattgtg 1

Identities = 510/527 (96%), Positives = 510/527 (96%), Gaps = 3/527 (0%)

RAPPORT DE STAGE

Contrat séjour Scientifique financé par l'Institut de Recherche
pour le Développement (IRD) du 4 Septembre au 30 Novembre 1999

Recherche de diversité au sein d'une
population d'isolats de *Stemphylium solani*
Weber au Sénégal. (suite)

voir RAP 501 ND1/2

Maymouna N'DIR

Département de Biologie végétale, Faculté des Sciences et Techniques,
Université Cheikh Anta Diop de Dakar-Sénégal.

Sous la direction de **Mr. Komi ASSIGBETSE**

IRD - Laboratoire de Phytopathologie Tropicale, BP 5045, F-34032,
Montpellier.

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION	3
II- MATERIEL ET METHODES	4
A- Le pathogène	
*Echantillonnage et isolement du champignon	
*Test de pouvoir pathogène	
B- Techniques moléculaires	
1- Préparation de l'ADN	
11- Culture de <i>Stemphylium solani</i>	
12- Extraction de l'ADN	5
2- L'amplification par PCR	6
21- Principe	
22- Les RAMs (Random Amplified Microsatellites ou Amplification au hasard des Microsatellites).	
221- Principe	
222- Séquences des amorces	
223- Protocole d'amplification	7
23- La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ou l'Amplification au hasard de fragments d'ADN polymorphes).	8
231- Principe	
232- Choix des amorces	
233- Protocole d'amplification	9
234- Cycles d'amplification	
24- La technique PCR/RFLP (appliquée à l'ITS)	
241- Principe	
242- Choix des amorces	
243- Les conditions d'amplification	10
244- Cycles de température	
245- Digestion des amplifiats	
a- Les enzymes de restriction	
b- Protocole et conditions de digestion	
III- RESULTATS	12
31- Le pouvoir pathogène	
32- Les ADN utilisés dans cette étude	
33- Analyse des résultats RAMs	
34- Analyse des résultats RAPD	13
35- Analyse de la PCR/RFLP	14
IV- CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	15
V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	16
VI- ANNEXES	17

RECHERCHE DE DIVERSITE AU SEIN D'UNE POPULATION D'ISOLATS DE *STEMPHYLIUM SOLANI* WEBER AU SENEGAL. (suite)

I - INTRODUCTION

L'aubergine africaine, *Solanum aethiopicum* L. est une solanacée occupant une place importante dans la production maraîchère du Sénégal. Parmi les parasites qu'elle abrite, le champignon *Stemphylium solani* est responsable d'une maladie foliaire appelée stemphyliose. Cette affection se manifeste par une nécrose foliaire suivie d'une abondante abscission des feuilles, elle occasionne ainsi des pertes de production pouvant aller jusqu'à 80%.

La recherche de variétés résistantes, souvent freinée par la grande diversité des agents pathogènes nécessite une analyse de cette diversité au sein des populations de parasites. Une telle analyse avait été initiée en Septembre 1998 au sein d'une population restreinte de 30 isolats de *Stemphylium solani* puis étendue en Septembre 1999 à 16 autres isolats de la même espèce. Au total cette étude aura porté sur une collection de 46 souches et des projections à venir élargiront cette collection.

Cette population a été analysée au niveau pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes, puis au niveau génétique en utilisant les techniques moléculaires suivantes :

- 1- l'amplification au hasard des microsatellites (RAMs).
- 2- l'amplification au hasard de fragments d'ADN polymorphiques (RAPD).
- 3- l'amplification de la région ITS de l'ADN ribosomal suivie de la digestion enzymatique des produits d'amplification (PCR/RFLP).

Tableau 1 : Quelques données sur les souches de *Stemphylium solani* étudiées

Souches	Origine	Année	Hôte d'origine
S0	kourounar	1993	S. aethiopicum
S1	jardin-bot.	1995	S. aethiopicum
S2	thiaroye	1995	S. aethiopicum
S2'	thiaroye	1995	S. aethiopicum
S3	thiaroye	1995	S. aethiopicum
S4	pikine	1995	S. aethiopicum
S5	pikine	1995	S. aethiopicum
S6	gorom	1995	S. aethiopicum
S8	kayar	1995	S.aethiopicum
S9	pout	1995	S. aethiopicum
S10	thiès	1996	S. aethiopicum
11	malika	1997	S. melongena
K1	kourounar	1998	S.aethiopicum
K2	kourounar	1998	S. aethiopicum
SL1	St Louis	1996	S. melongena
SL2	St Louis	1996	S. melongena
III	St Louis	1998	S. aethiopicum
Mbj	mbao	1997	S. aethiopicum
Mba	mbao	1997	S. melongena
PJ1	pikine	1996	S. aethiopicum
PJ2	pikine	1996	S. aethiopicum
I	St Louis	1996	Lycopersicum
12	malika	1997	S. aethiopicum
V	St Louis	1998	S. melongena
V'	St Louis	1998	S. melongena
Sip2	sips	1998	S. aethiopicum
Sip2'	sips	1998	S. aethiopicum
Sip3	sips	1998	Lycopersicum
Sip3'	sips	1998	Lycopersicum

Tableau 1 (suite)

Souches	Origine	Année	Hôte d'origine
T5inra	avignon	?	Lycopersicum
C2	kolda	1999	S. aethiopicum
C3	"	"	"
C4	"	"	S. melongena
C7	"	"	"
C8	"	"	"
C13	"	"	"
C15	"	"	"
C16	"	"	"
C21	"	"	"
C23	"	"	S. aethiopicum
C25	"	"	S. melongena
C27	"	"	"
C28	"	"	"
C31	"	"	S. aethiopicum
C32	"	"	S. melongena

II - MATERIEL et METHODES

A- Le pathogène

* Echantillonnage et isolement du champignon

Le premier échantillonnage avait été mené sur la bande côtière s'étendant de Dakar à Saint Louis (Ouest du Sénégal) et avait donné 30 isolats. Un second échantillonnage l'a été en Casamance, dans la région Sud du Sénégal et a enrichi la collection de 16 nouveaux isolats. Il faut toutefois noter une perte massive de souches de Casamance contaminées par le champignon *Neurospora crassa* qui rend l'isolement pratiquement impossible. De plus la collection est enrichie par une provenance d'Avignon nommée T5. Les lieux d'origine, les hôtes d'origine et l'année d'isolement des souches étudiées sont répertoriés dans le **tableau 1**

L'isolement et la conservation des souches sont faits sur milieu PDA. Toutes les cultures dérivent de clones monospores. Différents milieux (annexe) ont été utilisés suivant les besoins: le milieu V8 Agar pour la production de spores servant aux inoculations expérimentales. le milieu PDB liquide pour la production de mycélium servant à l'extraction d'ADN.

* Test de pouvoir pathogène

De jeunes plantes (stades 2 à 3 vraies feuilles) d'aubergine et de tomate sont inoculées par pulvérisation de leur feuillage avec une suspension de spores (5.10^5 spores/ml). Ce travail entamé à Dakar est en cours.

