

ALBA ZAREMSKI
CIRAD-Forêt/ Programme Bois

MARC DUCOUSSO
CIRAD-Forêt/L.S.T.M.

YVES PRIN
CIRAD-Forêt/L.S.T.M.

DANIEL FOUQUET
CIRAD-Forêt/Programme Bois

Caractérisation moléculaire des champignons lignivores

Utilisation d'une nouvelle technique

CINQ CHAMPIGNONS
RESPONSABLES DE POURRITURES CUBIQUES
ET TROIS DE POURRITURES FIBREUSES
ONT ÉTÉ CARACTÉRISÉS
PAR PCR/RFLP DE L'ADN RIBOSOMIQUE.
LES 150 SOUCHES DE LA COLLECTION
DU LABORATOIRE DE PRÉSERVATION
DU CIRAD-FORÊT POURRONT ÊTRE AINSI
ÉTUDIÉES AFIN DE CRÉER
UNE BANQUE DE DONNÉES.



Photo 1. Test d'efficacité de produits fongicides réalisé au laboratoire suivant la norme européenne EN 113.
Laboratory test to measure the effectiveness of fungicidal products, carried out in compliance with European norm EN 113.

Le laboratoire de préservation du CIRAD-Forêt possède plus de 150 souches de champignons lignivores tropicaux. Certaines de ces souches sont utilisées dans les tests normalisés européens de durabilité du bois comme, par exemple, NF EN 113 (cf. photo 1, p. 63), NFX 41-555, NF T 72-084 (AFNOR, 1989).

Une partie des souches de cette collection a été déterminée, avant 1982, en utilisant les caractères morphologiques des carpophores, des spores et du mycélium (KÜHNER, ROMAGNESI, 1953 ; ODDOUX, 1957 ; LUCAS, FOUGEROUSSE, 1982). Toutefois, l'obtention de sporophores en conditions contrôlées est très aléatoire et, de ce fait, la confirmation d'une détermination est rarement possible.

Le développement des techniques moléculaires, en particulier l'analyse de la diversité de l'opéron ribosomique par PCR/RFLP, permet une caractérisation suffisante pour reconnaître avec certitude une espèce fongique en utilisant seulement quelques milligrammes de mycélium végétatif frais (ROGERS *et al.*, 1990 ; WHITE *et al.*, 1990 ; BRUNS, WHITE, TAYLOR, 1991 ; HENRION, LE TACON, MARTIN, 1992 ; ERLAND S. *et al.*, 1994).

L'utilisation de la PCR/RFLP ajoute une caractérisation moléculaire aux descriptions existantes ; elle permettra de vérifier la détermination des souches. Celle-ci s'effectuera indépendamment de l'obtention de sporophores et permettra aussi d'identifier de nouveaux isolats sous réserve, bien entendu, que les données moléculaires existent pour ces espèces.

Ainsi, la création d'un référentiel de profils de restriction (banque de données moléculaires) permettra d'identifier un champignon lignivore directement dans un sciage ou une bille de bois. La détection précoce de la présence d'un champignon lignivore et son identification pourront être envisagées. Dans le futur, nous serons en mesure de mieux cibler l'utilisation de nouveaux fongicides respectueux de l'environnement.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'ITS de huit espèces de champignons, cinq de pourritures cubiques et trois de pourritures fibreuses par PCR/RFLP (cf. photo 2) souvent impliquées dans la dégradation du bois.



Photo 2. A : Exemple de pourriture cubique ; B et C : Exemple de pourriture fibreuse. La barre représente 1 cm.
Example of cubic rot ; B and C : Example of fibrous rot. The line is 1 cm long.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches

Huit souches cultivées sur milieu malt-agar (4%-2%) à 25 °C, mises dans l'obscurité, ont été étudiées (cf. tableau I, photo 3).



Photo 3. Sporophores de *Pycnoporus sanguineus* récoltés en Guyane française en 1997. La barre représente 1 cm.
Sporophores of Pycnoporus sanguineus collected in French Guiana in 1997. The line is 1 cm long.

