



HAL
open science

Phylogénie de champignons associés aux symbioses plante/fourmis

Marie Vasse

► **To cite this version:**

Marie Vasse. Phylogénie de champignons associés aux symbioses plante/fourmis. Sciences agricoles. 2012. dumas-00762381

HAL Id: dumas-00762381

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00762381v1>

Submitted on 7 Dec 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Mémoire de stage

Présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, spécialisation Inter-agro
Protection des Plantes et Environnement

Sur le thème

Phylogénie des champignons associés aux symbioses plante/fourmis



Par

Marie VASSE

Ecole de rattachement : Agrocampus-Ouest, Centre de Rennes

**Stage réalisé au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE-CNRS) de Montpellier
Sous la direction de Rumsaïs Blatrix, Doyle McKey et Marc-André Selosse**

Soutenu le 25 septembre 2012 à Montpellier, devant le jury composé de :

Président : Manuel Plantegenest, Agrocampus Ouest Rennes
Membres : Claire Neema, Supagro Montpellier (BGPI)
Emmanuelle Jouselin, INRA Montpellier (CBGP)
Marie-Stéphane Tixier, Supagro Montpellier (CBGP)

Les symbioses sont des interactions très étroites entre organismes et sont souvent à l'origine de la diversification des groupes impliqués. Des études récentes ont montré que des champignons de l'ordre des Chaetothyriales vivent en symbiose avec les fourmis, en particulier dans les symbioses plante/fourmis (où la plante héberge les fourmis en échange de protection contre les herbivores) et dans le carton fabriqué par de nombreuses fourmis arboricoles. La diversité des symbioses plante/fourmis résulte d'un nombre élevé de convergences évolutives, avec très peu de radiations. La phylogénie multilocus obtenue au cours de ce stage permet de reconstruire l'histoire évolutive de 81 souches de Chaetothyriales associées aux fourmis. Cette phylogénie regroupe ces champignons en trois grands clades. La diversification de ces champignons résulte donc de radiations évolutives faisant suite à un nombre réduit d'apparitions au cours de l'évolution, contrairement aux fourmis et plantes associées. Dans ces systèmes, la diversité des symbiotes ne s'est donc pas mise en place par co-spéciation mais plutôt par des changements d'hôtes. Etant donné l'existence d'autres types d'association entre fourmis et Chaetothyriales, il est possible qu'une grande part de la diversification de l'ordre soit liée à l'association avec les fourmis.

Mots clés : diversité, symbiose, phylogénie, Chaetothyriales, plante, fourmis

Symbioses are very tight interactions between two or more associates. They often lead to the diversification of the involved groups. Recent studies have shown that fungi belonging to the order Chaetothyriales live in symbiosis with ants, in particular in ant/plant symbioses (in which the plant provides the ants with nesting cavities and the ants in return protect the plant against herbivores) and in the carton structures built by numerous tree-nesting ants. Evolutionary convergences account for most of the diversity in ant/plant symbioses, with very few radiations. A multilocus phylogeny constructed during this study traces the evolutionary history of 81 strains of Chaetothyriales associated with ants. These strains cluster in three clades. In consequence, diversification in this group results from a small number of independent appearances of association with ants followed by evolutionary radiations, which is an evolutionary pattern very different from that shown by both associated ants and plants. In these systems, it is not co-speciation but host switching that explains symbiont diversity. Other associations involving Chaetothyriales and ants have been described. It is thus possible that a significant part of the order's diversification could be linked to the evolution of association with ants.

Key words: diversity, symbiosis, phylogeny, Chaetothyriales, plant, ants

AUTORISATION DE DIFFUSION DU MEMOIRE

1. Identification du rapport et de l'auteur.

Nom et Prénom de l'auteur : *VASSE Marie*

Titre du mémoire : *Phylogénie des champignons associés aux symbioses plante/fongus*

Ecole d'inscription : *Agrocampus Ouest, Centre de Rennes*

2. Autorisation de diffusion par l'auteur.

Par la présente, je déclare être titulaire du droit d'auteur pour le mémoire mentionné ci-dessus. J'autorise sans limitation de temps la Bibliothèque à diffuser ce mémoire dans un format électronique adapté et à effectuer toutes éventuelles modifications techniques nécessaires à une amélioration de la diffusion (modification du format) Si ce mémoire est confidentiel, la confidentialité sera respectée dans les mêmes conditions pour les exemplaires électroniques que pour les exemplaires papiers.

Signature de l'Auteur : *VASSE*

Date : *18/09/2012*

3. Autorisation de diffusion par le Maître de stage.

J'autorise par la présente l'auteur à diffuser le mémoire mentionné ci-dessus :

Intranet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Internet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt entre bibliothèques	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Après une période de confidentialité	<input type="radio"/> OUI	<input checked="" type="radio"/> NON	Résumé diffusable	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Consultation en bibliothèque	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Reproduction	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON

Signature du Maître de stage : *Restes*

Date : *79/9/12*

4. Autorisation de diffusion par l'enseignant tuteur.

J'autorise par la présente l'auteur à diffuser le mémoire mentionné ci-dessus :

Intranet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Internet	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Prêt entre bibliothèques	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Après une période de confidentialité	<input type="radio"/> OUI	<input checked="" type="radio"/> NON	Résumé diffusable	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON
Consultation en bibliothèque	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON	Reproduction	<input checked="" type="radio"/> OUI	<input type="radio"/> NON

Signature du tuteur enseignant : *Parkegnuf*

Date : *25/09/2012*

CONCLUSION:

Confidentialité absolue : OUI NON

Durée exigée :

Remerciements

Les derniers mots (écrits !) de ce rapport sont pour moi l'occasion de remercier les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ce travail. Je commence par Agrocampus Ouest et l'équipe de la dominante PPE qui m'a permis de réaliser ce stage. Je suis également très reconnaissante envers Patricia Lucas pour sa gentillesse et son efficacité.

Je tiens à remercier tout particulièrement Manuel Plantegenest pour avoir été un tuteur disponible, réactif par mail (oui oui !) et surtout de bon conseil.

Rumsaïs Blatrix, Doyle McKey et Marc-André Selosse m'ont proposé ce stage et je leur en suis très reconnaissante. J'ai beaucoup appris grâce à eux, ils m'ont permis de rencontrer des personnes passionnantes et de visiter une trufficulture !

Au laboratoire, j'ai pu rencontrer l'équipe du service des marqueurs génétiques et les autres stagiaires : Marie-Pierre, Véro, Roula, Mathieu, Elisa, Marjorie, Adeline, Francisco, Michaella et les autres qui m'ont fait découvrir le fonctionnement des lieux et ont égayé mes marathons de PCR. Qu'ils en soient vivement remerciés ! Merci aussi à Guillaume Gary pour m'avoir aidée à récupérer ma « gratification » auprès de la délégation et pour sa disponibilité lors des problèmes administratifs.

Avant de commencer ce stage, je n'avais aucune connaissance en phylogénie... Merci à Claudine Montgelard pour m'avoir accordé un peu de son temps et de son expérience. Merci à Gaël Kergoat pour ses conseils. Merci aussi à Cécile Gueidan pour les séquences et pour son aide précieuse même à distance ! Je remercie également Hermann Voglmayr qui m'a fourni certaines séquences de champignons du carton.

Merci à Doyle pour sa bonne humeur, ses blagues et son avis précieux sur des sujets divers et variés (et aussi pour les petits bruits que seul ton téléphone sait faire). Ce fut une chance de partager ton bureau ! Merci mille fois à Céline et Rum pour leur patience, leur disponibilité et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci encore à Rum de m'avoir permis de passer les concours des écoles doctorales et de m'avoir soutenue dans mes candidatures. Et merci aussi à Jean, même si notre cohabitation a été courte, et à Honoré.

Et pour finir, merci à Anne et Caro pour les magnifiques conversations mailistiques ; à Christophe, Marianne, Karl, Léa, Camille, Mathilde, Elise et Adélaïde pour tous les weekends et soirées agréables passés en leur compagnie. Et merci à Simon, pour tout.

Table des matières

Introduction.....	6
Symbioses et diversité.....	7
Symbioses : à l'origine de la diversité	7
Coévolution sans cospéciation : cas des symbioses plante/fourmis.....	8
Symbioses plante/fourmis : niche de diversification ?.....	10
Matériels et méthodes	13
Echantillonnage du matériel biologique	13
Données moléculaires	14
Alignement	15
Tests préliminaires pour l'inférence phylogénétique	15
Test de neutralité des marqueurs	15
Test de saturation des données	16
Test de biais de composition en bases.....	16
Inférence phylogénétique	17
Choix de la méthode d'inférence	17
Analyses par marqueur	17
Test de congruence entre marqueurs.....	17
Test de schéma de partitions et de modèles	18
Analyse combinée des trois marqueurs.....	18
Analyses supplémentaires.....	19
Résultats	20
Tests préliminaires pour l'inférence phylogénétique	20
Test de neutralité des marqueurs	20
Test de saturation des données	20
Test de biais de composition en bases.....	20
Inférence phylogénétique	20
Analyses par marqueur	20
Analyse combinée de trois marqueurs.....	20
Analyses supplémentaires.....	22
Discussion	23
Conclusion	26
Bibliographie.....	27
Annexe.....	34

Liste des tableaux, figures et annexe

Tableau 1 : Liste des systèmes (symbioses plante/fourmis et carton) échantillonnés et souches de Chaetothyriales isolées de ces systèmes

Tableau 2 : Protocoles PCR utilisés pour l'amplification des souches de Chaetothyriales associés aux fourmis

Tableau 3 : Amorces utilisées par marqueur moléculaire et ordres de grandeur des tailles de fragments

Tableau 4 : Echantillonnage taxinomique des souches associées au carton de fourmis

Tableau 5 : Echantillonnage taxinomique des souches issues des tomates

Tableau 6 : Proportions de séquences obtenues par marqueur

Tableau 7 : Proportions de caractères conservés, variables et informatifs par marqueur moléculaire et fréquences nucléotidiques moyennes

Figure 1 : Exemples d'interactions entre plantes, fourmis et champignons

Figure 2 : Visualisation du niveau de saturation des données

Figure 3 : Phylogramme de Chaetothyriales construit par la méthode de maximum de vraisemblance

Figure 4 : Phylogramme de Chaetothyriales construit par la méthode bayésienne

Annexe 1 : Echantillonnage taxinomique des souches non associées aux fourmis

Les réseaux complexes d'interactions entre les organismes et leur environnement jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes ainsi que dans l'assemblage des communautés (Belyea & Lancaster, 1999). La diversité des contextes biotiques et abiotiques rend possible un nombre considérable d'opportunités d'interactions, c'est-à-dire d'actions réciproques. Les interactions ont une empreinte forte sur la trajectoire évolutive des espèces engagées. Les interactions biotiques jouent un rôle important dans les processus de spéciation. Elles sont donc étroitement liées à l'apparition de la diversité biologique et appréhender la dynamique de cette diversité nécessite donc de comprendre l'évolution de ces interactions. Celles-ci englobent des relations très diverses allant de rapports antagonistes tels que la prédation ou la compétition à des symbioses mutualistes. Nous nous limiterons ici à l'étude des interactions symbiotiques.

L'équipe de recherche « Interactions Biotiques » du Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive de Montpellier étudie les interactions au sein des symbioses entre les plantes et les fourmis. La découverte d'autres partenaires (champignons, nématodes, bactéries) impliqués dans ces associations a soulevé des questions concernant leur évolution. Le travail présenté dans ce rapport a consisté en la construction de la phylogénie des champignons symbiotiques afin d'appréhender l'origine de leur diversité. Par la suite, cette phylogénie pourra apporter des éléments de compréhension de la nature des interactions ainsi que de l'évolution des symbioses et des conditions de leur apparition.

Symbioses et diversité

Symbioses : à l'origine de la diversité

Selon De Bary (1879), la symbiose (du grec sun-, avec, et -bios, vie) est la « vie en commun d'organismes d'espèces distinctes ». D'autres définitions plus récentes (e.g. Selosse, 2001) restreignent la symbiose aux coexistences durables et mutualistes, c'est-à-dire à bénéfiques réciproques. Cependant, les relations entre les différents partenaires impliqués dans les symbioses de cette étude étant très mal connues et les limites entre mutualisme et parasitisme étant parfois floues, j'ai choisi de considérer le mutualisme comme une forme particulière de symbiose. La définition qui prévaut dans ce mémoire est donc celle qui désigne la symbiose comme une association durable et intime entre deux organismes ou plus, quels que soient les échanges entre eux-ci.

Les interactions symbiotiques sont génératrices de diversité biologique et jouent un rôle prépondérant dans l'évolution de la nouveauté biologique (Margulis & Fester, 1991; Hoffmeister & Martin, 2003). Elles rapprochent des organismes non apparentés, tout en maintenant un équilibre dynamique dans leurs développements respectifs. Les interactions agissent à la fois sur l'amplitude écologique et sur l'aptitude ou la valeur sélective des individus (Maynard-Smith & Szathmary, 1995). Des événements évolutifs majeurs peuvent ainsi être attribués à des interactions symbiotiques : la colonisation du milieu terrestre par les végétaux, l'apparition de la cellule eucaryote ou encore la formation des mycorhizes et des lichens (Margulis & Bermudes, 1985; Margulis & Fester, 1991; Horiike *et al.*, 2001). En 1926, Mereschkowski définit la symbiogenèse comme la création d'espèces nouvelles par l'association d'espèces différentes (Mereschkowsky, 1926).

La symbiose peut générer l'apparition de nouvelles structures, cellules, organes (mycorhizes par exemple) et rend possible certains métabolismes : la fixation de l'azote par le rhizobium ou la photosynthèse par exemple (Jorgensen *et al.*, 1985; Zahran, 1999; MacLean *et al.*, 2007). Elle est donc à l'origine de nouveaux traits phénotypiques et physiologiques qui peuvent être inductibles par la présence du partenaire (facteurs Nod induisant les nodosités ; Long, 1996) ou acquis, dans ce cas leur présence devient constitutive. Elle aboutit à l'apparition de nouvelles espèces par endosymbiose intracellulaire ou par transferts de gènes entre partenaires (e.g. Kneip *et al.*, 2008). Elle peut également mener à la perte de certaines fonctions, on parle alors d'évolution régressive, ce qui peut aussi se traduire par des événements de spéciation. La symbiose contribue à l'émergence de niches écologiques nouvelles (Moran, 2007). Ainsi, les cnidaires des récifs coralliens constituent la base d'un écosystème qui abrite le tiers de la diversité biologique marine (Maragos *et al.*, 1996). De plus, elle crée des pressions de sélection sur les partenaires qui coévoluent. Cette évolution conjointe de deux ou plusieurs espèces en interaction, chacune évoluant en réponse à la sélection imposée par l'autre, peut ou non se traduire par une cospéciation. En effet, lorsque des organismes sont très étroitement associés ou qu'ils sont transmis verticalement, les événements de spéciation de chaque partenaire peuvent être concomitants. Il en résulte une radiation évolutive des groupes taxinomiques parties prenantes de l'interaction. C'est par exemple le cas des fourmis champignonnistes (les Attines) dont la radiation a abouti aux 230 espèces connues à ce jour (Mehdiabadi & Schultz, 2009) ou aux figuiers et à leurs hyménoptères pollinisateurs qui représentent plus de 700 espèces (Machado *et al.*, 2001). La cospéciation se traduit par des arbres phylogénétiques congruents entre les partenaires et pour lesquels les événements de spéciation concordent au niveau temporel. Chez les Attines, la coévolution entre les champignons cultivés et les fourmis a entraîné une cospéciation à large échelle

qui inclut également d'autres associés de la symbiose comme les parasites fongiques des cultivars, les *Escovopsis* (Currie *et al.*, 2003). D'après cette étude, les phylogénies entre les champignons cultivés, leur parasite et les fourmis seraient parfaitement congruentes pour les niveaux anciens d'association mais des transferts horizontaux expliqueraient qu'une cospéciation moins stricte se retrouve dans les niveaux plus récents d'association. En 2007, les travaux de Mikheyev *et al.* ont montré que ces transferts étaient certainement plus fréquents que ce que l'on avait cru jusqu'alors (Mikheyev *et al.*, 2007). De plus, la phylogénie des bactéries symbiotiques de ces fourmis est très peu corrélée à celle des Attines et des autres associés suggérant de nombreuses acquisitions de novo (Mueller *et al.*, 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2009; Mueller, 2012). Les récents progrès réalisés dans les méthodes d'inférence phylogénétique mettent en évidence que l'évolution de ces symbioses est complexe et que les phylogénies des différents partenaires ne sont pas exactement congruentes. Ainsi, il a été montré que le champignon *Pterula moniliformis* s'intégrait au sein du clade que l'on croyait monophylétique de champignons associés aux fourmis *Apterostigma*. Or ce champignon a un mode de vie libre et n'est pas associé aux fourmis ce qui contredit le scénario de stricte coévolution (Dentinger *et al.*, 2009). Les études moléculaires sur les figuiers et les hyménoptères pollinisateurs montrent également que l'évolution des associations ne suit pas un schéma simple. Une cospéciation stricte a tout d'abord été décrite par de nombreuses études (e.g. Berg & Wiebes, 1992; Herre *et al.*, 1999). Cependant, les figuiers peuvent être pollinisés par plusieurs espèces d'hyménoptères et beaucoup de ces hyménoptères pollinisent également plusieurs espèces de figuiers. Les phénomènes d'hybridation et d'introgession semblent jouer un rôle important dans la diversification des figuiers (Machado *et al.*, 2005). La cospéciation stricte a ainsi été remise en cause dans de nombreux travaux (e.g. Machado *et al.*, 2001; Jusselin *et al.*, 2003; Erasmus *et al.*, 2007). Pourtant, une étude sur les figuiers de la section *Galoglychia* publiée en 2008 (Jusselin *et al.*, 2008) a montré que la cospéciation expliquait l'évolution de ces associations, bien que les changements d'hôtes aient un rôle non négligeable.