B- Techniques moléculaires

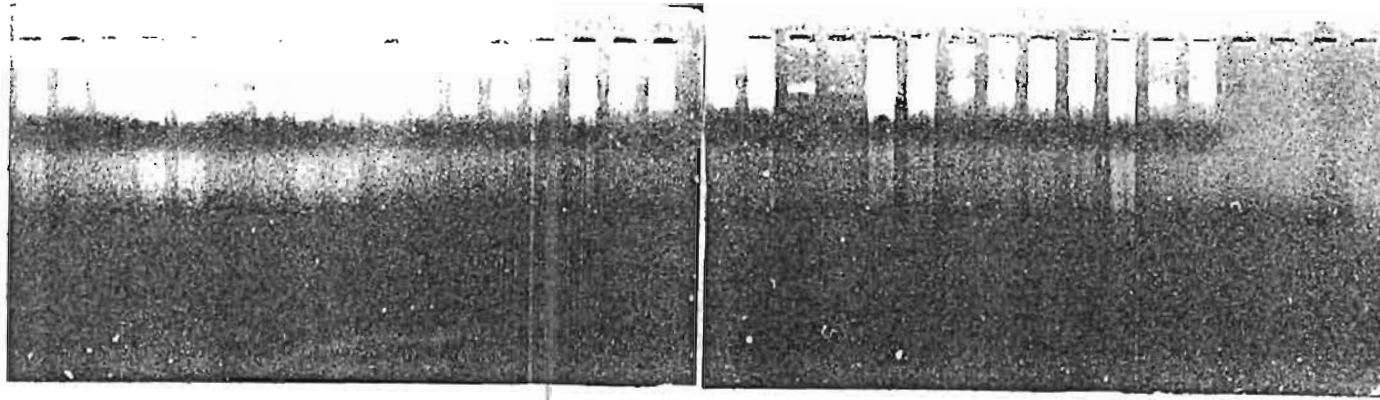
1- Préparation de l'ADN

11 - Culture de *Stemphylium solani*

Pour produire du mycélium en vue de l'extraction de l'ADN, des fioles de Roux contenant 200 ml de milieu PDB sont inoculés avec des fragments de thalle du champignon. Après 7 jours de culture à la température du laboratoire, le mycélium est récupéré par filtration, congelé à moins 20°C, traité à l'azote liquide puis lyophilisé pendant 48 heures.

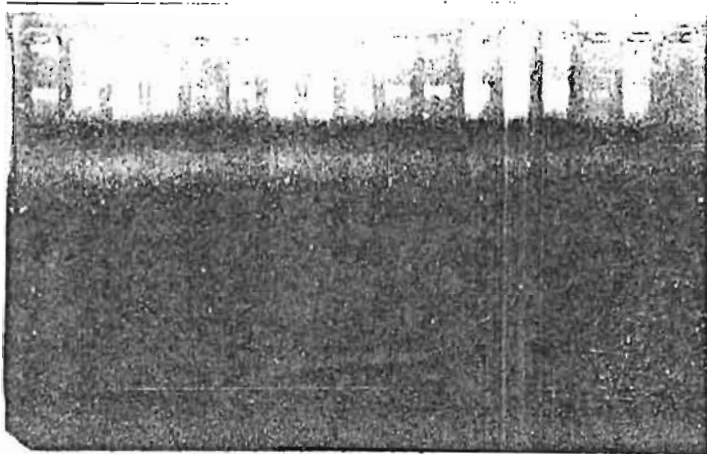
12 - Extraction de l'ADN au Phénol-Chloroforme-Alcool Isoamylique (P.C.I)

Figure 1 : ADN extraits des différentes souches de *S. solani*



a - puits : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

souche: S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 11 K1 K2 SL1 SL2 III Mbj Mba P11 PJ2 T51 12 V V' Sip2 Sip2' Sip3 Sip3'



b - puits : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

souche: 2 3 4 5 7 8 13 15 16 21 23 25 27 28 31 32

20

Une double extraction au P.C.I. a été effectuée: Des tubes Eppendorf de 1,5 ml sont remplis au tiers avec du mycélium lyophilisé et broyé en présence d'un peu de sable de Fontainebleau. L'extraction est faite dans 500 µl de tampon de lyse placé 30 minutes au bain marie 65°C après homogénéisation. Les protéines sont éliminées par traitement du mélange avec 500 µl de Phénol-Chloroforme-Alcool Isoamylique (25/24/1), suivie d'une centrifugation pendant 15 minutes à 12000 g. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée dans un nouveau tube.

L'ADN est précipité sélectivement avec 0,54 volume d'isopropanol en présence de 10% d'acétate de sodium (3M à pH 8), suivie d'une centrifugation (3 min. à 12000 g).

Le culot d'ADN obtenu est rincé avec 300 µl d'Ethanol 70% et à nouveau centrifugé (3 min à 12000 g) puis repris dans 300 µl de TE et placé au bain marie à 65°C pour dissolution.

Stemphylium solani produit beaucoup de pigments qui contaminent l'ADN, ceci explique qu'une deuxième extraction au P.C.I. a été appliquée à la solution d'ADN. 200 µl de tampon TE ont été ajoutés aux 300 µl de solution d'ADN. 500 µl de PCI sont ajoutés à cette solution d'ADN, le tout est homogénéisé et centrifugé à 4°C pendant 15 min. à 12000 g; le surnageant contenant l'ADN est récupéré.

L'ADN est précipité avec 0,54 volume d'isopropanol en présence de 10% d'acétate de sodium, puis suit une centrifugation pendant 3 min. à 12000 g. Le culot est rincé à l'éthanol 70%, centrifugé à 12000 g pendant 3 min, repris dans 300 µl de TE puis placé au bain marie à 65°C pour dissolution. Une fois en solution, l'ADN est traité à la RNase 1µl/100 µl (10mg/ml) pendant 1 heure à 37°C. Une deuxième précipitation de l'ADN est obtenue avec de l'éthanol absolu (-20 °C) en présence d'acétate de sodium. Le culot récupéré après centrifugation (3 min., 12000 g) est rincé avec 300 µl d'éthanol 70%, à nouveau récupéré après centrifugation et mis à sécher au Speed-vac. Cet ADN est enfin repris dans 100 µl de TE et placé à 4°C une nuit puis conservé à -20°C.

Pour vérifier l'état des ADN extraits, 5 µl de chaque solution d'ADN sont additionnés de tampon de charge (annexe). Ce mélange est déposé sur un gel d'agarose à 1%, soumis à l'électrophorèse (100 volts) et la révélation se fait sous UV (**figure 1** : a - représente les 30 ADN des isolats du séjour précédent, b - représente les ADN des 16 nouveaux isolats). En fonction de la qualité et de la quantité de l'ADN, des dilutions au 50ème et au 100ème sont effectuées dans du tampon TE pour une utilisation en amplification par PCR. (Tous les tampons sont décrits en annexe). En comparant les deux lots, il ressort qu'avec une double extraction le rendement en ADN est faible, mais ce dernier apparaît plus « propre », cependant il subsiste encore de faibles traînées de contaminants au niveau de certains puits.

