



**HAL**  
open science

# Impact de l'approche moléculaire sur la classification systématique des Agaricomycetidae

Adrien Chaboud

► **To cite this version:**

Adrien Chaboud. Impact de l'approche moléculaire sur la classification systématique des Agaricomycetidae. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-00808615

**HAL Id: dumas-00808615**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00808615>**

Submitted on 5 Apr 2013

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : [thesebum@ujf-grenoble.fr](mailto:thesebum@ujf-grenoble.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**IMPACT DE L'APPROCHE MOLECULAIRE SUR LA  
CLASSIFICATION DES AGARICOMYCETIDAE**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

**Adrien CHABOUD**

**Né le 10 mars 1988 à Grenoble (38)**

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le Jeudi 7 mars 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury :

**Docteur Lucile SAGE**, Docteur en Pharmacie, HDR UFR de Pharmacie

Membres du jury :

**Docteur Pierre ROUX**, Docteur en Pharmacie, mycologue

**Docteur Bernard CHAMPON**, Docteur en Pharmacie, co-directeur de thèse

**Docteur Bello MOUHAMADOU**, Maître de Conférences, UFR de Pharmacie, directeur de thèse

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : M. Christophe RIBUOT  
Vice-doyen et Directeur des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2012-2013

### ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

#### PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

#### PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

#### PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
---------	-------	--

#### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELADI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

Dernière mise à jour : 24/10/2012

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

### MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C./MCU-PH)

### PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



### PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROULLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

### PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
----------	---------------	---------

### ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

### ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Marion	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

### MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Famy	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LECERF-SHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
IBS : Institut de Biologie Structurale  
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 24/10/2012

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

# REMERCIEMENTS

A **Bello Mouhamadou**, mon maître de thèse qui m'a suivi durant ces huit mois et qui m'a consacré énormément de son temps pour diriger ces travaux, qui m'a accepté dans son laboratoire pour me permettre de faire nos manipulations.

A **Bernard**, qui m'a aidé à trouver mon sujet de thèse et qui m'a permis de réaliser toute la partie systématique.

A **Lucile**, qui m'a consacré de son temps pour me corriger et m'a aidé à réaliser ce travail et qui m'a si gentiment accueilli au laboratoire.

A **Pierre Roux**, qui a si gentiment accepté de faire partie du jury et qui nous a transmis tous les exciccatas de champignons, ainsi que pour sa disponibilité lors de mes nombreuses questions téléphoniques.

A **mes deux parents**, à qui je dois tout, qui se sont toujours privés pour nous et nous ont tout donné au cours de leur vie. Merci de m'avoir permis d'effectuer ces études de Pharmacie ainsi que de m'avoir toujours soutenu au cours de mes moments les plus difficiles. Que de bons moments passés à vos côtés....

A **Miga**, mon frère, qui m'aide quotidiennement de là-haut.

A **Alex** et sa petite famille, qui me conseille et m'aide régulièrement et avec qui je partage mes aventures quotidiennes (malgré la distance...).

A **Jérôme**, mon parrain, qui a toujours été là pour moi quand j'en avais besoin (merci encore pour la relecture) et qui m'a initié à la passion du sport et au goût de l'effort.

A **Cathy**, qui a toujours cru en moi et qui me soutient régulièrement.

A **tous mes Ami(e)s**, qui ont été avec moi, de près ou de loin.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	5
SOMMAIRE .....	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	10
DEFINITIONS ET ACRONYMES .....	11
INTRODUCTION.....	13
MATERIEL ET METHODES .....	17
1. Souches fongiques.....	18
2. Extraction d'ADN total de champignon.....	18
3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	19
3.1. Principe de la PCR .....	19
3.2. Etapes de la PCR (Figure 2).....	20
4. Electrophorèses des acides nucléiques .....	22
5. Analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques .....	22
6. Classifications .....	22
CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE DES AGARICOMYCETIDAE .....	23
1. Généralités sur la classification systématique .....	24
2. Critères de classification des champignons.....	28
2.1. Caractères macroscopiques .....	29
2.1.1. Le chapeau.....	29
2.1.2. Le stipe .....	34
2.1.3. La chair du champignon .....	36
2.2. Caractères microscopiques .....	36
2.2.1. Les spores .....	37
2.2.2. Les basides .....	37
2.2.3. Les cystides .....	38
2.2.4. Les boucles .....	38
2.3. Conclusion.....	39
3. Classification systématique des Agaricomycetidae .....	39
PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES AGARICOMYCETIDAE.....	43
1. Marqueurs moléculaires .....	44



1.1.	Marqueurs nucléaires .....	45
1.1.1.	Les ARN ribosomiques .....	45
1.1.2.	Les gènes codant pour les protéines nucléaires.....	48
1.2.	Marqueurs mitochondriaux .....	50
1.2.1.	Les ARN ribosomiques .....	51
1.2.2.	Le gène <i>cox 1</i> .....	52
2.	Phylogénie moléculaire .....	55
2.1.	Evolution de la classification des Basidiomycota .....	55
2.2.	Phylogénie des Agaricomycetidae .....	63
	DISCUSSION GENERALE .....	68
1.	Comparaison des deux types de classification .....	69
2.	Avantages et limites des approches.....	73
2.1.	Approche systématique .....	73
2.2.	Approche moléculaire .....	73
3.	Applications: méthodes moléculaires dans l'identification d'espèces de champignons..	74
3.1.	<i>Tricholoma equestre</i> (n°354) / <i>Tricholoma frondosae</i> (n°110936) / <i>Tricholoma auratum</i> (n° 2000-00-3516, souche 1: n°91-11-139, souche 2: n°97-11-2992) .....	75
3.2.	<i>Clitocybe amoenolens</i> (n°20092006) / <i>Lepista inversa</i> (souche 1: n°99-10-3307, souche 2: n°96-10-2694) .....	78
3.3.	<i>Amanita ovoidea</i> (n°637) / <i>Amanita proxima</i> (n°90-10-902).....	80
3.4.	Conclusion.....	81
	CONCLUSION .....	82
	BIBLIOGRAPHIE .....	84
	ANNEXES .....	90
	Annexe 1: Valeurs moyennes nutritives des champignons (Courtecuisse, 2007).....	91
	Annexe 2: Code couleur Romagnesi .....	91
	Annexe 3: Principaux réactifs chimiques et colorants .....	91
	Annexe 4: Amorces pour amplification .....	92

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Classification générale du règne des champignons (Kendrick, 2000).....	15
Figure 2: Principe de la PCR.....	21
Figure 3: <i>Boletus edulis</i> .....	26
Figure 4: Cycle de vie d'un champignon (Courtecuisse, 2007).....	27
Figure 5: Clef de détermination des champignons (Champon, 2009).....	28
Figure 6: Diagramme des éléments de classification systématique .....	29
Figure 7: Principaux éléments de classification macroscopique d'un champignon .....	29
Figure 8: Exemple de forme de champignons.....	30
Figure 9: Résumé des caractères macroscopiques (Bon, 2004) .....	31
Figure 10: Différents types d'hyméniums .....	31
Figure 11: Exemple de sporée de champignon lamellé.....	33
Figure 12: Cuticule déterminant les genres <i>Suillus</i> (à gauche) et <i>Xerocomus</i> (à droite).....	33
Figure 13: Ouverture du voile général (Bon, 2004) .....	34
Figure 14: Ouverture du voile partiel (Bon, 2004).....	34
Figure 15: Ouverture de l'armille (Bon, 2004).....	34
Figure 16: Détermination des genres <i>Amanita</i> , <i>Agaricus</i> et <i>Pluteus</i> .....	35
Figure 17: Principaux éléments de classification microscopique d'un champignon .....	36
Figure 18: Différents types de spores (Baar, 1996) .....	37
Figure 19: Cloisonnement et schématisation des basides .....	37
Figure 20: Différents types de cystides (Baar, 1996).....	38
Figure 21: Boucles de conjugaison .....	38
Figure 22: Comparaison de séquences variables de trois espèces distinctes .....	44
Figure 23: Organisation des gènes codant pour l'ADN ribosomique nucléaire.....	45
Figure 24: Structure secondaire de nuc-SSU eucaryote selon le modèle de Neefs et al, 1993, représentant les neuf domaines variables notés de V1 à V9.....	46
Figure 25: Partie 5' du gène nuc-LSU selon Vilgalys ( <a href="http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm">http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm</a> ). Les flèches indiquent les positions des amorces.....	47
Figure 26: Région partielle du gène nuc-SSU (Hibbett et Binder, 2003) .....	47
Figure 27: Région ITS (Hibbett et Binder, 2003) .....	48
Figure 28: Organisation du gène de la $\beta$ tubuline de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Einax et Voigt, 2003). .....	49

Figure 29: Organisation moléculaire du gène RPB2. Les flèches indiquent les positions des amorces permettant l'amplification des régions utilisées en phylogénie moléculaire. ....	49
Figure 30: Fusion d'une archéobactérie et d'une protéobactérie aérobie .....	50
Figure 31: Organisation du génome mitochondrial ( <a href="http://www.barcodeoflife.org/content/resources/meeting-materials">http://www.barcodeoflife.org/content/resources/meeting-materials</a> ) .....	51
Figure 32: Domaines variables V4, V6 et V9 du gène SSU ARNr d' <i>Agrocybe aegerita</i> (Gonzales et al, 1998). Les amorces sont indiquées par des flèches.....	52
Figure 33: Gène mitochondrial LSU.....	52
Figure 34: Principe du barcoding .....	53
Figure 35: Phylogénie des Basidiomycota selon la méthode de parcimonie et basée sur l'analyse de ARNr 18S (Swann et Taylor, 1993).....	55
Figure 36: Phylogénie des Basidiomycota (par la méthode de parcimonie) basée sur l'analyse de l'ARNr 18S (Swann et Taylor, 1995). .....	57
Figure 37: Phylogénie des Basidiomycota selon Patouillard (1900) .....	58
Figure 38: Phylogénie des Homobasidiomycètes avec les 8 "clades" majeurs (Hibbett et al, 1997).....	60
Figure 39: Arbre phylogénétique des Agaricomycotina (Matheny et al, 2007).....	63
Figure 40: Phylogénie des Agaricomycetes (Hibbett et al, 2007).....	64
Figure 41: Phylogénie des Agaricomycetidae (Binder et al, 2010) .....	67
Figure 42: Alignement des séquences V9. En vert apparaissent les mutations ponctuelles et en rouge les zones de délétion. " <i>T. auratum</i> b" correspond à la souche <i>Tricholoma auratum</i> à pied blanc .....	76
Figure 43: Phylogénie moléculaire réalisée par la méthode "Neighbor-Joining" utilisant les séquences V9 des quatre <i>Tricholoma</i> .....	77

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification systématique des Basidiomycota (Roux, 2006) .....	39
Tableau 2: Classification systématique des Agaricomycetidae (Roux, 2006) .....	41
Tableau 3: Eléments de classification systématique des ordres des Agaricomycetidae .....	42
Tableau 4: Principaux marqueurs fongiques disponibles dans les bases de données en 2009 (Begerow et al, 2010) .....	54
Tableau 5: Classification des Hétérobasidiomycètes et Homobasidiomycètes .....	59
Tableau 6: Evolution de la phylogénie moléculaire des champignons de 2001 à 2007.....	62
Tableau 7: Classifications des Agaricomycotina .....	71
Tableau 8: Comparaison des classifications de l'ordre des Boletales .....	72
Tableau 9: Critères de différenciation systématique des <i>Tricholoma</i> .....	75
Tableau 10: Différences (en nombre de nucléotides) pour la séquence V9 de <i>T. auratum</i> / <i>T.</i> <i>frondosae</i> .....	77
Tableau 11: Pourcentage de similarité des <i>Tricholoma</i> pour le gène ITS .....	77
Tableau 12: Critères de différenciation systématique .....	78
Tableau 13: Pourcentage de similarité pour le gène ITS.....	79
Tableau 14: Différences (en nombre de nucléotides) pour le gène V9 entre <i>C. amoenolens</i> / <i>L.</i> <i>inversa</i> .....	79
Tableau 15: Différences (en nombre de nucléotides) pour le gène ITS entre <i>C. amoenolens</i> / <i>L.</i> <i>inversa</i> .....	79
Tableau 16: Critères de différenciation systématique des deux <i>Amanita</i> .....	80

## DEFINITIONS ET ACRONYMES

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**AFTOL:** Assembling the Fungal Tree Of Life

**Armille:** voile partiel descendant jusqu'à la base du stipe

**Asque:** cellule reproductrice à l'intérieur de laquelle sont produites les spores chez les ascomycètes

**Barcoding:** identification d'une espèce par une séquence d'ADN lui étant associée

**Baside:** cellule reproductrice au sommet de laquelle sont produites les spores chez les Basidiomycètes

**Bet:** bromure d'éthidium

**Calcaricole:** qui préfère la présence d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )

**Carpophore:** fructification, c'est le champignon lui-même au sens large (pied + chapeau)

**Caulocystide:** organe stérile situé sur le pied du champignon

**Cheilocystide:** organe stérile situé sur l'arrête des lames

**Cox1:** cytochrome C oxydase subunit 1

**Cyanophile:** se dit d'une paroi de spore ou hyphe qui absorbe rapidement un colorant bleu tel que le bleu coton

**Cystide:** cellule stérile de l'hyménium des basidiomycètes

**Hyménium:** partie fertile du carpophore (comprenant basides ou asques)

**Hyménophore:** tissu qui constitue les lames, les aiguillons ou les pores et qui porte l'hyménium

**Hyphe:** filament, généralement cloisonné en cellules, constituant les champignons

**IGS:** Inter Genic Spacer

**Interspécifique:** qui concerne les relations entre des espèces différentes

**Intraspécifique:** qui apparaît à l'intérieur d'une même espèce biologique

**ITS:** Internal Transcribed Spacer

**kDa:** Kilo dalton

**Lignicole:** qui pousse sur du bois

**LSU:** Large Subunit

**Macroscopique:** visible à l'œil nu ou avec une loupe

**Mycélium:** partie végétative du champignon

**Mycorhize:** organe mixte, résultant de l'association d'un champignon et du système racinaire d'un arbre, au sein duquel s'effectuent des échanges symbiotiques.