Pour chaque souche, le mycélium est cultivé en boîte de Petri sur milieu de culture malt-agar (4%-2%) recouvert d'une feuille de cellophane (LECELLIER, SILAR, 1994), cf. photo 4. Après avoir passé dix jours de culture à 25 °C dans l'obscurité, le mycélium est récolté en prenant soin d'éliminer toute trace de milieu de culture, notamment la gélose de l'implant de repiquage. Les mycéliums sont ensuite congelés à l'azote liquide, puis conservés au congélateur à -80 °C.



Photo 4. Exemple de mycélium en culture ; souche 55A, cultivée suivant la méthode décrite précédemment.
Example of mycelium in culture: strain 55A, cultivated using the method shown before.

Purification de l'ADN

Dix à trente milligrammes de mycélium végétatif frais sont broyés dans 650 µl de tampon TEA (Tris HCl 100 mM pH 9,0 ; EDTA 20 mM pH 8,0 ; NaCl 1,4 M ; CTAB 2% ; β-mercaptoéthanol 0,2%). Le CTAB est utilisé pour précipiter les glucides. Les échantillons sont ensuite incubés au bain-marie à 65 °C pendant 30 min. en présence de protéinase K. Puis les échantillons sont centrifugés 10 min. à 14 000 tr.min.⁻¹. Six cents µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (12/12/1) sont alors ajoutés à la phase aqueuse. Les échantillons sont agités et centrifugés 5 min. à 14 000 tr.min.⁻¹. La phase

TABLEAU I
LISTE DES CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS
NUMÉRO DE RÉFÉRENCE, TYPE DE POURRITURE ET ORIGINE DE LA SOUCHE

Espèces	N° Réf.	TP*	Origine
<i>Tyromyces palustris</i>	243D	Cubique	Grume de Mapa dans un port de Guyane française (1985)
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	67D	Cubique	STAMM, BAM (Ebw.) N°109 Allemagne (1971)
<i>Antrodia sp.</i>	57	Cubique	Planches de <i>Terminalia superba</i> Cameroun (1952)
<i>Poria placenta</i>	34C	Cubique	Souche PRL280, UK (1970)
<i>Coriolus versicolor</i>	8A	Fibreuse	Souche CTB N°863-A, France (1970)
<i>Coniophora puteana</i>	4N	Cubique	Souche BAM Ebw.15, Allemagne
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	27O	Fibreuse	Grume de <i>Melaleuca leucodendron</i> , Nouvelle-Calédonie (1969)
<i>Lentinus squarrosulus</i>	55A	Fibreuse	Grume de <i>Pycnanthus angolensis</i> , Cameroun (1952)

* Type de Pourriture (TP) d'après LUCAS et FOUGEROUSSE (1982).

supérieure contenant l'ADN en solution est reprise par 600 µl de chloroforme, puis à nouveau centrifugée 5 min. à 14 000 tr.min.⁻¹ afin d'éliminer le phénol. La phase supérieure est enfin reprise avec 1 ml de propanol-2, puis placée une nuit au congélateur à -20 °C afin de précipiter l'ADN.

L'ADN est séparé de la phase aqueuse par une centrifugation de 20 min. à 14 000 tr.min.⁻¹, puis lavé avec 100 µl d'éthanol à 70%. L'ADN est rapidement séché à l'air avant d'être solubilisé (à 65 °C pendant 5 min.) dans 100 µl de tampon TE (Tris HCl M pH 8,0 ; EDTA 0,5 M pH 8,0 ; H₂O). L'ADN purifié est conservé au congélateur à -20 °C.