2 - L'amplification par PCR

21- Principe

Toutes les techniques biochimiques utilisées dans ce travail sont basées sur la technique PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne) (Saiki et *al.*, 1985; Mullis et Faloona, 1987). Elle consiste en une amplification enzymatique *in vitro* d'un segment d'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques complémentaires des séquences 5' et 3' du segment à amplifier.

Ce segment est recopié en plusieurs millions d'exemplaires par une série de réactions successives, basées sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante (la Taq DNA polymérase). Cette technique PCR a permis d'amplifier entre autre les microsatellites.

22 - Les RAMs (Random Amplified Microsatellites ou Microsatellites amplifiés au hasard)

221 - Principes

Cette technique décrite à l'origine par Zietkiewicz, Rafalski et Labuda (1994) s'est avérée utile dans l'étude des champignons. Cette technique associe l'essentiel des avantages qu'offre la technique RAPD et ceux qu'offre l'analyse des microsatellites. Ceci en fait un outil performant pour étudier les variations génétiques.

Il a été montré que cette technique d'investigation est performante chez les champignons (Hantula, Dusabenyagasani et Hamelin, 1996)

Dans l'analyse des RAMs, l'ADN situé entre les extrémités de deux microsatellites proches est amplifié et les produits d'amplification obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Le type de polymorphisme (absence/présence) est semblable à celui obtenu avec la technique RAPD (Zietkiewicz et *al.*, 1994 et Hantula et *al.*, 1996).

Nous avons choisi d'amplifier par PCR cette région de l'ADN située entre les extrémités de deux microsatellites contigus avec les amorces suivantes.

222 - Séquences des amorces

Sept amorces oligonucléotidiques ont été utilisées. Elles consistent en une répétition de séquences de 2, 3 ou 4 nucléotides. Cette répétition se fait comme dans les exemples suivants:

5' - CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC - 3'

5' - CAGA CAGA CAGA CAGA CAGA CAGA - 3'

et dans le texte les amorces utilisées sont notées (CAC)₇, (CGC)₇, (AAC)₇, (CAGA)₆, et (AAAG)₆.

223 - Protocole d'amplification

La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 25 µl du mélange suivant :

- tampon de la réaction (10x).....2,5 µl
- MgCl₂.....1,5 µl

- dNTPs (10mM).....0,5 μ l
- Amorce.....2 μ l
- H₂O stérile filtrée.....16,5 μ l
- Taq polymérase.....1 μ l

un mix est réalisé pour un nombre n de tubes, puis réparti à raison de 23 μ l /tube.

L'ADN (2 μ l) est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

NB: La technique RAMS étant utilisée pour la première fois dans ce travail, les 45 souches ont été effectivement utilisées dans les amplifications donnant 3 gels pour chaque amorce testée.

224 - Les cycles de température

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de température obtenus avec un thermocycler (PT 100, Labover).

94°C.....4 min première dénaturation

suivent 35 cycles d'amplification comprenant:

94°C.....45 sec Dénaturation

55°C.....1min Fixation des amorces

72°C.....1 min 30 Elongation

puis un dernier cycle de :

72°C.....15 min.

Les produits d'amplification sont conservés à

4°C.....infini.

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un grand gel horizontal d'agarose à 1,4% additionné de bromure d'éthidium (1 μ l/20 ml de gel). Cette électrophorèse se fait dans un tampon TAE 1X, pendant 2h 30 à 3h sous 120 volts. Les bandes amplifiées sont visualisées sous UV (312 nm).

23 - La technique "RAPD"(Random amplified Polymorphic DNA, ou Amplification au hasard de fragments d'ADN polymorphiques).

231 - Principe

Cette technique décrite par Williams et *al.*(1990) et Welsh et Mc Clelland (1990) est dérivée de la PCR et en diffère par l'utilisation d'une seule amorce. Cette PCR spéciale se fait en l'absence de toute information concernant les séquences de nucléotides de l'ADN à amplifier. Les amorces utilisées sont des oligonucléotides de 10 bases à séquence aléatoire. Les amorces ont été élaborées par "Opéron Technologies, Inc. Du Pont USA". L'hybridation de l'amorce se fait à basse température (34-36°C), permettant ainsi une hybridation peu spécifique favorisant la fixation à un maximum de sites.

Les fragments d'ADN amplifiés permettent de mettre en évidence un important polymorphisme génomique au sein des organismes étudiés. Ce polymorphisme peut être expliqué par des mutations survenues au niveau de l'ADN à amplifier.

En résumé, la technique RAPD est rapide à mettre en œuvre, permet l'étude d'un grand nombre d'isolats à la fois et s'est montrée efficace comme marqueur de la diversité génétique chez les champignons phytopathogènes.

232- Choix de amorces

A la lumière des amplifications RAPD effectuées en 1998, les amorces dont les séquences suivent ont été choisies.

Noms	5'	3'
OPF 02	GAGGATCCCT	
OPF 04	GGTGATCAGG	
OPF 06	GGGAATTCGG	
OPF 08	GGGATATCGG	
OPF 10	GGAAGCTTGG	
OPF 13	GGCTGCAGAA	
OPF 14	TGCTGCAGGT	
OPF 17	AACCCGGGAA	
OPF 20	GGTCTAGAGG	

233 - Protocole d'amplification

La réaction d'amplification a lieu dans un volume réactionnel de 25 μ l, avec le protocole suivant:

tampon de réaction de la taq polymérase (10X).....2,5 μ l
 MgCL₂ (25 mM).....1,5 μ l
 dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP).....0,25 μ l
 Amorce.....4 μ l
 H₂O stérile filtrée.....13,75 μ l
 Taq DNA polymérase.....1 μ l

L'ADN (2 μ l) est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

NB: La technique RAPD ayant déjà été utilisée avec les 30 premières souches, l'amplification dans la présente étude a porté sur les 16 nouveaux isolats et sur 3 représentants des 30 premiers. Ces 3 représentants correspondent aux trois profils obtenus dans la première étude.

234 - Les cycles d'amplification

Une première dénaturation de l'ADN est obtenue à 95°C pendant 4 minutes suivie de 35 cycles d'amplification; chaque cycle comprenant:

* une dénaturation à 92°C pendant 1 min puis la fixation de l'amorce à 36°C pendant 1 min puis une élongation à 72°C pendant 1 min 30. Une dernière étape 72°C pendant 15 min permet d'achever toutes les élongations.

24- La technique PCR/RFLP

241- Principe

L'unité ribosomique est constituée de séquences variées. Certaines sont variables, d'autres sont conservées. Parmi les dernières, nous avons ciblé les espaceurs internes transcrits (ITS), bien conservés à l'intérieur d'une espèce, ce qui en fait un bon indicateur de l'espèce chez beaucoup de champignons tels que *Phytium* (Chen, 1992), *Phytophthora* (Lee et Taylor, 1992).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Saiki et al., 1998) couplée à l'analyse par restriction (RFLP) est couramment utilisée en taxonomie fongique (White et al., 1990; Bruns, White et Taylor, 1991).

Le principe de la technique consiste à amplifier cette région ITS à l'aide de deux amorces ITS1F et ITS4 par PCR, de digérer le produit obtenu avec des enzymes de restriction et d'analyser sur gel d'agarose les produits de digestion obtenus.

