

## SOMMAIRE

<b>RESUME.....</b>	<b>2</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES ANNEXES.....</b>	<b>8</b>
<b>I INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>LA PRESENTATION GENERALE DE L'ENTREPRISE.....</b>	<b>11</b>
<b>II REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Les Champignons.....</b>	<b>13</b>
2.1.1. Caractères généraux.....	13
2.1.2. Les champignons lignivores.....	13
La pourriture cubique ou brune.....	14
La pourriture fibreuse ou blanche.....	15
La pourriture molle.....	15
2.1.3. Place des champignons lignivores dans la classification.....	16
<b>2.2. La notion d'espèce.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Le concept de biodiversité des espèces.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4. Méthodes de caractérisation taxonomique applicables aux champignons.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5. Conclusion.....</b>	<b>24</b>
<b>III MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Echantillonnage.....</b>	<b>25</b>
Le réseau des placettes permanentes en Guyane.....	25
La récolte des fructifications fongiques.....	26
<b>3.2. Isolement et production de mycélium.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3. Etudes moléculaires.....</b>	<b>31</b>
3.3.1. Extraction de l'ADN fongique.....	31
3.3.2. Amplification du gène de la petite sous unité ribosomique 18 S (SSU).....	32
3.3.3. Séquençage des produits de PCR.....	35
3.3.4. Purification des produits de séquençage.....	36

3.3.5. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données-BLASTn.....	37
3.3.6. Constitution d'un fichier de séquences de référence.....	37
<b>IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>38</b>
4.1. La récolte des fructifications.....	38
4.2. La culture des isolats.....	38
4.3. Extraction de l'ADN.....	40
4.4. Amplification du gène de la petite sous unité ribosomique 18 S (SSU).....	40
4.3. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données- .....	41
<b>V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>46</b>
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>47</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme du CIRAD.....	12
Figure 2. Le champignon de pourriture cubique <i>Serpula lacrymans</i> attaquant un bois indéterminé .....	14
Figure 3 : La flèche jaune montre le champignon de pourriture fibreuse, <i>Coriolus versicolor</i> attaquant le bois dans le sens des fibres du bois.....	15
Figure 4 : Organisation génétique de l'opéron codant pour les ARN ribosomiques procaryotes.....	22
Figure 5 : L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes.....	23
Figure 6. Le réseau des placettes permanentes en Guyane.....	25
Figure 7 : La lisière du site forestier de Paracou.....	26
Figure 8 : Le chemin forestier est inaccessible à cause de la montée des eaux .....	28
Figure 9 : Fructifications sur un angélique ( <i>Dycorynia guianensis</i> ) .....	29
Figure 10 : Fructifications sur un arbre sur pied.....	30
Figure 11 : Fructifications sur une feuille.....	30
Figure 12 : Isolement en boîte de Pétri, à partir d'une fructification fongique.....	31
Figure 13 : Schéma du gène nucléaire ribosomique 18 S (SSU) et des amorces définies pour les champignons .....	33
Figure 14 : Exemples de gels de PCR.....	34
Figure 15 : Exemple d'une partie d'un électrophorégramme obtenu.....	36

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Résultats de l'identification par BLASTn .....	41
Tableau 2 : Recherches de similarité de nos séquences avec les séquences des banques de données.....	43

## **LISTE DES ANNEXES**

<b>Annexe 1:</b> Liste présentant la référence des isolats, la date de prélèvement, le nombre de repiquage qu'il a fallu pour l'obtention de la souche pure et l'origine du substrat.....	51
<b>Annexe 2 :</b> Quantification de l'ADN extrait en ng/ml.....	53
<b>Annexe 3 :</b> Liste des espèces identifiées par BLASTn avec leur ordre et leur classe .....	55

## I. INTRODUCTION

La forêt guyanaise se caractérise par une très grande diversité en espèces d'arbres puisque l'on en compte à ce jour plus de 1200 espèces, contre moins de 200 recensées en métropole. Parmi ces espèces, certaines sont remarquables de part leur grande résistance face aux rigueurs du climat (taux d'humidité élevé) et aux processus de décomposition. Ces processus induisent la production de systèmes enzymatiques spécifiques et uniques chez les champignons lignocellulolytiques.

A l'heure actuelle, la diversité des champignons lignocellulolytiques tropicaux est encore très mal connue ainsi que la gamme des enzymes capables de dégrader les lignocelluloses présentes dans des espèces d'arbres ayant un bois très résistant. Selon le rapport de diversité entre les champignons filamenteux et les végétaux supérieurs en zone tropicale (d'au moins 5 pour 1 selon Roberts et Spooner, 2000) et le nombre de plantes recensées en Guyane de l'ordre de 5000 la biodiversité fongique est estimée à 25 000 espèces dont seules 3 % sont décrites. Nous ciblerons dans ce travail les champignons en particulier ceux qui dégradent le bois. Selon leur phénotype, ceux-ci peuvent être classés en : « pourritures blanches ou fibreuses » (essentiellement des basidiomycètes dont l'activité ligninolytique est prépondérante), « pourritures brunes ou cubiques » (essentiellement des basidiomycètes à la fois ligninolytiques et hémicellulolytiques), et en « pourritures molles » (deutéromycètes hémicellulolytiques en particulier *Trichoderma* et *Aspergillus*).

A ce jour, les méthodes classiques basées sur la description de caractères morphologiques et anatomiques des champignons demeurent incontournables. Cependant, elles possèdent des limites pour la caractérisation et l'identification de ces champignons, au niveau inter et intraspécifique. Elles restent fastidieuses et le plus souvent ne permettent pas l'identification des cultures mycéliennes.

Il apparaît indispensable de proposer de nouvelles alternatives pour l'identification des champignons dégradant le bois. Les techniques moléculaires combinant amplification et séquençage semblent particulièrement adaptées (Zaremski et *al.*, 2005). Dans cette étude les outils moléculaires comme la réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR) et le séquençage vont permettre une caractérisation suffisante pour reconnaître un taxon fongique. L'identification sera réalisée en comparant la séquence de la souche de champignon à identifier aux séquences de la banque GENBANK ([www.ncbi.org](http://www.ncbi.org)). Dans ce cadre

d'application, les banques de séquences sont un élément essentiel de la caractérisation taxinomique.

L'ensemble des études entreprises au cours de ce travail\* ont été menées avec des objectifs multiples:

- appréhender la diversité des fructifications fongiques du site forestier de Paracou en Guyane dont la microflore est peu ou pas connue, et la caractériser d'un point de vue taxinomique.
- constituer une collection d'isolats fongiques à partir de ces fructifications fongiques
- caractériser les isolats taxinomiquement originaux.

En plus des objectifs précédemment énumérés, cette approche taxinomique devrait aboutir à une meilleure connaissance de la diversité fongique, en particulier les champignons qui dégradent les bois.

Dans ce document, après une revue bibliographique visant à une meilleure connaissance des champignons en particulier ceux qui dégradent le bois, le thème de recherche développé sera destiné à préciser et fiabiliser la caractérisation et l'identification des champignons issus de collectes de fructifications fongiques du site forestier de Paracou en Guyane. En conclusion, nous insisterons particulièrement sur les perspectives fondamentales et appliquées offertes par tous ces outils de caractérisation moléculaire.

\*Stage en relation avec le projet E-TRICEL : Exploration de la biodiversité enzymatique pour la complémentarité du secrétome de *Trichoderma reesei* afin d'améliorer l'hydrolyse des lignocelluloses

## **LA PRESENTATION GENERALE DE L'ENTREPRISE**

Le CIRAD (Centre de coopération International Agronomique pour le Développement) est un établissement public créé en 1984. C'est l'institut français de recherche agronomique au service du développement des pays du Sud et de l'outre-mer français. La mission première du CIRAD est de « contribuer au développement rural des régions chaudes, par des recherches et des réalisations expérimentales, principalement dans les secteurs agricoles, forestiers et agroalimentaires ».

En 2008, environ 1840 agents, dont 1100 cadres scientifiques, travaillent au sein de cet établissement dont le siège social est à Paris, dirigé par Gérard Matheron. Le CIRAD comprend 52 unités de recherche réparties en trois départements :

- Systèmes biologiques (Bios) concernant la caractérisation et l'exploitation du vivant.
- Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux (Persyst) en lien avec les processus biologiques en interaction avec l'environnement ;
- Environnement et Sociétés (ES) qui exploite les relations entre l'agriculture, la gestion des ressources naturelles et les dynamiques sociales.

Les départements sont composés d'Unités de recherche, d'Unités de service et de services d'appui. Les unités de recherche en Métropole peuvent être propres (UPR), c'est-à-dire composées d'agents du CIRAD exclusivement, mixtes (UMR), c'est-à-dire composées d'agents du CIRAD et d'autres collectifs, Universités, Organismes de recherche ...

### **Présentation de l'UPR 39 : Diversité génétique et amélioration des espèces forestières**

L'Unité Propre de Recherche 39 du CIRAD-BIOS a pour objectif de mesurer l'impact des processus biotiques, abiotiques induits par l'activité humaine sur l'expression et l'évolution des caractères, et donc sur le comportement des espèces arborées. Elle conçoit des stratégies de gestion de la diversité intra spécifique dans les domaines de l'amélioration génétique, de l'aménagement des espaces forestiers et agroforestiers, de la conservation des espèces menacées et de la restauration des forêts dégradées.

Cette Unité de Recherche consiste à produire également des connaissances sur les champignons lignocellulolytiques dans le domaine de l'interaction microorganisme-arbre-environnement afin de mieux comprendre le rôle des facteurs environnementaux dans la



prédisposition des arbres aux attaques de pathogènes et le rôle de l'affaiblissement de la plante hôte (arbre) par différents facteurs dans sa colonisation par les microorganismes.

## Présentation de l'Unité Mixte de Recherche Ecologie des Forêts de Guyane (UMR EcoFoG) :

L'UMR Ecologie des Forêts de Guyane créée en 2001 et dirigée par Bernard THIBAUT regroupe les forces scientifiques de l'INRA, de l'ENGREF et du CIRAD, sur Kourou, avec un objectif scientifique restreint aux aspects de fonctionnement et de gestion de l'écosystème.

Les recherches conduites par l'Unité, centrées sur l'objet d'études « écosystèmes forestiers guyanais », ont pour but de contribuer à répondre à la question « Quelles sont les relations entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes forestiers ? ». Le projet est d'intégrer différentes approches en écologie et sciences des matériaux pour :

- D'une part comprendre les relations entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes forestiers exploités et en évolution sous les pressions climatiques et anthropiques,
- D'autre part susciter l'innovation dans la valorisation des ressources forestières dans le contexte de cette forte biodiversité en tenant compte des contraintes d'utilisation liée au milieu tropical humide.

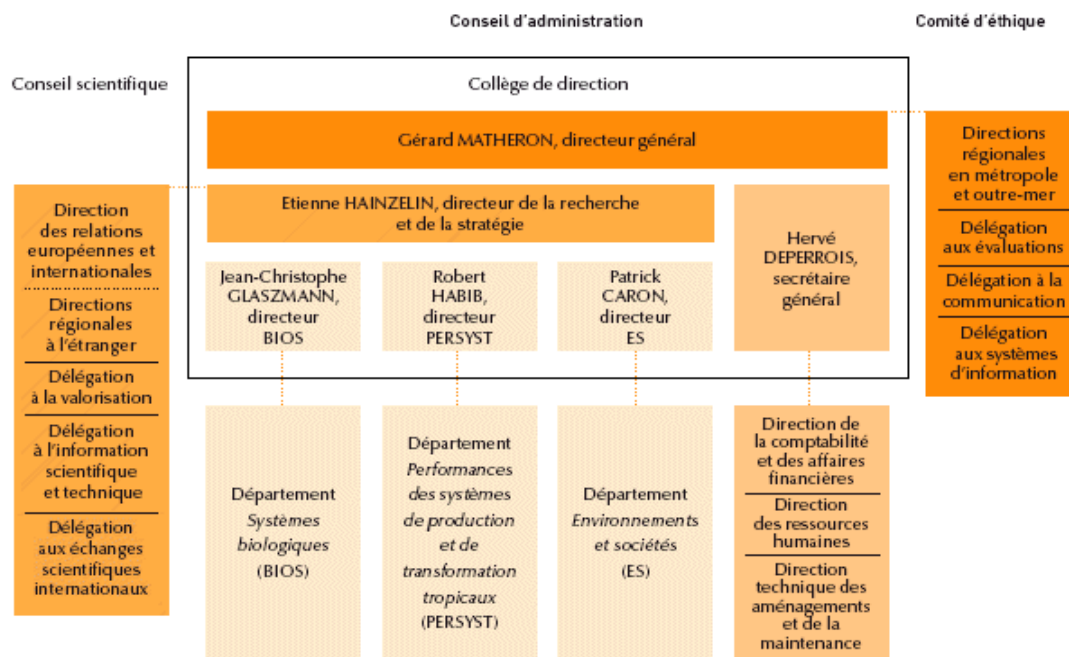


Figure 1 : Organigramme du CIRAD

## II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.1. Les Champignons

#### 2.1.1. Caractères généraux

Longtemps considérés comme des végétaux, les champignons forment, aujourd'hui, un règne à part entière : le règne des *Fungi* (du latin *fungus*, le champignon), qui compte environ un million d'espèces. Ce sont des organismes eucaryotes, c'est-à-dire possédant un véritable noyau, qui se différencient principalement des végétaux par leur absence de pigments chlorophylliens ce qui les rend incapables de synthétiser la matière carbonée indispensable à leur nutrition. Ils doivent donc vivre aux dépens des produits carbonés élaborés par d'autres organismes, autotrophes, vivants ou morts. Ainsi, ils se nourrissent soit en décomposant de la matière organique morte, ils sont alors qualifiés de saprophytes, soit au détriment d'autres organismes, ils sont alors parasites, ou bien encore en vivant en symbiose avec des organismes chlorophylliens.