PCR de l'ITS ribosomique

(SAIKI *et al.*, 1988 ; INNIS, GELFAND, 1990 ; SAIKI, 1990)

Les réactions de PCR ont été réalisées avec 25 µl de solution purifiée d'ADN et 25 µl de mélange réactionnel (Tampon de PCR 1X (Tris HCl 20 mM ; KCl 50 mM) ; MgCl₂ 1,5 mM ; 1% W-1 0,05% ; dNTP 50 mM chaque, amorces 0,2 mM ITS1 : 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' et ITS4 : 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') ; 1 unité de Taq). Un thermocycleur à effet Pelletier est programmé afin de réaliser 35 cycles successifs à 95 °C, 55 °C, puis 72 °C, pendant lesquels la phase d'élongation à 72 °C augmente progressivement de 45 s à 180 s (GARDES, BRUNS, 1993)

La longueur des fragments amplifiés (nombre de paires de bases) a été estimée par la distance de migration de chaque fragment dans un gel d'électrophorèse Agarose-Nusieve (0,8%-2,2%) par rapport aux marqueurs de poids moléculaires VIII et XIII (Boehringer Mannheim). Les fragments amplifiés ainsi que les marqueurs sont visualisés en lumière ultra-violette par fluorescence du bromure d'éthidium.

Digestion par des enzymes de restriction des ITS

(ERLAND *et al.*, 1994)

Les réactions de digestion des ITS amplifiés (amplifiats) sont réalisées avec 15 µl d'amplifiat et 5 µl d'un mélange de 2,5 µl H₂O ultrapure, 2 µl d'un réactif correspondant à l'enzyme et 5 unités d'enzyme. Ces réactions sont réalisées à 37 °C pendant une nuit avec les enzymes AluI (5'AG[^]ACT3'), DdeI (5'C[^]TNAG3'), Hinf/2 (5'G[^]ANTC3'), RsaI (5'GT[^]AC3'), CfoI (5'GCG[^]C3'), HaeIII (5'GG[^]ACC3'), Sau96A (5'[^]GATC3'), et MspI (5'C[^]CGG3') et 1 heure à 65 °C pour TaqI (5'[^]TCGA3').

La longueur des fragments de restriction obtenus est estimée de la même façon que pour l'ITS.

RÉSULTATS

Le nombre de paires de base (npb) des ITS amplifiés de chaque souche est présenté dans le tableau II.

TABLEAU II

NOMBRE DE PAIRES DE BASE DE L'ITS DE HUIT SOUCHES DE CHAMPIGNONS DÉGRADANT LE BOIS

Espèces	N° Réf.	npb
<i>Tyromyces palustris</i>	243D	690
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	67D	630
<i>Antrodia sp.</i>	57	690
<i>Poria placenta</i>	34C	690
<i>Coriolus versicolor</i>	8A	630
<i>Coniophora puteana</i>	4N	730
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	27O	630
<i>Lentinus squarrosulus</i>	55A	690

A titre d'exemple, deux schémas de profils de restriction représentatifs des résultats obtenus avec les souches 243D, 67D, 57, 34C, 8A, 4N, 27O et 55A sont présentés figures 1 et 2. Les sommes des npb des fragments

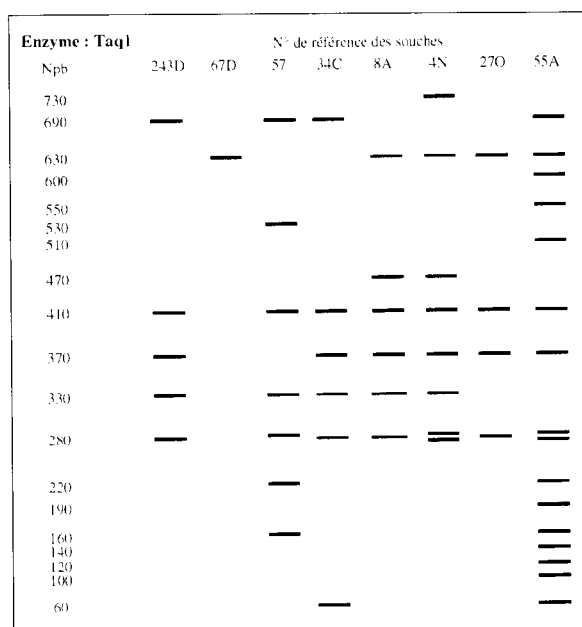


Figure 1. Schéma des profils de restriction obtenus avec les souches 243D, 67D, 57, 34C, 8A, 4N, 27O et 55A avec l'enzyme de restriction TaqI.
Diagram of RFLP profiles obtained with strain 243D, 67D, 57, 34C, 8A, 4N, 27O and 55A using TaqI restriction enzyme.