242 - Les amorces

ITS1 F	5'-TCC-GTA-TAG-GTG-AAC-CTC-GG 3'
ITS4	5'- TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'

243 - Conditions d'amplification

Les amplifications sont réalisées dans un volume final de 25 µl dans les conditions suivantes:

Tampon de réaction de la taq polymérase (10X).....	2,5 µl
MgCl ₂ (2,5mM).....	1,5 µl
dNTP (10 mM).....	0,5 µl
Amorce (20pmoles/µl).....	2 µl
H ₂ O stérile filtrée.....	12,5 µl
Taq polymérase.....	2 µl

244 - Les cycles de température

La réaction d'amplification a été réalisée grâce à différents cycles de température agencés comme suit: une première dénaturation de l'ADN est obtenue à 95°C pendant 5 minutes suivie de 30 cycles programmés comme suit: une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, l'hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes puis une minute d'extension à 72°C; la polymérisation est achevée par une dernière étape à 72°C pendant 15 minutes.

5 µl des produits d'amplification sont déposés sur un petit gel d'agarose à 1% , pour vérifier que l'amplification a bien eu lieu.

245 - Digestion des amplifiats

a- Les enzymes de restriction

Nous avons utilisé des enzymes de restriction dont les sites de restriction sont composés de 4 paires de bases (*Msp* I, *Hae* III, *Alu* I et *Nde* II) ou de 6 paires de bases (*EcoR* I). Les enzymes *BamH* I (6 paires de bases) et *Bsp* 143 et *Alu* I (4 paires de bases), déjà testées en 1998 n'étaient pas disponibles et n'ont pu être testées pour le présent travail.

b- Protocole de digestion

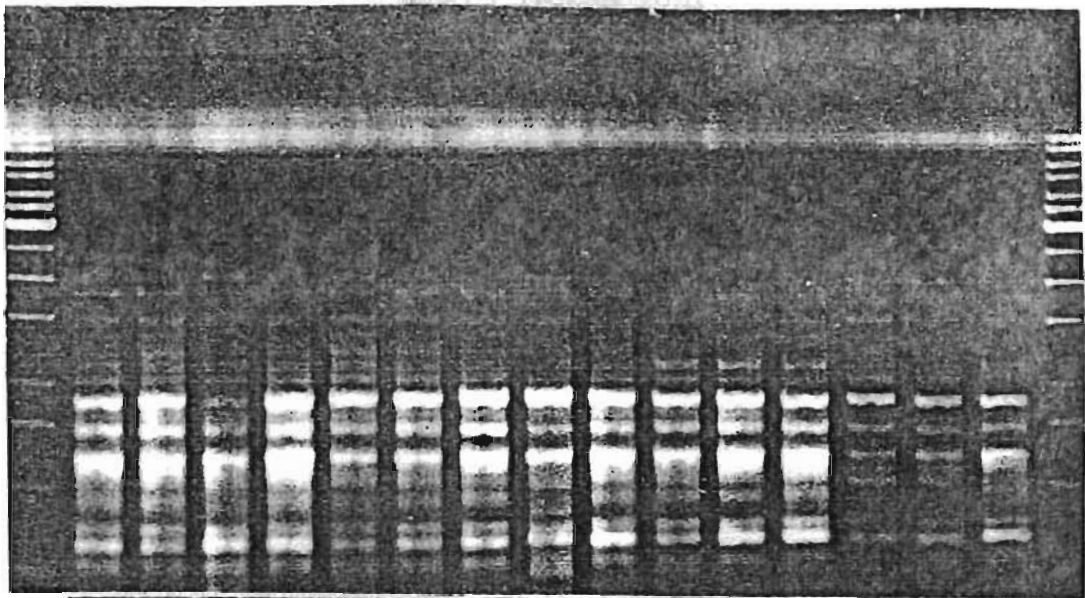
La digestion est effectuée dans un volume final de 20 μ l constitué comme suit:

Tampon de l'enzyme (10X).....	2 μ l
Eau filtrée stérile.....	11 μ l
Enzyme (10 ou 20 unités/ μ l).....	2 μ l
Produit PCR.....	5 μ l

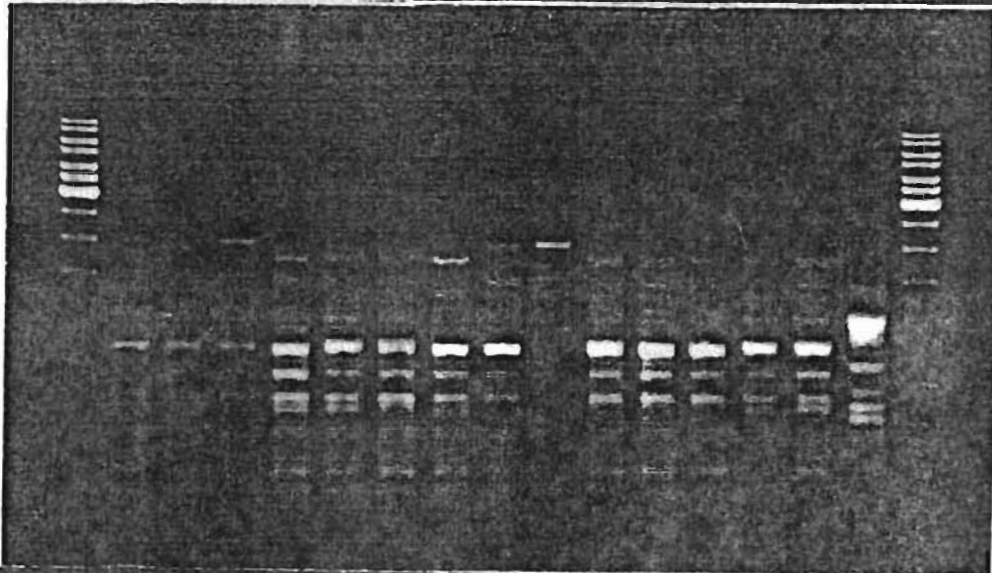
Ce mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant au moins 3 heures.

La réaction est arrêtée et les produits de digestion sont mis à migrer sur un gel d'agarose 1,4% sous une tension de 100 volts suivie d'une visualisation sous UV.

a)



b)



c)