**Nomenclature:** désigne une instance de classification qui permet de nommer avec précision les espèces selon un code bien défini (ICN)

**pb:** paire de bases

**Pleurocystide:** élément stérile de l'hyménium, situé sur les faces des lames ou à l'intérieur des tubes

**Polymorphisme:** possibilité de prendre des formes très différentes sans changer de nature

**Pore:** extrémité des tubes chez les bolets et polypores

**Spore:** cellule assurant la reproduction des champignons

**Sporée:** dépôt en masse des spores

**SSU:** Small Subunit

**Stipe:** pied des champignons à chapeau

**Systématique:** science de la classification des êtres vivants via un système permettant de les dénombrer et surtout de les classer en les organisant dans un certain ordre

**Taxonomie:** science qui a pour objet de décrire les organismes vivants

**Thermocycleur:** appareil automatisant la réaction de PCR

**Ubiquiste:** venant de divers milieux et d'habitats variés

**Vernaculaire:** nom usuel (vulgaire) d'une espèce animale ou végétale, par opposition aux noms qui suivent les règles de la nomenclature scientifique

**Voile partiel:** structure reliant le pied à la marge du chapeau, protégeant la partie fertile chez le jeune champignon

**Volve:** reste du voile général entourant la base du pied

# **INTRODUCTION**

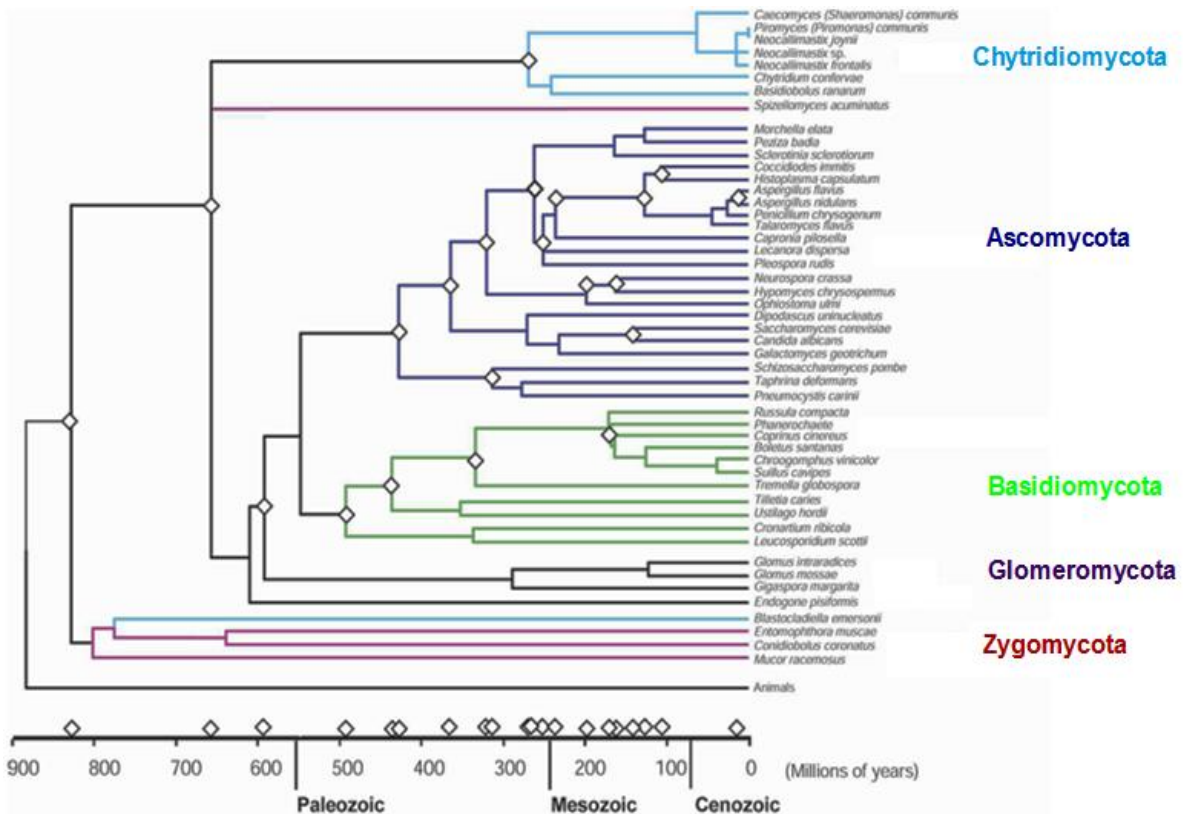
Les champignons constituent un règne à part entière. Ils forment un vaste groupe diversifié, estimé à environ 1 500 000 espèces dont seulement 100 000 (soit 7%) sont décrites (Hawksworth, 2004). Ce sont des organismes ubiquistes retrouvés dans tous les écosystèmes.

Longtemps considérés comme des végétaux, les champignons, « fungi », constituent à l'heure actuelle avec les Archaeobactéries, les Eubactéries, les Protistes, les Plantes et les Animaux, un des six règnes du monde vivant (Woese et al, 1977). Ce règne est composé d'organismes très hétérogènes mais qui présentent des caractéristiques communes. Les champignons possèdent un appareil végétatif ou un thalle simplifié qui ne porte pas de cellules différenciées et une paroi contenant de la chitine et des  $\beta$ -glucanes. Contrairement aux végétaux, les champignons sont incapables d'assimiler directement le carbone minéral. Ils sont donc hétérotrophes et peuvent être saprophytes, parasites ou impliqués dans une symbiose avec un organisme autotrophe comme les algues ou les plantes.

L'importance des champignons est considérable. Ils ont notamment un intérêt gustatif et un rôle important dans l'industrie alimentaire (fermentation alcoolique...), dans les biotechnologies (ADN recombinant), dans l'industrie pharmaceutique (antibiotiques : pénicillines, streptomycines...) et interviennent dans de nombreux cycles biogéochimiques (cycle de l'azote...). Par contre, certains peuvent avoir des effets néfastes, en particulier en tant que pathogènes de l'homme et de l'animal ou encore comme phytopathogènes.

La classification des espèces appartenant au règne des champignons a connu de nombreuses modifications. A l'heure actuelle, la classification des champignons s'est considérablement simplifiée et le règne fongique est divisé en cinq phyla : **Chytridiomycota**, **Glomeromycota**, **Zygomycota**, **Ascomycota**, **Basidiomycota** (Figure 1) définis par le caractère cloisonné ou non du thalle, la présence ou l'absence de gamètes ou de spores mobiles et les caractères morphologiques des organes différenciés de la reproduction sexuée.





**Figure 1: Classification générale du règne des champignons (Kendrick, 2000)**

Les Basidiomycota incluent des champignons levuriformes (*Cryptococcus neoformans...*), des champignons filamenteux microscopiques qui sont très souvent des parasites des végétaux (*Puccinia graminis*: agent de la rouille du blé, *Ustilago maydis*: agent du charbon du maïs). Ce phylum, regroupe également la majorité des champignons filamenteux macroscopiques à hyménophore (ou chapeau) portant des lamelles, des tubes ou des aiguillons. Certains de ces champignons sont très recherchés des gourmets pour leur qualité gustative et leur valeur nutritive (annexe 1). Cependant, on y trouve également des champignons vénéneux et parfois même mortels, nous obligeant à avoir une connaissance toujours plus précise des espèces, nous permettant d'apprécier une comestibilité éventuelle. Cette reconnaissance repose sur différents critères d'identification morphologiques ou moléculaires qui sont la base de la classification des champignons.

Aujourd'hui, les mycologues, scientifiques et cueilleurs de champignons utilisent une classification morphologique, dite systématique, basée sur l'observation de caractères macroscopiques et microscopiques. Mais l'arrivée de nouvelles techniques d'étude basées sur

la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN) a apporté une restructuration importante de la classification systématique.

Ainsi, l'objectif de cette thèse est de réaliser une étude comparative des classifications systématique et moléculaire afin de cerner les principales évolutions apportées par les méthodes moléculaires. Dans un premier chapitre, nous étudions la classification systématique en présentant les différents critères phénotypiques qui la détermine. Dans un second chapitre, l'aspect moléculaire est abordé par l'étude des marqueurs moléculaires et nous retraçons l'évolution des phylogénies qui en découlent. Enfin, nous effectuons, une étude comparative de ces deux classifications ainsi qu'une application pratique afin de comparer, d'un point de vue moléculaire, différents groupes d'espèces et tirer l'intérêt et les limites de chacune de ces deux approches. Chaque groupe est constitué par des espèces morphologiquement proches ou identiques.

Nous avons focalisé notre étude sur les champignons de la sous-classe des Agaricomycetidae regroupant un grand nombre de champignons basidiomycètes macroscopiques (plus de 9000 espèces décrites). Cette sous-classe regroupe également la plupart des champignons comestibles ou toxiques ayant un impact important dans l'alimentation humaine.

# **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Souches fongiques

Pour l'extraction d'ADN, nous utilisons les espèces suivantes (définies par leur N° d'exsiccata) qui nous ont été transmises par l'intermédiaire de Pierre Roux:

- *Tricholoma auratum*: deux souches différentes:

- Souche 1: n°91-11-1390: le 01/11/1991 à Caseneuve (Vaucluse), sous des pins sylvestres (François Cadène).
- Souche 2: n°97-11-2992: le 28/11/1997 à Sainte-Sigolène (Haute-Loire), sous des pins sylvestres (Docteur Alain Charret).

- *Tricholoma auratum* à pied blanc, souche n° 2000-00-3516: le 28/10/2000 à Bédarieux (Hérault), sous des cèdres (Didier Borgarino).

- *Tricholoma frondosae*: souche n°110936: sous des peupliers à Saint-Germain-L'Hermitage (Puy-de-Dôme).

- *Tricholoma equestre*: souche n°354: le 11/11/2011 à Freydière (Lucile Sage).

- *Lepista flaccida* variété *inversa*: deux souches :

- Souche 1: n°99-10-3307: le 15/10/1999 à Sainte-Sigolène (Haute-Loire), sous des pins sylvestres et avec des sorbiers des oiseleurs.
- Souche 2: n°96-10-2694: le 23/10/1996 à Clermont-Ferrand, sous des épicéas (Sophie Roux).

- *Clitocybe amoenoelens*: souche n°20092006: le 20/09/2006 dans le Vercors (Pierre-Arthur Moreau).

- *Amanita proxima*: souche n°90-10-902: le 17/10/1990 à Caseneuve (Vaucluse), sur un chemin bordé par des chênes pubescents et des pins sylvestres (Gavril Negrean).

- *Amanita ovoidea*: souche n°637: le 12/11/1989 à Cabrières d'Aigues (Vaucluse), sous des chênes pubescents et des pins d'Alep (*Pinus halepensis*) (Marie-Christine Roux).

## 2. Extraction d'ADN total de champignon

L'ADN total de chaque souche a été extrait en utilisant le « Fast DNA Spin Kit (QBIogene, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Environ 200 mg de chaque souche sont broyés dans le tampon de lyse cellulaire à l'aide d'un broyeur (FastPrep Instrument) pendant trois cycles de 40 secondes. L'échantillon est ensuite centrifugé à 14 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu contenant l'ADN est transféré dans un tube de

deux ml, auquel est ajouté un volume équivalent de solution Binding Matrix. Après mélange par retournement pendant cinq minutes à température ambiante, l'ensemble est transféré sur une colonne SPIN Filter, placée sur un tube collecteur et centrifugée à 14 000 g pendant 1 minute. L'ADN fixé sur la colonne est lavé par 500 µl de SEWS-M. Après une centrifugation à 14 000 g pendant 1 minute, 100 µl de solution DES sont rajoutés à la colonne contenant l'ADN. Après incubation dans un bain marie à 55°C pendant 5 minutes, l'ADN est élué par centrifugation à 14 000 g pendant 1 minute.

Les concentrations de l'ADN extrait sont mesurées à l'aide de l'appareil Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

### **3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

#### **3.1. Principe de la PCR**

La PCR (Polymérase Chain Reaction) est une technique mise au point en 1985 par Kary Mullis et ses collaborateurs. Elle permet d'amplifier *in vitro* une séquence spécifique d'un acide nucléique et d'obtenir une quantité importante de cette séquence, afin de la détecter et de la manipuler.

Elle permet donc d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Dans un laps de temps court (deux heures pour une séquence de 1000 pb), environ un million de copies de la séquence souhaitée peuvent être obtenues. La quantité d'amplifiat obtenue est généralement suffisante pour une utilisation ultérieure.

Le principe et les conditions expérimentales de la PCR sont simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques orientées en sens inverse. Les amorces définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

Au cours de la PCR, les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes, si bien que l'amplification obtenue est exponentielle et non linéaire.

La PCR a connu un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase thermostable, (isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*)

qui résiste aux températures élevées de dénaturation de l'ADN matrice, ce qui permet une automatisation de la technique.

### **3.2. Etapes de la PCR (Figure 2)**

- **Dénaturation de l'ADN matrice double brin**

Pour débiter la réaction, l'ADN est dénaturé en le chauffant à 95°C environ 30 secondes, afin de séparer les deux brins.

Cette dénaturation de l'ADN matrice doit être complète, en effet, une dénaturation partielle (temps de dénaturation inférieur à 30 secondes ou température inférieure à 95 °C) entraînerait le "self-priming". Dans certains cas, afin d'éviter ce phénomène, une prédénaturation de l'ADN matrice est réalisée en le chauffant à 95°C environ 10 minutes.

- **Hybridation des amorces avec l'ADN matrice**

En abaissant la température de 4°C en dessous des  $T_m$  (température de demi-dénaturation) des deux amorces, ces dernières vont pouvoir s'hybrider avec les séquences complémentaires présentes sur les fragments d'ADN dénaturé. La concentration des amorces étant beaucoup plus élevée que celle des brins d'ADN, chaque brin d'ADN s'hybridera avec l'amorce qui lui est complémentaire. Ainsi le brin orienté 3'→5', s'hybridera avec l'amorce directe orientée 5'→3' et le brin orienté 5'→3' s'hybridera avec l'amorce reverse orientée 5'→3'.

- **Elongation par la *Taq* polymérase**

A 95°C durant la phase de dénaturation, puis à  $T_m-4^\circ\text{C}$  durant la phase d'hybridation, la *Taq* polymérase est peu active parce que trop éloignée de sa température optimale d'activité (environ 72°C).

Comme toutes les ADN polymérases, la *Taq* polymérase ne peut initier la polymérisation des désoxyribonucléotides qu'à partir d'un ADN matrice apparié avec une amorce possédant une extrémité 3'OH libre. La *Taq* polymérase lie le brin matrice de 3' vers 5' et elle synthétise le nouveau brin de 5' vers 3' qui se prolonge d'autant qu'il existe un brin complémentaire pour servir de modèle.

La répétition des cycles, de la dénaturation à l'élongation, permet de doubler le nombre de fragments amplifiés à chaque cycle ( $2^n$  copies théoriques pour n cycles). Généralement, le nombre de cycles effectués au cours d'une PCR est de 40.