Le bois, étant naturel et de composition organique, est susceptible d'être altéré par ces champignons qui se développent en présence d'une humidité supérieure à 20%. En effet, il contient les substances carbonées qui leurs sont nécessaires. Les champignons se développant en surface ou à l'intérieur du bois sont appelés lignicoles mais cette dénomination générale ne prend pas en compte l'action du champignon sur le bois. On distingue alors deux classes :

- Les **champignons lignicoles vrais** qui se développent sur le bois en lui tirant des substances nutritives ou de réserve, comme l'amidon, mais sans dégradation de ses constituants. Cela ne provoque ainsi seulement qu'un désordre esthétique.
- Les **champignons lignivores** qui, en plus de se développer sur le bois, le dégradent puisqu'ils entraînent une destruction des composants majoritaires du bois, à savoir la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Cela provoque ainsi une pourriture conduisant à une perte de la résistance mécanique.

#### 2.1.2. Les Champignons lignivores

Ils appartiennent majoritairement aux classes des Basidiomycètes, des Ascomycètes et des Deutéromycètes. Pour se développer, un des facteurs les plus importants est l'humidité : en effet, tant que le bois conserve une humidité inférieure ou égale à 20%, il demeure insensible à l'attaque des champignons. L'humidité optimale pour le développement du mycélium se situe entre 30% et 50% selon les espèces.

Quand ils se développent et puisent dans le bois les éléments nécessaires à leur survie, ces champignons engendrent la pourriture du bois, c'est-à-dire, une détérioration profonde et irréversible de ses propriétés par hydrolyse enzymatique. Ils atteignent l'intégrité du bois en agissant au niveau structural : le champignon met à profit les éléments constitutifs de la paroi en sécrétant des enzymes qui dégradent la cellulose et la lignine. Cela entraîne un affaiblissement, voire la destruction complète des propriétés mécaniques, physiques, chimiques et esthétiques du bois.

Cependant, les champignons lignivores diffèrent selon leur mode d'action. Ainsi, on distingue différents types de dégradations entraînant trois types de pourritures possibles : la pourriture cubique (classe des Basidiomycètes), la pourriture fibreuse (classe des Basidiomycètes) et la pourriture molle (classe des Ascomycètes et des Deutéromycètes).

### ***La pourriture cubique ou brune***

Ils dégradent de façon préférentielle de la cellulose, la lignine reste très peu touchée. Ce phénomène n'est pas discernable extérieurement pendant les premiers stades de l'attaque, il se traduira peu à peu par une coloration foncée du bois (d'où son nom de pourriture brune) et l'apparition de fentes longitudinales puis transversales délimitant des structures plus ou moins cubiques. Le bois est très altéré dans sa structure et devient friable. La phase ultime de la dégradation conduit à une perte totale des résistances mécaniques.

On trouve notamment : *Serpula lacrymans* (la méréule), *Coniophora puteana* (le conioaphore), *Poria vaillantii*, *Gloeophyllum trabeum*...



Figure 2. Le champignon de pourriture cubique *Serpula lacrymans* attaquant un bois indéterminé

### ***La pourriture fibreuse ou blanche***

Tous les constituants des membranes sont touchés mais la lignine est dégradée préférentiellement. On peut distinguer deux groupes de pourriture fibreuse, les premières qui sont capables de dégrader simultanément les polymères structuraux c'est-à-dire, lignine, hémicelluloses et cellulose dans une proportion similaire (simultaneous white rot) tandis que les secondes ont une préférence pour dégrader la lignine et les hémicelluloses avant d'attaquer la cellulose (preferential white rot) (Eaton et Hale, 1993). Les champignons fibreux sont les seuls capables de dégrader totalement la lignine. Le bois attaqué conserve en partie sa structure et son aspect n'est modifié que par un changement de couleur, il prend une consistance molle et n'est pas friable. Ce type de pourriture n'est pas discernable macroscopiquement, pendant les premiers stades, mais peu à peu le bois subit une décoloration progressive conduisant à une couleur blanchâtre et se décompose en fibrilles.

Le champignon fibreux le plus étudié est *Coriolus versicolor* mais on peut citer également : *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus Ostreatus*...



Figure 3 : La flèche jaune montre le champignon de pourriture fibreuse, *Coriolus versicolor* attaquant le bois dans le sens des fibres du bois.

### ***La pourriture molle***

Ce type de pourriture est plus rare car ces champignons exigent une humidité élevée pour se développer. Ils sont capables de dégrader la cellulose, les hémicelluloses et parfois la lignine mais de façon partielle. La pourriture molle est caractérisée par un ramollissement superficiel du bois qui devient alors noirâtre, modifiant ainsi ses propriétés physiques et mécaniques.



### 2.1.3. Place des champignons lignivores dans la classification

Le règne des champignons se distingue du règne végétal par l'absence de photosynthèse dans sa nutrition et du règne animal par le fait que les champignons n'ingèrent pas leur nourriture mais l'absorbent. Les espèces du règne fongique sont réparties dans les quatre divisions suivantes : *Gymnomycota*, *Deuteromycota*, *Mastigomycota* et *Amastigomycota*. Suivant les auteurs, la classification des champignons comprend, cinq ou six grands groupes, dont deux sont parfois regroupés : les Myxomycètes et les Archimycètes. Pratiquement, aucun champignon lignivore n'est présent dans ces groupes. Par contre, les Phycomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Champignons imparfaits comprennent un grand nombre d'espèces qui dégradent le bois. À ce sujet dans la classification et la nomenclature, nous suivrons le Synopsis Fungorum 7 de Ryvarden et Gilbertson (1993). Cependant, il faut rappeler que la classification systématique des champignons peut avoir un caractère subjectif. En effet, pour les champignons, la notion de taxon ou d'espèce telle qu'elle est définie pour le règne végétal ou animal, conduit à une interprétation complexe du fait de la difficulté (voire l'impossibilité) de constater les capacités de reproduction croisée et de fertilité de la descendance pour la plupart des espèces (Ainsworth *et al.* , 2001 ; Burnett, 2003).

La division des *Amastigomycota* regroupe les champignons à reproduction sexuée, on y retrouve selon le type d'hyphes, quatre sous-divisions : les Zygomycètes, à hyphe syphonnée, les Glomeromycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes, à hyphe cloisonnée.

Dans cette étude, nous nous intéressons particulièrement aux Ascomycètes et aux basidiomycètes :

#### - Les Ascomycètes :

Ils se caractérisent par une reproduction sexuée donnant des ascospores contenues dans des asques. Certains sont à l'origine de pourriture cubique, fibreuse ou molle et aussi à l'origine des discolorations des bois comme *Ceratocystis picea* et *Pullularia pullulans*. On y retrouve des champignons importants tant par leur pathogénie humaine (Onyogénales), leur pathogénie agricole (Erysiphales ou oïdiums de la vigne, du rosier, etc.), leur renom culinaire avec les morilles et les truffes, que par la quasi disparition de l'orme champêtre en Europe dû au *Ceratocystis ulmi*.

#### - Les Basidiomycètes :

Ils se caractérisent par une reproduction sexuée donnant des basides portées par des basidiocarpes. On y trouve des agents bien connus, tout d'abord sur le plan agronomique avec

les Urédinales (responsable de la rouille des plantes), les Ustilaginales (agents du charbon des plantes), mais aussi sur le plan gastronomique (champignons de Paris, pleurotes, cèpes, chanterelles, ...) ou encore des champignons réputés pour leur toxicité tels que l'amanite phalloïde. C'est également dans cette sous-division qu'on retrouve la plupart des champignons des pourritures fibreuse et cubique.

On compte deux classes chez les Basidiomycètes : les Téliomycètes et les Hyménomycètes.

Pour la classe des Téliomycètes, on peut citer comme exemple de genres : *Gymnosporium* et *Leucosporidium*. Dans la classe des Hyménomycètes sont regroupés la majorité des champignons lignivores. Cette classe est elle-même divisée en deux sous-classes :

- La sous-classe des Phragmobasidiomycetidae : ce sont des champignons lignivores ou parasites. Les basidiospores germent généralement par réplication ou par formation de conidies.
  - La sous-classe des Holobasidiomycetidae : ce sont des champignons lignivores et rarement parasites; on y observe deux ordres : les Agaricales et les Aphyllophorales.
- Les Agaricales sont des champignons à hyménophores généralement lamellés, parfois tubulés ou lisses. On y retrouve des genres connus tels que *Coprinus* (coprin), *Pleurotus* (pleurote), *Armillaria* (armillaire) ou *Amanita* (amanite).
- Les Aphyllophorales contiennent des champignons à hyménophores généralement non lamellés. Les champignons lignivores appartiennent à cet ordre dont les principales familles sont : les Coniophoraceae, les Corticiaceae, les Ganodermataceae, les Hymenochaetaceae, les Polyporaceae et les Stereaceae.

## 2.2. La notion d'espèce

Une des premières traces écrites de la notion d'espèce, remonte au moins au IV<sup>ème</sup> siècle avant J.-C. avec Aristote qui dans sa classification des animaux utilisait le mot « *eidos* » pour désigner une unité élémentaire. Ce terme philosophique grec qui signifie « apparence » a été traduit en latin par le terme « *species* » d'où dérive le mot français espèce. Cependant, au cours du temps, ce terme perd son sens biologique et en acquiert d'autres. John Ray en 1686 redonne une acception moderne et biologique à ce terme. Le problème de la classification se pose alors dès la fin du XVII<sup>ème</sup> siècle et concerne essentiellement les spécimens botaniques.

Devant l'afflux de nouveaux spécimens provenant des mondes nouvellement découverts et la nécessité de pouvoir identifier facilement des plantes utiles en pharmacopée, la mise en place d'une classification s'impose.

Après toutes ces analyses, nous constatons que l'espèce a reçu une multitude de définitions, ce qui montre qu'aucune ne peut être reconnue comme universellement applicable en toutes circonstances et à toute entité biologique. En revanche, l'espèce recouvre deux concepts, celui de la classification et celui de l'évolution des taxons. Ainsi, la classification dont le but est de ranger les entités biologiques dans des catégories fixes, se heurte à la non-immuabilité des espèces. Mais pour notre objet, qui n'est pas la mycologie systématique, nous nous bornerons à une classification générale mais suffisamment précise pour que toute classification plus fine puisse s'y intégrer sans problème. Toutes les analyses suivantes sont nécessaires pour définir et pour donner un sens à l'espèce en particulier à la définition de l'espèce chez les Basidiomycètes.

### ***La Notion d'espèce chez les champignons***

L'étude systématique des champignons ne commence vraiment qu'à la fin du 18<sup>ième</sup> siècle. Les planches en couleurs de Bulliard (1752-1793) réunies sous le nom d'Histoire des Champignons, puis les travaux de Persoon (1761-1836) aboutissent au travail du Suédois Elias Magnus Fries (1794-1878), le père de la mycologie descriptive, *Systema Mycologicum* (1821) qui est son principal ouvrage.

Comme nous venons de le présenter, les concepts et définitions de l'espèce ont été longuement débattus et continuent d'évoluer. Mayden (1997) reprend 22 concepts énoncés dans la littérature définissant la notion d'espèce, dont le plus communément admis est le «*Biological species concept* » (Mayr, 1982). Ces concepts d'espèces sont basés sur des données biologiques, des homologies phénotypiques, des paramètres écologiques, et parfois des données moléculaires, l'ensemble constituant la taxonomie polyphasique, c'est-à-dire s'appuyant sur un ensemble de caractères, tant phénotypiques que moléculaires et biologiques. Chez les champignons, on observe fréquemment des populations, éventuellement sympatriques, isolées génétiquement au sein d'une espèce phénétique : aucun croisement n'est possible, sauf éventuellement à très faible fréquence, d'une population à l'autre. Un tel système d'incompatibilité est fréquent chez les Basidiomycètes (Boidin, 1986). Ces groupes d'interstérilité constituent en fait des "espèces biologiques" et peuvent parfois être corrélés à des différenciations morphologiques ou à des spectres d'hôtes distincts. Parfois pourtant, comme pour *Laccaria laccata*, *Heterobasidion annosum* ou certaines *Armillaria* (Korhonen,

1987), la définition phénétique est conservée car on néglige les interstérilités pour des raisons pratiques (critère peu opérationnel et risque de morcellement des espèces). De cette relative confusion ressort donc l'idée que la notion d'espèce reste complexe en mycologie.