Figure 2: Profils RAMs obtenus après amplification des ADN avec l'amorce (CAGA)₆

a)-**M** S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 11 K1 K2 SL1 **M**

b)-**M** SL2 III Mba Mbj PJ1 PJ2 1 12 V V' Sip2 Sip2' Sip3 Sip3' T5 **M**

c)-**M** C2 3 4 5 7 8 13 15 16 21 23 25 27 28 31 32 Té **M**

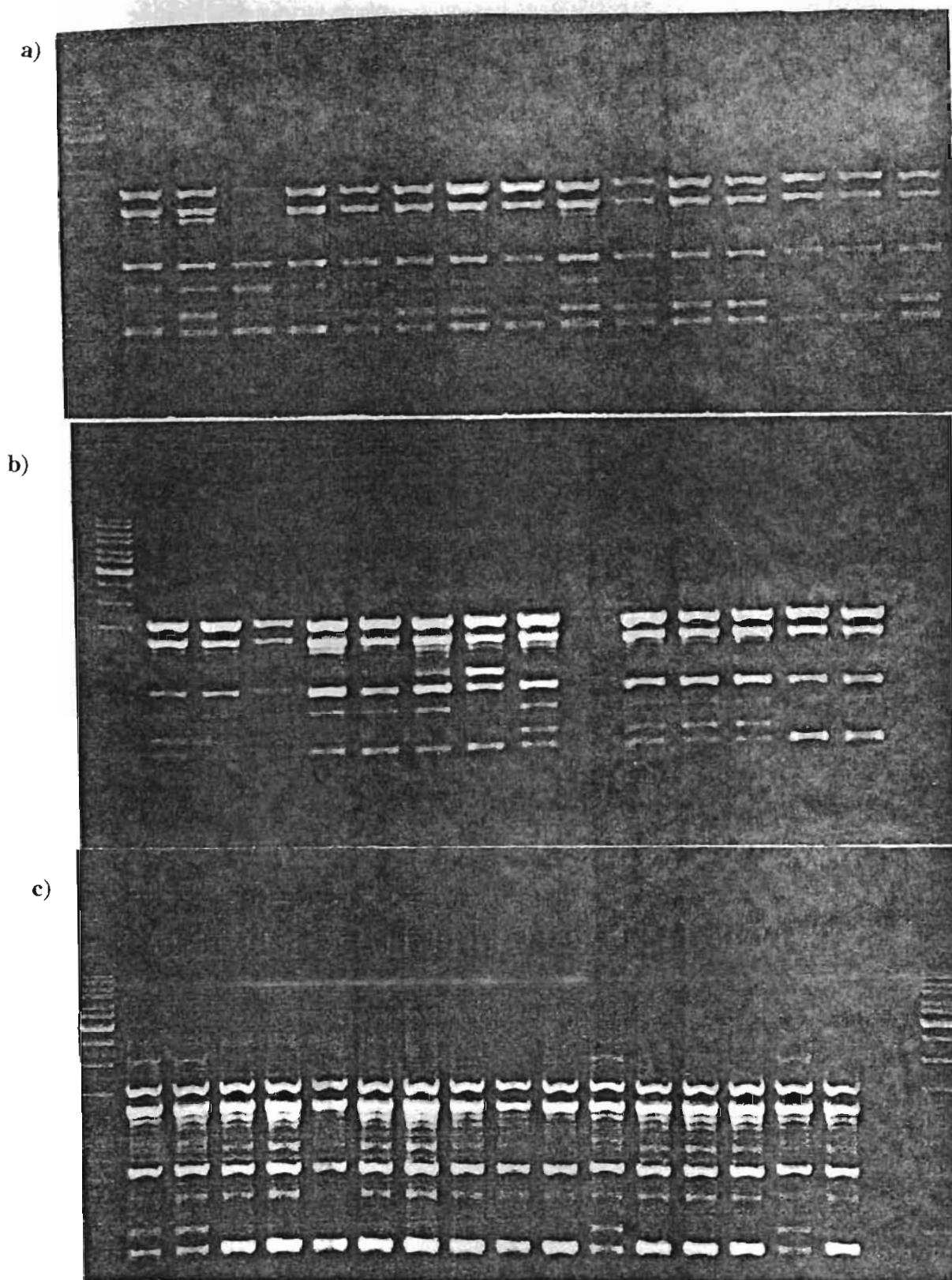


Figure 3: Profils RAMs obtenus après amplification des ADN avec l'amorce (AAC)7

a)-M S0 S1 S2 S2' S3 S4 S5 S6 S8 S9 S10 11 K1 K2 SL1

b)-M SL2 III Mba Mbj PJ1 PJ2 I 12 V V' Sip2 Sip2' Sip3 Sip3' T5

c)-M C2 3 4 5 7 8 13 15 16 21 23 25 27 28 31 32 Té M

Tableau 2 : Résultats partiels du test de pouvoir pathogène

Isolat >>	S0	S1	S2	S2'	S3	S4	S5	SL1	SL1	PJ1	PJ2	S7	S10	Mba	C16	C27	C28	C31
soxna	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
K.B.ND.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	S	S	S	S
rossol	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	-	-	-	-
romitel	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	-	S	-	-	-	-
xina	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S

III - RESULTATS

31- Le pouvoir pathogène

Les résultats, encore partiels, obtenus en 1998 et 1999 sont résumés dans le **tableau 2**, et montrent que: toutes les souches sont pathogènes sur les deux variétés d'aubergine du Sénégal.

Toutes les souches présentent une interaction différentielle avec les deux aubergines du Burkina Faso.

Ces tests d'inoculation expérimentales se poursuivent, cependant nous avons réduit la gamme d'hôtes.

32- Les ADN utilisés dans cette étude

Au total les ADN de 46 isolats ont été utilisés: les 30 viennent de la précédente étude, les 16 sont les nouveaux de la présente étude. Les dilutions au 100ème ont été utilisées.

33 - Analyse des résultats RAMs

*Mise au point technique

Différentes températures pour l'appariement des amorces à l'ADN ont été testées. La température d'hybridation de 55°C a été retenue.

* Les amorces

Parmi les amorces à séquences répétitives appliquées aux 46 isolats, certes cinq ont donné une amplification, mais seules (CAGA)₆, (AAC)₇ et (AAAG)₆ ont généré des bandes polymorphes, et après analyse nous en avons retenu (CAGA)₆ et (AAC)₇ pour rapprocher les isolats. **figures 2 et 3**.

Pour les amorces choisies, l'amplification a généré entre 7 et 12 bandes d'intensité différente. Les rapprochements donnent trois groupes selon la similitude des profils:

Les isolats du Sénégal appartenant à l'espèce *Stemphylium solani* (comme montré dans le rapport précédent grâce à l'alignement de séquences des rDNA ITS de *Stemphylium botryosum* - *Pleospora herbarum* et des souches du Sénégal) sont répartis dans les deux groupes notés 1 et 2 à côté du seul isolat d'Avignon formant le 3ème groupe et qui appartient à une espèce différente que nous n'avons pas déterminée .