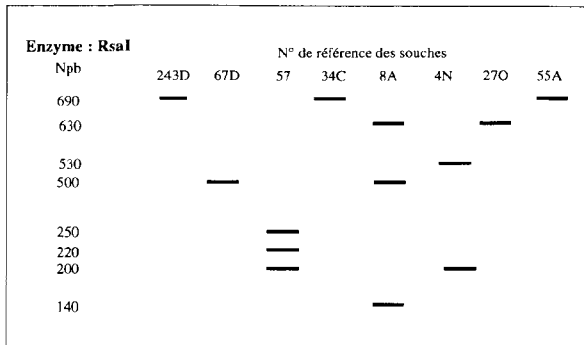


Figure 2. Schéma des profils de restriction obtenus avec les souches 243D, 67D, 57, 34C, 8A, 4N, 27O et 55A avec l'enzyme de restriction RsaI.

Diagram of RFLP profiles obtained with strain 243D, 67D, 57, 34C, 8A, 4N, 27O and 55A using RsaI restriction enzyme.

obtenus pour chaque souche et chaque enzyme sont présentées dans le tableau III.

DISCUSSION

Les fragments amplifiés pour chaque souche comprennent les espaceurs internes transcrits 1 et 2 et le gène ribosomique 5,8S (ERLAND *et al.*, 1994). La longueur des fragments amplifiés varie de 630 à 730 paires de base environ (cf. Tableau II). Des résultats similaires ont été obtenus avec de nombreuses autres espèces fongiques (e.g. : HENRION, LE TACON, MARTIN, 1992 ; GARDES, BRUNS, 1993). Les différences de longueur d'ITS entre souches peuvent être utilisées comme un premier élément de reconnaissance des espèces sans toutefois pouvoir donner d'indication sur le type de pourriture par exemple.

Neufs enzymes de restriction ont été utilisées. MspI, DdeI, RsaI (cf. fig. 2) et CfoI ne mettent pas en évidence un haut niveau de polymorphisme. HaeIII, AluI, Sau96A et Hinf2 permettent d'obtenir 26 profils de restriction différents et TaqI (cf. fig. 1) huit profils supplémentaires. Les combinaisons des profils obtenus avec ces neuf enzymes de restriction permettent une caractérisation suffisante pour distinguer clairement les huit souches étudiées, les unes des autres. Des résultats similaires ont été obtenus avec des champignons ectomycorhiziens où la diversité génétique entre espèces et au sein d'une même espèce a pu être mise en évidence (DUCOUSSO *et al.*, 1998 ; GUERIN-LAGUETTE, 1998).

La somme des npb dans chaque profil de restriction permet d'identifier trois situations :

- La somme des npb des fragments est égale au npb du produit de PCR non digéré (cf. fig. 2 : souches 57 et 4N, par exemple).
- La somme des npb des fragments est inférieure au npb du produit de PCR non digéré (cf. fig. 2 : souche 67D par exemple).
- La somme des npb des fragments est supérieure au npb du produit de PCR non digéré.

Le premier cas s'ajuste parfaitement à la théorie.

Dans le second cas, on peut facilement imaginer que l'enzyme de restriction utilisée génère de petits fragments susceptibles d'être « perdus » dans le gel au cours de la migration ou que l'enzyme utilisée génère deux fragments, ou plus, de poids moléculaires exactement identiques.