Hors des interactions hôtes-parasites, la cospéciation stricte est rare et elle résulte davantage d'un manque d'opportunités de transfert d'un hôte vers un autre que d'une adaptation du symbiote à son hôte le privant de possibilité de survie hors de cette association (Clayton *et al.*, 2003). Ainsi, lorsque les adaptations des partenaires à l'interaction ne sont pas très spécifiques et qu'un hôte alternatif offre des conditions de développement équivalentes dans une aire accessible par le symbiote, on peut observer des transferts d'hôtes qui peuvent être suivis ou non d'un événement de spéciation. La cospéciation reste cependant un phénomène fortement impliqué dans la diversification des partenaires des symbioses. La duplication est un autre type d'évènement coévolutif qui se produit lorsque les symbiotes subissent une spéciation sur leur hôte qui lui n'en subit pas. En général, cette situation reflète des différences écologiques entre les associés (Thomas *et al.*, 2010). Enfin, l'un des deux partenaires peut disparaître soit suite à une extinction soit parce qu'un des partenaires était absent de l'association au départ de la spéciation, ce que Johnson *et al.* (2003) appellent « missing the boat ».

Coévolution sans cospéciation : cas des symbioses plante/fourmis

La diversification des fourmis dès le milieu du Crétacé (100 Ma) coïncide avec celle des Angiospermes (Moreau *et al.*, 2006). Ces radiations simultanées ont conduit à une remarquable diversité d'interactions, principalement mutualistes (Beattie & Hughes, 2002). Notons cependant que si les relations antagonistes entre plantes et fourmis sont rares, les fourmis prédatrices des graines ou des feuilles telles que les fourmis champignonnistes ont un impact considérable sur les



Figure 1 : Exemples d'interactions entre plantes, fourmis et champignons. Domatie (A) et coupe longitudinale de domatie (B) de *Leonardoxa africana* et fourmis symbiotiques associées *Petalomyrmex phylax*. Piège en carton (C) des fourmis *Allomerus decemarticulatus* sur la plante *Hirtella physophora*. Nid en carton (D) de *Crematogaster* sp. sur un tronc d'arbre au Cameroun. Hyphes de Chaetothyriales issus de carton (E). Hyphes de Chaetothyriales de domaties de *Barterie fistulosa* associés aux fourmis *Tetraponera aethiops* (F, coloration au calcofluor). Photographies ©R. Blatrix

écosystèmes (e.g. Wirth *et al.*, 2003). Le spectre des interactions à bénéfiques réciproques couvre les relations opportunistes et non spécifiques jusqu'aux symbioses obligatoires. Beattie (1985) a proposé une classification qui distingue quatre types de mutualisme selon les bénéfices retirés par la plante : mutualismes de pollinisation, de dispersion des graines, de nutrition et de protection. Ces types ne sont pas exclusifs et le mutualisme de protection est commun à la quasi-totalité des associations plante/fourmis. Dans la majorité des mutualismes de protection, la plante attire la fourmi en produisant du nectar extrafloral. Les fourmis qui patrouillent la plante à la recherche du nectar participent à sa défense, soit directement en attaquant les herbivores (en général les insectes phytophages), soit indirectement par leur simple présence qui les dissuade. Dans certains cas, la plante fournit aussi un abri à la colonie de fourmis. Les nutriments sont prélevés sur la plante soit directement sur des nectaires extrafloraux ou des corpuscules nourriciers soit par l'intermédiaire d'un troisième partenaire, des hémiptères suceurs de sève (*Sternorrhyncha* et *Auchenorrhyncha*) élevés par les fourmis qui en récoltent le miellat (Hölldobler & Wilson, 1990).

On qualifie de myrmécophytes les plantes qui hébergent de manière plus ou moins continue des fourmis dans des structures creuses spécifiques appelées domaties (tiges, feuilles, stipules, etc.) (Figure 1, A et B). Le myrmécophytisme est apparu dans une centaine de genres de plantes et plus de quarante genres de fourmis sont engagés dans des relations étroites avec ces plantes. Les symbioses plante/fourmis sont présentes dans toutes les forêts tropicales humides de la planète (Fiala *et al.*, 1989). Des relations semblables se retrouvent en Asie, en Afrique et en Amérique. Les grandes colonies de fourmis agressives et très actives occupent les arbres pionniers à croissance rapide : ce sont par exemple *Oecophylla*, *Crematogaster*, *Camponatus* ou *Azteca* (Davidson & McKey, 1993). Les fourmis « timides » comme *Allomerus* ou *Myrmelachista* s'abritent dans des arbustes ou des arbrisseaux à trichomes ou présentant une pilosité importante sur les tiges. D'après Ward (1991), ces symbioses ont évolué à partir de situations de parasitisme dans lesquelles des fourmis habitent des cavités de la plante et élèvent des hémiptères. Dans les cas où la présence de la fourmi confère un bénéfice, la sélection aurait favorisé les plantes qui facilitent l'occupation par les fourmis. De plus, des préadaptations des fourmis et des plantes ont contribué à la mise en place des symbioses. Ainsi, certaines plantes possèdent de complexes glandes nectarifères (par exemple *Acacia* ou certaines espèces de *Macaranga*) ou des corps nourriciers (*Cecropia*) qui étaient exploités dans des interactions opportunistes avec des fourmis. De plus, les nœuds des tiges et brindilles sont des lieux d'attaque privilégiés pour les foreurs de bois et sont habités secondairement par les fourmis (Davidson & McKey, 1993). La compétition entre espèces de fourmis pour des sites de « nidification » a pu être un facteur déterminant dans l'évolution de traits adaptés à l'interaction (Davidson & McKey, 1993). La colonisation d'une plante se faisant toujours de novo car il n'y a pas de transmission verticale, les traits relatifs à la détection des hôtes ont été fortement sélectionnés.

Ces associations présentent différents degrés de spécificité conduisant à une organisation asymétrique des réseaux d'interactions. Ceux-ci sont constitués par un ensemble d'espèces généralistes de plantes et de fourmis qui interagissent et de quelques espèces spécialistes qui ne s'associent qu'avec certains généralistes (Bascompte *et al.*, 2003). Si l'association peut « rapidement » devenir bénéfique, elle peut également être perdue. Il s'agit en effet d'un système très labile : lorsque les traits liés au myrmécophytisme deviennent trop coûteux la lignée de plantes peut disparaître ou perdre ces traits. La tricherie est un autre facteur de disparition des symbioses. Elle est le fait exclusif des fourmis qui peuvent surexploiter les ressources de la plante, ne pas la protéger des agressions ou supprimer ses capacités de dispersion en coupant les bourgeons floraux, rendant ainsi nulle sa valeur sélective. Dans tous ces cas, une mutation de la plante qui mènerait à la perte du myrmécophytisme serait bénéfique (Chenuil & McKey, 1996). La distribution taxinomique des plantes myrmécophytes et de leurs fourmis associées suggère que ces symbioses sont fréquemment rompues. En effet, on observe de nombreux événements d'apparition indépendants et

très peu de radiations. Dans les quelques cas de radiation possible, où un genre contient plusieurs espèces de myrmécophytes, tels que *Cecropia* (Berg & Rosseli, 2005), *Macaranga* (Blattner *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2001; Itino *et al.*, 2001), *Acacia* (Gomez-Acevedo *et al.*, 2010), *Tachigali* (Van der Werff, 2008), *Triplaris* (Sanchez, 2011) ou *Neonauclea* (Razafimandimbison *et al.*, 2005), le nombre d'espèces reste relativement faible, en général de l'ordre de la dizaine. De plus, au sein de certains de ces genres, des origines indépendantes du myrmécophytisme sont possibles. Le même patron est observé pour les fourmis associées. Les adaptations similaires des plantes et des fourmis à la vie en symbiose sur les différents continents résultent donc, dans la grande majorité des cas, de convergence évolutive ou de parallélisme. Ces associations sont apparues de nombreuses fois indépendamment au cours de l'évolution.

Ainsi, ce n'est pas la cospéciation des partenaires qui contribue à la diversification de ces associations. Elles concernent pourtant de très nombreuses espèces de fourmis et de plantes. Ceci peut s'expliquer par l'apparente facilité d'acquisition des traits myrmécophytes. Les tiges creuses, par exemple, ne sont pas très couteuses ; de nombreuses espèces non associées aux fourmis en arborent. D'autre part, la colonisation par les fourmis de cavités naturelles ou de bois mort est également fréquente, ce qui facilite le passage à la vie dans les domaties.

La plupart de ces symbioses se situe dans des guildes sympatriques de plantes ou de fourmis ayant des traits similaires. Dans ce cas, un évènement de spéciation peut s'accompagner d'une modification des patrons d'association : un membre peut être remplacé par un autre, de nouveaux partenaires peuvent s'intégrer à la guilda, d'autres peuvent disparaître. Il apparaît que les associés sont davantage liés à leur environnement qu'à leur partenaire (Davidson & McKey, 1993). En effet, la qualité de l'hôte pour la fourmi varie plus significativement avec le milieu qu'avec l'hôte lui-même. De la même façon, l'effet de la fourmi sur la valeur sélective de la plante dépend plus fortement des conditions environnementales que de l'espèce de fourmi : par exemple, la qualité de la défense sera plus ou moins déterminante pour la plante en fonction de la quantité de ressources disponibles (Davidson & McKey, 1993). Les changements d'hôtes, les colonisations de novo et les remplacements de symbiotes expliquent les patrons d'évolution des partenaires. On parle alors de coévolution diffuse au sein des guildes car plus de deux espèces sont impliquées. Les rares cas de cospéciation correspondraient, dans cette optique, à des situations dans lesquelles les partenaires sont isolés et les modifications des patrons d'association limitées par l'absence d'hôte alternatif.

Symbioses plante/fourmis : niche de diversification ?

Plusieurs autres partenaires ont été découverts dans les systèmes symbiotiques plante/fourmis : nématodes (Blatrix *et al.*, 2009), hémiptères (Davidson & McKey, 1993), bactéries (Seipke *et al.*, 2012) et champignons (Miehe, 1911; Bailey, 1920; Huxley, 1978; Dejean *et al.*, 2005; Defosse *et al.*, 2009; Mayer & Voglmayr, 2009; Voglmayr *et al.*, 2011). Cette étude a pour objet les champignons de ces associations. Ces champignons sont des Ascomycètes et sont donc très différents des champignons connus associés aux fourmis Attines qui cultivent des Basidiomycètes. La première mention de la présence de champignons dans les domaties des plantes myrmécophytes date de 1911 lors de la description par Miehe des plantes *Hydnophytum* et *Myrmecodia* de Java (Miehe, 1911). En 1920, cette observation se généralise à de nombreuses familles de plantes en Asie, en Afrique et en Amérique (Bailey, 1920). Peu d'études sont réalisées sur ces champignons : Janzen relève leur présence dans les domaties de *Barteria fistulosa* en 1972 (Janzen, 1972) et Huxley identifie le champignon de *Hydnophytum* comme étant un *Arthrocladium* spp (Huxley, 1978). En 2009, la symbiose tripartite plante / fourmis / champignon *Leonardoxa africana* / *Petalomyrmex*

phylax / Chaetothyriales est décrite (Defosse et al., 2009). Les champignons des domaties de deux autres systèmes sont également isolés : *Barteria fistulosa* / *Tetraoponera aethiops* et *Keetia hispida* / *Crematogaster* sp. Les réactions en chaîne par polymérisation (PCR) environnementales réalisées sur les échantillons ont révélé la présence de trois (*P. phylax*), deux (*T. aethiops*) ou une (*Crematogaster* sp.) souches de champignons. Une étude récente a montré que les larves des fourmis habitant la plante consommaient ces champignons (Blatrix et al., 2012). D'autre part, il a été observé que les fourmis apportaient des débris divers et des cadavres de fourmis sur les champignons (Defosse et al., 2009; Moog, 2009). Ceux-ci sont donc impliqués dans les flux trophiques et le recyclage de la matière au sein de la symbiose (Defosse et al., 2011). Les relations entre la plante et le champignon ne sont pas encore élucidées. Toutes les souches isolées des domaties appartiennent à l'ordre des Chaetothyriales (Figure 1, F).

Des Chaetothyriales ont aussi été isolés du carton fabriqué par certaines fourmis (Figure 1, E). Ce carton est fait à partir de substrat végétal, de restes de cuticules ou autres matériaux et stabilisé par du mycélium de champignons. Il peut être utilisé par les fourmis pour construire leur nid (Figure 1, D) ou des galeries qui permettent de se déplacer sur les plantes à l'abri de la pluie par exemple. En plus de leur rôle de stabilisation de ces structures, les champignons du carton pourraient limiter la prolifération d'autres espèces fongiques comme des saprophytes. Plusieurs types de fourmis sont connus pour fabriquer du carton contenant du mycélium de champignon : les *Lasius* d'Europe (Schlick-Steiner et al., 2008), les fourmis arboricoles tropicales des genres *Azteca*, *Camponotus*, *Crematogaster*, *Dolichoderus*, *Monomorium* et *Technomyrmex* (Weissflog, 2001), et certaines espèces d'Amérique tropicale des genres *Allomerus* et *Azteca* qui vivent en symbiose avec des plantes (Dejean et al., 2005; Mayer & Voglmayr, 2009). Une grande partie de ces champignons appartiennent à l'ordre des Chaetothyriales, mais d'autres sont des Capnodiales ou des Venturiaceae (Mayer & Voglmayr, 2009; Voglmayr et al., 2011), clades proches des Chaetothyriales. A l'exception des fourmis *Allomerus decemarticulatus* pour lesquelles une seule souche a été décrite (Ruiz-Gonzalez et al., 2011), plusieurs souches coexistent au sein d'un même « carton » (Mayer & Voglmayr, 2009). Ces souches sont encore très peu étudiées et il n'y a que peu de données concernant la spécificité de ces champignons à l'espèce de fourmis. Afin d'étudier à la fois les champignons du carton et des domaties, le choix a été fait de concentrer cette étude sur les Chaetothyriales.

L'ordre des Chaetothyriales contient des champignons de modes de vie très différents. Certains sont des saprophytes, des pathogènes d'animaux ou de plantes, d'autres vivent sur les rochers dénudés, les fonds marins ou encore dans les symbioses avec des bryophytes (Gueidan et al., 2008). Presque tous sont des extrêmophiles. Leurs morphologies semblables rendent difficiles les classifications fondées sur ces traits (Voglmayr et al., 2011). De plus, ce sont de faibles compétiteurs et leur isolement est difficile. Tout ceci concourt au faible nombre d'études réalisées sur ces champignons.

Les symbioses plante/fourmis pourraient constituer une niche de diversification pour ce groupe de champignons. Afin de déterminer si l'association avec les plantes et les fourmis a entraîné une radiation évolutive chez les Chaetothyriales, une phylogénie de ce groupe doit être construite. Une première analyse a été réalisée par Voglmayr et al. (2011). Ces travaux ont replacé 47 souches de champignons associés aux symbioses dans une phylogénie des Chaetothyriales et ont révélé que ces souches appartenaient à quatre clades monophylétiques. Cependant, cette étude n'était fondée que sur un seul gène (une partie de la grande sous-unité de l'ADN ribosomique nucléaire) et était donc peu fiable. En effet, la phylogénie d'un gène ne reflète pas toujours la phylogénie des espèces à cause des erreurs stochastiques (échantillon trop petit), systématique (la méthode d'inférence phylogénétique ne permet pas de reconstruire l'arbre des espèces) ou biologique (la phylogénie est

correcte mais le gène utilisé à une histoire évolutive différente de l'espèce due à des transferts horizontaux, à la paralogie cachée ou au tri incomplet des lignées). L'utilisation de plusieurs gènes permet d'estimer la phylogénie des espèces car il est peu probable que les phylogénies de chaque gène soient toutes biaisées dans une direction particulière.

L'objet de cette étude est donc de compléter et d'affiner la phylogénie des Chaetothyriales associés aux symbioses plante/fourmis et au carton par l'ajout de marqueurs moléculaires et de souches.

La phylogénèse est le processus de diversification des espèces par filiation avec modification et transmission. La cladistique ou classification phylogénétique (Hennig, 1966) consiste en l'établissement des relations de parenté entre organismes grâce à l'identification de co-occurrences de caractères dérivés parmi les états de caractères homologues. La théorie de l'évolution nous enseigne que « qui partage quoi avec qui » renseigne sur « qui est plus apparenté à qui ». Le partage est le témoignage d'un ancêtre commun hypothétique.

Le développement des techniques de séquençage et de traitement de données est à l'origine de l'utilisation quasi-exponentielle des caractères moléculaires dans les analyses phylogénétiques. Ceux-ci présentent l'avantage de pouvoir être analysés dans un contexte de variable discrète. De plus, ils sont extrêmement abondants et leur utilisation est objective car la détermination de leur état est indépendante de l'expérimentateur. A l'exception de l'identification initiale de l'organisme dont l'ADN est extrait, les caractères moléculaires ne requièrent aucune compétence taxinomique et l'expérience acquise pour un groupe de taxa peut facilement être transposée à d'autres. De part leur ubiquité, ils permettent de comparer des organismes de plans morpho-anatomiques très différents. L'analyse des séquences nucléotidiques permet l'étude des divergences entre espèces : les gènes ont évolué selon la phylogénie qui unit les espèces entre elles, accumulant des substitutions qui se traduisent aujourd'hui par des différences observables entre génomes. La topologie de l'arbre inféré indique alors l'ordre dans lequel les divergences successives des lignées menant aux espèces actuelles se sont produites.