### **2.3. Le concept de Biodiversité des espèces**

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne se sont notamment considérablement développées. En effet, l'étude des microorganismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturale puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxinomie. La classification des isolats était alors réalisée sur la base de caractères phénotypiques et biochimiques. Seulement, une majorité considérable des micro-organismes observés typiquement dans la nature, et estimée à plus de 99%, ne serait pas cultivable par des techniques culturales standards (Amann *et al.*, 1995). Depuis une dizaine d'années, les études de diversité microbienne ont connu un nouvel essor grâce au développement des méthodes de biologie moléculaire et en particulier des techniques basées sur les molécules d'ARN ribosomiaux. Elles permettent la description de la composition des communautés microbiennes en s'affranchissant des étapes culturales. Désormais, les cultures et la nomenclature ne constituent plus un préalable incontournable aux études de diversité.

Certains micro-organismes sont extrêmement sensibles aux conditions environnementales. Afin de cultiver ces types de micro-organismes, diverses stratégies culturales peuvent être développées. A l'avenir, la mise au point de nouveaux milieux de culture et le développement de méthodes innovantes devrait permettre de cultiver un nombre exponentiel de micro-organismes incultivés à ce jour. Les essais de cultures sur des milieux comportant des extraits cellulaires ou les cultures d'enrichissement effectuées dans des réacteurs simulant les conditions *in situ* pourraient notamment s'avérer fructueux car il est fort probable que les relations synergiques aient une place importante dans les environnements naturels

La quasi-totalité des études de diversité est effectuée en amplifiant par PCR les ADNr présents dans des échantillons naturels à partir desquels l'ADN a été extrait. La question de la fidélité de la représentativité de la microflore peut donc également se poser car cette approche possède ses propres limites et ses biais. Selon la procédure d'extraction suivie, la lyse pourra être plus ou moins sélective et la qualité des acides nucléiques plus ou moins bonne (Theron et Cloete, 2000). Par conséquent la diversité microbienne pourra être plus ou moins



correctement estimée. Les artefacts liés à la PCR peuvent également biaiser l'évaluation de la diversité. En effet, les amplifications de différents ADN-matrices (Reysenbach *et al.*, 1992; Suzuki et Giovannoni, 1996), l'influence du nombre de copies des gènes d'ARNr et leur microhétérogénéité (Farrelly *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 2000; Crosby et Criddle, 2003), l'effet de la concentration de l'ADN-matrice, la spécificité des amorces (Weisburg *et al.*, 1991) et la formation de séquences chimériques (Kopczynski *et al.*, 1994) sont des phénomènes qui sont bien connus en PCR. Outre leurs biais inhérents, les méthodes moléculaires d'analyse de la diversité les plus couramment employées ne permettent pas d'attribuer une physiologie et un métabolisme à partir des séquences détectées. Les approches culturales et moléculaires, permettant chacune de répondre à des questions différentes et bien précises, s'avèrent donc complémentaires. L'émergence de techniques culturales nouvelles et le développement de techniques permettant d'inférer à la fois une fonction et une position phylogénétique devraient considérablement améliorer notre connaissance de la diversité microbienne.

## **2.4. Méthodes de caractérisation taxinomique applicables aux champignons**

### ***L'ADN ribosomal nucléaire et le séquençage***

Les techniques de biologie moléculaire les plus utilisées pour l'analyse de la biodiversité microbienne sont basées sur l'analyse de l'ADN en ciblant des gènes. La plupart des études sont ciblées sur les gènes codant pour l'ADN ribosomal de la petite sous unité.

L'analyse de l'ARNr 16S est aujourd'hui largement utilisée pour l'étude de populations bactériennes, et l'analyse des gènes codant pour l'ARNr 18S et des espaces internes transcrits (ITS : Internal Transcribed Spacer) sont utilisés de plus en plus pour analyser les populations fongiques. Les gènes codant pour l'ARNr sont des gènes idéaux car ils possèdent des régions conservées entre toutes les bactéries ou champignons, facilitant l'alignement de séquence lorsque des comparaisons sont faites, alors que d'autres régions exhibent des degrés de variations différents, ne permettant pas la distinction entre différents groupes. L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S chez les bactéries permet une discrimination fine. Chez les champignons, la séquence du gène codant pour l'ARNr 18S ne permet qu'une discrimination au niveau des genres et très rarement au niveau des espèces, mais une information plus fine peut être obtenue par l'analyse des régions ITS (Prosser, 2002).

Nous notons donc que l'ADN ribosomal nucléaire est présent en de multiples copies à l'intérieur du génome comportant à la fois des régions variables et des régions très conservées

et la plupart des données existant actuellement concernent cette région de l'ADN. Ainsi ses variations sont relativement bien connues chez de nombreux organismes, y compris certains champignons (Butler and Metzenberg 1989, Henrion *et al.*, 1992 ; Berbee et Taylor, 1993 ; Cullings et Vogler, 1998, Hibbet et Donoghue 2001, Binder et Hibbett 2002). Les séquences nucléotidiques ont fait également l'objet de publications de plus en plus nombreuses. Elles ont porté sur des parties diverses du génome et sur des champignons très variés. Cela a permis des avancées en systématique, au niveau des classes comme par exemple chez les Basidiomycètes (Walker et Doolittle, 1982 ; Illingworth *et al.*, 1991 ; Stickwell *et al.*, 1992 ; Swann et Taylor, 1993, 1995 ; Berres *et al.*, 1995 ; Bresinsky, 1996 ; Liu *et al.*, 1997). Berbee et Taylor (1993) focalisent leurs travaux sur l'évolution en utilisant des secteurs relativement stables de l'ADN, comme la petite unité 18S de l'ARN ribosomique. À l'inverse, les sections à évolution plus rapide, comme les espaceurs transcrits en particulier les ITS, sont de plus en plus utilisés pour détecter les parentés, soit au niveau des ordres, familles et des genres (Hibbett et Donoghue, 1995 ; Moncalvo *et al.*, 1995a, 1995b ; Hallenberg *et al.*, 1996 ; Nakasone, 1996 ; Moreth et Schmidt, 2000) , soit au niveau spécifique (Kasuga *et al.*, 1993 ; Nakasone et Sytsma, 1993 ; Adams et Knopp, 1996). Boidin *et al.* (1998), en comparant 360 séquences d'ITS d'espèces de Basidiomycètes, pour la plupart des Aphyllophorales propose cinq ordres nouveaux : Péniochorales, Phlébiales, Podoscyphales, Tramétales et Vuilleminiales ainsi que cinq familles nouvelles: Acanthophysaceae, Amylostereaceae, Gloiotheleaceae, Lophariaceae et Trametaceae.

En outre, il doit être souligné, qu'aujourd'hui, aucun couple unique d'amorces ou technique d'étude de profil des communautés n'est optimal pour l'estimation de la diversité microbienne, mais ils doivent être choisis selon le but de la recherche, le groupe de microorganismes ciblés et le contenu des banques de données. Par exemple, l'analyse de la diversité fongique, sur la base de la richesse et de l'abondance relative ainsi que la dynamique de la communauté, est compliquée à la fois par la nature mycélienne des champignons et la présence potentielle des spores dans l'échantillon donné (Anderson et Cairney, 2004).

#### *Amplification par PCR et choix des amorces*

La PCR est l'acronyme anglais de "*Polymerase Chain Reaction*", réaction de polymérisation en chaîne. C'est une technique d'amplification enzymatique, grâce à la Taq polymérase qui permet, à partir d'ADN, d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment cible de cet ADN. Le choix des amorces qui encadrent la séquence cible et permettent son

amplification, est donc primordial pour l'identification des microorganismes présents dans un échantillon environnemental.

Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S de la petite sous-unité des ribosomes (Figure 4) est le plus couramment amplifié pour l'analyse de la biodiversité bactérienne (Weisburg *et al.*, 1991). Ce gène consiste en des régions conservées et variables, et le choix des amorces va conditionner l'étendue du champ taxonomique étudié. En effet, il existe aujourd'hui un grand nombre d'amorces cibles qui va permettre d'amplifier l'ADN de bactéries appartenant à différents taxons comme par exemple les Eubactéries ou les Archaeobactéries, ou alors des amorces dites universelles vont permettre d'amplifier l'ADN de toutes les bactéries. Cette approche est devenue un outil très important dans l'étude de communautés bactériennes présentes dans des échantillons environnementaux (Schabereiter- Gurtner *et al.*, 2001a).



Figure 4 : Organisation génétique de l'opéron codant pour les ARN ribosomiques procaryotes.

Les champignons, qui sont des organismes eucaryotes, ne possèdent pas les mêmes ARN ribosomiques que les bactéries qui sont des organismes procaryotes. Ils doivent donc être analysés séparément. Or, l'étude de la diversité par biologie moléculaire est moins répandue chez les eucaryotes, en particulier au niveau des champignons. Le choix des amorces et donc du gène cible à amplifier pour identifier les champignons d'un échantillon environnemental est encore discuté. Cependant l'étude de la région de l'ADN codant pour les sous-unités ribosomiques est aujourd'hui établie. La Figure 5 montre ce gène.

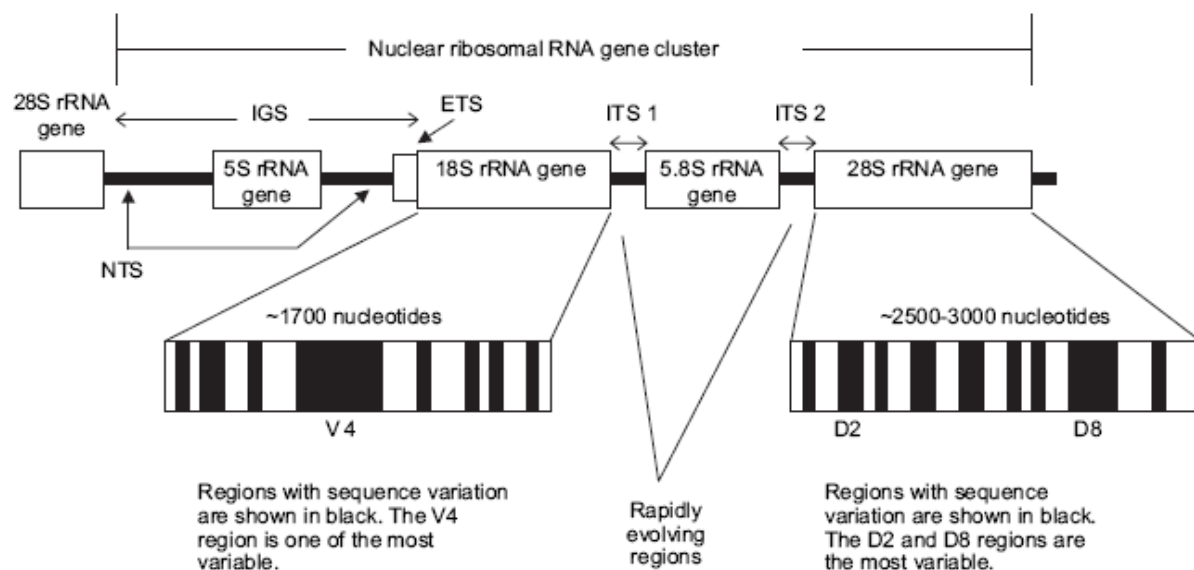


Figure 5 : L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes. L'opéron comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlés (IGS – intergenic spacer, NTS – non-transcribed spacer, ETS – externally transcribed spacer, ITS (internally transcribed spacer) (D'après (Mitchell et Zuccaro, 2006).

Au contraire des bactéries, l'identification taxonomique des champignons basée sur les séquences de la sous-unité ribosomique des eucaryotes, l'ARNr 18S, est plus problématique. En effet l'identification est limitée au niveau du genre ou de la famille. Cela est premièrement dû au manque relatif de variations dans le gène d'ARNr 18S entre espèces fongiques relativement proches, résultant de la période d'évolution relativement courte du règne des champignons comparé à celle des bactéries (Zhou *et al.*, 2000; Anderson et Cairney, 2004).

En revanche les régions ITS de l'ADNr bénéficient d'un taux d'évolution rapide, et il en résulte une variation de séquence plus grande entre des espèces relativement proches, comparé aux régions codantes plus conservées du gène codant pour l'ADNr 18S (Anderson et Cairney, 2004). C'est pourquoi afin d'obtenir une meilleure résolution, de prochaines études seront analysées sur les régions d'espaces non-codants (ITS). Cependant, nombre de régions ITS eucaryotes séquencées restent limitées et sont donc bien moins représentées dans les banques de données, comparées aux séquences d'ADNr 16S procaryotes. Mais ce problème s'atténue au fur et à mesure que les banques de données se remplissent (Prosser, 2002).