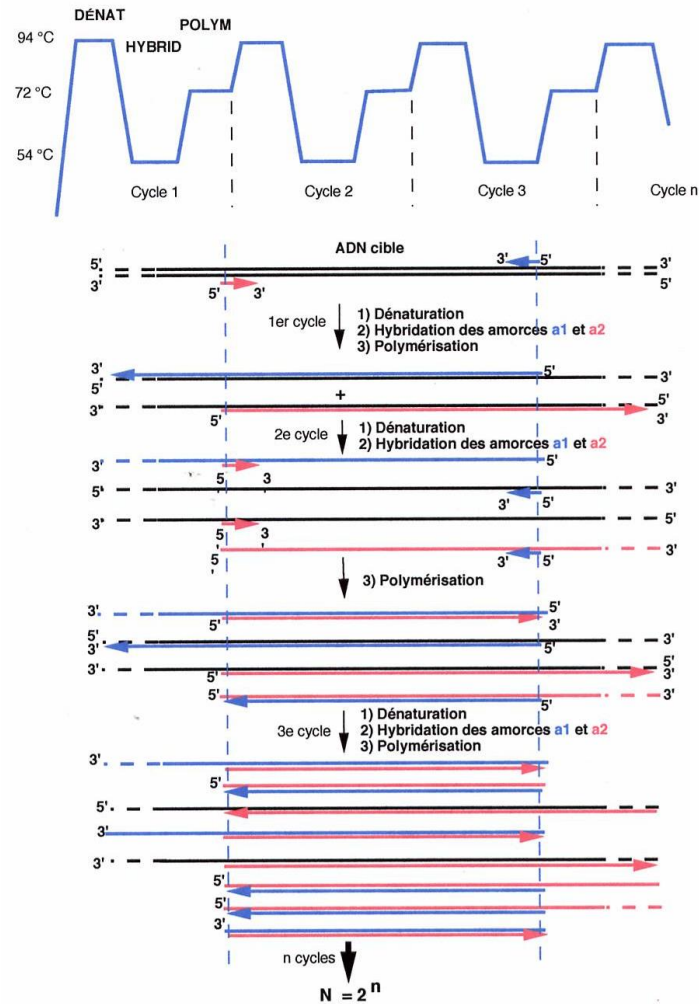


Figure 2: Principe de la PCR

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un thermocycleur PTC 200 (MJ Research Inc.). Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ l et contient 10 à 30 ng d'ADN (1 à 5  $\mu$ l) ; 4  $\mu$ M de chaque amorce ; 200  $\mu$ M de chaque dNTP ; 1 unité de *Taq* polymérase ; 50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, triton X-100 0.1% (v/v). Pour chaque PCR, 40 cycles ont été réalisés comportant une étape de dénaturation (95°C, 1 min), une étape de fixation de l'amorce sur sa séquence cible (T<sub>m</sub> de l'amorce la plus faible - 2°C, 1 min) et une étape d'élongation (72°C, 30 s à 3 min suivant la taille du fragment à amplifier). Le temps d'élongation par la *Taq* polymérase utilisée est de 1 minute par kpb à amplifier.

## 4. Electrophorèses des acides nucléiques

Les électrophorèses horizontales analytiques ont été réalisées dans des gels d'agarose (1,5 % p/v) d'un volume de 50 ml contenant 100 µg/ml de Bet. La migration est effectuée dans du tampon d'électrophorèse TEB (80 mM Tris-HCl pH 8 ; 2,5 mM EDTA ; 89 mM acide borique). La taille des différents fragments est déterminée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire Smart Ladder (Invitrogen) ou Raoul (Invitrogen).

## 5. Analyse bioinformatique des séquences nucléotidiques

La comparaison des séquences avec celles des bases de données a été réalisée via l'algorithme BLAST (Altschul et al, 1990). Les alignements des séquences nucléotidiques ont été réalisés grâce au logiciel Clustal W version 1.8 (Thompson et al, 1994). Les analyses phylogénétiques de la partie application pour les *Tricholoma*, *Lepista*, *Clitocybe* et *Amanita*, ont été réalisées par la méthode " Neighbor-Joining " (Saitou et Nei, 1987) en utilisant le logiciel Mega 3 (Tamura et al, 2007).

## 6. Classifications

- **Moléculaire**: définie par Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon P.F, Eriksson O.E, Huhndorf S, James T, Kirk P.M, Lücking R, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycol. Res., 111(5):509-548.
- **Systematique**: définie par Pierre Roux dans son ouvrage, Mille et un champignons, éd. Roux, 2006, 1125p



# **CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE DES AGARICOMYCETIDAE**

La classification systématique est basée sur l'observation de caractères macroscopiques, microscopiques et chimiques (Fries 1874, Fayod 1889). Que ce soit pour les mycologues, les scientifiques ou tout simplement pour le cueilleur du « dimanche », elle constitue un outil indispensable pour l'identification des champignons. Nous présentons dans ce chapitre les principaux caractères morphologiques de classification des champignons et nous nous appuyerons sur la sous-classe des Agaricomycetidae pour présenter la classification qui en découle.

## 1. Généralités sur la classification systématique

Les scientifiques ont développé la taxonomie et la systématique afin d'étudier un être vivant et de connaître sa description, son appartenance à un groupe phylogénétique. La taxonomie consiste à décrire les organismes vivants et à les regrouper en entités appelées taxons. Ensuite, interviendra la systématique, dont le rôle est d'organiser le classement et de préciser les rapports hiérarchiques existant entre tous ces taxons, en fonction des degrés de parenté et des hypothèses phylogéniques. « La taxonomie précise les limites des taxons alors que la systématique les range dans un système hiérarchisé » (Courtecuisse, 2007).

Il existe une hiérarchie, qui permet de classer les taxons dans des sortes de « tiroirs emboîtables » jusqu'à l'unité hiérarchique de base : l'espèce. La classification se fait par ordre d'importance décroissante comme suit :

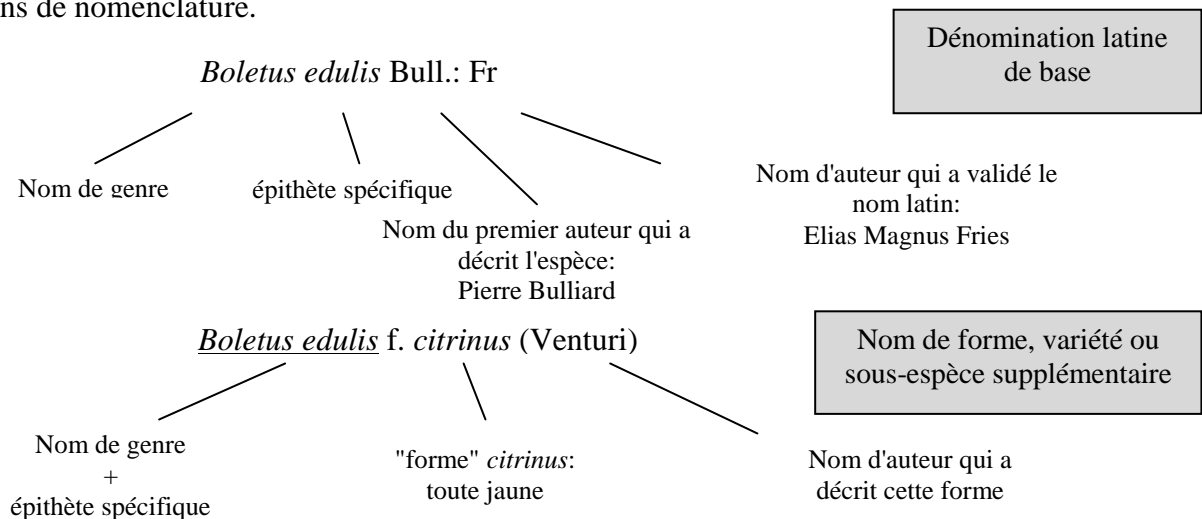
**Règne → Division → Subdivision → Classe → Sous-classe → Ordre → Sous-ordre → Famille → Sous-famille → Tribu → Genre → Sous-genre → Section → Sous-section → Espèce → Sous-espèce → Variété → Forme.**

Les terminologies permettent de savoir quelle est la place au sein des rangs hiérarchisés :

- Division** terminaison en **-MYCOTA**
- Subdivision** terminaison en **-MYCOTINA**
- Classe** terminaison en **-MYCETES**
- Sous-classe** terminaison en **-MYCETIDAE**
- Ordre** terminaison en **-ALES**
- Sous-ordre** terminaison en **-INEAE**
- Famille** terminaison en **-ACEAE**
- Sous-famille** terminaison en **-OIDEAE**

Une fois tous ces taxons bien délimités les uns par rapport aux autres et hiérarchisés, il est indispensable de les nommer avec précision. Pour cela, la communauté scientifique suit les règles édictées par l'ICN (International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants) (consultable sur <http://www.tela-botanica.org/actu/article4933.html>).

On utilise un binôme latin comprenant le nom de genre (initiale en majuscule) et un épithète spécifique (initiale en minuscule). Ce binôme est suivi des noms des autorités (nom de personnes ayant participé à l'histoire de la nomenclature ou de sa taxonomie) et accompagné de la variété s'il y en a. Ce nom de base peut ensuite subir des modifications pour répondre à des problèmes de classification (nouvelles variétés décrites...) ou pour des raisons de nomenclature.



Seul ce nom scientifique (en latin) permettra de cerner l'espèce en question avec précision. Parallèlement, certaines espèces sont aussi désignées par des noms français ou

vernaculaires plus couramment utilisés par les cueilleurs, mais qui peuvent parfois entraîner des confusions et incertitudes, car selon des régions, une même espèce pourra être nommée différemment (ex: Girolle et Chanterelle).

Si l'on prend l'exemple du Cèpe de Bordeaux (Figure 3):

**Nom scientifique** : *Boletus edulis* Bull.: Fr

**Nom vernaculaire** : Cèpe de Bordeaux

Sa classification hiérarchique donne :

<b>Règne</b>	Fungi
<b>Division</b>	Basidiomycota
<b>Subdivision</b>	Agaricomycotina
<b>Classe</b>	Agaricomycetes
<b>Sous-classe</b>	Agaricomycetidae
<b>Ordre</b>	Boletales
<b>Sous-ordre</b>	Boletineae
<b>Famille</b>	Boletaceae
<b>Sous-famille</b>	Boletoidae
<b>Genre</b>	<i>Boletus</i>
<b>Section</b>	<i>Edules</i>
<b>Espèce</b>	<i>Boletus edulis</i> Bulliard: Fr



**Figure 3:** *Boletus edulis*

Avant de passer à l'étude morpho-anatomique des champignons, nous allons détailler leur cycle de vie (Figure 4), permettant d'aborder les principales structures nécessaires à la reproduction et dont les mycologues se servent pour établir la classification systématique des champignons.

### Exemple du cycle de vie d'un champignon basidiomycète :

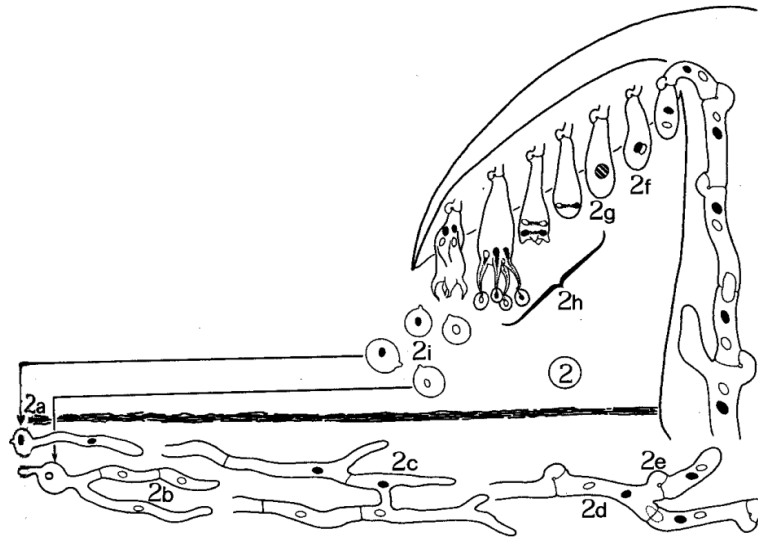


Figure 4: Cycle de vie d'un champignon (Courtecuisse, 2007)

**2a:** Naissance du champignon par germination d'une basidiospore qui produit le mycélium primaire dont chaque cellule renferme un seul noyau à  $n$  chromosomes.

**2b:** Développement et colonisation du substrat par le mycélium primaire (vitesse de croissance variable selon les paramètres environnementaux).

**2c:** En conditions favorables, la reproduction peut avoir lieu. Deux cas sont possibles:

- reproduction asexuée par croissance mycélienne
- reproduction sexuée: deux thalles de polarité complémentaire s'associent par plasmogamie (fusion des cytoplasmes)

**2d:** Formation d'un thalle dicaryotique.

**2e:** Entre chaque hyphe, au niveau des cloisons, présence possible de boucles de conjugaison (ou anses d'anastomose) permettant l'obtention d'un thalle dicaryotique.

**2f à 2g:** Quand les conditions environnementales sont réunies, le thalle dicaryotique produit un sporophore (ou carpophore: organe reproducteur) sur lequel se développent les cellules fertiles, appelée **basides**.

**2h:** Caryogamie donnant des noyaux à  $2n$  chromosomes, suivie d'une méiose conduisant à quatre basidiospores haploïdes.

**2i:** Germination des basidiospores qui donneront des mycéliums homocaryotiques.

## 2. Critères de classification des champignons

La classification systématique des champignons est basée et établie sur des caractères morphologiques. Pour classer un champignon, il faut tout d'abord l'identifier. Cette identification repose sur l'observation des caractères macroscopiques, organoleptiques, environnementaux et sur des caractères microscopiques. L'utilisation de clefs de détermination (Figure 5) concernant les caractères observés, permet, par une succession de choix et de propositions, d'avancer dans la détermination. Cependant, tous les caractères permettant l'identification des champignons ne sont pas pris en considération pour les classer. Dans le chapitre suivant, nous verrons les principaux éléments de classification systématique (Figure 6).