Il existe plusieurs méthodes de reconstruction phylogénétique, probabiliste, phénétique ou cladistique, fondées sur les caractères ou les distances. Il est possible aujourd'hui de combiner les informations moléculaires et morphologiques pour reconstruire l'histoire évolutive des espèces étudiées. Dans cette étude, seuls les caractères moléculaires seront utilisés car les données morphologiques ne permettent pas de distinguer des espèces.

En organisant la diversité, la phylogénie permet de rendre intelligible le foisonnement d'espèces d'êtres vivants. L'objectif de cette étude est de déterminer si la diversité des champignons des symbioses plante/fourmis est la conséquence d'une radiation évolutive ou si leur présence dans les symbioses résulte de multiples événements d'acquisitions indépendants, autrement dit si les symbioses plante/fourmis constituent ou non une niche de diversification pour les champignons qu'elles abritent.

Tableau 1: Liste des systèmes (symbioses plante-fourmi et carton) échantillonnés et souches de Chaetothyriales isolées de ces systèmes. Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées soit de l'intérieur de domaties de plantes à fourmis, soit du carton fabriqué par des fourmis arboricoles pour élaborer leur nid ou des galeries le long des branches.

Fourmis	Plantes	Habitat du champignon géographique	Origine géographique	Nombre de souches utilisées	Souches
<i>Tetraponera aethiops</i> F. Smith 1877	<i>Barteria fistulosa</i> Mast. (Passifloraceae)	domatie	Cameroun	4	CTeY1, CTeY2, CTeY7, CTeY9
<i>Pseudomyrmex penetrator</i> (F. Smith 1877)	<i>Tachigali</i> sp (Fabaceae)	domatie	Guyane française	4	FGPPC10, FGPPC11, FGPPC8, FGPPC12
<i>Pseudomyrmex malignus</i> (Wheeler 1921)	<i>Tachigali</i> sp (Fabaceae)	domatie	Guyane française	3	FGPMC2, FGPMC3, FGPMC6
<i>Petalomyrmex phylax</i> Snelling 1979	<i>Leonardoxa africana</i> (Baill.) Aubrév. (Fabaceae)	domatie	Cameroun	3	Pet3S_2a, Pet1S_1a, Pet1W_4b
<i>Crematogaster</i> sp.	<i>Keelia hispida</i> (Benth.) Bridson (Rubiaceae)	domatie	Cameroun	5	KhNk3_2, KhNk4_2a, KhNk4_3a, KhNk4_4a, KhNk2_3a
<i>Crematogaster</i> sp.	Rubiaceae non identifiée	domatie	Cameroun	3	PF5_1a, PF5_1b, PF5_2c
<i>Cladomyrma maschwitzi</i> Agosti 1991	<i>Crypteronia griffithii</i> C. B. Clarke (Crypteroniaceae)	domatie	Malaisie	3	MACm1_3e, MACM1, MACm1_1a
<i>Cladomyrma petalae</i> Agosti 1991	<i>Saraca thapingensis</i> Cantley ex King (Fabaceae)	domatie	Malaisie	5	MACpB, MACp1_1b, MACp1_3b, MACp1_1d, MACpA
<i>Crematogaster</i> sp.	<i>Macaranga hulletii</i> King ex Hook. f. (Euphorbiaceae)	domatie	Malaisie	2	MACrh1_2d, MACrh1_2a
<i>Azteca alfarí</i> Emery 1893	<i>Cecropia palmata</i> Willd. (Cecropiaceae)	domatie	Guyane française	2	AZn1a, AZn7a
<i>Azteca brevis</i> Forel 1899	<i>Tetrathylacium macrophyllum</i> Poepp. & Endl. (Salicaceae)	carton	Costa Rica	10	CR07_2_1, CR07_2_2, CR07_2_3, CR07_2_4, CR07_3_1, CR07_3_2, CR07_3_3, CR07_3_4, CR08_2_1, CR08_2_2
<i>Crematogaster</i> sp. + <i>Camponotus</i> sp.	non identifiée	carton	Malaisie	2	M_CAMP4, M_CAMP5
<i>Allomerus octoarticulatus</i> Mayr 1878	<i>Cordia nodosa</i> Lam. (Boraginaceae)	carton	Perou	2	AL3, AL4
<i>Pheidole</i> sp.	non identifiée	carton	Cameroun	1	CN_Phe1_1
<i>Crematogaster</i> sp.	non identifiée	carton	Cameroun	3	CN_Cre_Bo1_1, CN_Cre_Bo1_2, CN_Cre_Bo1_4
<i>Crematogaster</i> sp.	<i>Barteria nigritana</i> Hook. f. (Passifloraceae)	carton	Cameroun	3	CN_Cre_Bo3_2, CN_Cre_Bo3_5, CN_Cre_Bo3_6
<i>Crematogaster</i> sp.	non identifiée	carton	Thaïlande	9	M_CRE1, M_CRE1_1, M_CRE1_2, M_CRE1_3, M_CRE1_4, M_CRE1_5, M_CRE2, M_CRE3, M_CRE4
<i>Monomorium</i> sp.	Melastomataceae	carton	Malaisie	6	M_MO2, M_MO5, M_MO6, M_MO7, M_MO8, M_MO9

Matériels et méthodes

Echantillonnage du matériel biologique

L'isolement des souches pures de champignons a été effectué sur plusieurs années, avant le début de mon stage. Les champignons ont été récoltés dans les domaties de plantes myrmécophytes et dans le carton fabriqué par diverses fourmis arboricoles, en Asie, en Afrique et en Amérique du sud afin de couvrir autant que possible la diversité des symbioses. Ainsi, pour établir la phylogénie, je disposais de 81 souches associées aux fourmis. Le détail des systèmes symbiotiques échantillonnés se trouve dans le Tableau 1. Les premiers isollements ont été précédés de PCR environnementales qui ont révélé la présence de champignons appartenant à l'ordre des Chaetothyriales. Ces champignons ont une croissance très lente et sont de mauvais compétiteurs. La procédure d'isolement a donc été adaptée : dès l'arrivée au laboratoire le matériel fongique est prélevé dans les échantillons frais, finement fractionné, dilué dans une solution d'antibiotiques qui inhibe la croissance des bactéries et étalé en boîtes de Petri sur un milieu solide à 2% d'agar et d'extrait de malt. Les boîtes sont inspectées quotidiennement afin de retirer les champignons à croissance rapide que sont les espèces opportunistes présentes sous forme de spores ou de fragments d'hyphes et dont la croissance était inhibée dans les domaties et le carton. En parallèle, les fragments d'hyphes monilioïdes (Chaetothyriales et Capnodiales, entre autres) sont surveillés et transférés individuellement dans de nouvelles boîtes de Petri dès que la reprise de croissance est avérée (habituellement entre trois et cinq jours après étalage pour les Chaetothyriales). Les souches pures ainsi obtenues sont maintenues sur milieu de culture solide à température constante (24 °C) et servent de source pour les extractions d'ADN. Dans le cas des deux systèmes plante/fourmis les plus étudiés par l'équipe: *Barteria fistulosa* / *Tetraponera aethiops* et *Leonardoxa africana* / *Petalomyrmex phylax*, des expériences ont été conduites afin de déterminer si les souches isolées au laboratoire correspondaient bien aux symbiotes. Pour chacune des deux symbioses, une centaine d'individus a été échantillonnée sur une large part de l'aire de distribution afin de caractériser la spécificité du partenaire fongique par une approche de type code-barres génétique: les échantillons de champignon ont été séquencés pour la région espaceur intergénique transcrit (ITS), connue comme le meilleur marqueur universel pour le code-barres de champignons (Schoch *et al.*, 2012). Une souche dominante pour chaque système a été détectée dans la majorité des cas, parfois accompagnée d'une seconde souche et dans de très rares cas, un mélange de séquences était obtenu. Dans cette dernière situation, le clonage moléculaire a permis de retrouver la séquence principale trouvée dans les autres échantillons. Il semble donc qu'une souche principale soit associée à chacun des deux systèmes plante/fourmis avec, dans certains cas, une souche supplémentaire ou plus. D'autre part, lorsque les fourmis se voient proposer les deux souches prépondérantes mises en culture comme substrat nutritif, elles ne se nourrissent que de la souche principale. Ce patron d'association entre le champignon et la symbiose a été confirmé lors de la mise en culture qui a systématiquement permis de retrouver la souche principale de chaque système. Pour les autres systèmes, une à cinq domaties ont été prélevées pour isoler les souches fongiques. Ainsi, bien qu'il ne soit pas possible d'assurer que toutes les souches associées aux fourmis aient été isolées ni que toutes les souches étudiées participent aux symbioses, le protocole d'isolement prend en compte les caractéristiques biologiques de ces champignons et s'est avéré efficace pour les deux systèmes qui ont été testés.

Tableau 2 : Protocoles PCR utilisés pour l'amplification des souches de Chaetothyriales associés aux fourmis

	Taq Qiagen	Taq Sigma	Taq Phusion	Taq Kapa
Cycle court	95°C 15min; (94°C 1min, Ta 1min, 72°C 1min30) X 35; 60°C 20min	95°C 15min; (94°C 1min, Ta 1min, 72°C 1min30) X 35; 60°C 20min	98°C 30s; (98°C 10s, Ta 30s, 72°C 1min30) X 30; 72°C 10min	95°C 3min; (95°C 30s, Ta 30s, 72°C 1min30) X 35; 72°C 3min
Cycle long	95°C 15min; (94°C 1min, Ta 1min, 72°C 3min) X 40; 60°C 20min	95°C 15min; (94°C 1min, Ta 1min, 72°C 3min) X 40; 60°C 20min		
T amplification	45°C - 58°C	45°C - 55°C	50°C	45°C - 55°C
Mix pour 25µL	12,5µL mix Qiagen; 5µL solution Q; 2,5µL de chaque amorce [5µM]; 2,5µL ADN	12,5µL mix Sigma; 5µL eau; 2,5µL de chaque amorce [5µM]; 2,5µL ADN	12µL mix Phusion; 5µL de chaque amorce [5µM]; 3µL ADN	5 µL Buffer B; 5µL Enhancer; 0,5µL dNTP [10nM]; 2,5µL de chaque amorce [5µM]; 0,75µL polymérase; 7,5µL eau; 2,5µL d'ADN

Données moléculaires

L'ADN génomique a été extrait à partir des cultures grâce au kit Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit (Sigma) selon le protocole du distributeur. Cette méthode permet d'extraire rapidement l'ADN d'un grand nombre d'échantillons mais le produit obtenu n'est pas pur et contient encore des composés qui peuvent inhiber les PCR. Des extractions avec un protocole au cetyltriméthyl ammonium bromide (CTAB), modifié de Doyle & Doyle (1987), ont donc été réalisées lorsque cela était nécessaire. Pour certaines souches, des réplicats étaient disponibles et ont été conservés pour l'analyse afin de pallier les éventuels problèmes d'extraction ou de séquençage. D'autres souches provenant d'isolats différents mais dont les séquences ITS présentaient au moins 98% de similarité ont également été conservées. L'ADN extrait a été stocké à -20°C.

On désigne ici par « marqueur moléculaire » un fragment d'ADN dont le polymorphisme sert à reconstruire l'histoire du vivant. Initialement, sept marqueurs nucléaires et un marqueur mitochondrial avaient été choisis pour cette étude afin de limiter les risques d'erreur stochastique et de corroborer les résultats. Les marqueurs ne peuvent être choisis au hasard car ils ne doivent pas être influencés par la sélection. Deux types de marqueurs fréquemment utilisés pour la construction de phylogénie de champignons (Matheny *et al.*, 2007; Schoch *et al.*, 2009) ont été sélectionnés selon leur vitesse d'évolution :

- des marqueurs à évolution plus lente pour retracer les branchements anciens : grande et petite sous-unités de l'ADN ribosomique nucléaire (nuLSU et nuSSU), régions codant les deux plus grandes sous-unités de l'ARN Polymérase II (RPB1 et RPB2), petite sous-unité de l'ADN ribosomique mitochondrial (mtSSU)
- des marqueurs à évolution rapide pour résoudre les relations entre souches proches : zone intronique de la sous-unité beta de la tubuline (β tub), gène codant le facteur d'élongation TEF1, ITS

Les Chaetothyriales, et notamment les souches associées aux symbioses, sont des champignons peu étudiés. Aucune amorce spécifique n'est disponible pour l'amplification, et la production importante de métabolites (e.g. la mélanine) entraîne des difficultés dans la réalisation des PCR liées à la pureté de l'ADN extrait. Une longue période d'optimisation a donc été nécessaire pour obtenir chaque fragment. A partir de protocoles utilisés dans le laboratoire sur certaines souches de Chaetothyriales, j'ai procédé pas à pas en modifiant les conditions des PCR (concentration d'amorces, températures, durées des cycles), la qualité de l'ADN (différentes techniques d'extraction), la solution de polymérase (Qiagen multiplex, Taq Red Sigma, Kappa 2G Robust et Phusion) et en ajoutant des solutions agissant sur la configuration des molécules d'ADN afin de la rendre davantage propice à l'action de la polymérase (solution Q de Qiagen, Enhancer 1, Buffer A et B de Kappa). Le Tableau 2 résume les principales conditions de PCR utilisées. Les produits ont été visualisés par migration sur gel d'agarose 1,5%.

Les régions géniques ont été amplifiées grâce à des amorces publiées ou dessinées pour cette étude (Tableau 3). Pour la région RPB1 (A – D), les amorces universelles étaient extrêmement dégénérées et il a été nécessaire d'en dessiner de nouvelles. A partir d'une phylogénie préliminaire des Chaetothyriales associées aux fourmis (Voglmayr *et al.*, 2011), des groupes de souches supposées proches ont été définis. Des séquences de ce fragment avaient déjà été obtenues par Gueidan *et al.* (2008) pour des souches non associées aux fourmis. Un consensus de cinq séquences disponibles pour les souches les plus proches possibles des groupes définis a permis de dessiner de nouveaux couples d'amorces grâce au logiciel Primer3 (Rozenand & Skaletsky, 2000).

Tableau 3 : Amorces utilisées par marqueur moléculaire et ordres de grandeurs des tailles de fragments

Marqueur	Taille du fragment	Amorce	Sens	Séquence	Références		
ITS	529 - 1073	ITS1f	Sens	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993		
		ITS4	Anti-sens	TCCTCCGCTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990		
nuSSU	1410 - 1939	nSSU131	Sens	CAGTTATCGTTTATTTGATAGTACC	Kauff & Lutzoni, 2002		
		nSSU1088	Anti-sens	TGATTTCTCGTAAGGTGCCG	Kauff & Lutzoni, 2002		
		SR11R	Sens	GGAGCCTGAGAAACGGCTAC	Spatafora <i>et al.</i> , 1995		
		vNS6	Anti-sens	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	White <i>et al.</i> , 1990		
		nSSU1088R	Sens	CGGCACCTTACGAGAAATCA	Kauff & Lutzoni, 2002		
		NS7	Sens	GAGGCAATAACAGGTTCTGTGATGC	White <i>et al.</i> , 1990		
		NS24	Anti-sens	AAACCTTGTTACGACCTTTTA	Gargas & Taylor, 1992		
		LROR	Sens	GTACCCGCTGAACCTTAAGC	Rehner & Samuels, 1994		
nuLSU	1067 - 1716	LR5	Anti-sens	ATCCTGAGGGAACCTTC	Vilgalys & Hester, 1990		
		LR3R	Sens	GTCCTGAAACACGGACC	Vilgalys & Hester, 1990		
		LR7	Anti-sens	TACTACCACCAAGATCT	Vilgalys & Hester, 1990		
		mtSSU1	Sens	AGCAGTGAGGAATATTGGTC	Zoller <i>et al.</i> , 1999		
B tub	314 - 506	mtSSU3R	Anti-sens	ATGTGGCACGTCTATAGCCC	Zoller <i>et al.</i> , 1999		
		BT2a (F375)	Sens	GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson, 1995		
TEF1	116 - 446	BT2b (R824)	Anti-sens	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC	Glass & Donaldson, 1995		
		EF1-728F	Sens	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbon & Kohn, 1999; DeHoog <i>et al.</i> , 2006		
RPB1 (A-D)	~ 1300	EF1-986R	Anti-sens	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	Carbon & Kohn, 1999; DeHoog <i>et al.</i> , 2006		
		RBP11AF	Sens	GCCCGATTCGAGAGAATATG	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11AR	Anti-sens	ACATATCGGGCACCAGGAT	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11BF	Sens	CCTACTTCGCCCCAGGAC	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11BR	Anti-sens	GTTGCACCGAGTCACCTTTT	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11CF	Sens	TGGTTTCATGAACAAAGTCAAGA	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11CR	Anti-sens	GGGATGACGTCCCATCT	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11DF	Sens	CGATGCTGTCCGACGACT	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11DR	Anti-sens	CGTCTCAGCCGGTCAATAGT	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11EF	Sens	TCCTGTTTCTACCCACAGAAAA	Vasse (dans ce rapport)		
		RBP11ER	Anti-sens	AATATGCTGCTCGACCTTCC	Vasse (dans ce rapport)		
		RPB1 (D-G)	~ 1800	RPB1DF2asc	Sens	CAYAAGGARTCYATGATGGTGCAT	Gueidan <i>et al.</i> , 2007
				RPB1G2bR	Anti-sens	GCAAGRACNCCCACCATYTC	Gueidan <i>et al.</i> , 2007
RPB2	872	frPB2-5F	Sens	GAYGAYMGWGATCAYTYGG	Liu <i>et al.</i> , 1999		
		frPB2-1laR	Anti-sens	GCRTGGATCTTRTCRTCSACC	Liu <i>et al.</i> , 1999		

Alignement

Le séquençage a été réalisé par l'entreprise Genoscreen et par le Génoscope. Chaque fragment était séquençé dans les deux sens de lecture (sens et anti-sens). Les deux séquences ainsi obtenues ont été assemblées et vérifiées grâce au logiciel Sequencher 4.2.2 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Toutes les séquences ont été analysées par la même personne suivant un cahier des charges mis au point après traitement de quelques séquences afin de limiter la variabilité dans l'interprétation des chromatogrammes. Un échantillon de dix séquences pour chaque marqueur a été analysé une seconde fois quelques semaines après la première analyse afin de tester la répétabilité de la construction des consensus.