White *et al.* (1990) ont défini les premières amorces de PCR pour l'amplification des gènes codant pour l'ADNr 18S et ITS fongique. Bien que ces amorces ont été dessinées alors que

les informations de séquences étaient limitées, elles ont prouvées être des instruments très puissants et sont toujours largement utilisées. Ces amorces ont été, quoi qu'il en soit, dessinées pour amplifier le champ taxinomique le plus large possible, et ainsi, dans certains cas l'ADN de plantes a pu être amplifié lors d'études d'échantillons mixtes d'ADN de champignons et eucaryotes. Les amorces ITS1 couplées aux amorces ITS4 ont été spécialement utilisées pour amplifier des champignons de communautés mixtes d'ADN (Anderson et Cairney, 2004).

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler en premier lieu sur la SSU, région la plus couramment utilisée pour établir des arbres phylogénétiques et faire de l'identification de souches. Deux couples d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R ont été choisis dans le cadre de cette analyse taxinomique des espèces étudiées. Ces amorces ont été dessinées pour amplifier les deux extrémités des régions spécifiques du gène de la petite sous unité ribosomique 18S (SSU) chez les champignons.

## **2.5. Conclusion**

Ces outils moléculaires vont permettre d'étudier la diversité et la taxinomie des champignons de 101 fructifications fongiques issus du site forestier de Paracou en Guyane, en particulier les champignons qui dégradent le bois. Cette étude ne se limitera pas qu'aux observations morphologiques, histologiques et anatomiques des fructifications qui restent incontournables mais fastidieuses. Ainsi, l'étude des régions spécifiques du gène de la petite sous unité ribosomique 18S (SSU) en utilisant les deux couples d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R devra conduire à l'identification et à la discrimination de la plupart de ces espèces de champignons à partir d'une culture pure mycélienne.

### III. MATERIEL ET METHODES

#### 3.1. Echantillonnage

##### Le réseau des placettes permanentes en Guyane

Depuis 2001, ECOFOG en liaison avec l'Office National des Forêts (ONF) a entrepris de structurer un réseau de dispositifs permettant d'étudier la dynamique forestière et la diversité associée.

Ce réseau a été constitué à partir de différents dispositifs installés entre 1968 et 2006 dont les protocoles expérimentaux ont été harmonisés et les informations standardisées. Il comprend 23 placettes de 4 à 6 ha réparties sur 9 sites de Guyane et totalise 102 ha inventoriés et référencés dans une base de données. Différents types de peuplements (naturels, exploités, éclaircis) et un large éventail de conditions environnementales (pédologie, pluviométrie) sont représentés (voir Fig. 4). Par ailleurs, plusieurs sites de collecte bénéficient de structures d'accueil qui sont mises à la disposition des mycologues.



Figure 6. Le réseau des placettes permanentes en Guyane

Dans le cadre de ce travail, le site de collecte est le site forestier de Paracou. Ce site de Paracou (5°18'N, 52°53'W) est un terrain de 40000 ha défini en 1982, dans le cadre de



l'opération "Recherches sylvicoles sur les peuplements forestiers naturels guyanais", initiée par ECOFOG.



Figure 7 : La lisière du site forestier de Paracou

### **La Récolte des fructifications fongiques**

Les champignons sont choisis frais et en bon état sur le bois mort (environ 43), sur les arbres sur pied (environ 15) et sur les feuilles des arbres (environ 15).

Ils sont prélevés délicatement avec un couteau à l'extrême base du stipe afin d'éviter de détruire les éléments fragiles.

Chaque échantillon doit être enveloppé dans du papier aluminium avec l'étiquette correspondante et cela avant de le mettre dans une boîte ou dans une caisse. Chaque échantillon est ainsi classé par ordre numérique de récolte (de PP-01 à PP-101).

Il faut récolter au moins deux exemplaires de chaque champignon, certains seront utilisés pour décrire les caractères macroscopiques et d'autres pour réaliser une sporée, d'autres pour l'examen microscopique ; on peut conserver un exemplaire au réfrigérateur pendant 1 semaine ou au congélateur à -80°C pour une durée indéterminée.

Parallèlement, chaque fructification sera photographiée (vue d'ensemble) sur place, en forêt ou après récolte au laboratoire. Ces photos servent à constituer une fiche technique pour chaque champignon.

Les fructifications seront conservées dans des sachets plastiques scellés avec une fiche notée avec le numéro d'ordre de la récolte, la date, le lieu et l'essence si possible.





Figure 8 : Le chemin forestier est inaccessible à cause de la montée des eaux





Figure 9 : Fructifications sur un angélique (*Dycorynia guianensis*)





Figure 10 : Fructifications sur un arbre sur pied



Figure 11 : Fructifications sur une feuille

### 3.2. Isolement et production de mycélium

Toutes les fructifications récoltées ont été nettoyées (à l'eau distillée + alcool dilué) et stockées au congélateur.

Cent une (101) fructifications sont cultivées dans des boîtes de Pétri pendant une semaine.

Ces boîtes de Pétri contiennent environ 30 ml d'un milieu M.E.A (Malt Dextrose Agar) préparé selon les concentrations suivantes : extrait de malt en poudre (20g/l) ; agar (15g/l) ; glucose (20g/l) ; 1L d'eau distillée. Avant de couler les boîtes de pétri, 1 ml ( $5 \cdot 10^{-3}$  g/l) de streptomycine est ajouté au milieu de culture afin d'éliminer d'éventuels contaminants bactériens. Pour chaque échantillon, trois boîtes de pétri sont utilisées pour avoir une meilleure chance de réussite pour le repiquage.

A partir de cette culture en pleine croissance, on fait des repiquages de cubes de 2-3 mm. d'arête. On laisse les cultures incuber à l'obscurité et à une température de 20°C, en ne les amenant à la lumière que pour les examiner. Elles sont examinées toutes les 2 semaines pendant 6 semaines.

Une fois que la pureté de la culture est observée, celle-ci est repiquée sur 3 boîtes puis définitivement entretenue en boîte de Pétri pour la constitution de la mycothèque.



Figure 12 : Isolement en boîte de Pétri, à partir d'une fructification fongique

### 3.3. Etudes moléculaires

#### 3.3.1. Extraction de l'ADN fongique

Les fructifications des champignons récoltés à Paracou sont broyés dans l'azote liquide avec 200 mg de matériel biologique frais

Une pointe de spatule de PVPP (Polyvinyl-polypyrrolidine ;  $C_6H_9NO$ ) insoluble est ajoutée dans le mortier pour piéger les polyphénols présents dans les cellules.

Le broyat est mis en présence de 1,4 ml de tampon d'extraction chaud dans le mortier.

Le tampon d'extraction (Tris 100mM pH 9; NaCl 1,4M ; EDTA 20mM pH 8; CTAB 2% ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,2% ; qsp H<sub>2</sub>O 15ml) provoque la rupture des membranes lipidiques présentes dans les cellules et la libération de l'ADN présent dans ces mêmes cellules.

Les solutions sont mises dans des tubes eppendorfs 2ml et placés à incubation à 65°C pendant 30 minutes.

L'ajout de 600 $\mu$ l de solution de dichlorométhane ( $CH_2Cl_2$ ) : chloroforme ( $CHCl_3$ ) : alcool isoamyl ( $C_5H_{12}O$ ) (24 ;24 ;1) élimine les protéines et les polysaccharides encore présents dans les tubes. La phase aqueuse est alors récupérée après centrifugation (13500 tours/min, à 20°C, pendant 15minutes).

La précipitation de l'ADN se fait par l'ajout de 1ml d'isopropanol ( $C_3H_8O$ ) associé à 0,1ml d'acétate de sodium ( $CH_3CO_2Na$ ) 3M. Les tubes sont placés une heure à -20°C pour faciliter la précipitation de l'ADN puis centrifugés à 10000 tours/min à 4°C durant 10 minutes.

Le lavage de l'ADN des souches extraites s'effectue avec 1 ml d'éthanol 70% pour éliminer les traces d'isopropanol ,puis centrifugation à 13000 tours/min à 0°C durant 10 minutes.

Le culot est alors séché au speed vac puis suspendu dans 100  $\mu$ l d'eau miliQ.

L'ADN des souches extraites est quantifié par spectrométrie sur le spectrophotomètre Nano Drop ND-100. Il mesure la concentration et la pureté de l'ADN extrait avec 2 $\mu$ l d'échantillon. L'indice de pureté est calculé grâce aux rapports des mesures de l'absorbance à 260 et 280 nm. Ce rapport 260/280 doit se rapprocher de 1,8 pour qualifier l'échantillon de pur. Des valeurs plus petites indiqueraient la présence d'impuretés ou de protéines absorbant aux environs des mêmes longueurs d'ondes

### **3.3.2. Amplification PCR des régions SSU**

#### **Principe**

La réaction de polymérisation en chaine (PCR) est une réaction enzymatique en chaine qui permet l'amplification d'une région spécifique de l'ADN. Elle a été décrite initialement par Mullis (1987). La PCR utilise deux oligonucléotides (séquences courtes d'ADN) qui servent d'amorce à une enzyme la Taq DNA polymérase thermostable. Des dNTPs (ATP, TTP, CTP, GTP) permettent l'élongation de la chaine nucléotidique amplifiée. La PCR est un ensemble de cycles thermique répétés n fois

## Choix des amorces dans le cadre de la réaction de PCR

Deux couples d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R ont été choisis dans le cadre de la reconstruction phylogénétique des espèces étudiées. Ces amorces ont été dessinées pour amplifier des régions spécifiques du gène de la petite sous unité ribosomique 18S (SSU) chez les champignons (Bruns, T *et al* 1992). Les deux couples d'amorces présents amplifient les deux extrémités du gène 18S afin d'avoir le maximum d'information génétique pour ce gène.

SR6 : 5' TGTACGACTTTTACTT 3' ; SR10R : 5' TTTGACTCAACACGGG 3'  
 SR7 : 5' GTTCAACTACGAGCTTTTAA 3' ; SR1R : 5' TACCTGGTTGATQCTGCCAGT 3'

Le couple SR6/SR10R amplifie un fragment d'ADN de 579 pb situé en 3' du gène de la petite sous unité ribosomique. Le couple SR7/SR1R amplifie lui un fragment d'ADN de 637 pb situé en 5' de ce gène (cf. figure 5).

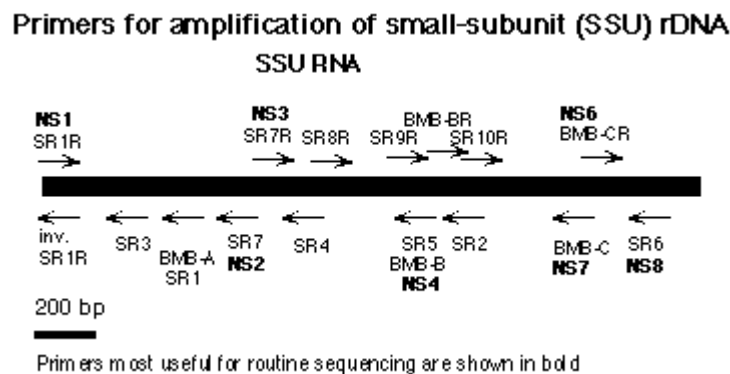


Figure 13 : Schéma du gène nucléaire ribosomique 18 S (SSU) et des amorces définies pour les champignons

Les réactions de PCR se font dans des plaques (type de plaque) 96 puits. Les plaques sont préparées en ajoutant dans chaque puits : 1,4µl d'eau miliQ ; 2µl de tampon 10X ; 0,4µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM) ; 1µl de dNTP (2,5mM) ; 8µl de PVP soluble (5%) ; 1µl pour chaque amorce forward (SR6 ou SR7) (10µM) et 1µl pour chaque amorce reverse (SR10R ou SR1R) (10µM) ; 0,2 µl de Taq Polymérase (5U/µl) ; 5µl d'ADN matrice dilué au 1/100<sup>ème</sup>.

Le programme de PCR utilisé pour les échantillons testé est le suivant:

- **La dénaturation initiale** : elle s'effectue par chauffage, au dessus de la température de fusion (T<sub>m</sub>) de l'ADN, à 94°C pendant 5 min , ce qui permet la rupture des liaisons hydrogènes, qui maintiennent l'ADN double brin, établies entre les bases (3 liaisons entre



G-C et 2 entre A-T). On obtient alors une molécule d'ADN simple brin prête pour l'hybridation avec les amorces.

- **cette dénaturation initiale est** suivie de 35 cycles composés de 3 étapes :

- **dénaturation à 92°C pendant 45 s**
- **hybridation** : la température est abaissée progressivement vers une température dépendant des températures d'hybridation ( $T_h$ ) des deux amorces utilisées qui doivent donc être voisines. Cette  $T_h$  est inférieure d'environ 5 à 10°C à la température de fusion. Cette dernière dépend de la composition en bases des amorces et est calculée grâce à la formule suivante :  $T_m = 2x (A+T) + 4x (G+C)$ .

On obtient donc  $T_m$  (SR6/SR10R) = à 44°C et  $T_m$  (SR7/SR1R) = 58 °C. Cette hybridation se fait pendant 1 min.