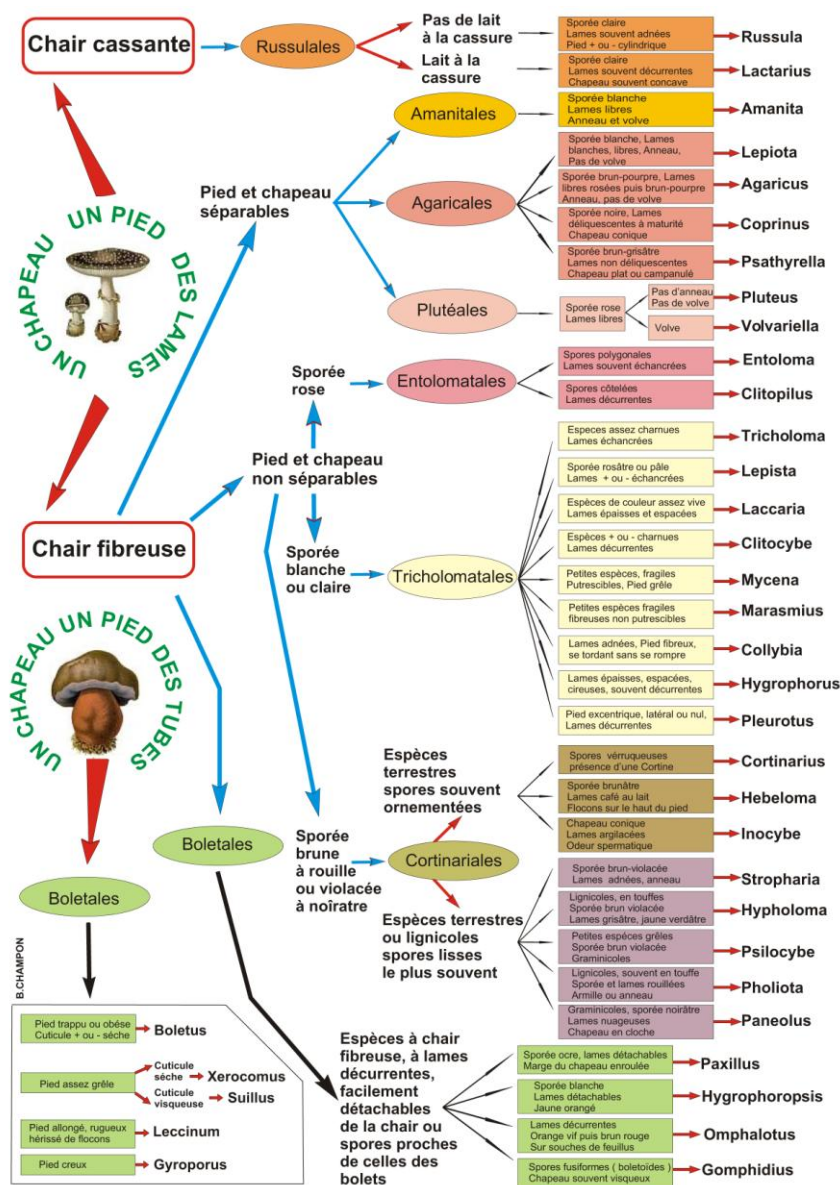


Figure 5: Clef de détermination des champignons (Champon, 2009)

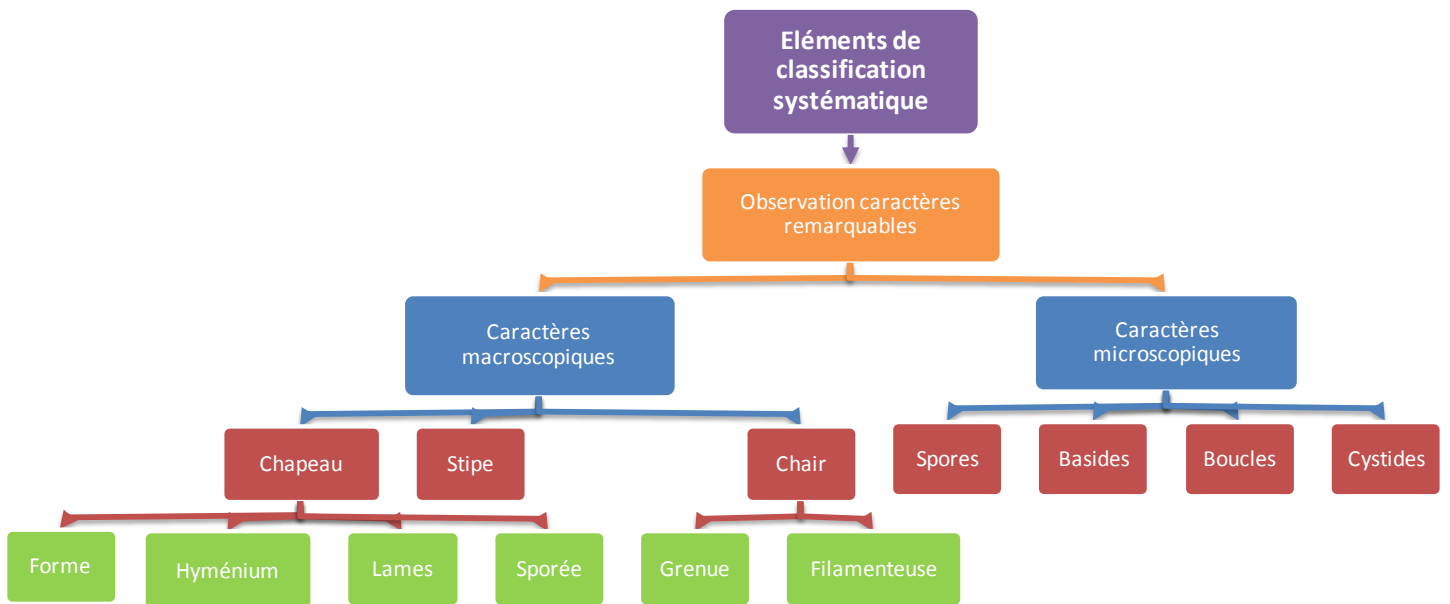


Figure 6: Diagramme des éléments de classification systématique

## 2.1. Caractères macroscopiques

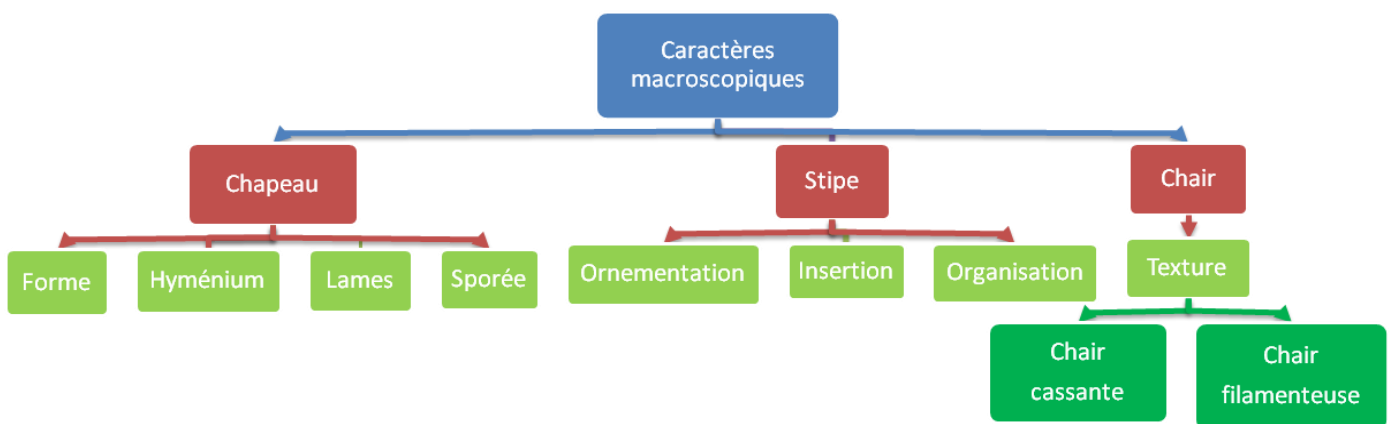


Figure 7: Principaux éléments de classification macroscopique d'un champignon

### 2.1.1. Le chapeau

- La forme

La forme générale du champignon (Figure 7) est souvent conditionnée par la localisation de l'hyménium qui peut être interne, externe ou protégé ou non par le chapeau. Ceci va permettre de dégager 3 groupes (Figure 8):

- **Les champignons à hyménium interne persistant** (angiocarpie) : au début de sa croissance, le champignon a une forme de boule, évoluant en une masse crémeuse et/ou pulvérulente (ce qui paraît être la chair du champignon, est en réalité l’hyménium) à maturité, les spores seront libérées par ouverture ou destruction des membranes (Gastéromycètes: Phallaceae, Clathraceae...).
- **Les champignons à hyménium externe protégé par le chapeau**: il s’agit de la forme « classique » du champignon possédant un hyménium libre sous le chapeau. (ex : *Russula*, *Agaricus*...).
- **Les champignons dont l’hyménium est à l’air libre et non protégé** par le chapeau (gymnocarpie) : le carpophore aura une forme plus ou moins variable et compliquée formant des plis, des cavités... (ex : Clavariaceae, Morchellaceae...).



Champignon à hyménium interne:  
*Clathrus archeri* (Jacques Gouraud, 2006)



Champignon à hyménium non protégé: *Morchella esculenta* (Olivier Voyer, 2007)



Hyménium protégé par le chapeau: *Amanita muscaria* (Jean-Pierre August, 2011)

**Figure 8: Exemple de forme de champignons.**

L’observation plus en détail du chapeau permet de définir les différentes silhouettes de chapeaux qui sont résumées sur la Figure 9.

On décrit ensuite la partie la plus externe du chapeau que l’on appelle « la marge » en notant différentes caractéristiques telles que la transparence, l’opacité ou si celle-ci est cannelée, striée ou floconneuse (Figure 9).



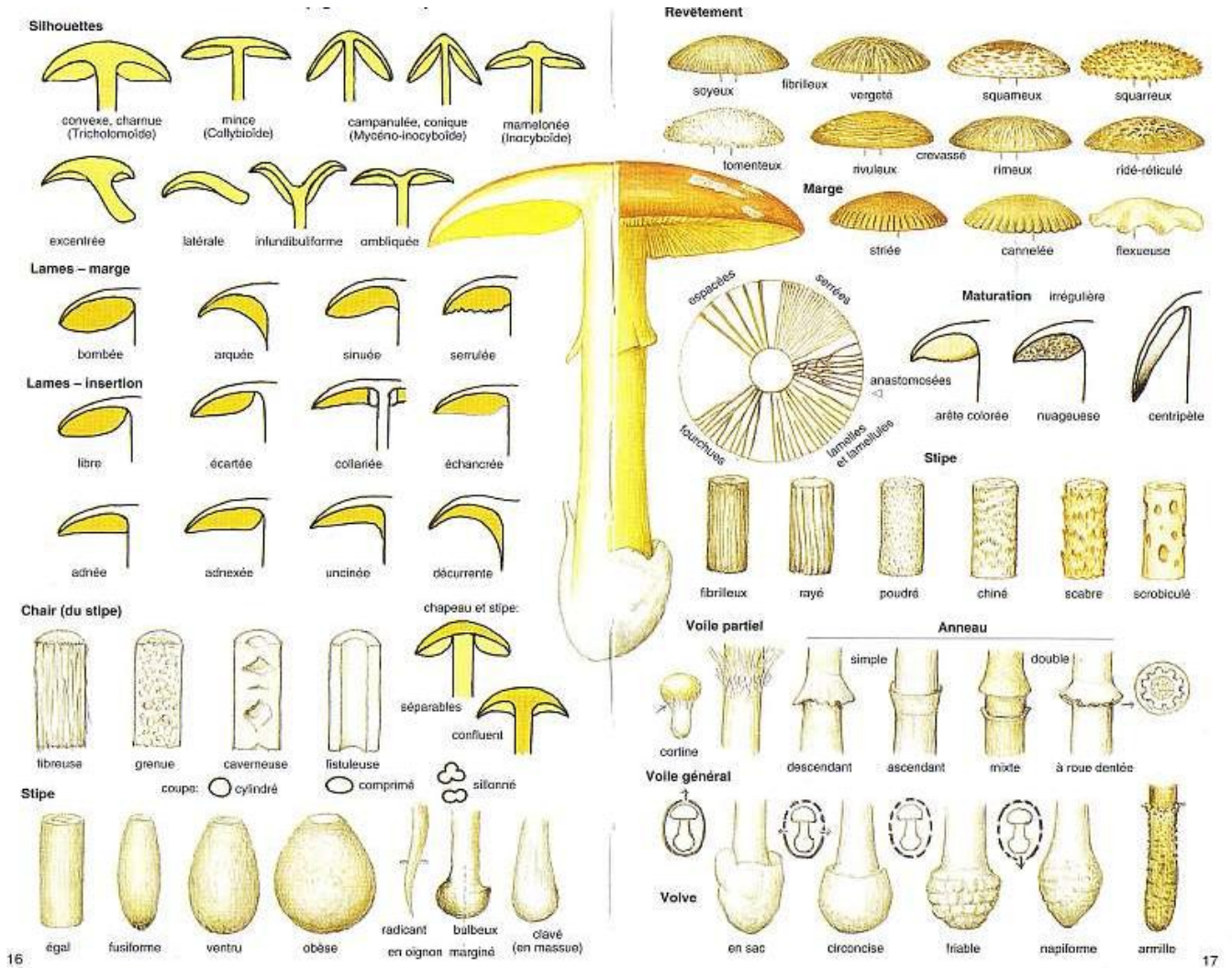


Figure 9: Résumé des caractères macroscopiques (Bon, 2004)

## • L'hyménium

L'hyménium est la partie fertile du champignon. Dans le cas d'un hyménium protégé par le chapeau, il peut être à tubes, à aiguillons ou à lames (Figure 10).



Hyménium à tubes



Hyménium à aiguillons



Hyménium à lames

Figure 10: Différents types d'hyméniums

- **Les lames**
- **Mode d'insertion**

Les différents types d'insertion des lames sont résumés dans la Figure 9. Selon le type d'insertion, il en résultera la notion de "séparabilité" du pied et du chapeau. Dans le cas de lames « libres » (ne touchant pas le stipe), elles feront entièrement partie du chapeau et celui-ci pourra, dans certains cas, se séparer très facilement du pied, on parlera de «**pied et chapeau séparables** ». Dans le cas contraire, si les lames sont adnées ou décurrentes, il y aura cohésion entre les deux parties, le champignon sera défini comme «**pied et chapeau non séparables** ». Entre ces différents modes d'insertion, tous les intermédiaires sont possibles.

- **Aspect**

La couleur des lames peut varier au cours de la croissance du champignon et peut prendre la teinte de la sporée. Ainsi, un champignon jeune pourra avoir des lames claires mais qui, à maturité, pourront être colorées, prenant la teinte des spores mûres (la couleur des lames et la couleur des spores sont deux caractères indépendants l'un de l'autre).

En outre, on apprécie la consistance des lames qui peuvent être cassantes et fragiles, lardacées (grasses au toucher), leur densité (espacées ou serrées) ainsi que leur adhérence avec la chair du chapeau.

- **La sporée**

La sporée constitue l'ensemble des basidiospores mûres déposées en masse (Figure 11). Elle peut être observée sur des éléments présents naturellement sous le chapeau du champignon : feuilles, chapeaux de petits champignons qui poussent en touffes, ou directement sur les lames ou sur les structures du pied du champignon (anneau, cortine..).