Trois jeux de données ont été utilisés. Le premier a été fourni par Cécile Gueidan du Muséum d'Histoire Naturelle de Londres et regroupe des séquences nuLSU, nuSSU et mtSSU de Chaetothyriales non associés aux fourmis et des Verrucariales utilisés en groupe externe. Ces Chaetothyriales ont été choisis pour être autant que possible représentatifs de la diversité de l'ordre. Le deuxième provient de l'Université de Vienne et a été produit par Hermann Voglmayr. Il contient des séquences ITS et nuLSU de certaines souches de Chaetothyriales des cartons de fourmis. Le troisième jeu de données est constitué des 412 séquences obtenues au cours de ce stage (Tableaux 4 à 6, Annexe 1). Le groupe externe est constitué de cinq souches de Verrucariales. Il sert à polariser les caractères et à l'enracinement de l'arbre.

L'alignement est une étape cruciale de la reconstruction phylogénétique. Il a pour but d'identifier les sites homologues dans chacune des séquences grâce au principe de connexion de E.G. Saint-Hilaire (Piveteau, 1950) : les sites conservés sont considérés homologues et permettent d'aligner les sites plus variables. L'alignement des séquences pour chaque marqueur a été réalisé manuellement grâce au logiciel Mesquite (version 2.75, Maddison & Maddison, 2007) et à l'aide des alignements automatiques générés par le logiciel Muscle (Edgar, 2004). Les régions géniques utilisées présentent de nombreux introns qui empêchent les logiciels de construire un alignement correct. Les introns et les zones ambiguës (sensu Lutzoni *et al.*, 2000) ont été délimités et supprimés de la matrice taxons/caractères conformément à la procédure suivie dans de nombreuses études phylogénétiques sur les Ascomycètes (e.g. Lumbsch *et al.*, 2004; Gueidan *et al.*, 2008).

A l'issue de l'étape d'alignement, des matrices de taxons/caractères sont obtenues pour chaque marqueur. Le Tableau 7 décrit ces matrices.

Tests préliminaires pour l'inférence phylogénétique

Les modèles d'évolution utilisés par les méthodes probabilistes d'inférence phylogénétique (modèles de Markov dits « Time Homogeneous Time Continuous Stationary ») se fondent sur certaines hypothèses concernant les données et notamment : les séquences étudiées ne sont pas sous sélection et leur composition en bases ne varie pas significativement entre elles ni dans le temps. D'autre part, il est nécessaire de vérifier que les données ne sont pas trop saturées pour rendre compte d'un signal phylogénétique. J'ai donc effectué les tests suivants sur le jeu de données.

Test de neutralité des marqueurs

Le principe du test D de Tajima (1989) repose sur la comparaison de deux estimateurs du taux de mutation dans la population. Le premier comptabilise le nombre total de sites polymorphes

Tableau 4 : Echantillonnage taxinomique des souches associées au carton de fourmis. Les séquences annotées d'une étoile * ont été obtenues par Hermann Volgmayr (Volgmayr *et al.*, 2011), les autres ont été ajoutées au cours de cette étude.

Souches	nLSU	nSSU	mtSSU	ITS	β tub	TEF	Pourcentage de réalisation
CR07_2_1	x	x	x	*	x	x	100
CR07_2_2	x	x	x	*		x	83
CR07_2_3	*	x		*			50
CR07_2_4	x	x	x	*	x	x	100
CR07_3_1	x	x	x	*		x	83
CR07_3_2	x	x	x	*	x	x	100
CR07_3_3	x	x	x	*	x		83
CR07_3_4	x	x	x	*	x	x	100
CR08_2_1	x	x	x	*	x	x	100
CR08_2_2	x	x	x	*	x		83
M_CAMP4	*	x	x	*	x		83
M_CAMP5	x	x	x	*	x		83
AL3	*	x	x	*		x	83
AL4	*	x	x	*	x	x	100
CN_Phe1_1	x	x	x	*	x		83
CN_Cre_Bo1_1	x	x	x	*	x	x	100
CN_Cre_Bo1_2	x		x	*		x	67
CN_Cre_Bo1_4	x	x	x	*		x	83
CN_Cre_Bo3_2	x	x	x	*		x	83
CN_Cre_Bo3_5	x	x	x	*	x	x	100
CN_Cre_Bo3_6	x	x	x	*	x	x	100
M_CRE1	*	x	x	*			67
M_CRE1_1	x	x		*	x		67
M_CRE1_2	*	x		*	x	x	83
M_CRE1_3	x	x	x	*		x	83
M_CRE1_4	*	x	x	*		x	83
M_CRE1_5	x	x	x	*	x		83
M_CRE2	x	x		*	x	x	83
M_CRE3	x	x	x	*	x	x	100
M_CRE4	*	x		*		x	67
M_MO2	*	x	x	*	x	x	100
M_MO5	x	x	x	*		x	83
M_MO6	x	x	x	*	x	x	100
M_MO7	x	x	x	*			67
M_MO8	x	x	x	*		x	83
M_MO9	x	x	x	*	x		83

observés. Le second est le nombre moyen de différences observées entre chaque paire de séquence. En absence de sélection, ces deux estimateurs sont égaux (valeur de D proche de zéro). Des valeurs positives de D indiquent un excès d'allèles de fréquences intermédiaires (sélection directionnelle) alors que les valeurs négatives témoignent d'une sélection purificatrice. Les tests de neutralité de Tajima ont été réalisés grâce au logiciel Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). Celui-ci détermine le caractère significatif ou non de chaque valeur D grâce à une simulation de mille jeux de données sous hypothèse de neutralité sélective. La valeur p est alors la proportion de statistiques D inférieures ou égales à la valeur D observée.

Test de saturation des données

Une façon intuitive de caractériser la divergence entre deux séquences est de compter le nombre de différences qu'elles présentent. On appelle « distance observée (p) » le nombre moyen de substitutions observées par site. Cependant, cette distance sous-estime le nombre réel de substitutions entre les séquences. En effet, lorsque deux séquences diffèrent pour un site, on sait qu'au moins une substitution s'est produite en ce site mais il est possible qu'il y en ait eu plusieurs. Or il est nécessaire de tenir compte des substitutions multiples pour estimer les distances évolutives. On définit la distance évolutive ou distance génétique (d) comme le nombre moyen de substitutions par site produit entre deux lignées depuis leur divergence. Elle prend ainsi en compte les différences observables et les substitutions multiples.

Pour estimer la distance évolutive entre deux séquences d'ADN, on utilise des modèles mathématiques d'évolution qui décrivent comment deux séquences se différencient en subissant un nombre x de substitutions.

Cependant, deux séquences nucléotidiques alignées prises au hasard présentent en moyenne 25% de similitude et jusqu'à 50% dans les cas où les insertions-délétions sont admises (Lemey *et al.*, 2009). Lorsque ces taux sont atteints, il n'est plus possible d'inférer la distance génétique à partir de la distance observée car le nombre de substitutions est trop élevé. Les similitudes observées entre les séquences sont fortement susceptibles d'être le résultat du hasard et non pas des homologies. On dit alors que les données sont saturées, elles ne permettent plus d'accéder au signal phylogénétique qu'elles contiennent.

Il est possible de tester le niveau de saturation des données en comparant les distances observées aux distances estimées. Les distances observées et estimées selon le modèle d'évolution choisi ont été obtenues grâce au logiciel MEGA v.5 (Tamura *et al.*, 2011). Les graphiques représentant les distances observées entre chaque paire de taxa en fonction des distances inférées ont été construits pour chaque marqueur moléculaire avec le logiciel R (R Development Core Team, 2011). La droite de régression entre ces distances permet d'évaluer le niveau de saturation des données : plus le coefficient directeur de cette droite est proche de zéro plus les données sont saturées.

Test de biais de composition en bases

Afin de tester si cette hypothèse du modèle d'évolution est vérifiée, il est nécessaire de comparer les compositions en bases des séquences étudiées. En effet, les modèles de Markov stipulent que ces compositions ne doivent pas être significativement différentes entre les séquences. Le test de Khi-deux implémenté dans le logiciel TREE-PUZZLE (Schmidt *et al.*, 2002) compare les compositions nucléotides des séquences en tenant compte de la distribution des fréquences des bases du modèle d'évolution choisi.

Tableau 5 : Echantillonnage taxinomique des souches issues des domaties. Les séquences annotées d'une étoile * ont été obtenues par Hermann Volgmayr (Volgmayr *et al.*, 2011), les autres ont été ajoutées au cours de cette étude.

Souches	nLSU	nSSU	mtSSU	ITS	B tub	TEF	Pourcentage de réalisation
CTeY1	x	x	x	x	x	x	100
CTeY2	x	x		x	x	x	83
CTeY7	x	x		x	x		67
CTeY9		x	x	x	x		67
FGPPC10	x	x	x	x			67
FGPPC11	x	x	x	x			67
FGPPC8_1	x	x	x	x			67
FGPPC8_2	x	x	x	x	x		83
FGPMC2	x	x	x	x	x		83
FGPMC3	x	x	x	x	x		83
FGPMC6	x	x	x	x		x	83
FGPPC12	x	x	x	x		x	83
Pet3S_2a_1	x	x	x		x		67
Pet3S_2a_2	x	x	x	x	x	x	100
Pet1S_1a_1	x	x	x	x	x	x	100
Pet1S_1a_2	x	x	x	x	x	x	100
Pet1W_4b_1		x	x	x	x		67
Pet1W_4b_2	x	x	x	x	x		83
KhNk3_2_1	x	x	x	x	x		83
KhNk3_2_2	x	x	x	x	x	x	100
KhNk4_2a		x		x	x		50
PF5_1a		x	x	x	x		67
KhNk4_3a	x	x	x	x	x	x	100
KhNk4_4a	x	x	x			x	67
KhNk2_3a_1				x	x		33
KhNk2_3a_2			x		x		33
PF5_1b	x	x	x	x	x		67
PF5_2c	x	x	x		x		67
MACpB	x	x	x		x		67
MACp1_1b	x	x	x	x			67
MACrh1_2d_1	x	x		x			50
MACrh1_2d_2	x	x		x	x		67
MACm1_3e	x	x	x				50
MACM1	*		x	*	x	x	83
MACm1_1a_1	x				x		33
MACm1_1a_2	x			x	x		50
MACp1_3b_1		x	x		x		50
MACp1_3b_2			x	x			33
MACp1_1d	x	x	x	x	x	x	100
MACm1_3i	x	x	x	x	x		83
MACpA		x	x		x	x	67
MACrh1_2a_1	x	x	x	x		x	83
MACrh1_2a_2	x	x	x	x		x	83
AZn1a	x	x	x	x	x		83
AZn7a	x	x	x	x			67

Inférence phylogénétique

Choix de la méthode d'inférence

Les méthodes probabilistes ont été préférées aux méthodes de parcimonie et de distance. En effet, les méthodes de parcimonie sont très sensibles à des biais systématiques tels que l'artéfact d'attraction des longues branches ou le biais de composition en bases (Galtier & Gouy, 1998). Cette méthode aura ainsi tendance à rapprocher les taxa dont les vitesses d'évolution ou les compositions nucléotidiques sont proches, indépendamment de leur véritable histoire évolutive. De plus, elle ne tient pas compte des substitutions multiples. Les méthodes de distance, comme leur nom l'indique, sont fondées sur l'analyse des distances génétiques entre séquences. L'information est alors réduite en comparaison avec les méthodes fondées sur les caractères : les informations relatives à des séquences sont résumées en une mesure de distance.

Notons néanmoins que les méthodes probabilistes reposent sur des hypothèses concernant les processus d'évolution et notamment leur réversibilité et l'indépendance de l'évolution des sites. Elles ne sont donc évidemment pas infaillibles et les topologies d'arbres obtenues représentent seulement les meilleures hypothèses d'évolution des séquences dans les conditions de l'étude.

Analyses par marqueur

Des phylogénies par marqueur moléculaire ont été construites pour les trois marqueurs à vitesse d'évolution plus « lente » : nuLSU, nuSSU et mtSSU. Cette étape permet de détecter les éventuelles erreurs puis de tester la congruence entre les histoires évolutives de chaque marqueur pour déterminer s'il est ou non possible de les concaténer.

Ces phylogénies ont été construites par la méthode probabiliste de maximum de vraisemblance implémentée dans le logiciel RAxML (Stamatakis, 2006). Le logiciel calcule la probabilité d'obtenir les données, c'est-à-dire la matrice des caractères, à partir d'un arbre donné. Cette probabilité est appelée vraisemblance et le logiciel sélectionne l'arbre correspondant à la vraisemblance maximale, c'est-à-dire celui qui a la plus forte probabilité de décrire la matrice de données sous un modèle d'évolution des séquences préalablement défini. En pratique, toutes les topologies d'arbres ne peuvent être testées et il faut procéder à des recherches heuristiques. Le logiciel RAxML part ainsi d'un arbre de parcimonie qui est amélioré de proche en proche jusqu'à l'obtention d'un arbre dont la vraisemblance est maximale.

Cinq Verrucariales ont été choisis comme groupes externes : *Staurothele areolata*, *Endocarpon pallidulum*, *Verrucaria viridula*, *Placopyrenium bucekii* et *Verrucula inconnexaria*.

Le choix du modèle d'évolution a été réalisé à l'aide du logiciel jModelTest (Guindon & Gascuel, 2003; Posada, 2008) et selon le critère d'information bayésien (BIC). Pour chaque marqueur, le modèle GTR+G (General Time Reverse) a été utilisé. Ce modèle considère que toutes les substitutions réversibles peuvent avoir lieu à leur propre vitesse et que les fréquences en bases azotées sont variables. L'ajout du paramètre G (gamma) correspond à une distribution gamma qui décrit l'hétérogénéité du taux de substitution entre sites. Dans le cas de séquences identiques, seulement une était conservée dans l'analyse.

Enfin, la robustesse des nœuds de l'arbre a été évaluée par une technique de rééchantillonnage : le « bootstrap » (Felsenstein, 1985). Cent répétitions ont été réalisées pour chaque topologie.

Test de congruence entre marqueurs

Avant de concaténer les matrices de chaque marqueur, il est nécessaire de vérifier que ces marqueurs n'ont pas des histoires évolutives très différentes. Les nœuds supportés par un bootstrap

Tableau 6 : Proportions de séquences obtenues par marqueur

	nuLSU	nuSSU	mtSSU
Pourcentage de réalisation	0,89	0,87	0,71

Tableau 7 : Proportions de caractères conservés, variables et informatifs par marqueur moléculaire et fréquences nucléotidiques moyennes. Le premier nombre est le pourcentage de chaque catégorie et le nombre entre parenthèses représente le nombre de nucléotides de chaque catégorie. L'écart-type des fréquences nucléotidiques est indiqué à côté de chaque valeur.

	Marqueurs moléculaires		
	nuLSU	nuSSU	mtSSU
Nombre de caractères	1318	1582	583
Caractères conservés	69,12 (911)	74,65 (1181)	46,83 (273)
Caractères variables	30,12 (397)	24,65 (390)	51,29 (299)
Caractères informatifs	22,76 (300)	13,34 (211)	40,14 (234)
Singletons	7,36 (97)	11,19 (177)	10,81 (63)
Fréquence moyenne de A	27 ± 0,7	26 ± 0,9	32 ± 0,6
Fréquence moyenne de G	29 ± 0,7	26,6 ± 0,6	22,6 ± 0,7
Fréquence moyenne de C	20 ± 0,8	21,2 ± 0,7	17,7 ± 0,7
Fréquence moyenne de T	24 ± 1,0	26,2 ± 0,5	27,7 ± 0,9

supérieur à 70% pour chaque marqueur ont été comparé afin de détecter d'éventuelles incongruences (Mason-Gamer & Kellogg, 1996). Les topologies ont également été comparées grâce à l'algorithme de de Vienne *et al.* (2007). Ce logiciel détermine si les topologies sont davantage congruentes que des topologies prises au hasard. D'après les deux tests, les marqueurs utilisés supportent des topologies congruentes. Les matrices ont donc été concaténées pour la suite des analyses.

Test de schéma de partitions et de modèles

Lors de la concaténation des trois marqueurs moléculaires, de nombreux schémas de partitions sont possibles. Le logiciel PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012) permet de choisir quelles partitions appliquer au jeu de données et quel modèle utiliser pour chaque partition. L'utilisateur doit spécifier quelles partitions demandent à être testées. Dans un souci de limiter les temps de calcul, seules trois partitions a priori ont été décrites correspondant à chaque marqueur. A partir de ces données, le logiciel estime un arbre de BioNJ (méthode de distance Neighbor-Joining légèrement modifiée) grâce à l'algorithme de PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003; Guindon *et al.*, 2010) puis sélectionne le meilleur modèle pour chaque schéma possible de partitions. Le logarithme de la vraisemblance de chaque sous-ensemble préalablement défini par l'utilisateur est alors calculé et, par addition de ces valeurs, on obtient la vraisemblance de chaque schéma de partitions. Le meilleur schéma de partitions est alors choisi grâce à un critère déterminé par l'utilisateur : critère d'information d'Akaike (AIC) ou critère d'information bayésien (BIC).