Dans ces conditions, les amorces vont alors se fixer sur chaque brin, de part et d'autre de la région à amplifier.

- **élongation** : la température est remontée pour atteindre la température optimale (72°C) de la Taq polymérase qui va alors synthétiser deux nouveaux brins à partir des amorces en piochant les dNTPs complémentaires du brin matriciel dans le milieu. Cette élongation se fait pendant 2 min

- La dernière phase consiste en une **élongation finale** à 72°C pendant 5 min.

Les produits de l'amplification sont ensuite stockés à 4°C.

La présence de produits de PCR est révélée par migration dans un gel d'agarose 0,8% avec bain de bromure d'éthydium. Le marqueur de taille utilisé est le 1Kb Plus DNA Ladder.

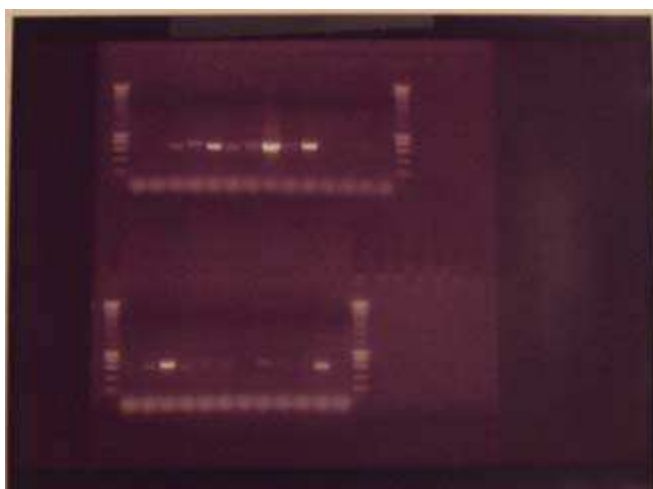


Figure 14 : Exemples de gels de PCR

Les résidus de l'amplification par PCR (amorces et dNTP libres) peuvent nuire à la qualité du séquençage. Ils sont éliminés et purifiés grâce à une enzyme : l'ExoSAP-IT® (Exonuclease I-Shrimp Alakaline Phosphatase). L'ExoSAP-IT® dégrade les amorces ou les séquences nucléotidiques simples brins, la phosphatase alcaline hydrolyse les dNTPs en surplus dans les réactions de PCR.

Pour chaque échantillon, 2 µl d'ExoSAP-IT® sont ajoutés à 10 µl de produits de PCR.

Ces deux enzymes sont dans une première étape activées 15 min à 37°C pendant laquelle l'excès d'amorces et de dNTPs est supprimé. L'ExoSAP-IT® est inactivée suite à une incubation à 80°C pendant 15 min.

### 3.3.3. Séquençage des produits de PCR

#### Principe

Le séquençage se fait par une méthode d'analyse de séquence de l'ADN basée sur une détection de la fluorescence. La réaction de séquence dite méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) consiste en la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire d'une matrice d'ADN simple brin terminée par un nucléotide terminateur portant une fluorescence. Les brins d'ADN sont séparés en fonction de leur taille dans le capillaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide haute définition. Les bandes sont repérées lors de leur passage au niveau du système de détection par un faisceau laser, et un jeu de filtres est alors utilisé pour les différencier d'après leur spectre d'émission.

#### La réaction de séquence

Une fois purifiés, les produits de PCR sont séquencés selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les réactions de séquences se font suivant le mélange suivant : 4 µl de produit de PCR purifié ; 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (5mM) ; 1,5 µl de tampon ABI BigDye; 2 µl d'amorce (2.5 µM) sens ou anti sens ; 1 µl H<sub>2</sub>O miliq ; 1 µl de BigDye v.3.1®

Le BigDye contient des ddNTP (didésoxynucléotide triphosphate) en une concentration définie. Chaque ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) est lié à un fluorochrome différent et possèdent pas de groupe hydroxyle libre en 3' contrairement au dNTP (désoxynucléotide triphosphate) empêchant la formation de liaisons phosphodiester entre les nucléotides. Leur incorporation dans les séquences nucléotidiques interrompt donc l'élongation de la chaîne de nucléotides. Nous obtenons ainsi des fragments de différentes tailles. Le programme de séquençage dans le thermocycler se déroule selon les paramètres suivants :





Le programme s'effectue en deux phases. : La première est une dénaturation initiale à 96°C pendant 1 min suivit de 25 cycles avec pour chaque cycle : dénaturation à 96°C pendant 10 s ; hybridation à 50°C pendant 5 s ; élongation à 60°C pendant 2 min.

### 3.3.4. Purification des produits de séquençage

La purification des produits de séquençage se fait sur colonnes de résine Sephadex® G-50 préparées dans des plaques MultiScreen MILLIPORE® afin d'éliminer des sels et autres résidus du séquençage.

Une fois préparées, 6µl d'eau miliQ est ajouté sur les mini colonnes puis 10µl de réaction de séquence au milieu de chaque colonne de Sephadex.

Dans les puits des plaques 96 puits destinées au séquenceur, l'ajout de 4µl de Hi-Formamide évite l'évaporation des produits de séquençage. La plaque MultiScreen est alors centrifugée 5min à 910g.

Les séquences simples brins obtenues sont corrigées à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS et BIOEDIT.

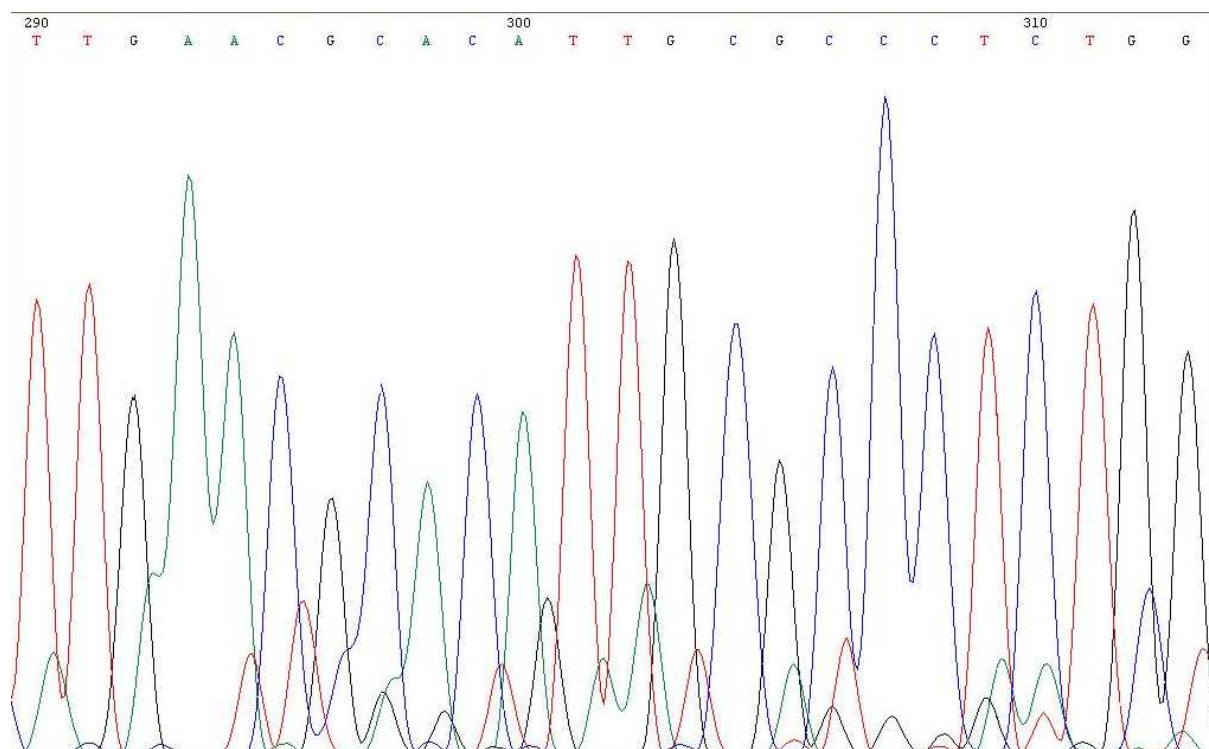


Figure 15 : Exemple d'une partie d'un électrophorégramme obtenu

### **3.3.5. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST**

#### **Principe**

L'identité d'une séquence fongique est obtenue après une recherche d'homologie dans les banques de données, comme « Genbank » au Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), soutenu par l'Institut Européen de Bio-informatique (EMBL-Bank, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>), le « Ribosomal Database Project » (<http://rdp.cme.msu.edu/http://www.psb.ugent.be/rRNA/blastrna.html>), et le projet AFTO(<http://aftol.biology.duke.edu/pub/blastUpload>) (Gonzales et Saitz-Jimenez, 2005; Mitchell et Zuccaro, 2006). Les séquences inconnues sont alignées avec celles qui sont connues et présentes dans les banques de données. Les recherches effectuées par l'Outil Local de Base de Recherche (ou BLAST pour Basic Local Alignment and Search Tool) au NCBI fournit la liste des résultats probables correspondant à la séquence inconnue, avec les valeurs de similarités des séquences. Le *BLAST* est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997).

Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

### **3.3.6. Constitution d'un fichier de séquences de référence**

Lors de la réalisation des BLAST, toutes les séquences de référence proches de nos souches seront extraites des banques de données NCBI. Elles constitueront ainsi une source de séquences de référence, outil essentiel pour nos études taxonomiques et pour des prochaines études phylogénétiques.

## **IV- RESULTATS ET DISCUSSION**

*Afin de respecter la propriété intellectuelle du CIRAD et pour des raisons de réelle confidentialité, des résultats ne sont pas présentés et interprétés dans ce rapport (séquences, photos, affiliations phylogénétiques)..*

### **4.1. La récolte des fructifications fongiques**

La récolte s'est effectuée sur le site forestier de Paracou pendant la saison des pluies (période idéale pour la récolte des champignons) qui se caractérise par de fréquentes et fortes averses qui balayent la Guyane deux fois par an (novembre à février et avril à juillet) et qui correspondent à 20 à 30 jours de pluie par mois. L'humidité moyenne de l'air était supérieure à 90% et la température de l'air d'environ 35°C.

La variation fréquente du niveau des eaux des petites rivières rendait parfois difficile l'accès à certains endroits du site (inondations des layons, végétation plus dense, moustiques, serpents, etc...) et la récolte souvent infructueuse.

Chaque récolte a duré environ 4 heures dans cette forêt tropicale humide où la faune et la flore guyanaise sont particulièrement riches et variées (orchidées, poux d'agouti, mygale, tatou, toucan, papillon « morpho », etc.).

Il a fallu environ deux mois pour récolter 101 fructifications fongiques notées de PP-001 à PP-101 issues de bois morts, d'essences forestières et de feuilles d'arbres.

### **4.2. La culture des isolats.**

La recherche d'un milieu de culture favorable à la croissance du mycélium s'est avérée nécessaire notamment pour la plupart des champignons de Guyane qui montraient des difficultés à croître sur le milieu M.A (Malt Agar), classiquement utilisé au laboratoire. C'est le milieu M.E.A (Malt Dextrose Agar) contenant l'antibiotique streptomycine qui a été retenu.

Cependant, de nombreuses contaminations dans les boîtes de Pétri ont été rencontrées lors de l'isolement. Elles sont causées principalement par la présence de bactéries, de moisissures, d'insectes et d'acariens venant des fructifications fongiques. Les contaminants se développent en colonies humides et irradientes. Ils suivent l'évolution du mycélium et résistent bien aux

antibiotiques. Les insectes et les acariens apportent souvent les moisissures et l'isolement est difficile à obtenir dans ces cas là.

Dans ce contexte tropical un nombre important de contaminations a été observé lors des isolements et des repiquages successifs de ces souches ont été effectuées avant l'obtention d'une souche pure : sur 101 fructifications repiquées 25 sont contaminées.

Il est apparu que ces isolements doivent se faire impérativement dans les 24 heures qui suivent la récolte sinon la fructification se décompose très vite.

Il semble que ce mode d'isolement en conditions tropicales (température et humidité de l'air du laboratoire très forte) ne soit pas adapté à ces champignons. L'exploration d'autres techniques d'isolement seront envisagées pour ce type d'isolement (ajouts d'antibiotiques, d'anti acariens dans les milieux de culture, isolement à partir de fructifications séchées, culture de thalle mycélien sur feuille de cellophane...).

La liste des isolats fongiques étudiés dans l'étude figurent en Annexe 1. Cette liste présente la référence des isolats, l'origine du substrat, la date de prélèvement et le nombre de repiquage qu'il a fallu pour l'obtention de la souche pure.