Pour obtenir une sporée, il suffit de déposer le chapeau du champignon sur une feuille blanche, ou sur une plaque de verre, en orientant la surface fertile vers le bas, après avoir coupé proprement le pied au niveau du chapeau. En quelques heures, la couleur de la sporée est évaluée avec précision et comparée à un code couleur (annexe 2). Ce caractère est essentiel dans la classification systématique des Agaricomycetidae.

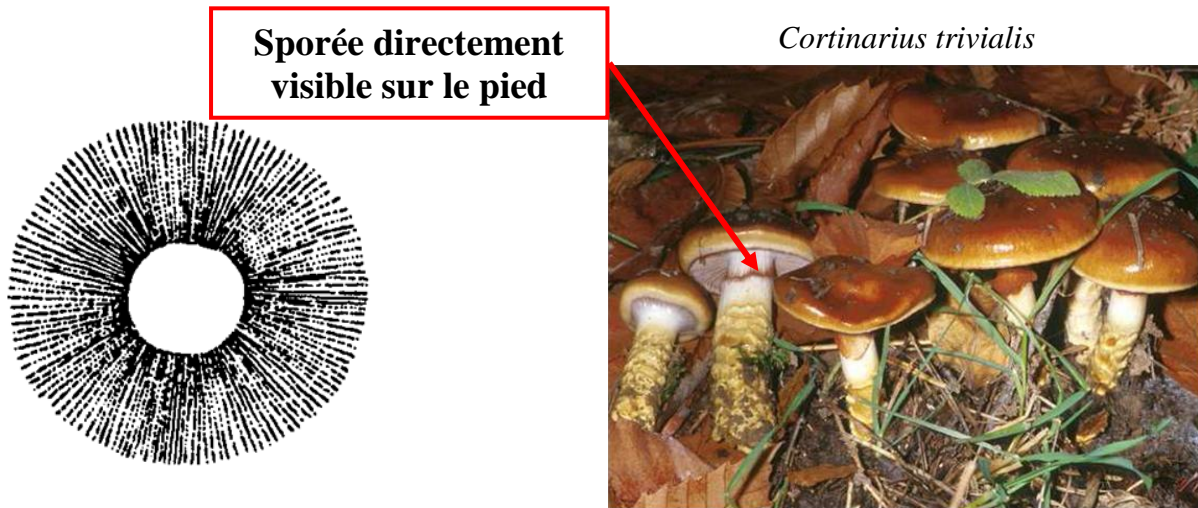


Figure 11: Exemple de sporée de champignon lamellé

- **La cuticule et le revêtement**

Le degré de viscosité ou de matité du chapeau est un critère important particulièrement pour la classification des Boletales (Figure 12). Une cuticule sèche permet de déterminer le genre *Xerocomus* alors que le genre *Suillus* possède un revêtement visqueux.



Figure 12: Cuticule déterminant les genres *Suillus* (à gauche) et *Xerocomus* (à droite)

### 2.1.2. Le stipe

Trois éléments principaux se rapportent au pied du champignon.

- **Ornementation du stipe**

Sur le pied des champignons, on distingue trois types de voiles :

- Le **voile général** qui entoure entièrement le carpophore lorsque le champignon est jeune, formant un œuf (Figure 13). Ce voile se déchire lors de la croissance et peut laisser une volve au niveau du pied et des squames dites « véleaires » sur le chapeau (facilement détachables contrairement aux squames innées qui font partie de l'épiderme). Selon le type d'ouverture du voile, il en résultera la présence d'une volve à la base du pied de forme variable : en sac, circoncise ou friable (Figure 9).

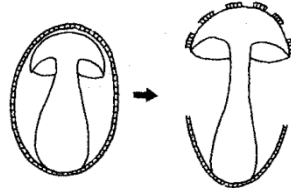


Figure 13: Ouverture du voile général (Bon, 2004)

- Le **voile partiel** qui relie seulement la marge du chapeau au sommet du stipe en protégeant l'hyménium. Ce voile se déchire lors de la croissance (Figure 14) et peut laisser sur le pied un **anneau** qui peut être membraneux ou en toile d'araignée (**cortine**).

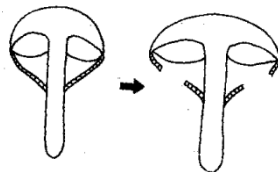


Figure 14: Ouverture du voile partiel (Bon, 2004)

- Le voile peut également se déchirer au niveau de l'hyménium laissant le pied du champignon enchâssé dans une sorte de « chaussette » appelée **armille** (Figure 15).

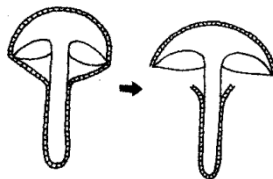


Figure 15: Ouverture de l'armille (Bon, 2004)

Pour exemple, ces structures sont utilisées pour distinguer les genres *Amanita*, *Agaricus* et *Pluteus* (Figure 16).

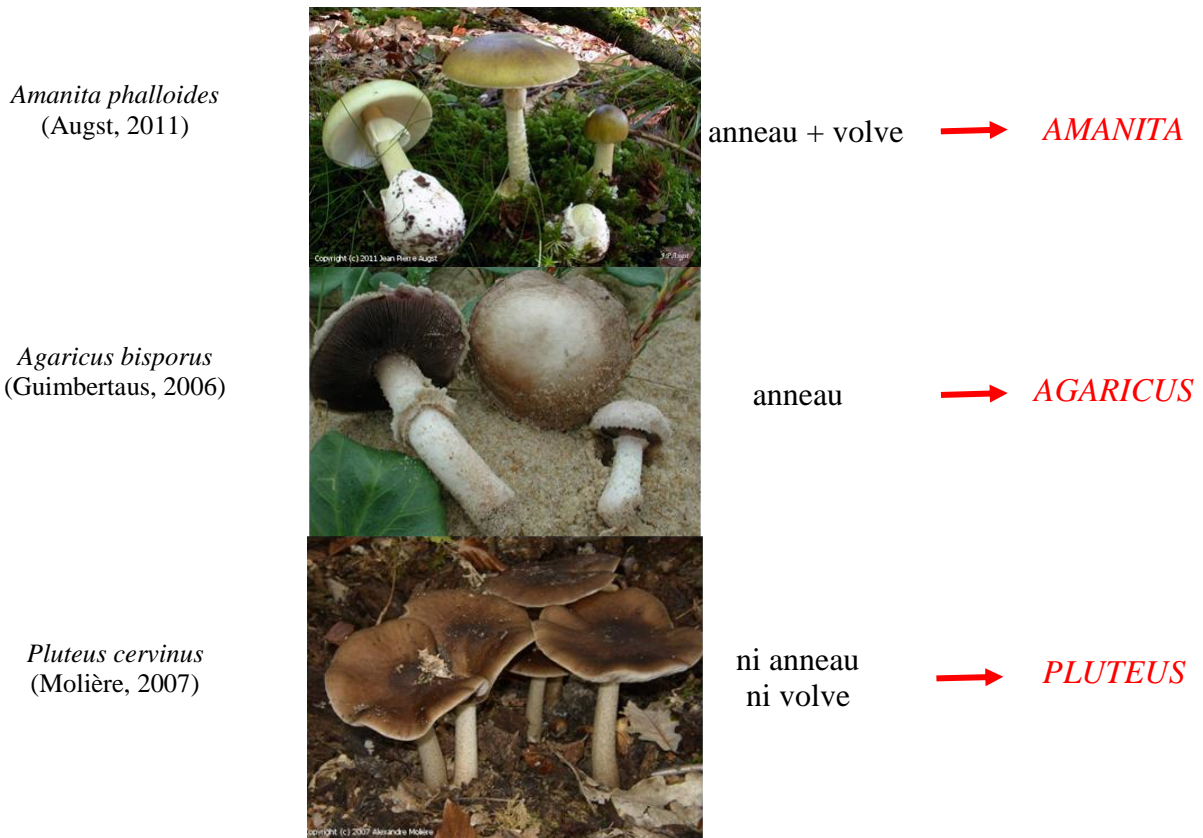


Figure 16: Détermination des genres *Amanita*, *Agaricus* et *Pluteus*

- **Insertion et aspect**

Le **mode d'insertion du pied** sur le chapeau permet de définir deux groupes de champignons: les silhouettes pleurotoïdes avec le stipe excentrique, latéral ou absent et le groupe des champignons à stipe central.

Puis on notera **la forme générale du pied** en détaillant la base de celui-ci, qui peut être par exemple obèse, égale, fusiforme ou ventrue (Figure 9).

Le **revêtement du stipe** peut être chiné, rayé, fibrilleux, scrobiculé ou lisse (Figure 9).

- **Organisation**

L'**organisation interne du pied**, plein ou creux, caractérise certains genres. Par exemple, chez les Boletaceae, un pied creux permettra de définir les genres *Gyroporus* et *Boletinus* alors qu'un pied plein caractérisera les genres : *Suillus*, *Chalciporus*, *Xerocomus*, *Boletus*, *Leccinum*, *Tylopilus*, *Porphyrellus* et *Strobilomyces*.

### 2.1.3. La chair du champignon

Chez les Agaricomycetidae, on retrouve principalement deux types de chair. Pour la quasi-totalité des champignons à lames, la chair est généralement fibreuse: la présence de fibres a pour conséquence une cassure qui n'est pas nette avec de grands filaments. Dans le cas contraire, la chair est constituée de sphérocytes, elle se cassera comme de la craie (cassure nette), on parlera de chair grenue. Le caractère "chair grenue" sera suffisant pour définir l'ordre des Russulales. Au sein de cet ordre, lorsque la cassure est nette et franche, il est possible d'avoir un latex qui s'écoule (lait), permettant de séparer deux genres de champignons:

- Chair **cassante** + **lait** qui s'écoule = genre *Lactarius*
- Chair **cassante** + **absence de lait** = genre *Russula*

Il existe cependant, d'autres types de chairs plus ou moins élastiques ou tenaces comme chez les Polypores ou gélatineuses comme chez les Trémelles.

## 2.2. Caractères microscopiques

Les caractères microscopiques indiqués sur la Figure 17 constituent également des éléments clés de classification systématique.

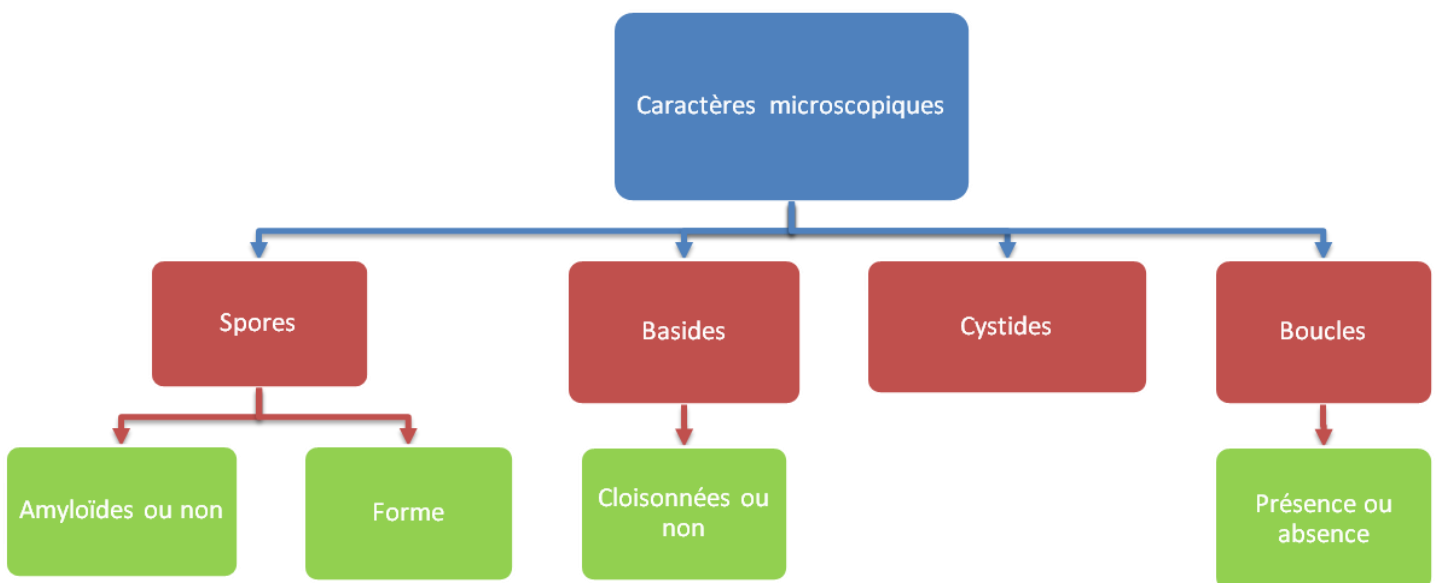
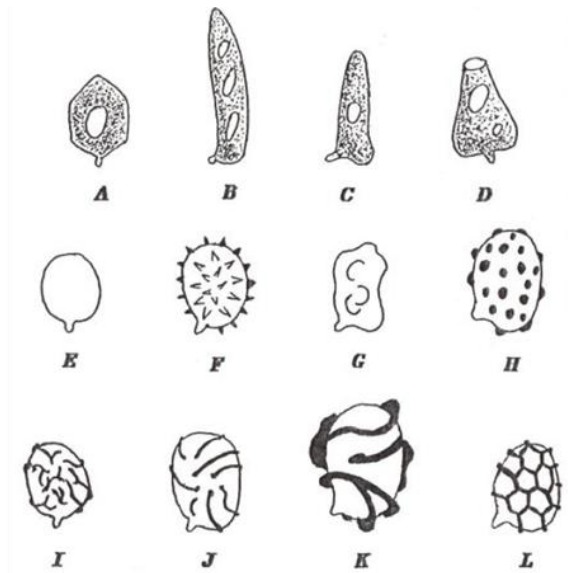


Figure 17: Principaux éléments de classification microscopique d'un champignon

### 2.2.1. Les spores

La forme des spores (Figure 18) et leurs composants chimiques (spores amyloïdes ou non) interviennent dans la classification.



- (A) polyédriques chez les Entolomes
- (B) bolétoïdes: très allongées pour de nombreux bolets
- (C) éperonnées chez certaines Lépiotes
- (D) mitriformes chez certains Coprins
- (E) lisses
- (F) épineuses
- (G) gibbeuses
- (H) verruqueuses
- (I) caténuées
- (J) cristulées
- (K) ailées
- (L) réticulées

Figure 18: Différents types de spores (Baar, 1996)

### 2.2.2. Les basides

L'étude microscopique des basides repose essentiellement sur leur caractère cloisonné ou non (Figure 19).