Analyse combinée des trois marqueurs

Lorsque l'on dispose de plusieurs marqueurs pour un même groupe de taxa, deux méthodes d'analyse sont possibles. La première nommée « coherentism » ou « total evidence » par Kluge (2004) ne reconnaît la cohérence que de l'ensemble des caractères. Il préconise l'utilisation d'une matrice des caractères concaténée et la robustesse est calculée par bootstrap sur une seule matrice appelée « supermatrice ». La seconde a été développée par Rieppel (2003) et correspond au « foundationalism ». Dans ce cas, les phylogénies séparées de chaque marqueur sont confrontées pour former un « superarbre » dont la fiabilité correspond au nombre de fois où les données indépendantes conduisent au même clade. D'après Gadagkar *et al.* (2005), l'approche par supermatrice conduit à une meilleure précision pour les analyses de vraisemblance. Toutefois, elle peut également renforcer certains biais et les auteurs conseillent d'ajouter le nombre de marqueurs supportant chaque clade en plus de valeurs de bootstrap.

Le jeu de données concaténé a été soumis à une analyse de maximum de vraisemblance avec le logiciel RAxML. D'après les résultats de PartitionFinder, une seule partition a été appliquée et GTR+I+G a été choisi comme modèle d'évolution selon le critère BIC. Le paramètre I désigne la prise en compte d'une fraction de sites invariables. La robustesse de la phylogénie ainsi inférée a été testée par cent répétitions de bootstrap.

Une seconde analyse a été réalisée sur ce jeu de données : une analyse bayésienne grâce au logiciel MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012). Contrairement à la vraisemblance qui repose sur la probabilité d'obtenir les données à partir d'un arbre, la méthode bayésienne s'intéresse à la probabilité d'un arbre connaissant les données. Il ne s'agit alors plus d'une interprétation « fréquentiste » des probabilités (la vraisemblance maximale est la fréquence idéale avec laquelle le processus stochastique de simulation aboutit aux données) mais d'une vision « subjectiviste » (la probabilité d'un arbre est dans ce cas son degré de plausibilité). La méthode bayésienne permet de décrire la distribution de probabilités a posteriori sur l'ensemble des arbres possibles. Grâce à une chaîne de Markov-Metropolis, l'univers des arbres possibles est visité et au fur et à mesure de l'avancée de cette marche aléatoire, la probabilité des arbres est de plus en plus forte. En effet, pour

avancer d'un arbre dans cette marche, il faut que sa probabilité postérieure soit plus forte que l'arbre précédent. Au début du processus, la chaîne échantillonne très facilement des arbres de plus en plus probables. Par la suite, elle atteint des arbres dont la probabilité postérieure domine l'ensemble de la distribution. C'est pourquoi une période dite « d'allumage » correspondant au début de la chaîne est supprimée pour la suite des analyses. Le reste de la distribution est échantillonné à une fréquence définie par l'utilisateur et un arbre consensus est construit à partir de cet échantillonnage. Le même modèle d'évolution que pour la méthode de vraisemblance, GTR+I+G, a été utilisé afin d'obtenir des phylogénies qui puissent être comparées. Deux analyses de quatre chaînes, une chaîne dite « froide » et trois chaînes « chauffées », ont été conduites simultanément pour 11 millions de générations à partir d'un arbre quelconque. Le paramètre de température utilisé est celui implémenté par défaut par le logiciel et a une valeur de 0.2. Les arbres ont été échantillonnés toutes les 500 générations et une zone « d'allumage » (« burn-in ») de 2750000 arbres soit 25% de l'échantillon a été éliminée. En effet, au-delà de cette zone, les valeurs maximales de vraisemblance sont atteintes et le risque de rencontrer un maximum local est minimisé. La robustesse de chaque nœud est estimée par les valeurs de probabilités postérieures qui correspondent à la proportion des arbres de l'échantillon dans lesquels le clade est représenté.

Analyses supplémentaires

Afin de mieux résoudre les branchements les plus récents, des marqueurs très variables ont été utilisés. Sept sous-clades ont été déterminés à partir de la topologie nuLSU-nuSSU-mtSSU : le clade de souches issues du carton, le clade de souches issues des domaties et cinq sous-clades dans le clade mixte (Figure 3). L'objectif était de construire une phylogénie à partir des marqueurs TEF1, β tub et ITS pour chaque sous-clade de champignons des symbioses. Cependant, les difficultés d'amplification n'ont pas permis d'obtenir les jeux de données complets et le nombre de séquences manquantes a empêché la réalisation d'une étude combinée des trois marqueurs. Une phylogénie par marqueur et par clade a été construite grâce au logiciel RAxML avec pour modèle d'évolution GTR+G d'après les résultats de jModelTest. La robustesse des nœuds a été estimée par cent répétitions de bootstrap également réalisées avec le logiciel RAxML.

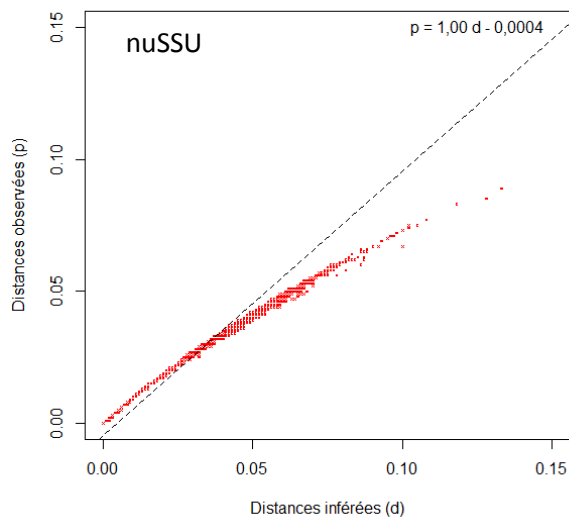
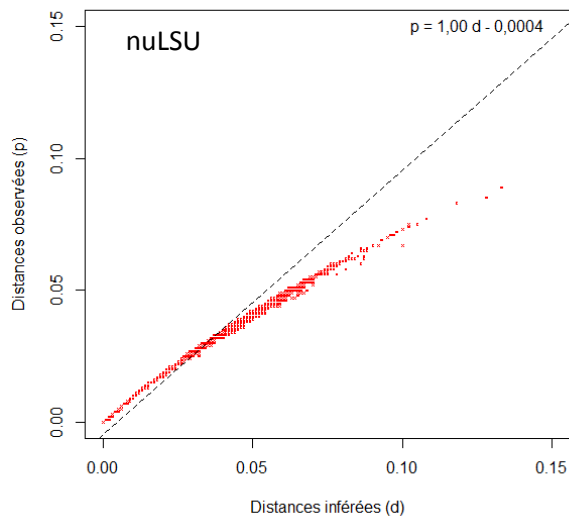
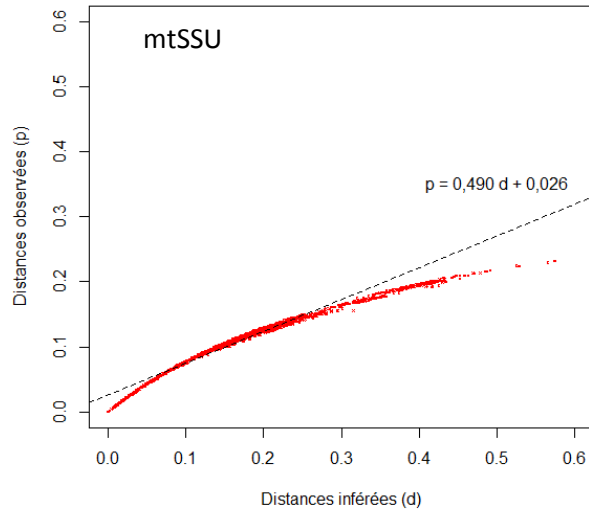


Figure 2 : Visualisation du niveau de saturation des données par les relations entre distances observées et distances inférées grâce au modèle d'évolution GTR + G pour chaque marqueur ribosomique. Les coefficients directeurs des droites de régression indiquent le niveau de saturation des données : proches de 0 les données sont très saturées, proches de 1 les données sont faiblement saturées.

Résultats

Suite aux difficultés détaillées précédemment, l'amplification des régions codantes RPB1 et RPB2 a échoué et les analyses se sont fondées sur les six autres gènes. Étant donné leur forte divergence entre espèces éloignées, les trois marqueurs ITS, β tub et TEF1, n'ont pas été utilisés pour la construction de l'arbre global des Chaetothyriales.

Tests préliminaires pour l'inférence phylogénétique

Test de neutralité des marqueurs

L'analyse réalisée avec le logiciel Arlequin a montré qu'aucun des marqueurs utilisés pour la construction de l'arbre global (nuSSU, nuLSU, mtSSU) n'était sous sélection : la valeur D identique pour les trois marqueurs et égale à 0.03194 n'est significative dans aucun des cas ($P_{\text{nuLSU}} = 0.799$; $P_{\text{nuSSU}} = 0.0808$ et $P_{\text{mtSSU}} = 0.0808$). Ces marqueurs sont donc utilisables pour construire une phylogénie. En effet, la phylogénie de marqueurs sous sélection ne sera pas représentative de la phylogénie des espèces. L'utilisation de plusieurs marqueurs moléculaires neutres maximise les chances d'approcher la véritable histoire évolutive des espèces étudiées.

Test de saturation des données

Les graphes confrontant les distances observées aux distances inférées par le modèle d'évolution indiquent que les données de chaque matrice sont faiblement saturées : les coefficients directeurs des droites de régression sont de 1 ; 0,49 et 0,96 respectivement pour les marqueurs nuSSU, mtSSU et nuLSU (Figure 2). Ceci indique que tous les marqueurs sont porteurs de signal phylogénétique et qu'il est utile de les conserver dans l'analyse.

Test de biais de composition en bases

D'après le test de Khi-deux du logiciel TREE-PUZZLE, il n'y a pas de différence significative dans les compositions en nucléotides des séquences utilisées. L'hypothèse des modèles d'évolution utilisés est donc vérifiée. D'autre part, on peut remarquer qu'il n'y a pas de déséquilibre important dans la composition nucléotidique des séquences (Tableau 7).

Inférence phylogénétique

Analyses par marqueur

Parmi les trois marqueurs utilisés, mtSSU est le plus variable : 40,14% des nucléotides sont informatifs. Pour nuSSU et nuLSU respectivement, 13,34% des 1582 nucléotides et 22,76% des 1318 nucléotides sont informatifs (Tableau 7).

Les analyses réalisées sur les trois marqueurs nuLSU, nuSSU et mtSSU présentent des topologies similaires à l'exception de quelques différences minimales. Les tests de congruence ont confirmé que les trois marqueurs décrivaient la même histoire évolutive, ceux-ci ont donc été analysés simultanément.

Analyse combinée de trois marqueurs

La matrice des marqueurs concaténés contient 199 souches de champignons et 3481 caractères. Toutes les souches ajoutées lors de cette étude appartiennent à l'ordre des Chaetothyriales. Les topologies d'arbres obtenues par maximum de vraisemblance et par analyse

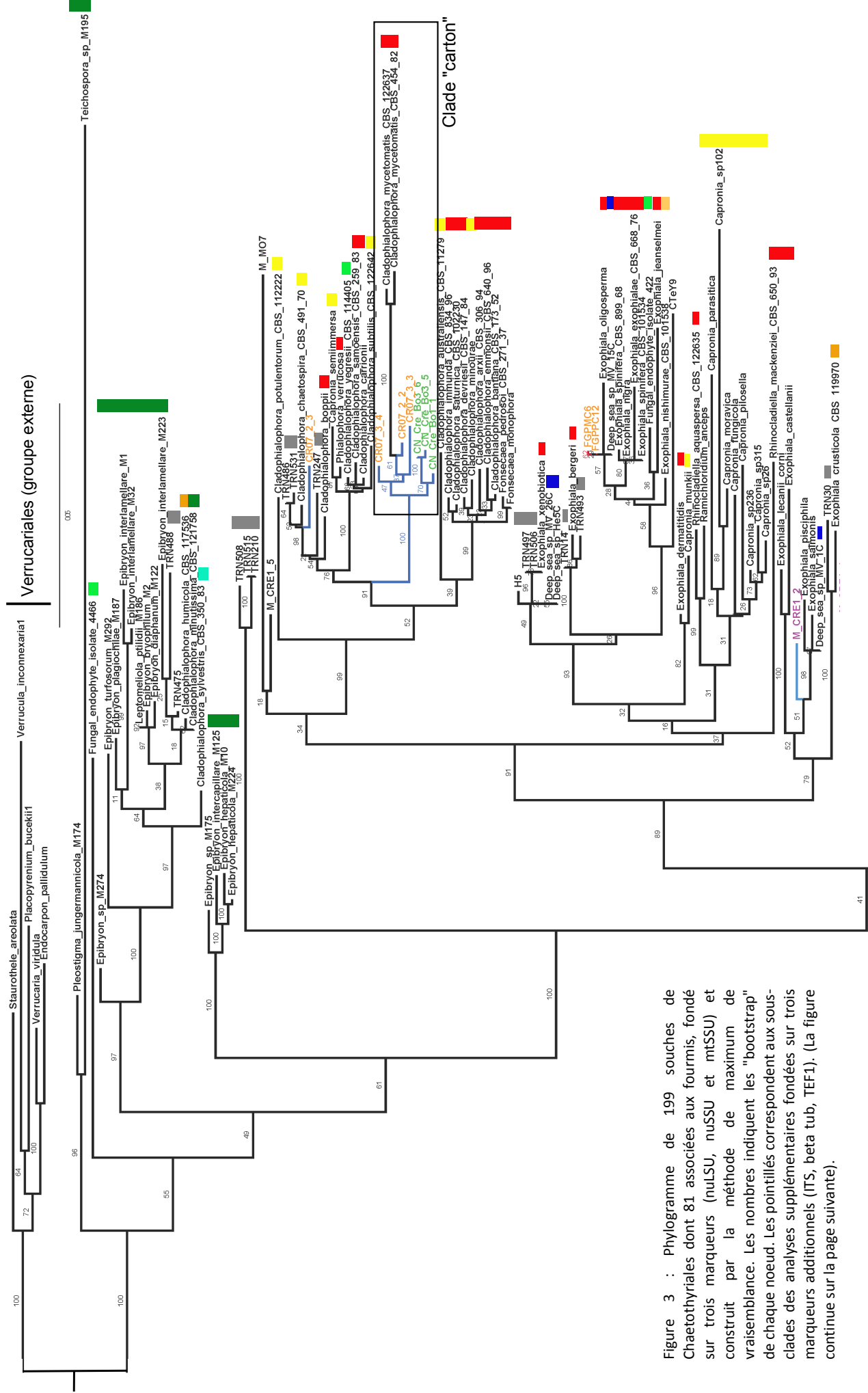


Figure 3 : Phylogramme de 199 souches de Chaetothyriales dont 81 associées aux fourmis, fondé sur trois marqueurs (nuLSU, nuSSU et mtSSU) et construit par la méthode de maximum de vraisemblance. Les nombres indiquent les "bootstrap" de chaque noeud. Les pointillés correspondent aux sous-clades des analyses supplémentaires fondées sur trois marqueurs additionnels (ITS, beta tub, TEF1). (La figure continue sur la page suivante).

bayésienne sont identiques à l'exception d'un branchement entre deux sous-clades du clade « mixte » (Figures 3 et 4). On remarque également quelques différences dans l'agencement des nœuds pour les souches basales (certains champignons des genres *Epibryon* et *Cladophialophora* par exemple). Les sous-clades 6 et 7 sont regroupés dans l'arbre de vraisemblance et plus éloignés sur l'arbre bayésien (Figures 3 et 4). Les souches de champignons associées aux fourmis se retrouvent principalement dans trois clades : un clade de souches provenant du carton (dit clade « carton »), un clade des souches provenant des domaties (dit clade « domatie ») et un clade mixte (dit clade « mixte ») constitué à la fois de souches du carton et de souches des domaties. Cette topologie corrobore globalement les résultats préliminaires de l'étude de Voglmayr *et al.* (2011) fondée sur un seul fragment (une partie de nuLSU) et moins de souches.