## **Discussion**

A l'origine de nombreuses études, l'exploration de la diversité des communautés microbiennes présentes dans un environnement a longtemps mis en œuvre des méthodes indirectes comprenant une étape de mise en culture des bactéries en laboratoire. Ces méthodes reposent sur la notion de culture pure, selon laquelle une population clonale dérive de la division cellulaire d'une cellule unique. Or ces méthodologies, pourtant à la base même de la microbiologie, présentent de nombreuses limites. Il est en effet reconnu depuis plusieurs années que la « cultivabilité », ou encore la capacité d'une cellule à former des colonies sur un milieu de culture, est extrêmement variable selon les micro-organismes. Il s'avère difficile de faire développer les microorganismes en conditions de laboratoire. Les raisons de cette « non cultivabilité » restent parfois obscures, mais il n'est pas difficile de concevoir que les conditions artificielles de culture en laboratoire sont probablement trop restrictives selon les microorganismes. Et malgré le souci de reproduire au mieux les conditions environnementales, de nombreux facteurs potentiellement essentiels pour la croissance de certains microorganismes restent non maîtrisés en laboratoire, comme le rôle des phages lysogéniques, l'influence du « quorum-sensing », ou encore bien d'autres effets imprévisibles de la micro-niche. Les interactions entre microorganismes, existant dans l'environnement

naturel, peuvent également s'avérer très influentes sur la croissance des micro-organismes en laboratoire, et certaines nécessiteront la présence d'autres types de microorganismes pour se développer de manière optimale (Herrera, 2006). Les méthodes sélectives de mise en culture n'ont donc permis de prendre en compte qu'une faible partie de la diversité des microorganismes existant réellement. Dans le cas du sol, le nombre de bactéries donnant des colonies sur milieux de culture est par exemple estimé entre seulement 0,1 et 10%.

Depuis les travaux pionniers de Torsvik *et al.* (1990) mettant en évidence des bactéries non cultivées en étudiant directement l'ARN extrait d'un échantillon environnemental, de nouvelles méthodes moléculaires, qualifiées de génomique environnementale, ont été mises au point pour déterminer plus exactement la diversité des communautés bactériennes en s'affranchissant du biais de la culture (Herrera, 2006).

Le bénéfice le plus important des techniques moléculaires est donc la possibilité de caractériser la diversité sans requérir aux méthodes de cultures en laboratoire. De plus, l'identification moléculaire est plus rapide que les méthodes basées sur la culture des microorganismes et devient la méthode la plus choisie pour les identifications de nombreux groupes environnementaux (Prosser, 2002).

#### **4.3. Extraction de l'ADN**

L'adaptation du protocole mis en place au laboratoire a permis une extraction optimale. Ainsi l'ADN des 101 champignons étudiés a pu être extrait et amplifié.

La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont été évaluées comme décrit dans la partie précédente (*cf.* partie 3.3.1. de la partie matériels et méthodes). Les quantités d'ADN obtenues varient en fonction des échantillons : de 9 à 118 ng/ml. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'obtention de culots colorés dus probablement à la présence de pigments, de tanins, d'impuretés qui « fausseraient » les mesures effectuées au Nano Drop. Dans ce dernier cas, une étape supplémentaire concernant le lavage du culot, lors de l'extraction de l'ADN, peut être envisageable.

Les concentrations des ADN extraits sont présentées en Annexe 2.

#### **4.4. Amplification du gène de la petite sous unité ribosomique 18 S (SSU)**

Après plusieurs conditions expérimentales testées, le protocole d'amplification est très bien adapté à la région spécifique du gène de la petite sous unité ribosomique 18 S (SSU) pour 83% des champignons pour laquelle nous avons obtenu une bande d'un poids moléculaire compris entre 540 et 660 pb. Les tailles des amplifiats obtenus ont été estimées à l'aide du

marqueur 1KbPlus DNA Ladder. Globalement la taille des SSU des souches étudiées est très variable.

#### 4.5. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Sur le gel d'électrophorèse, on visualise toujours une seule bande. Ceci confirme la spécificité des amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R. Cependant lors du séquençage, certaines séquences amplifiées avec les couples d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R n'ont pas pu être lues. Il semblerait que le couple d'amorce SR6/SR10R (73% séquences lues) soit plus spécifique que SR7/SR1R (27% séquences lues).

- Ces 84 séquences ont été corrigées à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS et BIOEDIT : 72 ont pu être corrigées et les 12 autres ont révélées des contaminations (plusieurs courbes).
- La recherche de similarité a donc été réalisée sur 72 séquences (86% des séquences) en utilisant le BLASTn sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pour comparer nos séquences avec celles présentes en banques.

Le tableau 1 présente les recherches de similarité de nos séquences avec les séquences des banques de données. Dans ce tableau figurent le numéro de la souche étudiée, le nom du champignon identifié par BLASTn, son numéro de référence ou d'accession pour les couples d'amorces (SR6/SR10R) et (SR7/SR1R).

Tableau 1 : Résultats de l'identification par BLASTn

N° de la souche	Identification BLASTn (SR6/SR10R)	N°_accession (SR6/SR10R)	Identification BLAST n (SR7/SR1R)	N°_accession (SR7/SR1R)
PP_001	<i>Nolanea sericea</i>	DQ367421		
PP_002_D03	<i>Antrodiella americana</i>	AY336781		
PP_002_H12	<i>Steccherinum fimbriatum</i>	AF518590		
PP_006	<i>Resinicium saccharicola</i>	DQ834916		
PP_007_F03	<i>Xylaria sp.</i>	EU593767		
PP_007			<i>Muscodor albus</i>	AF324337
PP_008	<i>Hygrocybe coccinea</i>	DQ444858		
PP_009	<i>Omphalotus olivascens</i>	DQ851577		
PP_010			<i>Dentipellis separans</i>	AF334911
PP_010_A04	<i>Hygrocybe coccinea</i>	DQ444858		
PP_011			<i>Athelia bombacina</i>	M55638
PP_011_B04	<i>Chaetocalathus cf.</i>	AY916685		
PP_012	<i>Marchandiomyces sp.</i>	AY662664		
PP_013	<i>Burgoa angulosa</i>	AF289662		
PP_018	<i>Rhodocollybia maculata</i>	AY752966		

Suite tableau 1

N° de la souche	Identification BLASTn (SR6/SR10R)	N°_accession (SR6/SR10R)	Identification BLAST n (SR7/SR1R)	N_ ascession (SR7/SR1R)
PP_019			<i>Coriolopsis gallica</i>	AY336772
PP_019_F04	<i>Earliella scabrosa</i>	AY336766		
PP_021	<i>Paxillus filamentosus</i>	DQ534686		
PP_025			<i>Coriolopsis gallica</i>	AY336772
PP_026			<i>Trametes versicolor</i>	AY309016
PP_026_A05	<i>Pycnoporus sp.</i>	EU888830		
PP_028	<i>Campanella subdendrophora</i>	AY445118		
PP_032	<i>Entoloma sinuatum</i>	AY657007		
PP_033	<i>Astrodiella andinium</i>	AY293158	<i>Scytinostroma eurasiaticogalactinum Coriolopsis gallica</i>	AY293159 AY336772
PP_036				
PP_036_E05	<i>Earliella scabrosa</i>	AY336766		
PP_041	<i>Paxillus filamentosus</i>	DQ534686		
PP_044	<i>Miladina lecithina</i>	DQ646538		
PP_045			<i>Steccherinum fimbriatum</i>	AF518590
PP_045_A06	<i>Antrodiella americana</i>	AY336780		
PP_047			<i>Chrysompholiana grassulata</i>	AY752969
PP_047_B06	<i>Hohenbuehelia tristis</i>	DQ851573		
PP_048	<i>Xylariaceae sp.</i>	EU593767		
PP_051	<i>Fomitopsis rosea</i>	AY336764		
PP_052			<i>Marasmius oreades</i>	DQ457644
PP_052_E06	<i>Omphalotus olivascens</i>	DQ851577		
PP_054	<i>Pleuroflammula flammea</i>	DQ08021		
PP_055_G06	<i>Rhodocollybia maculata</i>	AY752966		
PP_055			<i>uncultured Agaricomycotina Athelia bombacina</i>	EU647038 M55638
PP_056				
PP_056_H06	<i>Marasmius sp.</i>	AY916732		
PP_059_B07	<i>Crinipellis zonata</i>	AY916691		
PP_059			<i>Moniliophthora roreri</i>	AY916745
PP_061	<i>Cryptococcus peneaus</i>	AB085799		
PP_062	<i>Coriolopsis byrsina</i>	AY336773	<i>Pycnoporus sp.</i>	EU888830
PP_064	<i>Lentinus tigrinus</i>	AY946269		
PP_066			<i>Muscodor albus</i>	AF324337
PP_067	<i>Hygrocybe miniata</i>	DQ444859		
PP_068	<i>Marasmius alliaceus</i>	AY787214		
PP_069_H07	<i>Melanoleuca verrucipes</i>	DQ457645		
PP_069			<i>Arthromyces matolae Lepiota procera</i>	EU708331 L36659
PP_073				
PP_073_A08	<i>Lyophyllum boudieri</i>	DQ825433		
PP_075	<i>Hohenbuehelia tremula</i>	DQ440645		
PP_076			<i>uncultured Agaricomycotina</i>	EU647049
PP_079	<i>Pycnoporus sp.</i>	EU888830		

Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

Le tableau 2 présente les recherches de similarité de nos séquences avec les séquences des banques de données. Dans ce tableau figurent le numéro de la souche étudiée, le nom du champignon identifié par BLASTn, son numéro de référence ou d'accèsion pour les couples d'amorces (SR6/SR10R) et (SR7/SR1R), le nombre de paires de bases de chacune de ces séquences (npb) et la longueur de la séquence qui a été comparée par BLAST avec son pourcentage d'identité noté entre parenthèses.

Tableau 2 : Recherches de similarité de nos séquences avec les séquences des banques de données

Numéro de la souche	Identification BLAST	Nombre de paire de base	Identité BLAST longueur de séquence et %
PP_001	<i>Nolanea sericea</i>	660	483/490 (98%)
PP_002_D03	<i>Antrodiella americana</i>	540	487/494 (98%)
PP_002_H12	<i>Steccherinum fimbriatum</i>	615	571/576 (99%)
PP_006	<i>Resinicium saccharicola</i>	638	476/494 (96%)
PP_007_F03	<i>Xylaria sp.</i>	546	479/489 (97%)
PP_007	<i>Muscodor albus</i>	610	573/581 (98%)
PP_008	<i>Hygrocybe conica</i>	553	490/495 (98%)
PP_009	<i>Omphalotus olivascens</i>	553	485/494 (98%)
PP_010	<i>Dentipellis separans</i>	610	568/579 (98%)
PP_011	<i>Athelia bombacina</i>	611	586/597 (98%)
PP_011_B04	<i>Chaetocalathus cf.</i>	657	489/491 (99%)
PP_012	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	547	487/493 (98%)
PP_013	<i>Marchandiomycetes sp.</i>	552	475/492 (96%)
PP_018	<i>Omphalotus olivascens</i>	552	489/491 (99%)
PP_019	<i>Coriolopsis gallica</i>	610	580/583 (99%)
PP_019_F04	<i>Earliella scabrosa</i>	555	491/492 (99%)
PP_021	<i>Paxillus filamentosus</i>	555	492/495 (99%)
PP_025	<i>Coriolopsis gallica</i>	605	573/577 (99%)
PP_026	<i>Trametes versicolor</i>	604	565/575 (98%)
PP_026_A05	<i>Pycnoporus sp.</i>	554	492/492 (100%)
PP_028	<i>Campanella subdendrophora.</i>	552	491/492 (99%)
PP_032	<i>Entoloma sinuatum</i>	556	492/495 (98%)
PP_033	<i>Asterostroma andinium</i>	611	487/498 (97%)
PP_036	<i>Coriolopsis gallica</i>	608	576/579 (99%)
PP_036_E05	<i>Earliella scabrosa</i>	552	491/492 (99%)
PP_041	<i>Paxillus filamentosus</i>	562	540/547 (98%)
PP_044	<i>Miladina lecithina</i>	555	491/492 (99%)
PP_045	<i>Steccherinum fimbriatum</i>	612	571/579 (98%)
PP_045_A06	<i>Antrodiella americana</i>	548	487/494 (98%)
PP_047	<i>Chrysompholiana grossulata</i>	612	491/495 (99%)
PP_047_B06	<i>Hohenbuehelia tristis</i>	555	541/552 (98%)
PP_048	<i>Xylariaceae sp.</i>	551	489/489 (100%)
PP_051	<i>Fomitopsis rosea</i>	552	486/492 (98%)
PP_052	<i>Marasmius oreades</i>	612	579/582 (99%)