Figure 4: Profils RAPD obtenus après amplification des ADN avec l'amorce OPF 14

M 2 3 4 5 7 8 13 15 16 21 23 25 27 28 31 32 T So Mba T5

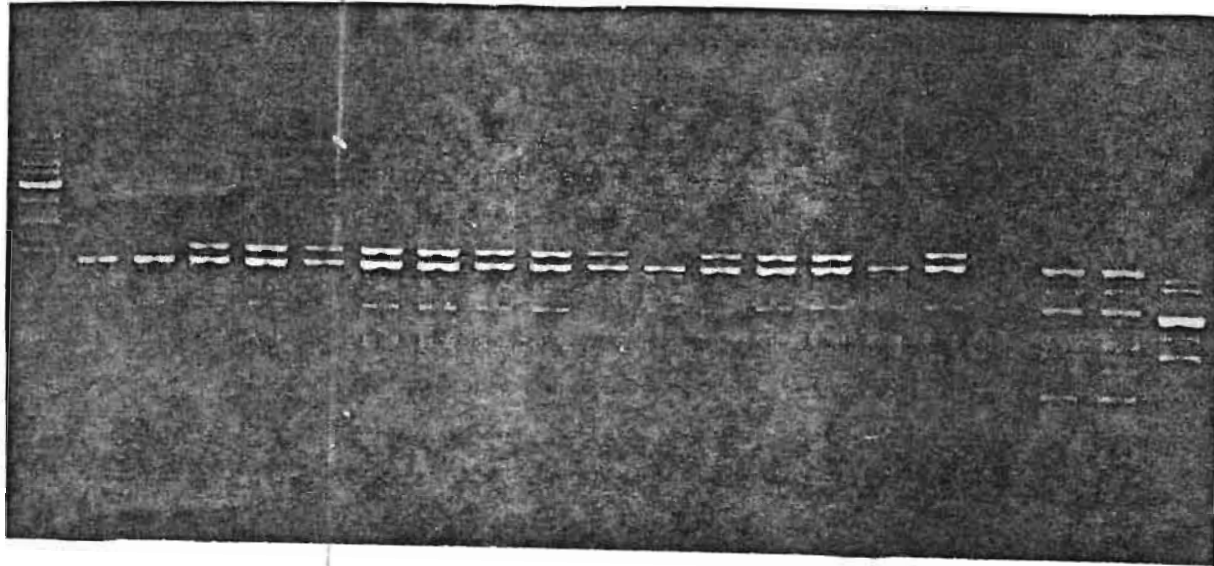


Figure 5: Profils RAPD obtenus après amplification des ADN avec l'amorce OPF 13

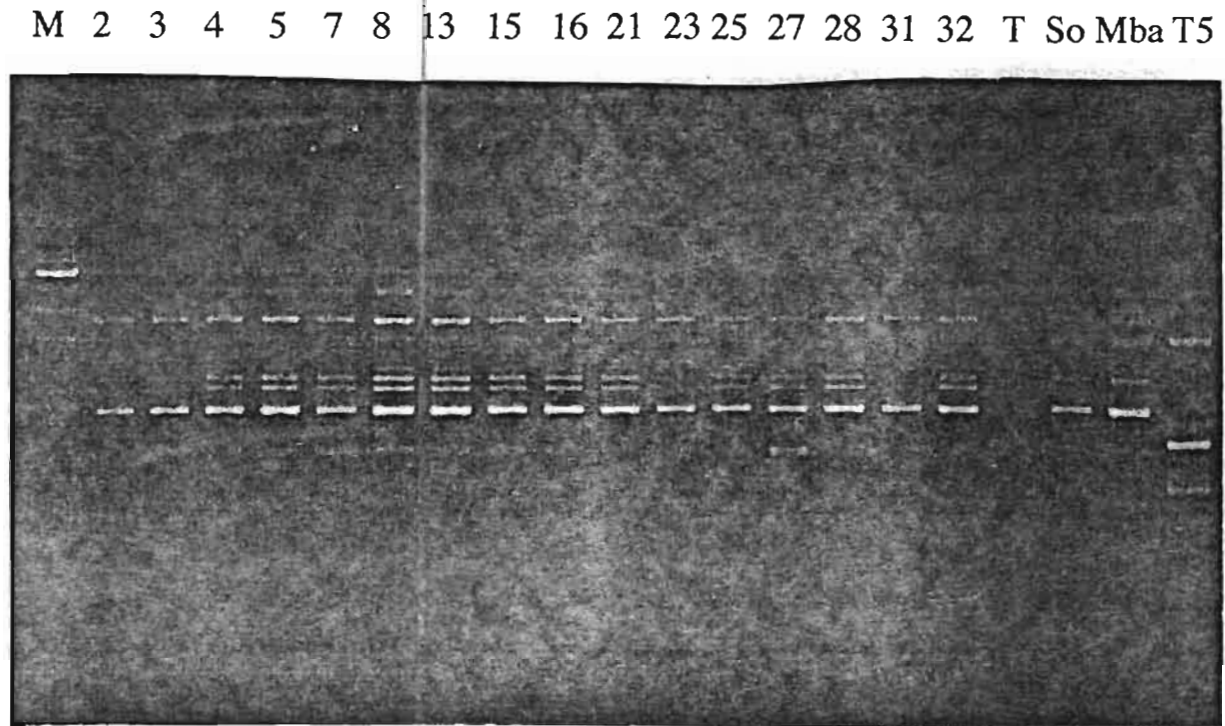
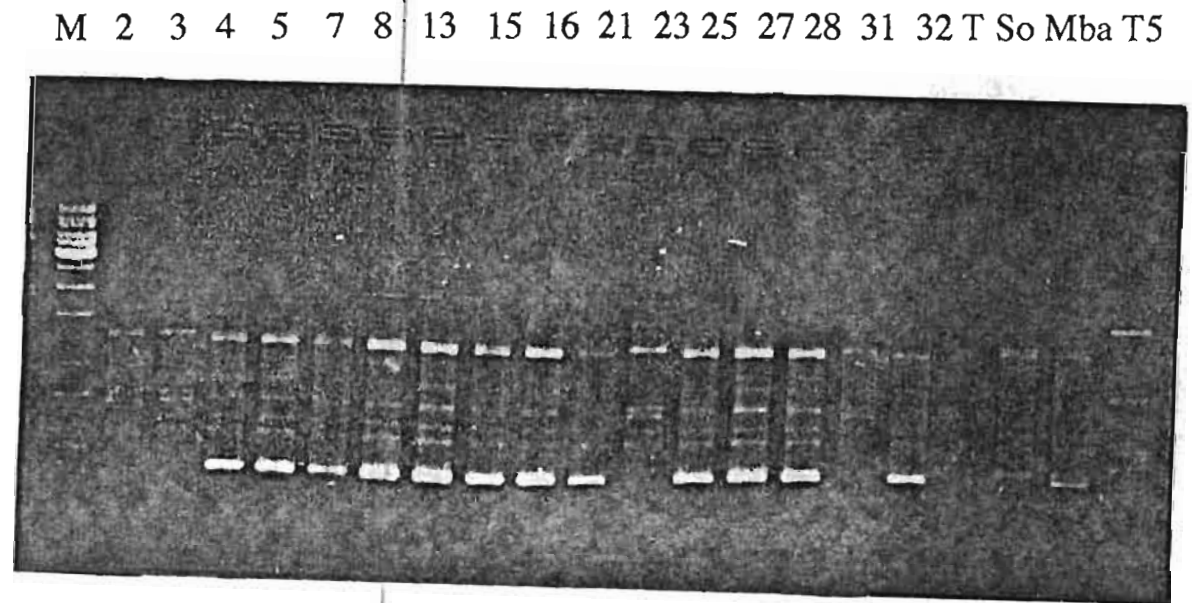


Figure 6: Profils RAPD obtenus après amplification des ADN avec l'amorce OPF 20



Groupe 1	Groupe 2	groupe 3
So - S2 - S2' - S5 - S6 - S10 - 11 - K1 - K2 - SL1 - MBJ - PJ1 -V - V' Sips3 Sips3'- 4 - 5 - 7 - 8 - 13 - 15 - 16 - 21 - 25 - 27 - 28 - 32.	S1 - S3 - S4 - S8 - SL2 -III - MBa -I - Sips2 - Sips2' - 2 - 3 - 23 -31 -	T5

34- Analyse des résultats RAPD

Parmi les 14 amorces testées, 8 ont donné une bonne amplification (OPF2-OPF4-OPF6-OPF8-OPF10-OPF13-OPF14 et OPF20) et seuls 3 d'entre elles (OPF 02 - OPF 13 - OPF 20) ont été retenues pour l'analyse.