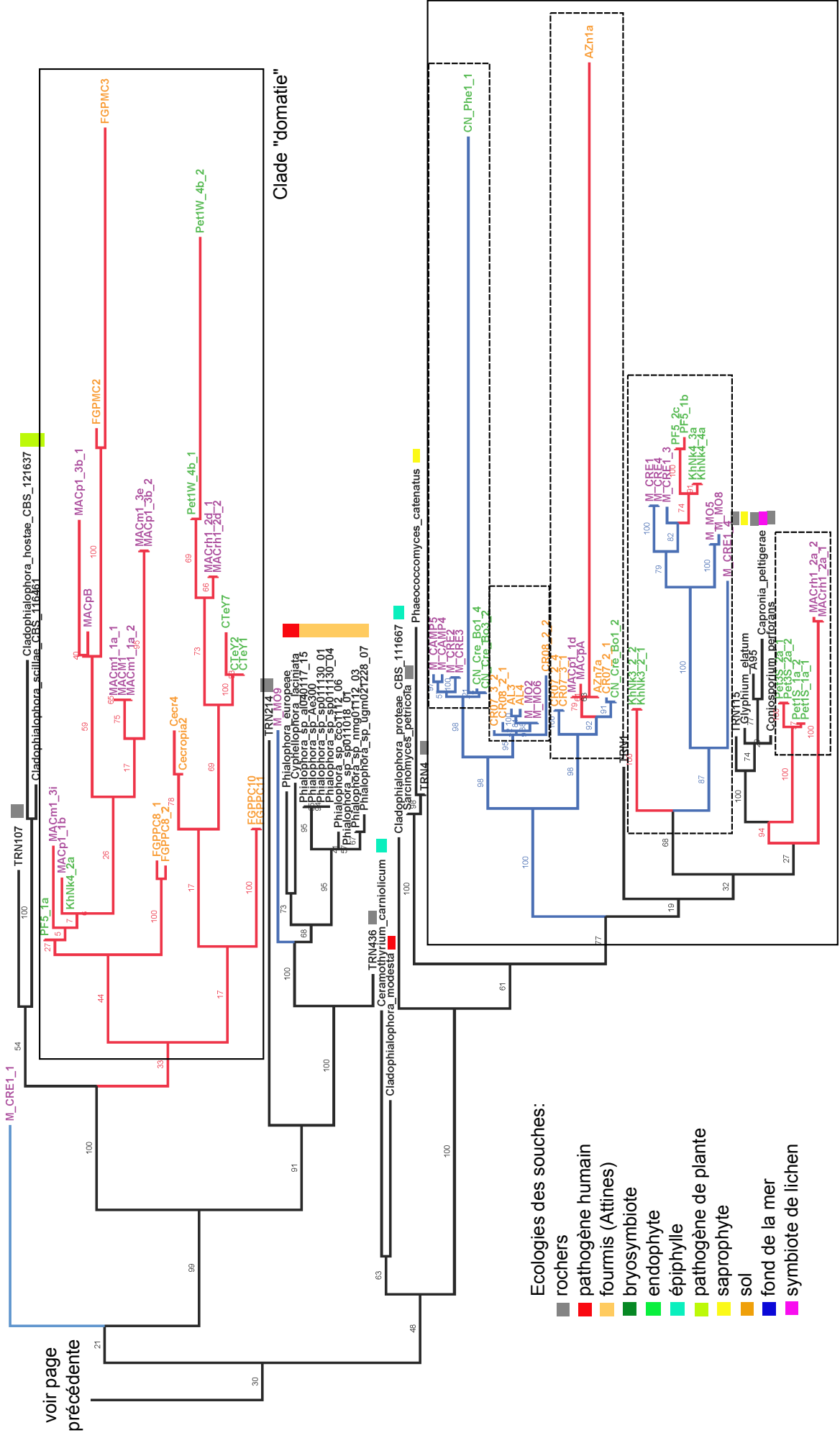
Les embranchements basaux ne sont pas très bien supportés mais les nœuds à la base des clades des souches de champignons associées aux fourmis sont robustes (valeurs de bootstrap supérieures à 95%, valeurs de probabilités postérieures égales à 100). L'utilisation de gènes codants tels de RPB1 ou RPB2 qui sont moins variables que les ADN ribosomiques permettrait d'obtenir une meilleure résolution des nœuds ancestraux.

Le clade « domaties » contient 23 des 38 souches isolées des domaties. Le clade « carton » regroupe 6 souches issues du carton et deux souches de *Cladophialophora mycetomatis* qui sont des pathogènes humains. Le clade « mixte » comprend 23 souches de carton, 16 souches des domaties et cinq souches non associées aux fourmis. Parmi ces cinq souches, trois sont des champignons que l'on retrouve sur les rochers dénudés, un vit en symbiose sur les lichens et le dernier est un saprophyte.

Les trois clades sont distants sur l'arbre général, le clade mixte et le clade domaties étant les plus proches et formant un ensemble constitué essentiellement de champignons associés aux fourmis. En effet, le clade « domaties » est proche d'un autre clade qui regroupe des champignons du genre *Phialophora*, qui sont parasites des bactéries symbiotiques des fourmis Attines.

Le clade « domatie » est très soutenu à sa base (BS 100%) mais certains de ses branchements internes sont peu robustes. On retrouve ainsi un couple de souches répliqués qui semblent éloignées phylogénétiquement : MACp1_3b_1 et MACp1_3b_2. De même, les souches MACm1_3e et MACm1_3i apparaissent très différentes alors que leurs séquences ITS sont identiques. A cette exception près, les répliqués des souches sont soit identiques soit plus proches parents, les différences étant dues à des longueurs de séquences différentes suite à des problèmes d'amplification ou de séquençage ou encore à des données manquantes (un marqueur absent par exemple). Les quatre longues branches de l'arbre correspondent à des différences importantes de longueur de séquences et sont des artefacts de construction. Aucune souche de champignon associée à des espèces de fourmis différentes ne présente de séquence identique. Les souches dont les ITS présentaient plus de 98% de similarité sont également regroupées dans des clades très soutenus : par exemple CTeY1/CTeY2 ou FGPMC2/FGPMC3. Dans le cas de la symbiose plante/fourmis entre *Barteria fistulosa* et *Tetraoponera aethiops*, pour laquelle nous connaissons le patron de spécificité du champignon (voir matériel et méthodes), les souches impliquées forment un clade monophylétique constitué de deux espèces probables : les souches CTeY1 et CTeY2 forment deux isolats d'une même « espèce » de champignon (séquences ITS également identiques) qui est le symbiote principal et CTeY7 semble être une « espèce » différente (de plus la région ITS est similaire à seulement 93% avec CTeY1) mais proche, et qui est le symbiote secondaire. Ce regroupement phylogénétique de souches communes à un système plante/fourmis ne semble pas général. Par exemple, la symbiose plante/fourmis entre *Saraca thaipingensis* et *Cladomyrma petalae* a fourni cinq souches réparties en trois « espèces » probables ([MACp1-1b], [MACpB, MACp1_3b], [MACp1_1d, MACpA]) dont deux se trouvent dans le clade « domaties » et une dans le clade « mixte ».

Aucun patron géographique n'est décelable dans la topologie de l'arbre. Des souches qui apparaissent très proches phylogénétiquement proviennent de continents différents : les souches CR07_3_4, CR07_3_3 du clade « carton » ont été isolées au Costa Rica sont très proches des souches CN_Cre_Bo3_5 et CN_Cre_Bo1_1 du Cameroun. Au contraire, des souches prélevées dans différents



systèmes symbiotiques sympatriques peuvent appartenir à des clades différents : par exemple, les souches KhNk4_2a, CTeY1, PF5_2c et Pet3S_2a, qui sont phylogénétiquement éloignées, proviennent de quatre symbioses plante/fourmis différentes récoltées sur une aire de moins d'1 km². D'autre part, des souches différentes isolées de la même domatie peuvent être placées dans des clades différents : KhNk4_2a appartient au clade « domatie » alors que KhNk4_3a, KhNk4_4a, KhNk3_2_2 et KhNk3_2_1 appartiennent au clade « mixte ».

Analyses supplémentaires

Trop peu de séquences étaient disponibles par marqueur pour obtenir des phylogénies utilisables. De plus, ces marqueurs sont extrêmement variables et les nœuds de chaque topologie n'étaient pas mieux soutenus que ceux de l'analyse combinée des marqueurs nuLSU-nuSSU-mtSSU. Les phylogénies inférées par des marqueurs différents n'étaient pas non plus toujours congruentes.

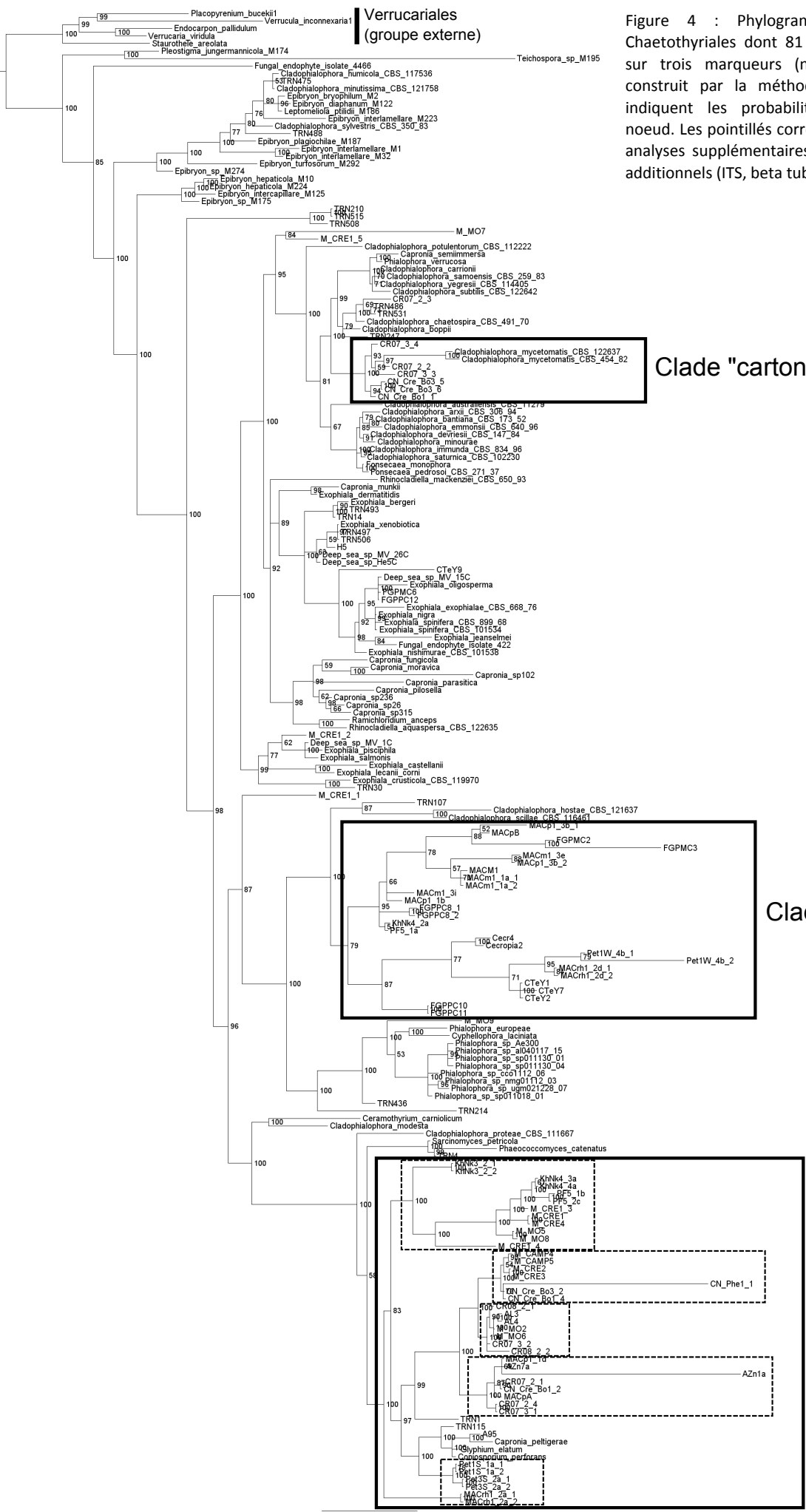


Figure 4 : Phylogramme de 199 souches de Chaetothyriales dont 81 associées aux fourmis, fondé sur trois marqueurs (nuLSU, nuSSU et mtSSU) et construit par la méthode bayésienne. Les nombres indiquent les probabilités postérieures de chaque noeud. Les pointillés correspondent aux sous-clades des analyses supplémentaires fondées sur trois marqueurs additionnels (ITS, beta tub, TEF1).

Discussion

Les marqueurs utilisés dans cette analyse n'ont pas permis de résoudre toutes les relations phylogénétiques entre les souches étudiées. Des marqueurs moins variables seraient utiles pour obtenir des nœuds ancestraux plus robustes. Des marqueurs plus variables sont également nécessaires pour inférer la phylogénie récente mais il semble que les marqueurs supplémentaires choisis n'aient pas été très adaptés car trop variables. Cependant, de part les irrésolutions liées au manque de données pour de nombreuses souches concernant ces marqueurs, on ne peut affirmer qu'ils sont inappropriés pour décrire les branchements récents. Les données manquantes sont également à l'origine des longues branches de la topologie principale. L'utilisation de réplicats pour une même souche permet de mieux visualiser l'effet des données manquantes car, pour trois de ces longues branches, seul le nombre de nucléotides diffère entre ces souches et leurs réplicats, leurs séquences étant identiques par ailleurs. Il apparaît donc nécessaire de compléter le jeu de données afin d'inférer une phylogénie plus fiable.

D'autre part, certaines relations dans le clade « domatie » semblent témoigner d'une erreur dans la topologie. En effet, la souche MACp1_3b_2 devrait être identique à MACp1_3b_1. Or elle apparaît similaire à MACm1_3e et différente de la souche réplikat. Il est peu probable que cette topologie reflète la véritable histoire évolutive de ces souches car les deux souches réplicats sont issues d'un même hyph. Il peut s'agir d'une contamination d'une souche par une autre via des acariens par exemple qui, en passant d'une boîte à l'autre, repiquent les souches, ou d'une erreur d'étiquetage d'un tube. Ce genre de problème illustre le risque d'utiliser des séquences de différents marqueurs issues de GeneBank. En effet, ces séquences sont souvent obtenues à partir d'individus différents et les regrouper dans une analyse combinée en les attribuant à une « espèce » représentée par un individu peut aboutir à ce genre d'erreur. En effet, la feuille de l'arbre censée représenter une « espèce » particulière peut s'avérer être reconstituée à partir de séquences provenant d'espèces différentes. Ceci est particulièrement problématique chez les champignons qui peuvent muter rapidement, dont la taxinomie n'est pas toujours très claire et pour lesquels les données morphologiques restent restreintes. C'est pourquoi, pour toutes les souches utilisées dans cette étude, les séquences de chaque marqueur ont été obtenues à partir d'un seul individu ou considérées comme provenant de souches différentes, même pour les souches dites réplicats.

Les souches de Chaetothiales associées aux fourmis correspondent à autant d'espèces potentielles non décrites à ce jour et représentent une diversité remarquable. Les souches réplicats représentent certainement une même espèce ainsi que les couples de souches isolées d'une même domatie et dont les séquences ITS sont identiques. Les autres souches apparaissent bien différenciées et sont corroborées par les différentes phylogénies des gènes produites dans cette analyse. De plus, les distances génétiques observées entre les souches ne tiennent pas compte des zones ambiguës qui ont été supprimées de l'analyse pour éviter les homoplasies et qui sont très variables. Le concept d'espèce phylogénétique par concordance généalogique (Taylor *et al.*, 2000) attribuerait donc une espèce à chaque souche (ou couple de réplicats). Il est cependant difficile de parler d'espèces dans le cadre de notre étude car chacune ne serait représentée que par un ou deux individus et qu'il n'y aurait pas de représentativité de la variation intraspécifique. La difficulté d'obtenir les échantillons et de les conserver jusqu'à la mise en culture explique le faible nombre de souches par système. En effet, les fourmis doivent être vivantes pour maintenir les champignons et le transport de ce matériel biologique aboutit fréquemment à des échecs. De plus, une fois les souches de la domatie mises en culture, il faut s'assurer de protéger les souches d'intérêt contre la contamination et la compétition avec des champignons comme *Penicillium* ou *Aspergillus*. S'il est légitime d'affirmer que la phylogénie regroupe plusieurs espèces différentes, il n'est pas possible de

déterminer un seuil qui fixerait la limite entre variation intra et interspécifique. Pour cela, d'autres individus des mêmes espèces supposées seraient nécessaires.

Les Chaetothyriales des symbioses plante/fourmis sont répartis en trois grands clades quasi-monophylétiques. Cette phylogénie n'est absolument pas congruente avec celles des plantes ou des fourmis symbiotiques et témoigne d'un patron de diversification différent. En effet, les symbioses plante/fourmis constituent globalement des convergences évolutives qui résultent d'évènements phylogénétiquement indépendants (hormis quelques rares radiations). La topologie des arbres semble indiquer trois origines de l'association des champignons avec les plantes et les fourmis. A partir de ces évènements, des changements d'hôtes suivis de spéciation pourraient être à l'origine de la diversification des groupes. Les relations phylogénétiques étroites entre des champignons isolés de symbioses de continents différents pourraient être expliquées par l'hypothèse suivante : les changements d'hôtes se feraient à grande échelle spatiale car les Chaetothyriales ont d'importantes capacités de dispersion notamment grâce au stade levure (les Chaetothyriales passent fréquemment du stade mycélien au stade levure et vice versa). Si l'association entre ces champignons et les symbioses plante/fourmis est ancienne, il est envisageable qu'une certaine proportion de ces symbioses tripartites ait disparu, les symbioses plante/fourmis n'étant pas stables d'un point de vue évolutif (Davidson & McKey, 1993). Il manquerait donc dans la phylogénie que l'on peut construire aujourd'hui toutes les espèces de champignons éteintes. Ceci expliquerait que l'on n'observe plus de patron géographique. Il n'est pas aberrant d'imaginer une dispersion des Chaetothyriales d'un continent vers un autre car d'autres champignons de cet ordre présentent une distribution mondiale (Sudhaham *et al.*, 2011). En ce qui concerne l'ancienneté des évènements de spéciation, il est plus difficile de se prononcer car il n'existe pas de fossile connu de Chaetothyriales ce qui rend impossible une datation fiable de la phylogénie.

Il semblerait donc que la spéciation de ces champignons soit liée à leur hôte. Les symbioses plante/fourmis seraient alors à l'origine de la diversification de groupes de Chaetothyriales en créant de nouvelles niches. Il serait intéressant d'étudier la phylogénie des autres partenaires de ces symbioses (bactéries, hémiptères, nématodes ...) afin de déterminer si ce patron d'évolution est commun. Cependant, il faut noter que ce schéma évolutif n'est valable que dans le cadre de l'échantillonnage réalisé dans cette étude. Cet échantillonnage ne représente évidemment pas toute la diversité de l'ordre et la découverte de nouvelles espèces de Chaetothyriales pourrait modifier la vision que nous avons de leur évolution. Ainsi, Gueidan *et al.* (2008) avaient défini les champignons des rochers dénudés comme étant l'état ancestral de l'ordre mais l'obtention des séquences des champignons du genre *Epibryon* récemment étudiés (Stenroos *et al.*, 2010) a placé ce groupe à la base de la phylogénie des Chaetothyriales (cette étude). Les Chaetothyriales en symbiose avec les bryophytes (dont le genre *Epibryon*) forment un groupe polyphylétique basal. Cette écologie pourrait donc constituer l'état ancestral de l'ordre. Il est envisageable que des espèces de Chaetothyriales découvertes à l'avenir s'insèrent dans les clades de champignons associés aux fourmis. Par exemple, une étude récente décrivant de nouvelles espèces épiphyllées du genre *Trichomerium* et fournissant leurs séquences nuLSU semble placer ce genre au sein des souches associées au carton des fourmis (Chomnunti *et al.*, sous presse). Quoiqu'il en soit, toutes les souches de symbioses associées dans cette étude sont apparentées aux souches décrites par Volgmayr *et al.* (2011) et appartiennent aux clades définis dans cette étude.