Les interprétations possibles du troisième cas paraissent plus complexes. **Première hypothèse** : les souches étudiées sont en fait des mélanges de plusieurs individus ou

TABLEAU III

SOMMES DES NPB DES FRAGMENTS DE RESTRICTION OBTENUS AVEC LES SOUCHES 243D, 67D, 57, 34C, 8A, 4N, 27O ET 55A ET LES ENZYMES DE RESTRICTION MSPI, HINF2, TAQI, HAEIII, DDEI, SAU96A, RSAI, ALUI ET CFOI

N° Réf.	MspI	Hinf2	TaqI	HaeIII	DdeI	Sau96A	RsaI	AluI	CfoI
243D	690	690	2080	710	690	1260	690	610	300
67D	1290	330	630	690	710	1210	500	0	630
57	690	330	2620	580	690	1590	670	540	670
34C	690	690	2080	710	690	1300	690	610	340
8A	1260	480	2490	680	1270	1190	1270	440	640
4N	760	730	3490	730	730	730	730	620	370
27O	1020	500	1690	650	780	1320	630	440	640
55A	690	640	5300	750	1610	1470	690	400	690

espèces ayant un ITS avec le même npb. **Deuxième hypothèse** : les souches étudiées sont hétérozygotes, au moins pour les gènes ribosomiques. Les souches utilisées étant dicaryotiques, cette deuxième hypothèse ne peut expliquer qu'un doublement du npb par rapport au npb du fragment initial non digéré (cf. fig. 2 : souche 8A par exemple). Dans le cas de Taql (cf. fig. 1), la somme des npb des fragments obtenus avec la souche 55A est multipliée par 7,6 par rapport au npb du fragment non digéré. Dans d'autres cas, nous observons des sommes comprises entre 2 et 7,6 fois le npb du fragment non digéré. Nous pouvons, alors, émettre l'hypothèse que différentes familles (de 2 à 8 au moins) de gènes ribosomiques sont capables de coexister au sein d'un même thalle. Cette hypothèse avait déjà été émise pour un autre groupe de champignons : les lactaires à lait rouge (GUERIN-LAGUETTE, 1998). Cependant, cette dernière hypothèse contredit le principe de la tendance à l'homogénéisation des nombreuses copies différentes des gènes ribosomiques chez un individu (HILLIS, DIXON, 1991).



Pour chaque souche, nous avons obtenu un amplifiat d'ITS d'une taille allant de 630 à 730 paires de bases. La différence de longueur des ITS n'est pas une indication suffisante à elle seule pour distinguer toutes les souches les unes des autres. Les profils de restriction obtenus avec les neuf enzymes choisies permettent une caractérisation suffisante des souches étudiées pour les distinguer les unes des autres sans ambiguïté.

Ces résultats démontrent clairement l'utilité des outils moléculaires comme la PCR/RFLP des ITS pour caractériser les champignons dégradant le bois.

Toutefois, il faut admettre que cette méthode de caractérisation, aussi performante soit-elle, n'est que de peu d'utilité avec les fongicides utilisés actuellement dans le traitement des bois. Cependant, il est très probable que les nouvelles réglementations internationales proscrirent l'utilisation des produits à large spectre, dangereux pour l'environnement. De ce fait, une bonne connaissance des champignons impliqués dans l'attaque des bois sera nécessaire pour choisir et appliquer avec efficacité les nouveaux traitements plus respectueux de l'environnement.

En conséquence, la méthode développée dans ce travail va être étendue à l'ensemble de la collection du laboratoire de préservation du CIRAD-Forêt. Une banque de données sur les profils de restriction des champignons dégradant le bois sera ainsi constituée. Elle sera très utile pour détecter rapidement et identifier ces champignons directement dans les grumes, les planches ou les bois de service et recommander, le cas échéant, les traitements fongicides adaptés. □

Ce texte a fait l'objet d'une communication au XIX^e Congrès IRGWP (International Research Group on Wood Preservation), qui s'est tenu à Maastricht (Pays-Bas) du 14 au 19 juin 1998.