D'une manière générale, les fragments d'ADN amplifiés obtenus pour chaque amorce donnent des profils relativement simples contenant plusieurs bandes d'intensité différente. Certaines amorces génèrent plus de bandes que d'autres différences. Ces profils présentent des différences (apparition ou disparition de bandes) avec cependant beaucoup de bandes communes à tous les isolats. Ceci révèle une grande parenté entre les isolats du Sénégal.

Les profils RAPD obtenus avec chaque amorce sont reproductibles dans des tests séparés. Les amorces retenues (OPF 14 - OPF 13 - OPF 20) présentent des bandes polymorphes nettes (**figures 4 ,5 et 6**) et ont permis de ranger les isolats dans trois groupes notés profil 1, 2 et 3 sur la base de la similitude des profils obtenus, comme suit:

Profil-1	Profil-2	Profil 3
So - S2 - S2' - S5 - S6 - S9 - S10 - 11 - SL1 - SL2 - MBa - PJ1 - 12 - V - V' - Sips3 - Sips - 4 - 5 - 8 - 13 - 15 - 16 - 21 - 25 - 27 - 28 - 32.	S1 - S3 - S4 - S8 - K1 - K2 - III - MBj - 1 - Sips2 - Sips2' 2 - 3 - 23 - 31.	T5

Figure 7 : Amplification par PCR des ITS des souches de *S. solani*

M 2 3 4 5 7 8 13 15 16 21 23 25 27 28 31 32 M S3 Mba Mbj T5 Teau

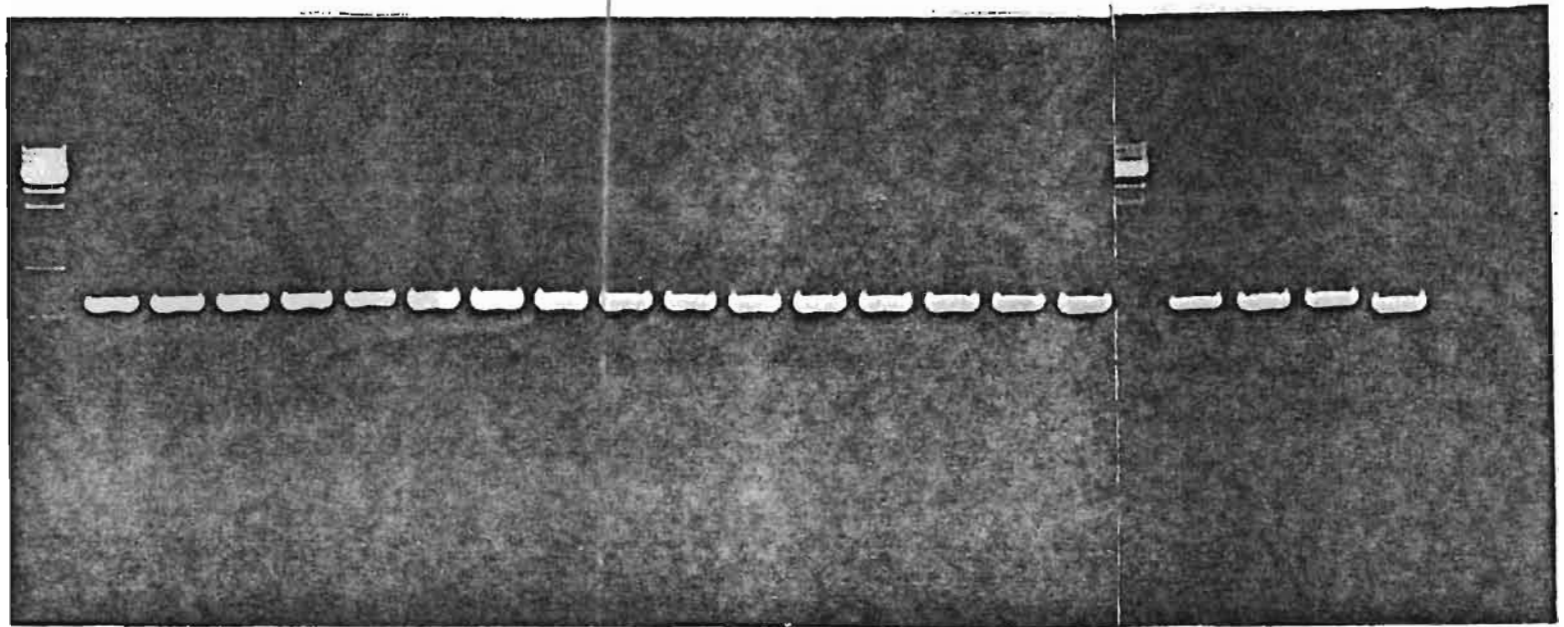
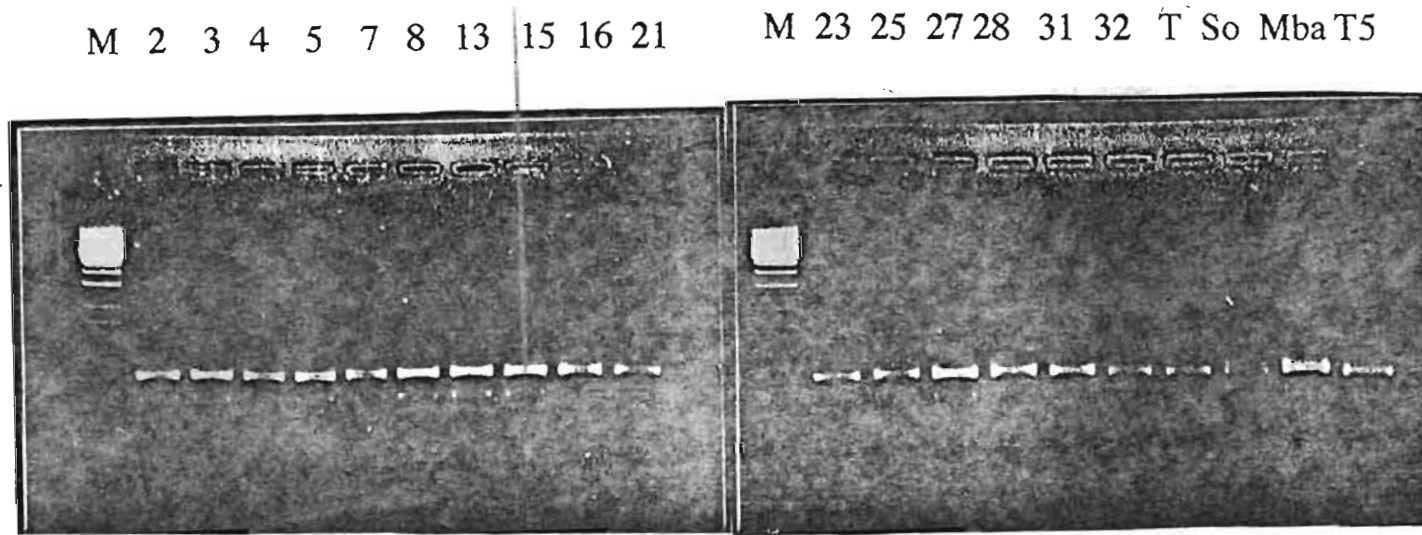


Figure 8: Profil de restriction résultant de la digestion des ITS par Nde II



35 - Analyse de la PCR/RFLP

Une bonne amplification par PCR de la région ITS a été obtenue par tous les isolats considérés. Dans le travail précédent (1998), nous avons obtenu une seule bande pour les 29 isolats provenant du Sénégal, cette bande était à environ 600 paires de bases (pb) et une bande de taille différente pour l'isolat d'Avignon à environ 500 pb.