Figure 19: Cloisonnement et schématisation des basides

### 2.2.3. Les cystides

Les cystides sont les éléments stériles de l'hyménium. On distingue (Figure 20) :

- les pleurocystides situées sur la face des lames
- les cheilocystides situées sur l'arête des lames
- les piléocystides sur le chapeau et les caulocystides sur le pied.

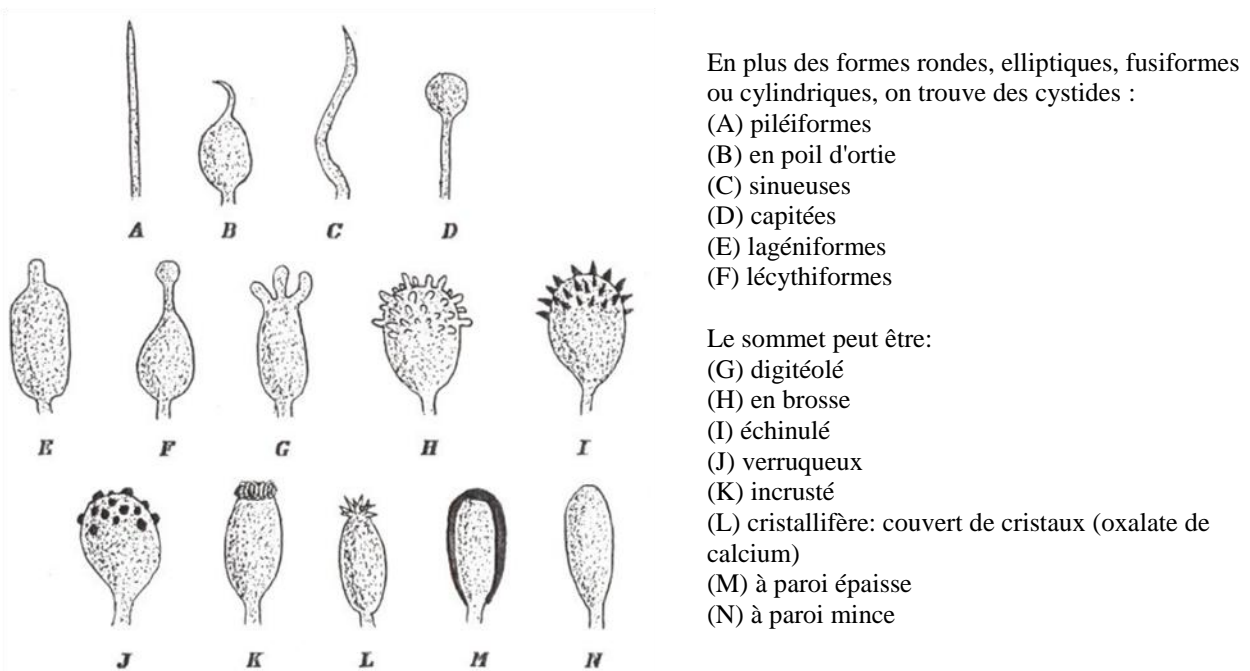


Figure 20: Différents types de cystides (Baar, 1996)

### 2.2.4. Les boucles

Les boucles de conjugaison (ou anses d'anastomose) sont présentes au niveau des cloisons entre les hyphes. Elles sont le signe du passage des noyaux d'un hyphe à l'autre (cf. cycle de vie d'un champignon). On se limite à déterminer la présence ou l'absence des boucles (Figure 21). Par exemple, les espèces de l'ordre des Russulales, ne possèdent pas de boucles.

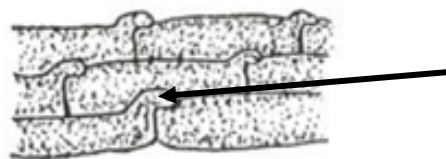


Figure 21: Boucles de conjugaison



### 2.3. Conclusion

Les différents caractères macroscopiques et microscopiques peuvent être pris en compte individuellement ou en les combinant de manière à former des groupes d'espèces les plus homogènes possible pour permettre la classification des champignons. Dans le paragraphe suivant, nous allons présenter la classification systématique qui résulte de la combinaison de ces caractères.

## 3. Classification systématique des Agaricomycetidae

Les Agaricomycetidae sont une des quatre sous-classes des Basidiomycota (Tableau 1).

Tableau 1: Classification systématique des Basidiomycota (Roux, 2006)

<b>Agaricomycetidae</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Basides non cloisonnées</li><li>- Hyménium formé sur des lames ou des tubes</li><li>- Chair généralement charnue et putrescible</li></ul>
<b>Aphylophoromycetidae</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Basides non cloisonnées</li><li>- Hyménium formé sur une surface lisse, plissée ou à aiguillons, jamais de vraies lames</li><li>- Chair généralement coriace et non putrescible</li></ul>
<b>Gasteromycetidae</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Basides non cloisonnées</li><li>- Spore produite à l'intérieur du carpophore (gléba); surfaces non fertiles</li></ul>
<b>Phragmobasidiomycetes</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Basides cloisonnées</li><li>- Texture généralement gélatineuse</li></ul>

Au sein de la sous-classe des Agaricomycetidae, la classification systématique reconnaît six ordres, les Agaricales, les Boletales, les Cortinariales, les Entolomatales, les Russulales et les Tricholomatales (Tableau 2), tous définis par des basides non cloisonnées, un hyménium formé sur des lames ou des tubes, généralement à la surface inférieure du chapeau et une chair généralement charnue et putrescible (Tableau 3).

L'ordre des Boletales, regroupe tous les Agaricomycetidae qui possèdent un **hyménium à pores** (quelques espèces n'ont pas de pores mais des caractères bolétoïdes:

ébauche de pores ou de pigments caroténoïdes ou encore forme des spores). Les cinq autres ordres sont des champignons à lames.

L'ordre des Russulales comprend les espèces à **chair cassante et non fibreuse**.

Chez les champignons à **chair fibreuse et cassure non franche**, on va retrouver deux groupes:

- d'une part, l'ordre des Agaricales, espèces à **lames libres, pied et chapeau séparable**.
- d'autre part, les espèces à **lames non libres, pied et chapeau non séparables**, classées en trois ordres selon la couleur de la sporée:
  - **blanche** pour les Tricholomatales
  - **rosâtre** pour les Entolomatales (spores anguleuses ou à côtes au microscope, on peut retrouver quelques rares Tricholomatales à sporée rosâtre)
  - **ochracée ou brune ou brun violacé** pour les Cortinariales.

L'ordre des Russulales ne comprend que deux genres: *Lactarius* et *Russula* qui sont ensuite définis par des sous-genres. La répartition au sein des cinq autres ordres des Agaricomycetidae se décline en familles (Tableau 2). Ainsi, au sein des Boletales, on retrouve cinq familles: Boletaceae, Paxillaceae, Gomphidiaceae, Hygophoropsidaceae, Omphalotaceae... L'ordre des Tricholomatales est l'ordre des Agaricomycetidae le plus conséquent, il est composé de six familles. Les Entolomatales comprennent seulement deux familles: les Macrocystidiaceae et les Entolomataceae. Les ordres des Cortinariales et des Agaricales sont relativement importants, ils regroupent respectivement quatre et cinq familles (Tableau 2).

Tableau 2: Classification systématique des Agaricomycetidae (Roux, 2006)

<b>BOLETALES</b>	<b>RUSSULALES</b>	<b>TRICHOLOMATALES</b>	
<b>BOLETACEAE</b> <i>Aureoboletus</i> <i>Boletus</i> <i>Boletinus</i> <i>Buchwaldoboletus</i> <i>Chalciporus</i> <i>Gyrodon</i> <i>Gyroporus</i> <i>Leccinum</i> , <i>Phylloporus</i> <i>Porphyrellus</i> <i>Strobilomyces</i> <i>Suillus</i> <i>Tylopilus</i> <i>Xerocomus</i> <b>PAXILLACEAE</b> <i>Paxillus</i> <b>GOMPHIDIACEAE</b> <i>Chroogomphus</i> <i>Gomphidius</i> <b>HYGROPHOROSPIDACEAE</b> <i>Hygrophoropsis</i> <b>OMPHALOTACEAE</b> <i>Omphalotus</i>	<b>LACTARIUS</b>  <i>Sous Genre Lactarius</i> <i>Lactifluus</i> <i>Piperites</i> <i>Plinthogalus</i> <i>Rhysocybella</i> <i>Russularia</i>  <b>RUSSULA</b>  <i>Sous Genre Amoenua</i> <i>Compactae</i> <i>Heterophyllidia</i> <i>Ingratula</i> <i>Incrustatula</i> <i>Russula</i>	<b>PLEUROTACEAE</b> <i>Campanella</i> <i>Cheimonophyllum</i> <i>Clitopilus</i> <i>Crepidotus</i> <i>Faerberia</i> <i>Hohenbuehelia</i> <i>Hypsizygus</i> <i>Lentinus</i> <i>Lentinellus</i> <i>Omphalotus</i> <i>Ossicaulis</i> <i>Panellus</i> <i>Pleurotus</i> <i>Phyllostopsis</i> <i>Pleurocybella</i> <i>Resupinatus</i> <i>Tectella</i> <b>TRICHOLOMATACEAE</b> <i>Armillaria</i> <i>Calocybe</i> <i>Clitocybe</i> <i>Laccaria</i> <i>Lepista</i> <i>Leucopaxillus</i> <i>Lyophyllum</i> <i>Melanoleuca</i> <i>Omphalina</i> <i>Tricholoma</i> <i>Tricholomopsis</i>	<b>DERMOLOMATACEAE</b> <i>Camarophyllopsis</i> <i>Chamaemyces</i> <i>Cystoderma</i> <i>Dermoloma</i> <i>Leucocortinarius</i> <i>Phaeolepiota</i> <i>Rhodotus</i> <i>Squamanita</i> <b>HYGROPHORACEAE</b> <i>Camarophyllopsis</i> <i>Cuphophyllum</i> <i>Hygrocybe</i> <i>Hygrophorus</i> <i>Neophygrophorus</i> <b>MARASMIACEAE</b> <i>Baeospora</i> <i>Collybia</i> <i>Crinipellis</i> <i>Flammulina</i> <i>Lactocollybia</i> <i>Marasmiellus</i> <i>Marasmius</i> <i>Megacollybia</i> <i>Micromphale</i> <i>Oudemansiella</i> <i>Setulipes</i> <i>Strobilurus</i> <i>Xeromphalina</i> <i>Xerula</i> <b>MYCENACEAE</b> <i>Hemimycena</i> <i>Hydropus</i> <i>Mycena</i> <i>Mycenella</i>
<b>ENTOLOMATALES</b>	<b>CORTINARIALES</b>		<b>AGARICALES</b>
<b>MACROCYSTIDIACEAE</b> <i>Macrocyctidia</i> <b>ENTOLOMATACEAE</b> <i>Clitopilus</i> <i>Entoloma</i> <i>Rhodocybe</i>	<b>BOLBITIACEAE</b> <i>Agrocybe</i> <i>Bolbitius</i> <i>Conocybe</i> <i>Pholiotina</i> <i>Simocybe</i> <b>CREPIDOTACEAE</b> <i>Crepidotus</i> <i>Flammulaster</i> <i>Galerina</i> <i>Gymnopilus</i> <i>Phaeomarasmius</i> <i>Phaeocollybia</i> <i>Tubaria</i>	<b>CORTINARIACEAE</b> <i>Alnicola</i> <i>Cortinarius</i> <i>Hebeloma</i> <i>Hebelomina</i> <i>Inocybe</i> <i>Rozites</i> <b>STROPHARIACEAE</b> <i>Hypholoma</i> <i>Kuehneromyces</i> <i>Melanotus</i> <i>Pholiota</i> <i>Phaeonematoloma</i> <i>Phaeogalera</i> <i>Psylocybe</i> <i>Stropharia</i>	<b>AMANITACEAE</b> <i>Amanita</i> <i>Limacella</i> <b>LEPIOTACEAE</b> <i>Cystolepiota</i> <i>Echinoderma</i> <i>Lepiota</i> <i>Leucoagaricus</i> <i>Leucocoprinus</i> <i>Macrolepiota</i> <i>Melanophyllum</i> <i>Pulverolepiota</i> <b>PLUTEACEAE</b> <i>Pluteus</i> <i>Volvariella</i> <b>AGARICACEAE</b> <i>Agaricus</i> <b>COPRINACEAE</b> <i>Coprinellus</i> <i>Coprinus</i> <i>Coprinopsis</i> <i>Panaeolus</i> <i>Parasola</i> <i>Psathyrella</i>

Tableau 3: Eléments de classification systématique des ordres des Agaricomycetidae

<b>Champignons avec des pores</b>			
<b>Boletales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyménium tubuleux ou à lames anastomosées (généralement séparables du chapeau)</li> <li>- Certains spécimens à lames classés ici pour leurs éléments caractéristiques des Bolets: microscopie (pigment caroténoïde, spores boletoïdes, cystide particulière) et chimie</li> </ul>		
<b>Champignons à lames</b>			
<b>Russulales</b>	<b>Chair non fibreuse à cassure franche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sporée blanche à jaune</li> <li>- Spores amyloïdes</li> <li>- Pas de boucle de conjugaison</li> <li>- Espèces mycorrhiziques</li> </ul>	
<b>Tricholomatales</b>	<b>Chair fibreuse à cassure non franche</b>	<b>Lames non libres Pied et chapeau non séparables</b>	- Sporée <b>blanche</b>
<b>Entolomatales</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sporée <b>rosâtre</b></li> <li>- Spores de forme particulière: anguleuses ou côtelées</li> </ul>
<b>Cortinariales</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sporée <b>ochracée</b>, brune ou brun-violacé</li> <li>- Pied et chapeau confluents</li> </ul>
<b>Agaricales</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sporée blanche, rose et brune</li> </ul>
		<b>Lames libres Pied et chapeau séparables</b>	

# **PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES AGARICOMYCETIDAE**

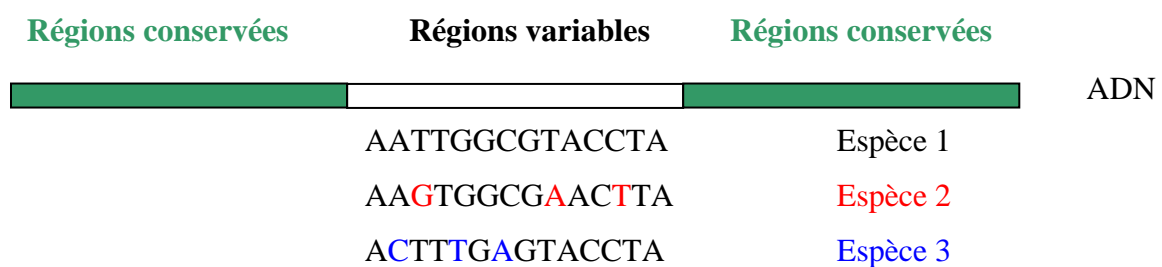
La phylogénie moléculaire est basée sur l'utilisation des séquences nucléotidiques ou protéiques. Elle permet d'établir les liens de parenté entre différents êtres vivants. Ces 20 dernières années, des techniques moléculaires, comme la PCR et le séquençage, ont été développées et ont conduit à l'obtention d'un grand nombre de séquences d'ADN. L'utilisation de ces séquences a induit des changements profonds dans la classification systématique. Dans cette partie, nous présenterons les marqueurs moléculaires les plus utilisés pour la phylogénie moléculaire des champignons et les différentes classifications qui en résultent.