Suite tableau 2

Numéro de la souche	Identification BLAST	Nombre de paire de base	Identité BLAST longueur de séquence et %
PP_052_E06	<i>Omphalotus olivascens</i>	552	535/550 (97%)
PP_054	<i>Pleuroflammula flammea</i>	551	489/492 (99%)
PP_055_G06	<i>Rhodocollybia maculata</i>	556	492/493 (90%)
PP_055	<i>uncultured Agaricomycotina</i>	612	578/583 (99%)
PP_056	<i>Athelia bombacina</i>	610	578/583 (99%)
PP_056_H06	<i>Marasmius sp.</i>	564	470/499 (94%)
PP_059_B07	<i>Crinipellis zonata</i>	553	490/491 (99%)
PP_059	<i>Moniliophthora roreri</i>	608	577/578 (99%)
PP_061	<i>Cryptococcus peneaus</i>	662	452/549 (82%)
PP_062	<i>Coriolopsis byrsina</i>	613	492/492 (100%)
PP_064	<i>Lentinus tigrinus</i>	553	528/540 (97%)
PP_066	<i>Muscodor albus</i>	605	570/589 (96%)
PP_067	<i>Hygrocybe miniata</i>	555	488/494 (98%)
PP_068	<i>Marasmius alliaceus</i>	551	488/491 (99%)
PP_069_H07	<i>Melanoleuca verrucipes</i>	554	543/549 (98%)
PP_069	<i>Arthromyces matolae</i>	612	580/582 (99%)
PP_073	<i>Lepiota procera</i>	602	583/591 (98%)
PP_073_A08	<i>Lyophyllum boudieri</i>	554	489/492 (98%)
PP_075	<i>Hohenbuehelia tremula</i>	592	489/492 (98%)
PP_076	<i>uncultured Agaricomycotina</i>	609	569/569 (100%)
PP_078	<i>Trechispora sp.</i>	553	492/492 (100%)
PP_079	<i>Pycnoporus sp.</i>	551	492/492 (100%)
PP_082	<i>Hygrocybe conica</i>	613	489/493 (99%)
PP_083	<i>Fomitopsis pinicola</i>	552	491/493 (99%)
PP_085	<i>Marasmius sp.</i>	612	491/491 (99%)
PP_086	<i>Lepolichen coccophorus</i>	554	473/490 (96%)
PP_088	<i>Pycnoporus sp.</i>	552	492/492 (100%)
PP_090_B09	<i>Pycnoporus sp.</i>	549	481/551 (87%)
PP_090	<i>Cymatoderma caperatum</i>	615	482/496 (97%)
PP_091	<i>Agaricus bisporus</i>	609	490/491 (99%)
PP_092	<i>Psilocybe stunzii</i>	553	492/492 (100%)
PP_093	<i>uncultured Boletaceae</i>	611	578/584 (98%)
PP_093_E09	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	553	493/493 (100%)
PP_094	<i>Steccherinum fimbriatum</i>	611	570/575 (99%)
PP_094_F09	<i>Antrodiella americana</i>	551	487/494 (98%)
PP_098	<i>Marasmius rotula</i>	611	568/575 (98%)
PP_098_G09	<i>Nolanea sericea</i>	617	483/490 (98%)
PP_099	<i>Omphalotus olearius</i>	608	491/491 (100%)
PP_101	<i>Ramaria rubella</i>	551	480/492 (97%)

Après BLAST nous observons les résultats suivants : 97% de ces séquences possèdent plus de 90% de similarité sur plus de 80% de leur longueur.

Sur 101 champignons, 72 ont pu être identifiées par BLASTn. Quatre espèces sont des ascomycètes du genre *Muscodor* et *Xylaria*. Les 68 autres espèces, toutes de la classe des basidiomycètes, se répartissent dans les ordres suivants : 31 agaricales, 1 athéliale, 2

bolétales, 1 gomphale, 12 polyporales, 1 trechiscoporale et 1 tremellale. On y trouve également un taxon indéterminé très proche des lichens.

Dans l'ordre des polyporales, on y rencontre les principaux genres tels que *Antrodiella*, *Coriolopsis*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Pycnoporus*, *Steccherinum*, *Trametes*, *Fomitoporia*. Ces champignons ont tous la particularité à dégrader le bois.

Dans nos résultats, le taxon indéterminé très proche des lichens pose problème. En effet, les banques de données génétiques sont sous-représentées pour beaucoup de groupes de champignons. Le « Genbank » du NCBI est la base de données la plus large et il abrite environ 16400 séquences représentant des espèces fongiques. Ce sont des séquences d'ARNr principalement d'ascomycètes, représentant approximativement 63% de toutes les séquences déposées, 34% pour les Basidiomycètes et 1% de Zygomycètes. Cette déficience de dépôts peut rendre l'identification de séquences fongiques de Paracou difficile sans l'accès à d'autres sources d'informations, comme celles dérivées d'une collection de cultures locales (Mitchell et Zuccaro, 2006). En conséquence, la précision taxonomique de beaucoup de séquences dans les bases de données peut être remise en question. Une étude de trois groupes taxonomiques majeurs, rapporte un taux d'erreur d'identification de 20% (Mitchell et Zuccaro, 2006).

Toutes ces espèces identifiées par BLASTn avec leur ordre et leur classe figurent dans l'Annexe 3.

## **VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Afin de caractériser les 101 champignons du site forestier de Paracou en Guyane se développant dans un écosystème particulier (température de l'air 35°C et humidité de 90%), nous avons développé une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse de la diversité de séquences de la petite sous-unité (SSU) de l'ADN ribosomal (r) utilisant les deux couples d'amorces SR6/SR10R et SR7/SR1R. Cette caractérisation s'est réalisée indépendamment du recours aux caractères morphologiques macro et microscopiques des fructifications nécessaires à l'identification des genres et espèces.

Notre protocole permet d'extraire avec une bonne répétabilité l'ADN des champignons à partir de quelques mg de mycélium pur ; extraits d'ADN qui nous ont permis d'obtenir, avec la plupart des souches étudiées, un amplifiat d'une taille variant de 540 à 660 paires de bases.

L'analyse par BLASTn des séquences obtenues avec 72 souches des champignons de Guyane nous a permis également de placer les limites résolutes des fragments étudiés pour la caractérisation de ces souches. Les résultats de BLASTn menés avec nos séquences dans la banque de données de NCBI nous permettent d'envisager l'utilisation de cet outil pour l'identification à minima du genre d'une souche pour laquelle nous ne disposons pas d'information quant aux caractéristiques morpho-anatomiques des fructifications, mais pour laquelle nous savons que de nombreuses séquences du genre sont disponibles. Afin de préciser cette caractérisation taxinomique moléculaire, il paraît souhaitable de compléter ces données de séquences, par exemple d'autres séquences ribosomales nucléaires ou mitochondriales ou en s'appuyant sur d'autres gènes, comme celui codant pour la  $\beta$ tubuline. L'utilisation combinée d'autres gènes structuraux augmenterait la précision taxinomique de ces méthodes.

Enfin, cette étude taxinomique des champignons du site forestier de Paracou en Guyane nous a permis de caractériser également la diversité des champignons dégradant le bois qui se situent tous dans l'ordre des polyporales et d'initier les recherches sur les affiliations phylogénétiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams G.A. and Knopp B.R. 1996. *Athelia* arachidicola, the sexual state of *Rhizoctonia* carotae, a pathogen of carrot in cold storage. *Mycologia* 88:459-472.
- Ainsworth J.C., Kirk P.M., Bisby G.R., Cannon P.F., David J.C. and Stalpers J.A. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of Fungi*. CAB International.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59(1):143-69.
- Anderson I. C. and Cairney J. W. G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6 (8): 769-779.
- Berbee M.L. and Taylor J.W. 1993. Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Can. J. Bot.* 71:1114-1127.
- Berres M.E., Szabo L.J. and Mc Laughlin D.J. 1995. Phylogenetic relationships in Auriculariaceae Basidiomycetes based on 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87:821-840.
- Binder M. and Hibbett D.S. 2002. High level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22:76-90
- Boidin J. 1986. Intercompatibility and the species concept in the saprobic Basidiomycotina. *Mycotaxon* 26:319-336
- Boidin J., Mugnier J. and Canales R. 1998. "Taxonomie moléculaire des Aphyllophorales". *Mycotaxon* 66 : 445-491.
- Bresinsky A. 1996. Abstammung, Phylogenie und Verwandtschaft im Pilzreich. *Zeitschr. Myk.* 62:147-168.
- Burnett J. 2003. Fungal populations and species. *Oxford University Press, Oxford*, 348 p.
- Butler D.K. and Metzenberg R.L. (1989) Premeiotic change of nucleolus organizer size in *Neurospora*. *Genetics* 122:783-791.
- Crosby, L. D., and C. S. Criddle, 2003. Understanding systematic error in microbial community analysis techniques as a result of ribosomal RNA (rrn) operon copy number. *BioTechniques*. 34(4), 790-803.
- Cullings K.W. and Vogler D.R. 1998. A 5,8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: application to ecology and evolution. *Mol. Ecol.* 7:919-923.

Eaton R.A. and Hale M.D.C. 1993. Wood decay, pests and protection. Chapman and Hall, London, 546 p.

Farrelly V., Rainey F. A. and Stackebrandt E. 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (7): 2798-2801.

Hallenberg N., Larsson E. and Mahlapuu M. 1996. Phylogenetic studies in *Peniophora*. *Mycol. Res.* 100:179-187.

Herrera L. K. and Videla H. A. 2004. The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54: 125-134.

Kasuga T., Woods C., Woodward S. and Mitchelson K. 1993. *Heterobasidion annosum* 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence. *Curr. Genet.* 24: 433-436.

Henrion B., Le Tacon F. and Martin F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122:289-298.

Hibbett D.S. and Donoghue M.J. 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the *Polyporaceae* through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* 73:853-861.

Hibbett D.S. and Donoghue M.J. 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in Homobasidiomycetes. *Syst. Biol.* 50:215-242

Illingworth C.A., Andrews J.H., Bibeau C. and Sogin M.L. 1991. Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans* and *Colletotrichum gloeosporoides* inferred from sequence comparisons of small-subunit ribosomal RNAs. *Experim. Mycol.* 15:65-75.

Korhonen K. 1987. Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Kartstenia* 18:31-42.

Kozdroj J. and Van Elsas J. D. 20010 Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 43 (décembre): 197-212.

Kopczynski, E.D., M.M. Bateson and D.M. Ward. 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal RNA sequences composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:746-748.

Liu Y.J., Rogers S.O. and Ammirati J.F. 1997. Phylogenetic relationships in *Dermocybe* and related *Cortinari* taxa based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Can. J. Bot.* 75:519-532.

Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement of the saga of the species problem. Dans : Species: the units of biodiversity, (eds.) Claridge M.F., Dawson H.A. et Wilson M.R. Chapman and Hall, New York, 381-424.

Mayr E. 1982. Speciation and macroevolution. *Evol.* 36:1119-32.

Mitchell J. I. and Zuccaro A. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, 20 (2): 62-74.

Moncalvo J.M., Wang H.H. and Hseu R.S. 1995a Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25 S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87:223-238.

Moncalvo J.M., Wang H.H. and Hseu R.S. 1995b. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol. Res.* 99:1489-1499.

Moreth U. and Schmidt O. 2000. Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* 54:1-8.

Nakasone K.K. and Sytsma K.J. 1993. Biosystematic studies on *Phlebia acerina*, *P. rufa* and *P. radiata* in North America. *Mycologia* 85:996-1016.

Nakasone K.K. 1996. Morphological and molecular studies on *Auriculariopsis albomellea* and *Phlebia radiata* and a reassessment of *A. ampla*. *Mycologia* 88:223-238.

Prosser J.I. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 244 (1-2): 9-17.

Reysenbach A.L, Giver L.G., Wickham G.S. and Pace N.R. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 58(10): 3417-3418

Roberts, P.J. and Spooner, B.M. 2000. Cantharelloid, clavarioid and theleporoid fungi from Brunei Darussalam. *Kew Bulletin* 55: 843 – 851.

Schabereiter-Gurtner C., Piñar G., Lubitz W. and Rölleke S. 2001. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiological Methods*, 45: 77-87.

Sert H., Sümbül H. and Sterflinger K. 2007. Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey). *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 217-227.

Theron J and Cloete T.E. 2000. Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 26, No. 1, Pages 37-57.

Torsvik V., Goksoyr J. and Daae F. L. 1990 High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (3): 782-787.

Stickwel S., Szaro T.M., Weisburg W.G. and Sogin M.L. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1:231-241.

Suzuki M. and Giovannoni S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:625-630.

Swann E.C. et Taylor J.W. 1993. Higher taxa of Basidiomycetes: a 18S Rdna gene perspective. *Mycologia* 85:923-936.

Swann E.C. and Taylor J.W. 1995. Phylogenetic diversity of yeast-producing basidiomycetes. *Mycol. Res.* 99:1205-1210.

Walker W.F. and Doolittle W.F. 1982. Redividing the Basidiomycetes on the basis of 5S Rdna sequences. *Nature* 299:723-724.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. and Lane D. L. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697-703.

White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, 1990: 315-322.

Zaremski A., Ducouso M., Domergue O., Fardoux J., Rangin C., Fouquet D., Joly H., Sales C., Dreyfus B., Prin Y. 2005. In situ molecular detection of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. *Canadian journal of forest research*, 35: 1256-1260. 2005: (ISI: 1.531; Q1).

Zhou G., Whong W.-Z., Ong T. and Chen B. 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Molecular and Cellular Probes*, 14: 339-348.