Pour le présent travail, nous avons amplifié l'ITS des 16 nouvelles souches et y avons ajouté 3 représentants de souches de 1998 et la souche d'Avignon.

La **figure 7** montre les ITS amplifiés par PCR. Pour tous les isolats l'ITS a une taille d'environ 600 pb à la seule différence de l'ITS de l'isolat d'Avignon qui fait environ 500pb.

Les profils obtenus après digestion par *Hae* III, *Eco* RI et *Msp* I n'ont pas généré de polymorphisme.

La digestion de l'ITS par *Nde* II (**figure 8**) donne deux types de profil:

deux bandes identiques pour toutes les souches et deux autres bandes de taille différente pour l'isolat T5.

Il ressort de cette analyse que tous les 45 isolats du Sénégal appartiennent à la même espèce; en effet la bande ITS a la même taille pour toutes les souches, de plus la restriction de cet ITS donne pour chaque enzyme le même profil . Par comparaison, l'isolat T5 appartient à une espèce différente de *S. solani* par sa bande ITS de taille différente et par ses profils de restriction différents de ceux du premier lot.

Ici la restriction n'a pas révélé de polymorphisme, donc n'a pas pu différencier les souches du Sénégal.

IV - CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Nous étions arrivés à une première conclusion dans le précédent rapport et nous le confirmons dans le présent travail : toutes les souches à l'exception de celle d'Avignon appartiennent à la même espèce de *Stemphylium solani*, tandis que la souche d'Avignon appartient à une autre espèce différente de *S. solani* mais que nous n'avons pas encore déterminée.

En faisant des recoupements entre les résultats des différentes techniques (RAMs et RAPD), et en les comparant aux résultats issus du premier travail, nous avons pu réaliser deux groupements avec l'ensemble des 45 souches. Les résultats obtenus dans tous les cas sont similaires. T5 donne toujours à lui seul un troisième profil toujours différent des deux premiers.

Les tests de pouvoir pathogène se poursuivent et nous verrons si les différences observées avec les approches déjà utilisées correspondent à une différence au niveau du comportement des souches face à la gamme d'hôtes.

De nouveaux échantillonnages et isolements sont également prévus pour étendre cette étude naissante à l'ensemble du territoire sénégalais et pourquoi pas au delà.

V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bruns, T.D., White, T.J. & Taylor J. W.**, 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 22, 525 - 564.
- Chen, W.**, 1992. Restriction fragment length polymorphism in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Phythium* species. Phytopathology 82, 1467 - 1472.
- Hantula, J. Dusabenyagasani, M. & Hamelin, R.**, 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. European Journal of Forest Pathology, in press.
- Lee, S. B. & Taylor, J. W.** 1992. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Molecular Biology and Evolution 9, 636 - 653.
- Mullis K. B. et Faloona**, 1987. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction . Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 51, 263 - 273.
- Saiki R. K., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlih H. A., and Arnheim N.**, 1985. Enzymatique amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230 : 1350 - 1354.
- Welsh, J. and Mc Clelland, M.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res.18 : 6531 - 6535.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S.,and Taylor J. W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to Methods and Applications (ed. M.A. Innis, D.H. Gefland, J.S. Sninsky and T.J. White) pp. 315 - 322. Ac. Press: San Diego, California.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.**, 1990bDNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18 : 6531 - 6535.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A.& Labuda, D.**, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20, 176 - 183.

VI - ANNEXES

1- Les milieux de culture

P.D.A. (Potato dextrose Agar): 200 g de pommes de terre bouillie dans 1 l d'eau, 15 g d'agarose et 10 g de dextrose.

V8 agar (Jus de légumes V8- agar): 200 ml de jus de légumes-V8, 800 ml d'eau, 18 g de CaCO₃ et 15 g d'agarose.

P.D.B. (Potato-déxtrose Broth): 125 g de purée de pommes de terre et 10 g de dextrose pour 1 l d'eau.

2- Les tampons

Tampon T.E.

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

Tampon de lyse

Tris-HCl	10 mM, pH 8,0
EDTA	50 mM, pH 8,0
SDS	3%
β-mercaptoéthanol	1%

Tampon de réaction d'amplification

Tris-HCl	750 mM, pH 9,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM

Tampon d'électrophorèse

T.A.E.

Tris-Acétate	40 mM, pH 8,0
EDTA	1 mM, pH 8,0

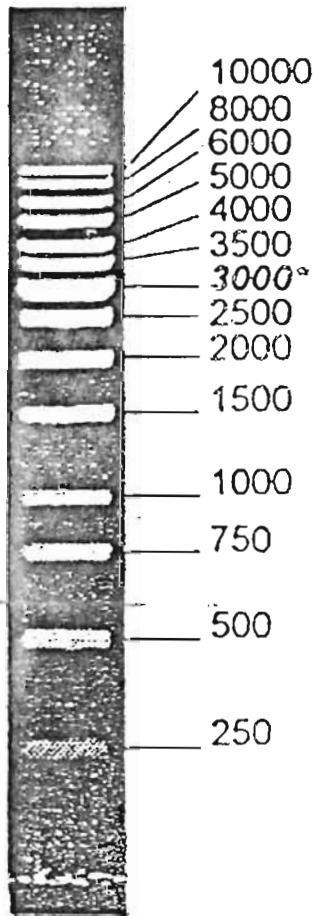
Tampon de charge

Saccharose dans H ₂ O	40%
Colorant Orange G	

Annexe - 3

3 - Le marqueur de poids moléculaire: marqueur 1Kb

- marqueur 1Kb



1.0% agarose

Annexe - 4

Enzymes de restriction utilisées et leurs sites de restriction:

<i>Alu I</i>	5' ...AG ↓ CT ...3' 3' ...TC ↑ GA ...5'
<i>Hae III</i>	5' ...GG ↓ CC ...3' 3' ...CC↑ GG ...5'
<i>Msp I</i>	5' ...C↓ CGG ...3' 3' ...GGC ↑ C ...5'
<i>Nde II</i>	5' ...↓ GATC ...3' 3' ...CTAG ↑...5'
<i>EcoR I</i>	5' ...G ↓ AATTC ...3' 3' ...CTTAA ↑G ...5'