## 1. Marqueurs moléculaires

Les régions du génome utilisées pour la phylogénie moléculaire sont appelées marqueurs moléculaires. Elles doivent remplir les conditions suivantes :

- (i) elles doivent être ubiquistes, c'est-à-dire présentes chez tous les taxons étudiés ;
- (ii) elles doivent contenir une région variable spécifique de chaque espèce et encadrée par deux séquences conservées chez la plupart des champignons (Figure 22).

La comparaison des séquences des régions variables des différentes espèces permet d'apprécier leur proximité ou leur éloignement phylogénétique.



**Figure 22: Comparaison de séquences variables de trois espèces distinctes**

Chez les champignons, les marqueurs moléculaires utilisés sont les gènes, ou séquences intergéniques, présents sur le génome nucléaire ou mitochondrial.

## 1.1. Marqueurs nucléaires

Deux types de séquences sont utilisés pour étudier la phylogénie moléculaire des champignons : les gènes encodant les ARN ribosomiques et les gènes codant pour des protéines cytoplasmiques.

### 1.1.1. Les ARN ribosomiques

Les gènes codant pour les ARN ribosomiques sont au nombre de quatre et dans le cas des champignons, ces gènes sont: le gène encodant l'ARN ribosomique 18 S constitutif de la petite sous-unité du ribosome (40 S) encore appelée nuc-SSU (nuclear-Small SubUnit) et les gènes encodant les ARNr 5S, 5,8S et 25S appartenant à la grande sous-unité (60 S) du ribosome aussi appelée nuc-LSU (nuclear-Large SubUnit) (Figure 23).

Ces gènes sont organisés en cluster d'unités répétées et séparées par les séquences IGS (Inter Genic Spacer). A l'intérieur de chaque unité, les gènes 18 S et 5,8 S sont séparés par les séquences ITS1 ("Internal Transcribed Spacer") et les gènes 5,8 S et 25 S sont séparés par les séquences ITS2 (Figure 23).

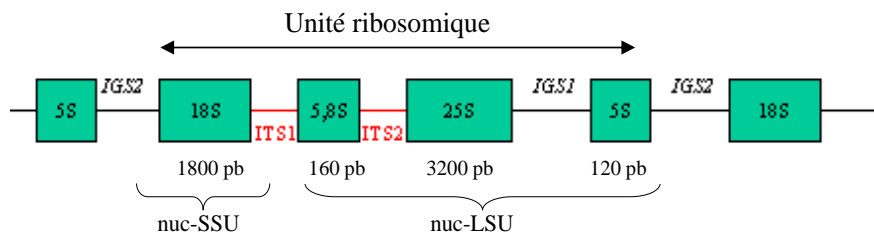


Figure 23: Organisation des gènes codant pour l'ADN ribosomique nucléaire

La taille d'une unité varie suivant les champignons de 7,7 à 24 kpb et le nombre de copies est de 60 à 220 par génome haploïde.

Les séquences des gènes codant pour les ARNr 18S, 25S, 5S et 5,8 S sont généralement hautement conservées au niveau des phyla, familles et genres. En revanche, les séquences ITS et IGS sont beaucoup plus polymorphes (Berbee et Taylor, 2001) et présentent des variations interspécifiques importantes pour ITS et une variabilité intraspécifique élevée pour les séquences IGS.

Dans cet opéron, les séquences utilisées pour la phylogénie moléculaire sont les séquences 18S, 25S et ITS. Du fait de la taille importante des gènes nuc-SSU et nuc-LSU, respectivement 1800 et 3200 pb (Neefs et al, 1993), seule une petite partie de ces séquences (séquences partielles) est utilisée en phylogénie. Ces séquences partielles correspondent à différents domaines définis par le modèle de Neefs (Neefs et al, 1993). En effet, Neefs en décrivant la structure secondaire de ces gènes, a défini au sein de chacun, neuf domaines variables allant de V1 à V9, encadrés chacun par des domaines constants (Figure 24). Cette organisation se retrouve à la fois pour le gène nuc-SSU et pour le gène nuc-LSU.

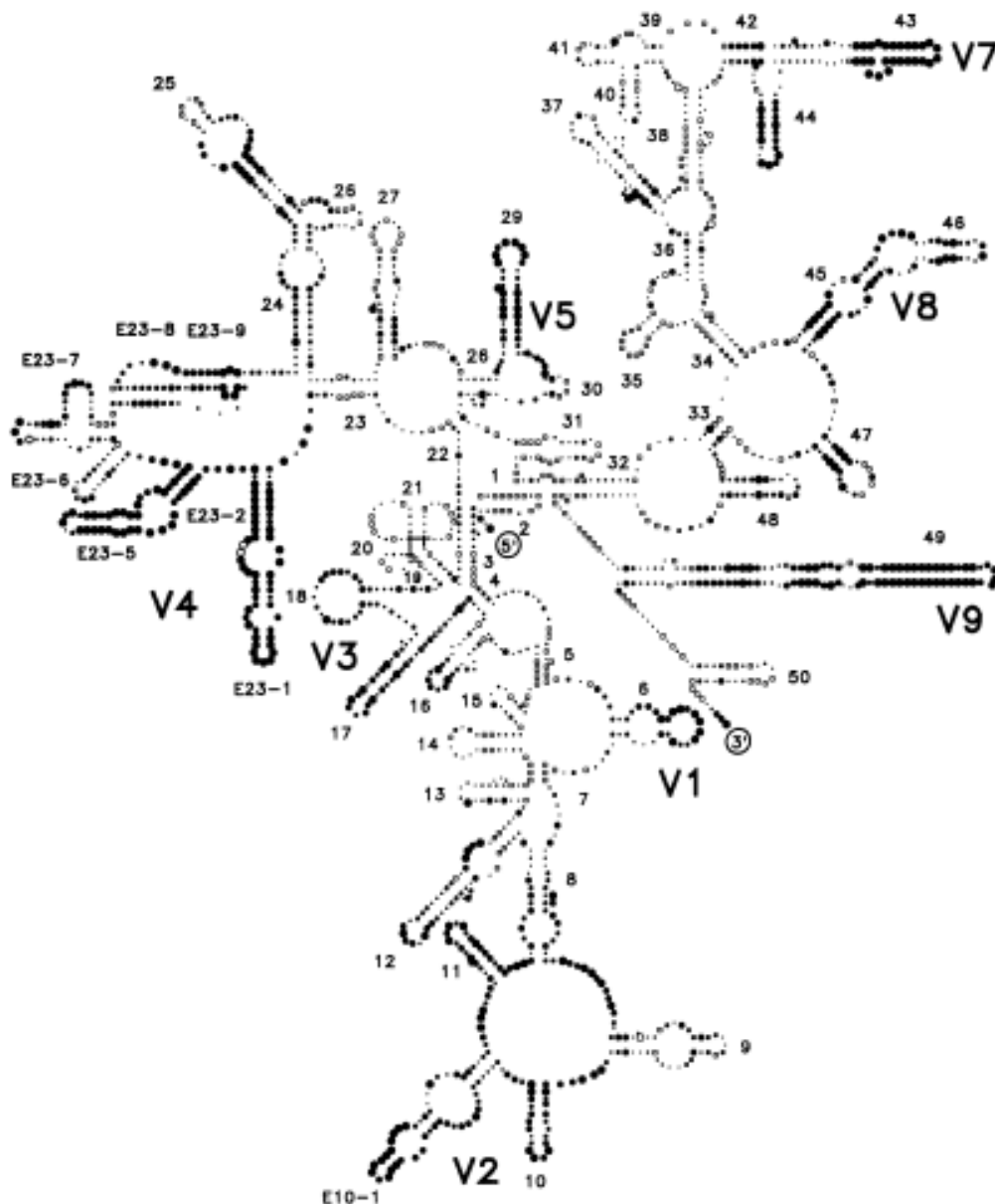


Figure 24: Structure secondaire de nuc-SSU eucaryote selon le modèle de Neefs et al, 1993, représentant les neufs domaines variables notés de V1 à V9



- **Le gène nuc-LSU**

La séquence partielle du gène utilisée en phylogénie correspond à la partie 5' qui comprend les 600 à 900 premières bases des trois domaines variables V1, V2 et V3 (Michot et al, 1984, 1990). Il s'agit de la portion du gène nuc-LSU contenant le plus d'informations phylogénétiques (Hillis et Bull, 1993; Kuzoff et al, 1998; Hopple et Vilgalys, 1999). Généralement, l'amplification du gène se fait sur la partie délimitée par les amorces 5.8SR à LR7 (Vilgalys Laboratory) (Figure 25).

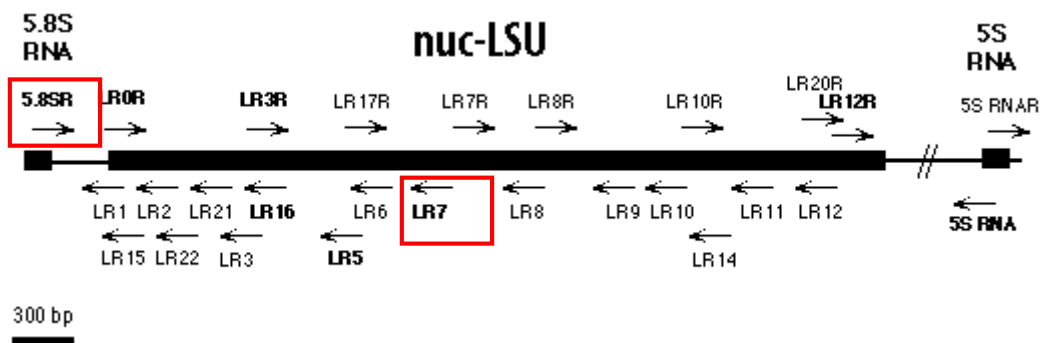


Figure 25: Partie 5' du gène nuc-LSU selon Vilgalys (<http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>). Les flèches indiquent les positions des amorces

- **Le gène nuc-SSU**

En ce qui concerne le gène nuc-SSU (Figure 26), en général, seules les parties délimitées par les amorces PNS1 et NS41 (Hibbett et Binder, 2003), générant une séquence d'environ 1150 pb, sont utilisées pour la phylogénie.

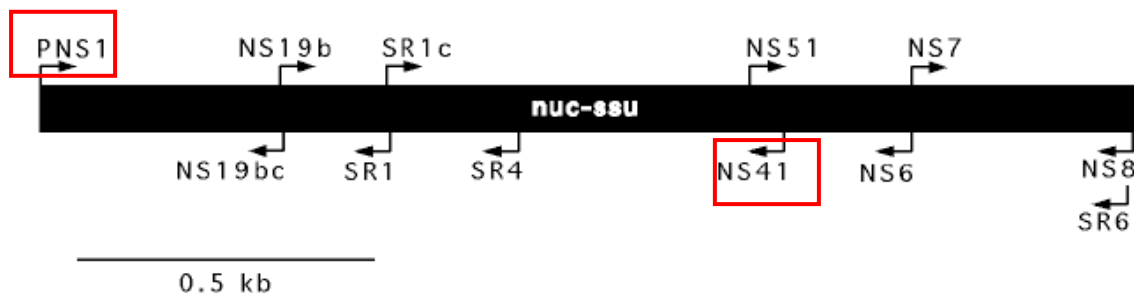


Figure 26: Région partielle du gène nuc-SSU (Hibbett et Binder, 2003)

## - Les séquences ITS

La séquence ITS est la région d'ADN la plus largement utilisée pour la phylogénie des champignons. Actuellement, il est référencé plus de 150 000 séquences d'ITS fongiques dans les bases de données (Damon et al, 2010).

La séquence ITS comprend les régions ITS1, ITS2 et le gène 5,8S. Sa taille varie de 600 à 700 pb (Carriconde et al, 2008). Plusieurs amorces spécifiques, notamment les amorces ITS1F et ITS4 (Gardes et Bruns, 1993) permettant l'amplification sélective des séquences fongiques, ont été décrites (Figure 27). En raison de son haut degré de variation par rapport aux gènes nuc-LSU et nuc-SSU, la région ITS est très utilisée pour la caractérisation moléculaire des espèces fongiques.

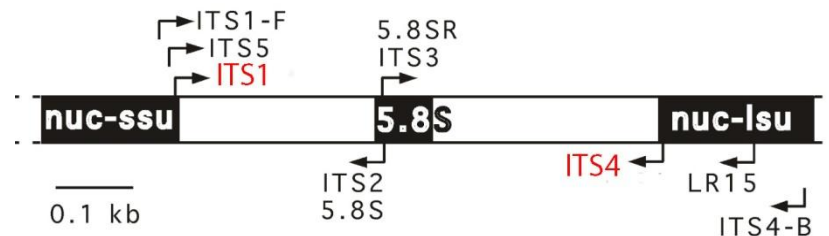


Figure 27: Région ITS (Hibbett et Binder, 2003)

### 1.1.2. Les gènes codant pour les protéines nucléaires

Les séquences encodant les protéines sont soumises à de fortes contraintes fonctionnelles car elles codent pour des protéines ayant des rôles importants au niveau cellulaire. De ce fait, les mutations sur ces séquences sont rares, ce qui en fait un avantage par rapport aux séquences d'ARNr pour les analyses phylogénétiques.

Les gènes les plus utilisés sont ceux qui codent pour la  $\beta$ -tubuline, les ARN polymérasés de type II (RPB).

## - Le gène de la $\beta$ -tubuline

C'est un gène très conservé au cours de l'évolution qui code pour une protéine d'environ 55 kDa. Il est présent en une seule copie par génome haploïde et possède une taille variant d'environ 700 à 2000 pb due à la présence de nombreux introns (Corradi et al, 2004).

Quatre régions possédant suffisamment d'informations phylogénétiques sont utilisées comme marqueurs moléculaires (Figure 28).