► Alba ZAREMSKI
Daniel FOUQUET
Programme Bois/CIRAD-Forêt

► Marc DUCOUSSO
Yves PRIN
Laboratoire L.S.T.M.
CIRAD-Forêt/Baillarguet

AFNOR, 1989.
Préservation du bois - Recueil des normes françaises. Paris, France, 671 p.

BRUNS T., WHITE T.J., TAYLOR J.W., 1991.
Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 22:525-564.

DUCOUSSO M., ABOUROUH M., HONRUBIA M., MOUSAIN D., 1998.
Characterization of *Pisolithus* spp. using PCR/RFLP of rDNA Internal Transcribed Spacer. In : Second International Conference on Mycorrhizae, Uppsala, Sweden (sous presse).

ERLAND S., HENRION B., MARTIN F., GLOVER L.A., ALEXANDER IJ., 1994.

Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. New Phytol. 126:525-532.

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

- GUERIN-LAGUETTE A., 1998.
Les lactaires à lait rouge : mycorhization contrôlée des pins et caractérisation moléculaire. Application à l'étude de la compétence écologique et de la compétitivité d'isolats de *Lactarius deliciosus*. Thèse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, France, 116 p.
- HENRION B., LE TACON F., MARTIN F., 1992.
Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122:289-298.
- HILLIS D.M., DIXON M.T., 1991.
Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66:411-453.
- INNIS M.A., GELFAND H., 1990.
Optimization of PCRs. *In* : PCR Protocols : A guide to methods and applications. San Diego, USA, Academic Press, p. 5-11.
- KÜHNER R., ROMAGNESI H., 1953.
Flore analytique des champignons supérieurs (agarics, bolets, chanterelles). Paris, France, Masson.
- LECELLIER G., SILAR P., 1994.
Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Current Genetics* 25:122-123.
- LUCAS S., FOUGEROUSSE M., 1982.
Catalogue des cultures de champignons Basidiomycètes de pourriture du bois. Nogent-sur-Marne, France, C.T.F.T., 32 p.
- ODDOUX L., 1957.
Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie - Cytologie - Exigences alimentaires. Lyon, France, Faculté des Sciences de Lyon.
- ROGERS S.O., AMMIRATI J.F., LOBUGLIO K., REHNER S.A., BLEDSOE C., 1990.
Molecular taxonomy and phylogenetics of Basidiomycetes. *In* : Fourth International Mycological Congress, A. Reisinger, A. Bresinsky éd., Regensburg, Allemagne, p. 339.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HOM G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A., 1988.
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* : 239-487.
- SAIKI R.K., 1990.
Amplification of genomic DNA. *In* : PCR Protocols : A guide to methods and applications. San Diego, USA, Academic Press, p. 15-19.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J., 1990.
Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* : PCR Protocols. A guide to methods and applications, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White éd., San Diego, USA, Academic Press, p. 315-322.

Bientôt un détecteur de termites tropicaux

Les attaques d'insectes xylophages dans les constructions représentent une menace de plus en plus grande, que ce soit en Europe où le phénomène s'est accéléré ces dix dernières années ou sous les tropiques où les infestations sont permanentes.

Les dégâts les plus importants sont causés par les capricornes et les termites. Ces insectes présentent la particularité non seulement de se nourrir mais également de se développer à l'intérieur du bois.

Leur détection précoce, sans destruction des ouvrages, a fait l'objet de plusieurs études. Le C.T.B.A. et le CIRAD-Forêt mettent au point un appareil permettant d'amplifier et d'isoler, des autres sons environnants, ceux des insectes recherchés. Une analyse de ces sons permet à terme d'identifier l'insecte.

Actuellement, seuls les termites métropolitains (*Reticulitermes santonensis*) ont permis une valorisation partielle de l'appareil. Un travail de recherche est en cours qui permettra à cet appareil de détecter également les termites tropicaux.