La phylogénie actuelle met également en évidence le fait qu'il n'existe pas d'origine unique des champignons des symbioses et qu'ils ne découlent pas d'une seule écologie particulière. En effet, les souches basales ou proches des clades associés aux fourmis correspondent à des champignons de mode de vie très différents à l'exception du clade « carton ». Toutes les souches proches de ce clade appartiennent au genre *Cladiophialophora* (ou ont été récemment attribuées à ce genre comme les

Fonsecaea, (Badali *et al.*, 2008)) qui contient de nombreux pathogènes humains. Cependant, il est possible que ces champignons ne soient connus que pour leur action sur l'homme et qu'ils ne soient en réalité pathogènes que de façon opportuniste. Des changements faciles et rapides de mode de vie pourraient expliquer qu'il y ait des différences si marquées dans l'écologie de souches proches mais il est difficile de prononcer en absence de phylogénie datée.

Les souches de Chaetothyriales associées aux symbioses plante/fourmis semblent être spécifiques à chaque couple plante/fourmis, et peut-être plus particulièrement à l'espèce de fourmi considérée. Pour les systèmes *Leonardoxa africana* / *Petalomyrmex phylax* et *Barteria fistulosa* / *Tetraponera aethiops* étudiés en détail par l'équipe, l'association constante entre la symbiose plante/fourmis et des souches particulières de champignons a été vérifiée et le caractère symbiotique de cette association tripartite a été prouvé (Defosse *et al.*, 2009; Defosse *et al.*, 2011; Blatrix *et al.*, 2012). De plus, dans le système *Leonardoxa africana* / *Petalomyrmex phylax*, si la plante est occupée par une autre espèce de fourmi (comme cela arrive quelques fois), les champignons ne sont pas présents. Pour ces deux systèmes ainsi que pour *Pseudomyrmex penetrator* / *Tachigali* sp., les fourmis nourrissent leurs larves avec les champignons des domaties (Blatrix *et al.*, 2012). Ces observations révèlent des liens étroits entre les fourmis et les champignons qui pourraient être généralisables aux autres systèmes de part la spécificité des champignons. Dans une même zone géographique, des symbioses coexistent et chacune présente des champignons différents. Lorsque plusieurs souches ont été isolées d'une même domatie, toutes appartiennent à l'un des trois clades de champignons associés aux fourmis même si les PCR environnementales ne permettent pas de détecter leur présence indiquant qu'elles ne sont pas prédominantes dans l'agrégat. Pour le système *Barteria fistulosa* / *Tetraponera aethiops*, la souche secondaire CTeY7 apparaît très proche de la souche principale CTeY1, alors que dans le système *Crematogaster* sp. / *Keetia hispida*, la souche principale KhNk3_2 est dans le clade « mixte » et les souches secondaires KhNk4_2a et KhNk4_3a dans les clades « domatie » et « mixte » (on appelle souche principale celle dont le marqueur ITS ressort le plus fréquemment en PCR environnementale). Ces observations suggèrent une forte liaison avec les fourmis. Toutefois, les analyses sur les échantillons environnementaux des autres systèmes n'ont pas été réalisées. De plus, deux souches issues des domaties de *Tachigali* sp., FGPMC6 et FGPMC12, apparaissent hors des clades. Ces deux souches, représentant probablement la même espèce, sont assez particulières car elles ont une vitesse de croissance bien plus élevée que toutes les autres souches de l'étude, y compris les souches FGPMC2 et FGPMC3 isolées de la même domatie. On peut imaginer qu'il s'agisse d'un clade supplémentaire de Chaetothyriales associés aux fourmis mais encore peu échantillonné, ou d'un nouveau groupe en voie de diversification bien que cela reste hautement spéculatif. Ce sont plus probablement des champignons qui n'ont pas de rôle au sein de la symbiose et sont par exemple des endophytes. Les PCR environnementales sur ce système apporteront un élément de réponse à cette hypothèse.

De nombreuses espèces de fourmis arboricoles construisent des nids ou des galeries en carton. Dans la plupart des cas, elles ne s'installent pas sur une espèce de plante en particulier mais sont au contraire très opportunistes dans le choix du support. Par ailleurs, certaines fourmis impliquées dans des symbioses avec des plantes myrmécophytes fabriquent, elles aussi, du carton. Malheureusement, nous disposons de très peu d'échantillons de carton par espèce de fourmi et ces échantillons ne couvrent qu'une seule espèce de plante par espèce de fourmi. Il est donc impossible de conclure sur la spécificité des souches de Chaetothyriales du carton par rapport à l'espèce de fourmi qui le construit et par rapport à la plante support. A l'exception de quelques souches distribuées isolément dans le phylogramme, les souches du carton sont groupées dans deux clades (le clade « carton » et le clade « mixte »), ce qui suggère que la construction de carton par les fourmis puisse être à l'origine d'une diversification des Chaetothyriales.

Les Chaetothyriales associés aux fourmis dont les séquences ont été obtenues dans cette étude forment trois grands clades quasi-monophylétiques au sein d'un ordre très diversifié. La phylogénie pourrait ainsi témoigner de radiations survenues chez ces champignons à la suite d'un faible nombre d'acquisitions par des systèmes impliquant des fourmis. Ces fourmis n'étant pas apparentées, il s'agirait plutôt d'évènements de spéciation liés à des changements d'hôtes qu'à de la co-spéciation. Le clade « domatie » est proche du clade des champignons parasites des bactéries de la cuticule des fourmis Attines. Au sein des Chaetothyriales, des clades sont donc constitués presque exclusivement de champignons qui entretiennent des relations particulières avec différentes espèces de fourmis. Il semblerait que l'association avec les fourmis forme une niche particulière qui induit une diversification dans certains groupes de Chaetothyriales. On retrouve également des Chaetothyriales dans d'autres systèmes impliquant des fourmis (pour lesquels les souches n'étaient pas disponibles pour cette analyse) tels que le carton des *Lasius* d'Europe (Schlick-Steiner *et al.*, 2008) ou les pièges des *Allomerus* de Guyane française (Dejean *et al.*, 2005; Ruiz-Gonzalez *et al.*, 2011) ce qui montre que l'association Chaetothyriales/fourmis est largement répandue.

Bibliographie

- Badali H., Gueidan C., Najafzadeh M. J., Bonifaz A., van den Ende A. H., de Hoog G. S., 2008. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Studies in Mycology* **61**, 175-191.
- Bailey I. W., 1920. Some relations between ants and fungi. *Ecology* **1**, 174-189.
- Bascompte J., Jordano P., Melian C. J., Olesen J. M., 2003. The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9383-9387.
- Beattie A. J., 1985. The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. Cambridge University Press, Cambridge, 182 p.
- Beattie A. J., Hughes L., 2002. Ant plant interactions. pp. 211-235 in: Herrera, C.M., Pellmyr, O. (Ed.) - Plant-animal interactions: an evolutionary approach, Wiley-Blackwell, Oxford.
- Belyea L. R., Lancaster J., 1999. Assembly rules within a contingent ecology. *Oikos* **86**, 402-416.
- Berg C., Rosseli P. F., 2005. *Cecropia*. The New York Botanical Garden Press, New York, 233 p.
- Berg C. C., Wiebes J. T., 1992. African fig trees and fig wasps. North-Holland, Amsterdam, 298 p.
- Blatrix R., Bouamer S., Morand S., Selosse M. A., 2009. Ant-plant mutualisms should be viewed as symbiotic communities. *Plant Signaling and Behaviour* **4**, 554-556.
- Blatrix R., Djiéto-Lordon C., Mondolot L., La Fisca P., Voglmayr H., McKey D., 2012. Plant-ants use symbiotic fungi as a food source: new insight into the nutritional ecology of ant-plant interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 3940-3947.
- Blattner F. R., Weising K., Banfer G., Maschwitz U., Fiala B., 2001. Molecular analysis of phylogenetic relationships among myrmecophytic *Macaranga* species (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 331-344.
- Carbone I., Kohn L. M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**, 553-556.
- Chenuil A., McKey D. B., 1996. Molecular phylogenetic study of a myrmecophyte symbiosis: did *Leonardoxa* / ant associations diversify via cospeciation? *Molecular Phylogenetics and Evolution* **6**, 270-286.
- Chomnunti P., Bhat D. J., Gareth Jones E. B., Chukeatirote E., Bahkali A. H., Hyde K. D., sous presse. Trichomeriaceae, a new sooty mould family of Chaetothyriales. *Fungal Diversity*.
- Clayton D. H., Bush S. E., Goates B. M., Johnson K. P., 2003. Host defense reinforces host-parasite cospeciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15694-15699.
- Currie C. R., Wong B., Stuart A. E., Schultz T. R., Rehner S. A., Mueller U. G., Sung G. H., Spatafora J. W., Straus N. A., 2003. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science* **299**, 386-388.
- Davidson D. W., McKey D., 1993. The evolutionary ecology of symbiotic ant-plant relationships. *Journal of Hymenoptera Research* **2**, 13-83.
- Davies S. J., Lum S. K. Y., Chan R., Wang L. K., 2001. Evolution of myrmecophytism in western Malesian *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution* **55**, 1542-1559.
- De Bary A., 1879. De la symbiose. *Revue Internationale des Sciences* **3**, 301-309.
- de Hoog G. S., Zeng J. S., HARRAK M. J., Sutton D. A., 2006. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek* **90**, 257-268.
- de Vienne D. M., Giraud T., Martin O. C., 2007. A congruence index for testing topological similarity between trees. *Bioinformatics* **23**, 3119-3124.
- Defosse E., Djiéto-Lordon C., McKey D., Selosse M. A., Blatrix R., 2011. Plant-ants feed their host plant, but above all a fungal symbiont to recycle nitrogen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**, 1419-1426.

- Defosse E., Selosse M. A., Dubois M. P., Mondolot L., Faccio A., Djiéto-Lordon C., McKey D., Blatrix R., 2009. Ant-plants and fungi: a new threeway symbiosis. *New Phytologist* **182**, 942-949.
- Dejean A., Solano P. J., Ayroles J., Corbara B., Orivel J., 2005. Arboreal ants build traps to capture prey. *Nature* **434**, 973.
- Dentinger B. T. M., Lodge D. J., Munkacsi A. B., Desjardin D. E., McLaughlin D. J., 2009. Phylogenetic placement of an unusual coral mushroom challenges the classical hypothesis of strict coevolution in the *Apterostigma pilosum* group ant-fungus mutualism. *Evolution* **63**, 2172-2178.
- Doyle J. J., Doyle J. L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11-15.
- Edgar R. C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**, 1792-1797.
- Erasmus J. C., van Noort S., Jusselin E., Greeff J. M., 2007. Molecular phylogeny of fig wasp pollinators (Agaonidae, Hymenoptera) of *Ficus* section *Galoglychia*. *Zoologica Scripta* **36**, 61-78.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1** : 47-50.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fiala B., Maschwitz U., Pong T. Y., Helbig A. J., 1989. Studies of a South East Asian ant-plant association: protection of *Macaranga* trees by *Crematogaster borneensis*. *Oecologia* **79**, 463-470.
- Gadagkar S. R., Rosenberg M. S., Kumar S., 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* **304**, 64-74.
- Galtier N., Gouy M., 1998. Inferring pattern and process: Maximum-likelihood implementation of a nonhomogeneous model of DNA sequence evolution for phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 871-879.
- Gardes M., Bruns T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**, 113-118.
- Gargas A., Taylor J. W., 1992. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* **84**, 589-592.
- Glass N. L., Donaldson G. C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1323-1330.
- Gomez-Acevedo S., Rico-Arce L., Delgado-Salinas A., Magallon S., Eguiarte L. E., 2010. Neotropical mutualism between *Acacia* and *Pseudomyrmex*: Phylogeny and divergence times. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **56**, 393-408.
- Gueidan C., Roux C., Lutzoni F., 2007. Using a multigene phylogenetic analysis to assess generic delineation and character evolution in *Verrucariaceae* (*Verrucariales*, *Ascomycota*). *Mycological Research* **111**, 1145-1168.
- Gueidan C., Villasenor C. R., de Hoog G. S., Gorbushina A. A., Untereiner W. A., Lutzoni F., 2008. A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. *Studies in Mycology* **61**, 111-119.
- Guindon S., Gascuel O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**, 696-704.
- Guindon S., Dufayard J. F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**, 307-321.
- Hennig W., 1966. *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press Urbana, 263 p.
- Herre E. A., Knowlton N., Mueller U. G., Rehner S. A., 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 49-53.

- Hoffmeister M., Martin W., 2003. Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environmental Microbiology* **5**, 641-649.
- Hölldobler B., Wilson E. O., 1990. The ants. Belknap Press, Cambridge, 732 p.
- Horiike T., Hamada K., Kanaya S., Shinozawa T., 2001. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nature Cell Biology* **3**, 210-214.
- Huxley C. R., 1978. Ant-plants *Myrmecodia* and *Hydnophytum* (Rubiaceae), and the relationships between their morphology, ant occupants, physiology and ecology. *New Phytologist* **80**, 231-268.
- Itino T., Davies S. J., Tada H., Hieda O., Inoguchi M., Itoioka T., Yamane S., Inoue T., 2001. Cospeciation of ants and plants. *Ecological Research* **16**, 787-793.
- Janzen D. H., 1972. Protection of *Barteria* (Passifloraceae) by *Pachysima* ants (Pseudomyrmecinae) in a Nigerian rain-forest. *Ecology* **53**, 885-892.
- Johnson K. P., Adams R. J., Page R. D. M., Clayton D. H., 2003. When do parasites fail to speciate in response to host speciation? *Systematic Biology* **52**, 37-47.
- Jorgensen B. B., Erez J., Revsbech N. P., Cohen Y., 1985. Symbiotic photosynthesis in a planktonic foraminiferan, *Globigerinoides sacculifer* (Brady), studied with microelectrodes. *Limnology and Oceanography* **30**, 1253-1267.
- Jousselin E., Rasplus J. Y., Kjellberg F., 2003. Convergence and coevolution in a mutualism: Evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution* **57**, 1255-1269.
- Jousselin E., van Noort S., Berry V., Rasplus J. Y., Ronsted N., Erasmus J. C., Greeff J. M., 2008. One fig to bind them all: Host conservatism in a fig wasp community unraveled by cospeciation analyses among pollinating and nonpollinating fig wasps. *Evolution* **62**, 1777-1797.
- Kauff F., Lutzoni F., 2002. Phylogeny of the Gyalectales and Ostropales (Ascomycota, Fungi): among and within order relationships based on nuclear ribosomal RNA small and large subunits. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**, 138-156.
- Kluge A. G., 2004. On total evidence: for the record. *Cladistics* **20**, 205-207.
- Kneip C., Voss C., Lockhart P. J., Maier U. G., 2008. The cyanobacterial endosymbiont of the unicellular algae *Rhopalodia gibba* shows reductive genome evolution. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 30.
- Lanfear R., Calcott B., Ho S. Y. W., Guindon S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 1695-1701.
- Lemey P., Salemi M., Vandamme A. M. (Ed.), 2009. The phylogenetic handbook, Cambridge University Press, Cambridge, 723 p.
- Liu Y. J. J., Whelen S., Benjamin D. H., 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 1799-1808.
- Long S. R., 1996. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885-1898.
- Lumbsch H. T., Schmitt I., Palice Z., Wiklund E., Ekman S., Wedin M., 2004. Supraordinal phylogenetic relationships of Lecanoromycetes based on a Bayesian analysis of combined nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**, 822-832.
- Lutzoni F., Wagner P., Reeb V., Zoller S., 2000. Integrating ambiguously aligned regions of DNA sequences in phylogenetic analyses without violating positional homology. *Systematic Biology* **49**, 628-651.
- Machado C. A., Robbins N., Gilbert M. T. P., Herre E. A., 2005. Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6558-6565.
- Machado C. A., Jousselin E., Kjellberg F., Compton S. G., Herre E. A., 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **268**, 685-694.
- MacLean A. M., Finan T. M., Sadowsky M. J., 2007. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology* **144**, 615-622.