**Annexe 1:** Liste présentant la référence des isolats, la date de prélèvement, le nombre de repiquage qu'il a fallu pour l'obtention de la souche pure et l'origine du substrat

Réf.	Date de l'ensemencement	Nbre de repiquage	Obtention de la Souche pure	Origine (Bois mort, Arbre sur pied, Feuille)
PP-001	12/03/2008	3	non	bois mort
PP-002	12/03/2008	2	non	bois mort
PP-003	12/03/2008	1	oui	bois mort
PP-004	12/03/2008			
PP-005	12/03/2008	2	oui	feuille
PP-006	12/03/2008	2	non	bois mort
PP-007	12/03/2008			bois mort
PP-008	12/03/2008	2	non	arbre sur pied
PP-009	12/03/2008	2	oui	feuille
PP-010	12/03/2008	2	oui	bois mort
PP-011	12/03/2008	1	oui	bois mort
PP-012	12/03/2008	4	oui	bois mort
PP-013	12/03/2008	2	oui	bois mort
PP-014	18/03/2008	3	oui	feuille
PP-015	18/03/2008	2	oui	
PP-016	18/03/2008	5	oui	
PP-017	18/03/2008	2	non	
PP-018	18/03/2008			bois mort
PP-019	18/03/2008	4	oui	bois mort
PP-020	18/03/2008	2	oui	bois mort
PP-021	18/03/2008	3	non	bois mort
PP-022	18/03/2008			
PP-023	18/03/2008	2	oui	
PP-024	18/03/2008	3	oui	
PP-025	18/03/2008	3	oui	bois mort
PP-026	18/03/2008	3	oui	bois mort
PP-027	18/03/2008	2	oui	bois mort
PP-028	18/03/2008	2	oui	bois mort
PP-029	18/03/2008	3	non	
PP-030	18/03/2008	5	non	
PP-031	18/03/2008	3	oui	
PP-032	18/03/2008	3	oui	arbre sur pied
PP-033	18/03/2008	4	oui	bois mort
PP-034	18/03/2008	2	oui	
PP-035	18/03/2008	2	oui	
PP-036	18/03/2008			bois mort
PP-037	18/03/2008	2	non	
PP-038	18/03/2008			
PP-039	18/03/2008	3	oui	
PP-040	18/03/2008	2	oui	bois mort
PP-041	18/03/2008	1	oui	arbre sur pied
PP-042	18/03/2008	3	oui	
PP-043	18/03/2008	2	oui	
PP-044	18/03/2008	4	oui	bois mort
PP-045	18/03/2008	2	oui	bois mort
PP-046	18/03/2008	3	oui	bois mort
PP-047	18/03/2008	2	non	arbre sur pied
PP-048	18/03/2008	1	oui	arbre sur pied
PP-049	18/03/2008	2	oui	bois mort
PP-050	18/03/2008	2	non	
PP-051	03/04/2008	2	non	bois mort
PP-052	03/04/2008	2	non	feuille
PP-053	03/04/2008	1	non	feuille
PP-054	03/04/2008	2	non	feuille
PP-055	03/04/2008	2	oui	feuille
PP-056	03/04/2008			bois mort
PP-057	03/04/2008	2	non	feuille
PP-058	03/04/2008			feuille
PP-059	03/04/2008	2	oui	bois mort
PP-060	03/04/2008	2	non	feuille
PP-061	03/04/2008	1	oui	bois mort
PP-062	03/04/2008	2	oui	feuille



*Suite Annexe 1* .....

PP-063	03/04/2008	3	oui	
PP-064	03/04/2008	1	non	bois mort
PP-065	03/04/2008	2	oui	
PP-066	03/04/2008	2	oui	arbre sur pied
PP-067	03/04/2008	2	oui	arbre sur pied
PP-068	03/04/2008	2	non	feuille
PP-069	03/04/2008	2	non	arbre sur pied
PP-070	03/04/2008			bois mort
PP-071	03/04/2008	3	oui	
PP-072	03/04/2008	3	oui	
PP-073	03/04/2008	5	oui	arbre sur pied
PP-074	03/04/2008	4	oui	bois mort
PP-075	03/04/2008	1	oui	arbre sur pied
PP-076	03/04/2008			arbre sur pied
PP-077	03/04/2008			
PP-078	03/04/2008	2	non	bois mort
PP-079	03/04/2008			bois mort
PP-080	09/06/2008			
PP-081	09/06/2008			
PP-082	09/06/2008			arbre sur pied
PP-083	09/06/2008			bois mort
PP-084	09/06/2008			
PP-085	09/06/2008			feuille
PP-086	09/06/2008			bois mort
PP-087	09/06/2008			
PP-088	09/06/2008			bois mort
PP-089	09/06/2008	2	oui	bois mort
PP-090	30/04/2008	2	oui	bois mort
PP-091	30/04/2008			arbre sur pied
PP-092	30/04/2008	2	oui	bois mort
PP-093	30/04/2008	2	non	arbre sur pied
PP-094	30/04/2008	2	non	arbre sur pied
PP-095	30/04/2008	2	oui	bois mort
PP-096	30/04/2008	2	oui	bois mort
PP-097	30/04/2008	2	non	feuille
PP-098	30/04/2008	2	non	bois mort
PP-099	30/04/2008			feuille
PP-100	30/04/2008	2	oui	
PP-101	30/04/2008			bois mort

## Annexe 2 : Quantification de l'ADN extrait en ng/ml

N°souche	quantité ADN extrait ng/ml
PP-01	30,83
PP-02	83,4
PP-03	53,47
PP-04	113,68
PP-05	103,12
PP-06	22,22
PP-07	10,34
PP-08	82,56
PP-09	90,57
PP-10	17,12
PP-11	27,52
PP-12	32,52
PP-13	62,35
PP-14	70,23
PP-15	56,32
PP-16	45,12
PP-17	47,25
PP-18	65,28
PP-19	102,23
PP-20	110,15
PP-21	45,89
PP-22	46,52
PP-23	42,23
PP-24	65,25
PP-25	25,89
PP-26	14,52
PP-27	17,89
PP-28	15,64
PP-29	13,25
PP-30	12,25
PP-31	78,95
PP-32	102,32
PP-33	18,95
PP-34	118,23
PP-35	23,26
PP-36	25,63
PP-37	25,98
PP-38	35,89
PP-39	58,96
PP-40	78,95
PP-41	59,65
PP-42	74,52
PP-43	15,26
PP-44	25,26
PP-45	32,56
PP-46	15,78
PP-47	15,48
PP-48	9,56
PP-49	110,89

Suite Annexe 2	
PP-50	101,25
PP-51	98,58
PP-52	95,62
PP-53	48,52
PP-54	45,23
PP-55	62,57
PP-56	65,25
PP-57	68,96
PP-58	72,25
PP-59	104,25
PP-60	25,6
PP-61	12,35
PP-62	123,5
PP-63	78,95
PP-64	45,89
PP-65	42,28
PP-66	25,96
PP-67	15,26
PP-68	78,95
PP-69	58,26
PP-70	48,95
PP-71	25,64
PP-72	14,87
PP-73	102,36
PP-74	14,52
PP-75	45,62
PP-76	26,35
PP-77	48,95
PP-78	41,26
PP-79	47,89
PP-80	12,36
PP-81	45,26
PP-82	26,35
PP-83	18,9
PP-84	14,56
PP-85	15,64
PP-86	14,89
PP-87	25,36
PP-88	12,32
PP-89	21,54
PP-90	12,36
PP-91	58,92
PP-92	65,26
PP-93	24,56
PP-94	56,23
PP-95	102,32
PP-96	112,32
PP-97	98,23
PP-98	87,95
PP-99	12,89
PP-100	23,64

### Annexe 3 : Liste des espèces identifiées par BLASTn avec leur ordre et leur classe

N°souche	Identification BLASTn	Classification (NCBI)	SR6	SR7	groupe phylogénétique	famille
PP-91	<i>Agaricus bisporus</i>	AY787216	positif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-70	<i>Arthromyces matotae</i>	EU708331	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-28	<i>Campanella subdendrophora</i>	AY445118	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-12	<i>Chaetocalathus cf.</i>	AY916685	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-47	<i>Chrysomphalina grassulata</i>	AY75269	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-59	<i>Crinipellis zonata</i>	AY916691	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-10	<i>Dentipellis separans</i>	AF334911	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-32	<i>Entoloma sinuatum</i>	AY657007	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-75	<i>Hohenbuehelia tremula</i>	DQ440645	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-48	<i>Hohenbuehelia tritisi</i>	DQ851573	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-08	<i>Hygrocybe coccinea</i>	DQ444858	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-82	<i>Hygrocybe conica</i>	DQ851574	positif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-67	<i>Hygrocybe miniata</i>	DQ444860	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-73	<i>Lepiota procera</i>	L36659	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-74	<i>Lyophyllum boudieri</i>	DQ825433	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-68	<i>Marasmius alliaceus</i>	AY787214	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-52	<i>Marasmius oreades</i>	DQ457644	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-97	<i>Marasmius rotula</i>	DQ11391	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-58; PP85	<i>Marasmius sp.</i>	AY916732	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-69	<i>Melanoleuca verrucipes</i>	DQ457645	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-60	<i>Monolophothora roeri</i>	AY916745	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-01; PP-98	<i>Nolanea sericea</i>	DQ367421	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-99	<i>Omphalotus olearius</i>	DQ459374	positif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-09; PP-53	<i>Omphalotus olivaceus</i>	DQ851578	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-54	<i>Pleuroflammula flammea</i>	DQ08021	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-94	<i>Pleurotus salmonestris</i>	EJ39285	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-92	<i>Psilocybe stuezi</i>	DQ851584	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-07	<i>Resinicium saeccharicola</i>	DQ834916	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-18; PP-55	<i>Rhodocollybia maculata</i>	AY752966	positif	negatif	agaricale	basidiomycete
PP-56	<i>Uncultured agaricomycotina</i>	EU647038	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-76	<i>Uncultured agaricomycotina</i>	EU647049	negatif	positif	agaricale	basidiomycete
PP-11; PP-57	<i>Athelia bombacina</i>	M55638	negatif	positif	atheliale	basidiomycete
PP-21; PP-41	<i>Paxillus filamentosus</i>	DQ534686	positif	negatif	boletale	basidiomycete
PP-93	<i>uncultured boletaceae</i>	EF024683	negatif	positif	boletale	basidiomycete
PP-101	<i>Ramaria rubella</i>	AY707095	positif	negatif	gomphale	basidiomycete
PP-44	<i>Miladina lecitina</i>	DQ646538	positif	negatif	pezizale	ascomycete
PP-02; PP-46; PP-96	<i>Antrodia americana</i>	AY336781	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-33	<i>Asterostroma andinum</i>	AF518571	positif	positif	polyporale	basidiomycete
PP-62; PP-88	<i>Coriopsis byrsina</i>	AY336773	positif	positif	polyporale	basidiomycete
PP-19; PP-25; PP-36	<i>Coriopsis gallica</i>	AY336777	negatif	positif	polyporale	basidiomycete
PP-20	<i>Earliella scabrosa</i>	AY336766	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-83	<i>Fomitopsis pinicola</i>	AY336765	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-51	<i>Fomitopsis rosea</i>	AY336764	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-40	<i>Ganoderma lucidum</i>		positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-64	<i>Lentinus tigrinus</i>	AY946269	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-27; PP-89; PP-79	<i>Pycnoporus sp.</i>	EU888830	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-03; PP-45; PP-95	<i>Steccherinum fimbriatum</i>	AF518590	positif	negatif	polyporale	basidiomycete
PP-26	<i>Trametes versicolor</i>	AY309016	negatif	positif	polyporale	basidiomycete
PP-90	<i>cymatoderma caperatum</i>		negatif	positif	trussulale	basidiomycete
PP-13	<i>Fomitoporia mediterranea</i>	AY662664	positif	negatif	taxon incertain	basidiomycete
PP-86	<i>Lepidichen coccophorus</i>	AF274110	positif	negatif	taxon incertain	ascomycete
PP-14	<i>Marchandiomycetes sp.</i>	AF289662	positif	negatif	taxon incertain	basidiomycete
PP-78	<i>Trechispora sp.</i>	AY803753	positif	negatif	trechisporale	basidiomycete
PP-61	<i>Cryptococcus peneus</i>	AB085799	positif	negatif	tremellales	basidiomycete
PP-05; PP-66	<i>Muscador albus</i>	AF324337	negatif	positif	xylariales	ascomycete
PP-06	<i>Xylaria sp.</i>	EU593767	positif	negatif	xylariales	ascomycete
PP-49	<i>Xylariaceae sp.</i>	EU593767	positif	negatif	xylariales	ascomycete
PP-04			negatif	negatif		
PP-100			positif	negatif		
PP-15			positif	negatif		
PP-16			negatif	negatif		
PP-17			positif	negatif		
PP-22			positif	negatif		
PP-23			negatif	negatif		
PP-24			positif	negatif		
PP-29			positif	negatif		
PP-30			negatif	negatif		
PP-31			negatif	negatif		
PP-34			positif	negatif		