- Maragos J. E., Crosby M. P., McManus J. W., 1996. Coral reefs and biodiversity: a critical and threatened relationship. *Oceanography* **9**, 83-99.
- Margulis L., Bermudes D., 1985. Symbiosis as a mechanism of evolution: status of cell symbiosis theory. *Symbiosis* **1**, 101-124.
- Margulis L., Fester R. (Ed.), 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis, MIT Press, Cambridge, 470 p.
- Mason-Gamer R. J., Kellogg E. A., 1996. Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae). *Systematic Biology* **45**, 524-545.
- Matheny P. B., Wang Z., Binder M., Curtis J. M., Lim Y. W., Nilsson R. H., Hughes K. W., Hofstetter V., Ammirati J. F., Schoch C. L., Langer E., Langer G., McLaughlin D. J., Wilson A. W., Froslev T., Ge Z. W., Kerrigan R. W., Slot J. C., Yang Z. L., Baroni T. J., Fischer M., Hosaka K., Matsuura K., Seidl M. T., Vauras J., Hibbett D. S., 2007. Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**, 430-451.
- Mayer V. E., Voglmayr H., 2009. Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**, 3265-3273.
- Maynard-Smith J., Szathmary E., 1995. The major transitions in evolution. W. H. Freeman, Oxford, 346 p.
- Mehdiabadi N. J., Schultz T. R., 2009. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News* **13**, 37-55.
- Mereschkowsky K. S., 1926. Symbiogenesis and the origin of species. T. H. Morgan.
- Miehe H., 1911. Untersuchungen über die javanische *Myrmecodia*. *Abhandlungen der Mathematisch-Physischen Klasse der Königlich-Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften* **32**, 312-361.
- Mikheyev A. S., Mueller U. G., Boomsma J. J., 2007. Population genetic signatures of diffuse co-evolution between leaf-cutting ants and their cultivar fungi. *Molecular Ecology* **16**, 209-216.
- Moog J., 2009. The association of the plant-ant *Cladomyrma* with plants in southeast Asia. PhD, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Moran N. A., 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8627-8633.
- Moreau C. S., Bell C. D., Vila R., Archibald S. B., Pierce N. E., 2006. Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. *Science* **312**, 101-104.
- Mueller U. G., 2012. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* **15**, 269-277.
- Mueller U. G., Dash D., Rabeling C., Rodrigues A., 2008. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. *Evolution* **62**, 2894-2912.
- Piveteau J., 1950. Le débat entre Cuvier et Geoffroy Saint-Hilaire sur l'unité de plan et de composition. *Revue d'histoire des sciences et de leurs applications* **3**, 343-363.
- Posada D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1253-1256.
- Razafimandimbison S. G., Moog J., Lantz H., Maschwitz U., Bremer B., 2005. Re-assessment of monophyly, evolution of myrmecophytism, and rapid radiation in *Neonauclea* s.s. (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 334-354.
- Rehner S. A., Samuels G. J., 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **98**, 625-634.
- Rieppel O., 2003. Semaphoronts, cladograms and the roots of total evidence. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**, 167-186.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A., Huelsenbeck J. P., 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**, 539-542.

- Rozenand S., Skaletsky H. J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. pp. 365-386 *in*: Krawetz, S., Misener, S. (Ed.) - Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology, Humana Press, Totowa, NJ.
- Ruiz-Gonzalez M. X., Male P. J. G., Leroy C., Dejean A., Gryta H., Jargeat P., Quilichini A., Orivel J., 2011. Specific, non-nutritional association between an ascomycete fungus and *Allomerus* plant-ants. *Biology Letters* **7**, 475-479.
- Sanchez A., 2011. Evolutionary relationships in Polygonaceae with emphasis on *Triplaris*. PhD, Wake Forest University, Winston-Salem, USA.
- Schlick-Steiner B. C., Steiner F. M., Konrad H., Seifert B., Christian E., Moder K., Stauffer C., Crozier R. H., 2008. Specificity and transmission mosaic of ant nest-wall fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 940-943.
- Schmidt H. A., Strimmer K., Vingron M., von Haeseler A., 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**, 502-504.
- Schoch C. L., Sung G. H., Lopez-Giraldez F., Townsend J. P., Miadlikowska J., Hofstetter V., Robbertse B., Matheny P. B., Kauff F., Wang Z., Gueidan C., Andrie R. M., Trippe K., Ciufetti L. M., Wynns A., Fraker E., Hodkinson B. P., Bonito G., Groenewald J. Z., Arzanlou M., de Hoog G. S., Crous P. W., Hewitt D., Pfister D. H., Peterson K., Gryzenhout M., Wingfield M. J., Aptroot A., Suh S. O., Blackwell M., Hillis D. M., Griffith G. W., Castlebury L. A., Rossman A. Y., Lumbsch H. T., Lucking R., Budel B., Rauhut A., Diederich P., Ertz D., Geiser D. M., Hosaka K., Inderbitzin P., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Mostert L., O'Donnell K., Sipman H., Rogers J. D., Shoemaker R. A., Sugiyama J., Summerbell R. C., Untereiner W., Johnston P. R., Stenroos S., Zuccaro A., Dyer P. S., Crittenden P. D., Cole M. S., Hansen K., Trappe J. M., Yahr R., Lutzoni F., Spatafora J. W., 2009. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology* **58**, 224-239.
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W., Bolchacova E., Voigt K., Crous P. W., Miller A. N., Wingfield M. J., Aime M. C., An K. D., Bai F. Y., Barreto R. W., Begerow D., Bergeron M. J., Blackwell M., Boekhout T., Bogale M., Boonyuen N., Burgaz A. R., Buyck B., Cai L., Cai Q., Cardinali G., Chaverri P., Coppins B. J., Crespo A., Cubas P., Cummings C., Damm U., de Beer Z. W., de Hoog G. S., Del-Prado R., Dentinger B., Dieguez-Uribeondo J., Divakar P. K., Douglas B., Duenas M., Duong T. A., Eberhardt U., Edwards J. E., Elshahed M. S., Fliegerova K., Furtado M., Garcia M. A., Ge Z. W., Griffith G. W., Griffiths K., Groenewald J. Z., Groenewald M., Grube M., Gryzenhout M., Guo L. D., Hagen F., Hambleton S., Hamelin R. C., Hansen K., Harrold P., Heller G., Herrera G., Hirayama K., Hirooka Y., Ho H. M., Hoffmann K., Hofstetter V., Hognabba F., Hollingsworth P. M., Hong S. B., Hosaka K., Houbraken J., Hughes K., Huhtinen S., Hyde K. D., James T., Johnson E. M., Johnson J. E., Johnston P. R., Jones E. B., Kelly L. J., Kirk P. M., Knapp D. G., Koljalg U., Kovacs G. M., Kurtzman C. P., Landvik S., Leavitt S. D., Liggenstoffer A. S., Liimatainen K., Lombard L., Luangsa-Ard J. J., Lumbsch H. T., Maganti H., Maharachchikumbura S. S., Martin M. P., May T. W., McTaggart A. R., Methven A. S., Meyer W., Moncalvo J. M., Mongkolsamrit S., Nagy L. G., Nilsson R. H., Niskanen T., Nyilasi I., Okada G., Okane I., Olariaga I., Otte J., Papp T., Park D., Petkovits T., Pino-Bodas R., Quaedvlieg W., Raja H. A., Redecker D., Rintoul T., Ruibal C., Sarmiento-Ramirez J. M., Schmitt I., Schussler A., Shearer C., Sotome K., Stefani F. O., Stenroos S., Stielow B., Stockinger H., Suetrong S., Suh S. O., Sung G. H., Suzuki M., Tanaka K., Tedersoo L., Telleria M. T., Tretter E., Untereiner W. A., Urbina H., Vagvolgyi C., Vialle A., Vu T. D., Walther G., Wang Q. M., Wang Y., Weir B. S., Weiss M., White M. M., Xu J., Yahr R., Yang Z. L., Yurkov A., Zamora J. C., Zhang N., Zhuang W. Y., Schindel D., Fungal Barcoding C., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 6241-6246.

- Seipke R. F., Barke J., Ruiz-Gonzalez M. X., Orivel J., Yu D. W., Hutchings M. I., 2012. Fungus-growing *Allomerus* ants are associated with antibiotic-producing actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 443-447.
- Selosse M. A., 2001. La symbiose. Vuibert, Paris, 154 p.
- Spatafora J. W., Mitchell T. G., Vilgalys R., 1995. Analysis of gene-coding for small-subunit rRNA sequences in studying phylogenetics of Dematiaceae fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1322-1326.
- Stamatakis A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690.
- Stenroos S., Laukka T., Huhtinen S., Dobbeler P., Myllys L., Syrjanen K., Hyvonen J., 2010. Multiple origins of symbioses between ascomycetes and bryophytes suggested by a five-gene phylogeny. *Cladistics* **26**, 281-300.
- Sudhaham M., Van den Ende A., Sihanonth P., Sivichai S., Chaiyarat R., Menken S. B. J., Van Belkum A., De Hoog G. S., 2011. Elucidation of distribution patterns and possible infection routes of the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* using AFLP. *Fungal Biology* **115**, 1051-1065.
- Tajima F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.
- Taylor J. W., Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. S., Fisher M. C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**, 21-32.
- Thomas F., Lefèvre T., Raymond M., 2010. Biologie évolutive. De Boeck, Bruxelles, 814 p.
- Van der Werff H., 2008. A synopsis of the genus *Tachigali* (Leguminosae: Caesalpinioideae) in northern South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **95**, 618-661.
- Vilgalys R., Hester M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**, 4238-4246.
- Voglmayr H., Mayer V., Maschwitz U., Moog J., Djiéto-Lordon C., Blatrix R., 2011. The diversity of ant-associated black yeasts: Insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. *Fungal Biology* **115**, 1077-1091.
- Ward P. S., 1991. Phylogenetic analysis of pseudomyrmecine ants associated with domatia-bearing plants. pp. 335-373 in: Huxley, C.R., Cutler, D.F. (Ed.) - Ant-plant interactions, Oxford University Press, Oxford.
- Weissflog A., 2001. Freinestbau von Ameisen (Hymenoptera, Formicidae) in der Kronenregion feuchttropischer Wälder Südostasiens. PhD, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Wirth R., Herz H., Beyschlag W., Hölldobler B., 2003. Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama. Springer, Berlin, 233 p.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S., Taylor J. W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Ed.) - PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego.
- Zahran H. H., 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 968-+.
- Zoller S., Scheidegger C., Sperisen C., 1999. PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* **31**, 511-516.

Références informatiques

R Development Core Team 2011. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>

Annexe 1 : Echantillonnage taxinomique des souches non associées aux fourmis. Les séquences « c » ont été obtenues par Cécile Guidan (Gueidan *et al.*, 2008).

Souches				Pourcentage
	nLSU	nSSU	mtSSU	de réalisation
A95	c	c		67
Capronia fungicola	c	c		67
Capronia moravica	c	c		67
Capronia munkii	c	c		67
Capronia parasitica	c	c		67
Capronia peltigerae	c	c		67
Capronia pilosella	c	c		67
Capronia semiimmersa	c	c		67
Capronia sp102	c	c		67
Capronia sp236	c	c		67
Capronia sp26	c	c	c	100
Capronia sp315	c	c	c	100
Ceramothyrium carniolicum	c	c		67
Cladophialophora arxii CBS 306 94	c	c	c	100
Cladophialophora australiensis CBS 112793	c	c	c	100
Cladophialophora bantiana CBS 173 52		c	c	67
Cladophialophora boppii	c	c	c	100
Cladophialophora carrionii	c	c	c	100
Cladophialophora chaetospira CBS 491 70	c	c	c	100
Cladophialophora devriesii CBS 147 84	c	c	c	100
Cladophialophora emmonsii CBS 640 96	c		c	67
Cladophialophora hostae CBS 121637	c	c	c	100
Cladophialophora humicola CBS 117536		c	c	67
Cladophialophora immunda CBS 834 96	c	c	c	100
Cladophialophora minourae	c	c	c	100
Cladophialophora minutissima CBS 121758	c		c	67
Cladophialophora modesta	c	c	c	100
Cladophialophora mycetomatis CBS 122637	c	c	c	100
Cladophialophora mycetomatis CBS 454 82	c	c	c	100
Cladophialophora potulentorum CBS 112222	c	c	c	100
Cladophialophora proteae CBS 111667	c	c	c	100
Cladophialophora samoensis CBS 259 83	c	c	c	100
Cladophialophora saturnica CBS 102230	c	c	c	100
Cladophialophora scillae CBS 116461	c	c	c	100
Cladophialophora subtilis CBS 122642	c	c	c	100
Cladophialophora sylvestris CBS 350 83	c	c	c	100
Cladophialophora yegresii CBS 114405	c	c	c	100
Coniosporium perforans	c	c	c	100
Cyphellophora laciniata	c	c	c	100
Deep sea sp He5C		c		33

Deep sea sp MV 15C		c		33
Deep sea sp MV 1C		c		33
Deep sea sp MV 26C		c		33
Epibryon bryophilum M2	c	c		67
Epibryon diaphanum M122	c	c		67
Epibryon hepaticola M10	c	c		67
Epibryon hepaticola M224	c	c		67
Epibryon intercapillare M125	c	c		67
Epibryon interlamellare M1	c	c		67
Epibryon interlamellare M223	c	c		67
Epibryon interlamellare M32	c	c		67
Epibryon plagiochilae M187	c			33
Epibryon sp M175	c	c		67
Epibryon sp M274	c	c		67
Epibryon turfosorum M292	c			33
Exophiala bergeri	c	c	c	100
Exophiala castellanii	c	c	c	100
Exophiala crusticola CBS 119970	c	c	c	100
Exophiala dermatitidis	c	c	c	100
Exophiala exophialae CBS 668 76	c	c	c	100
Exophiala jeanselmei	c	c		67
Exophiala lecanii corni	c	c	c	100
Exophiala nigra	c	c	c	100
Exophiala nishimurae CBS 101538	c	c	c	100
Exophiala oligosperma	c	c	c	100
Exophiala pisciphila	c	c	c	100
Exophiala salmonis	c	c	c	100
Exophiala spinifera CBS 101534	c		c	67
Exophiala spinifera CBS 899 68		c		33
Exophiala xenobiotica	c	c	c	100
Fonsecaea monophora	c	c	c	100
Fonsecaea pedrosoi CBS 271 37		c	c	67
Fungal endophyte isolate 422	c			33
Fungal endophyte isolate 4466	c	c		67
Glyphium elatum	c	c	c	100
H5	c	c		67
Leptomeliola ptilidii M186		c		33
Phaeococcomyces catenatus		c	c	67
Phialophora europeae	c	c	c	100
Phialophora sp Ae300	c			33
Phialophora sp al040117 15	c			33
Phialophora sp cco1112 06	c			33
Phialophora sp nmg01112 03	c			33
Phialophora sp sp011018 01	c			33
Phialophora sp sp011130 01	c			33

Phialophora sp sp011130 04	c			33
Phialophora sp ugm021228 07	c			33
Phialophora verrucosa	c	c	c	100
Pleostigma jungermannicola M174	c	c		67
Ramichloridium anceps	c	c	c	100
Rhinocladiella aquaspersa CBS 122635	c	c	c	100
Rhinocladiella mackenziei CBS 650 93	c		c	67
Sarcinomyces petricola	c	c	c	100
Teichospora sp M195	c	c		67
TRN1	c	c	c	100
TRN107	c	c	c	100
TRN115	c	c	c	100
TRN14		c	c	67
TRN210	c	c	c	100
TRN214	c		c	67
TRN247	c	c	c	100
TRN30	c	c	c	100
TRN4	c	c	c	100
TRN436	c	c		67
TRN475	c	c	c	100
TRN486	c	c	c	100
TRN488	c		c	67
TRN493	c	c	c	100
TRN497		c	c	67
TRN506	c		c	67
TRN508	c	c	c	100
TRN515	c	c	c	100
TRN531	c	c	c	100
Verrucaria viridula	c	c	c	100
Verrucula inconnexaria1	c	c	c	100
Staurothele areolata	c	c	c	100
Placopyrenium bucekii1	c	c	c	100
Endocarpon pallidulum	c	c	c	100

Groupe externe



Diplôme : Ingénieur agronome
Spécialité : Protection des Plantes et Environnement
Spécialisation / option :
Enseignant référent : Yannick Outreman

Auteur(s) : Marie Vasse

Organisme d'accueil : Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS)

Date de naissance* : 29/06/1988

Adresse : 1515 Route de Mende

Nb pages : 65 Annexe(s) : 5

34293 Montpellier 5, FRANCE

Année de soutenance : 2012

Maîtres de stage : Rumsaïs Blatrix, Doyle McKey, Marc-André Selosse

Titre français : Phylogénie des champignons associés aux symbioses plante/fourmis

Titre anglais : Phylogeny of ant/plant symbioses fungi

Résumé : Les symbioses sont des interactions très étroites entre organismes et sont souvent à l'origine de la diversification des groupes impliqués. Des études récentes ont montré que des champignons de l'ordre des Chaetothyriales vivent en symbiose avec les fourmis, en particulier dans les symbioses plante/fourmis (où la plante héberge les fourmis en échange de protection contre les herbivores) et dans le carton fabriqué par de nombreuses fourmis arboricoles. La diversité des symbioses plante/fourmis résulte d'un nombre élevé de convergences évolutives, avec très peu de radiations. La phylogénie multilocus obtenue au cours de ce stage permet de reconstruire l'histoire évolutive de 81 souches de Chaetothyriales associées aux fourmis. Cette phylogénie regroupe ces champignons en trois grands clades. La diversification de ces champignons résulte donc de radiations évolutives faisant suite à un nombre réduit d'apparitions au cours de l'évolution, contrairement aux fourmis et plantes associées. Dans ces systèmes, la diversité des symbiotes ne s'est donc pas mise en place par co-spéciation mais plutôt par des changements d'hôtes. Etant donné l'existence d'autres types d'association entre fourmis et Chaetothyriales, il est possible qu'une grande part de la diversification de l'ordre soit liée à l'association avec les fourmis.

Abstract: Symbioses are very tight interactions between two or more associates. They often lead to the diversification of the involved groups. Recent studies have shown that fungi belonging to the order Chaetothyriales live in symbiosis with ants, in particular in ant/plant symbioses (in which the plant provides the ants with nesting cavities and the ants in return protect the plant against herbivores) and in the carton structures built by numerous tree-nesting ants. Evolutionary convergences account for most of the diversity in ant/plant symbioses, with very few radiations. A multilocus phylogeny constructed during this study traces the evolutionary history of 81 strains of Chaetothyriales associated with ants. These strains cluster in three clades. In consequence, diversification in this group results from a small number of independent appearances of association with ants followed by evolutionary radiations, which is an evolutionary pattern very different from that shown by both associated ants and plants. In these systems, it is not co-speciation but host switching that explains symbiont diversity. Other associations involving Chaetothyriales and ants have been described. It is thus possible that a significant part of the order's diversification could be linked to the evolution of association with ants.

Mots-clés :

diversité, symbiose, phylogénie, Chaetothyriales, plante, fourmis