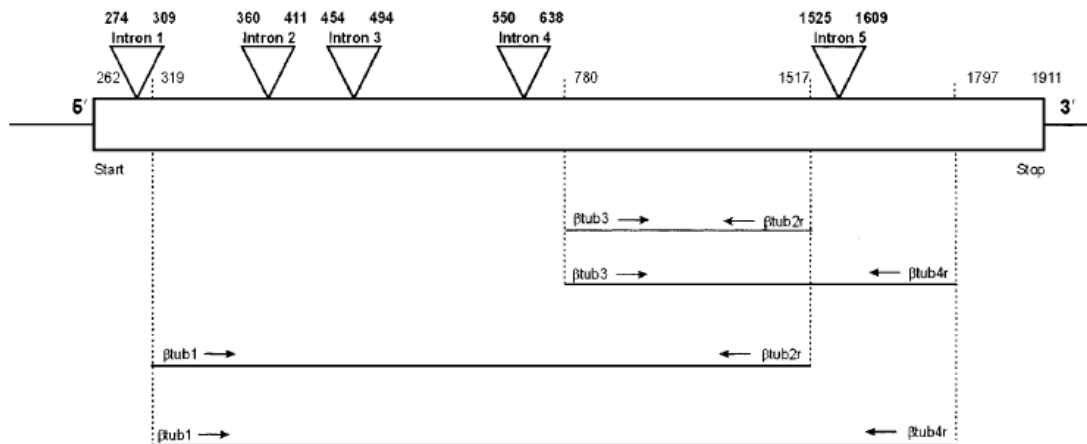


Figure 28: Organisation du gène de la  $\beta$  tubuline de *Schizosaccharomyces pombe* (Einax et Voigt, 2003).

### - Les gènes RPB1 et RPB2

Les gènes RPB1 et RPB2 codent pour les deux grandes sous-unités de l'ARN polymérase de type II. Ces gènes, en encodant les domaines catalytiques de cette enzyme, possèdent des domaines conservés utilisés avec succès en phylogénie chez les eucaryotes (Stiller et Hall, 1999; Liu et Hall, 2004). Chez les champignons, la séquence partielle du gène RPB2 d'environ 1100 pb, et amplifiée grâce au couple d'amorces fRPB2-5F et bRPB2-7.1R, est utilisée pour l'identification et la phylogénie moléculaire (Binder et al, 2010) (Figure 29).

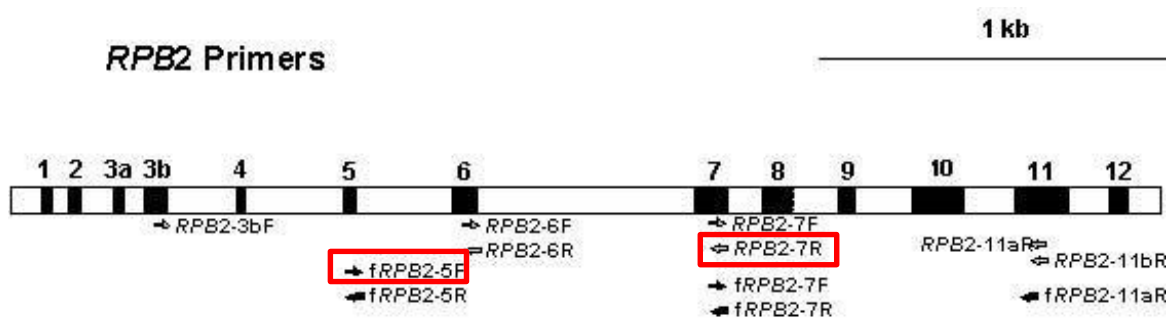


Figure 29: Organisation moléculaire du gène RPB2. Les flèches indiquent les positions des amorces permettant l'amplification des régions utilisées en phylogénie moléculaire.

## 1.2. Marqueurs mitochondriaux

Les mitochondries sont des organites cellulaires rencontrés chez la quasi-totalité des eucaryotes. Elles sont impliquées dans la phosphorylation oxydative via la chaîne respiratoire (Saraste, 1999) et porteuses d'une information génétique spécifique : le génome mitochondrial (ou ADNmt). Les mitochondries auraient une origine endosymbiotique (Martin et Muller, 1998), la cellule eucaryote avec mitochondries proviendrait de la fusion originelle entre une  $\alpha$ -protéobactérie et une archéobactérie (Gray et al, 1999) (Figure 30).

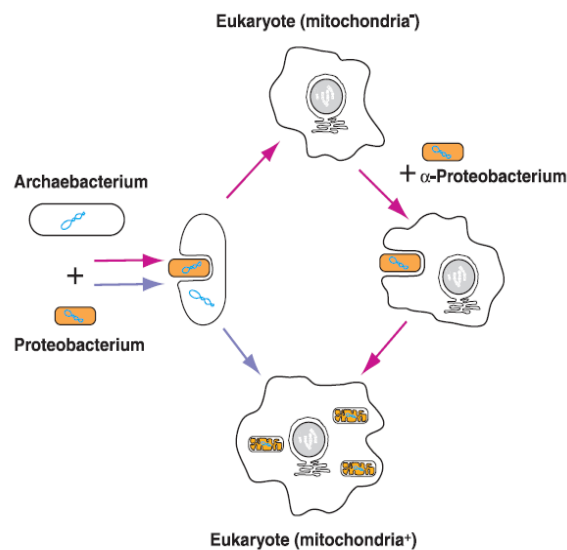
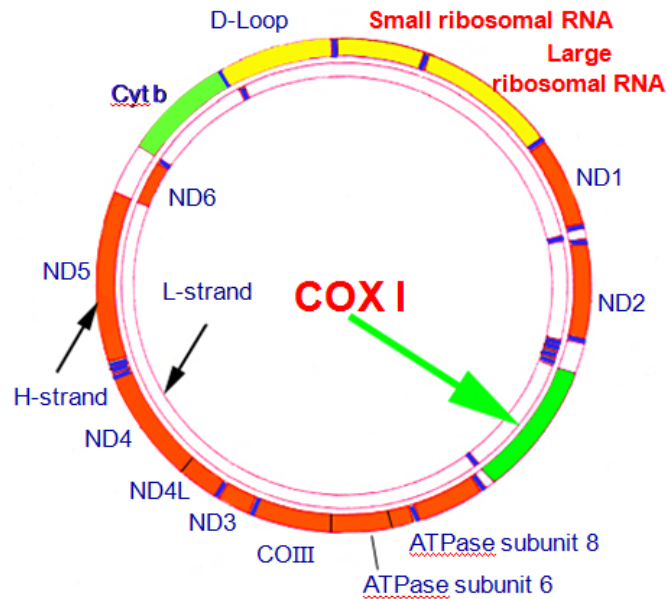


Figure 30: Fusion d'une archéobactérie et d'une protéobactérie aérobie

Le génome mitochondrial (Figure 31) aurait une origine monophylétique (Gray et al, 1999; Lang et al, 1999; Andersson et al, 2003), avec un ensemble de gènes hautement conservés chez la majorité des génomes mitochondriaux animaux, végétaux et fongiques (Truscott et al, 2003).

Les gènes mitochondriaux sont adaptés à la phylogénie moléculaire car ils possèdent un taux de recombinaison génétique très faible et une faible variabilité intra-spécifique.

Les principaux marqueurs mitochondriaux utilisés sont les gènes encodant les ARN ribosomiques et le gène *cox1* (ou CO I).



**Figure 31: Organisation du génome mitochondrial**  
 (<http://www.barcodeoflife.org/content/resources/meeting-materials>)

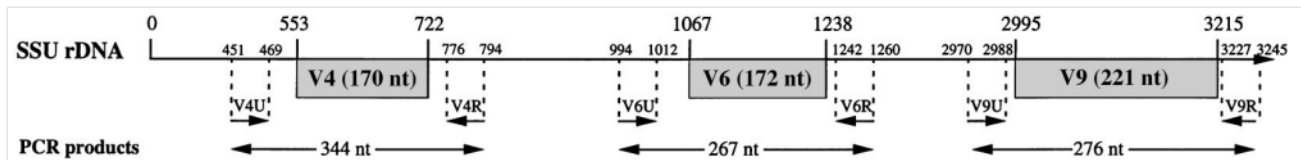
### 1.2.1. Les ARN ribosomiques

Chez les champignons, les gènes codant pour les ARN ribosomiques mitochondriaux sont au nombre de deux: le gène 16S qui code pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (mt-SSU-ARNr) et le gène 23S qui code pour l'ARN de la grande sous-unité du ribosome (mt-LSU-ARNr).

On retrouve dans le génome mitochondrial des champignons, une seule copie de chacun de ces gènes, leur position, au sein du génome varie selon les espèces de champignon. Ces deux gènes sont séparés par des régions allant de quelques bases à plusieurs kpb contenant d'autres gènes mitochondriaux.

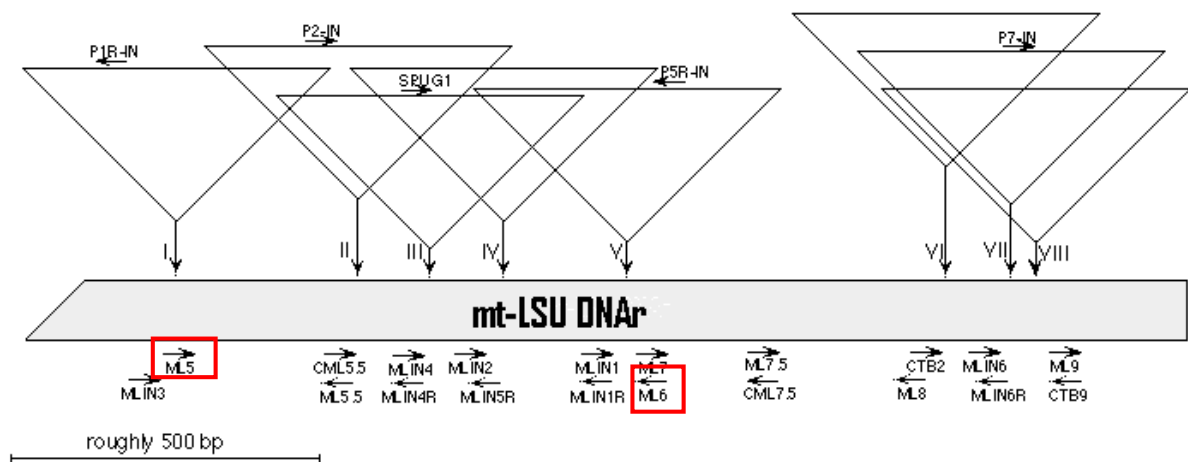
Comme les gènes codant pour les ARN ribosomiques nucléaires, les gènes mt-LSU-ARNr et mt-SSU-ARNr possèdent la même organisation, c'est-à-dire neuf domaines variables encadrés chacun par des régions constantes.

Pour le gène mt-SSU, trois domaines sont les plus utilisés en phylogénie moléculaire: V4, V6 et V9 (Figure 32). Chaque domaine variable est amplifié par un couple d'amorces spécifiques générant des fragments n'excédant pas 500 pb (annexe 3).



**Figure 32: Domaines variables V4, V6 et V9 du gène SSU ARNr d'*Agrocybe aegerita* (Gonzales et al, 1998). Les amorces sont indiquées par des flèches.**

Pour le gène mt-LSU, la séquence partielle délimitée par les amorces ML5 et ML6 est la plus utilisée, générant par PCR une séquence d'environ 400 pb (Bruns et al, 1998). Cette partie peut contenir des séquences introniques (I, II, III, IV et V sur la Figure 33).



**Figure 33: Gène mitochondrial LSU.**

### 1.2.2. Le gène *cox 1*

Parmi les gènes mitochondriaux, on retrouve le gène *cox1* (cytochrome C oxydase subunit 1) qui code pour une protéine composante du complexe IV de la chaîne respiratoire (Molitor et al, 2009). Ce gène est porté universellement chez tous les eucaryotes et code pour une protéine fortement conservée, le rendant très utile pour l'étude des relations phylogénétiques entre organismes (Bowe et al, 1999). De plus, il présente un niveau de variabilité intéressant: les différences observées entre les individus d'une même espèce sont très faibles, voire nulles mais relativement élevées entre des individus d'espèces différentes. C'est pour cette raison que le gène *cox1* se révèle être un outil performant pour le « barcoding ». Le barcode consiste à associer une séquence d'ADN à une espèce, permettant l'identification taxonomique des organismes vivants à partir de la séquence de ce fragment d'ADN (Hebert et al, 2004) (Figure 34).

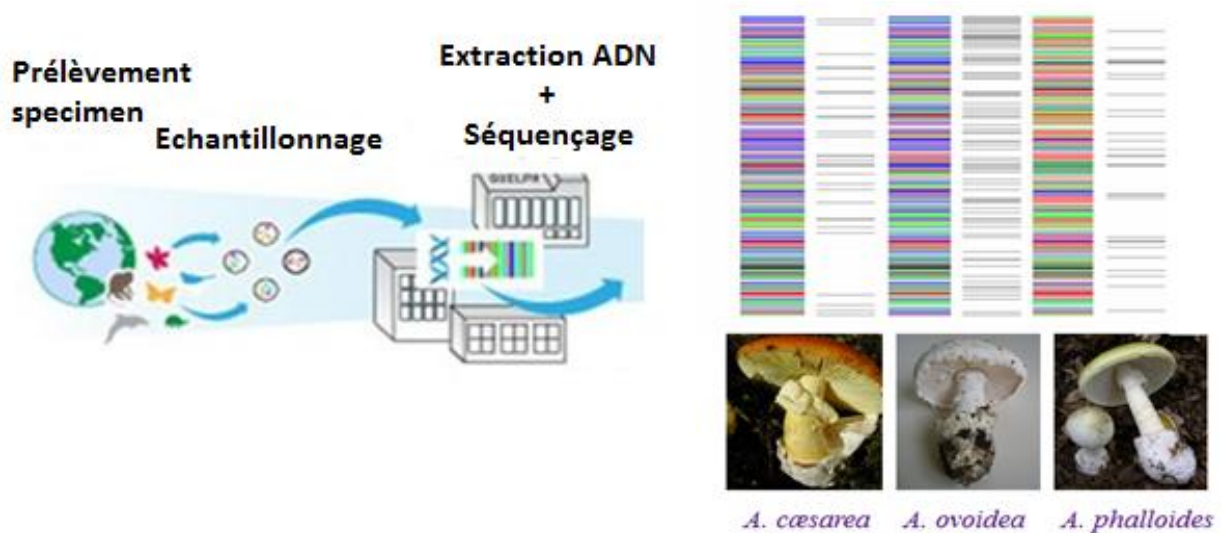


Figure 34: Principe du barcoding

En revanche, le gène *cox1* peut contenir de nombreux introns (du groupe I ou II) (Vialle et al, 2009), jusqu'à 19 séquences introniques chez *Agaricus bisporus* (18 du groupe I et 1 du groupe II) (Ferandon et al, 2010), ce qui en fait le plus grand réservoir d'introns rapporté à ce jour. La plupart de ces introns code pour des homing endonucléases impliquées dans le transfert latéral de ces introns. Ces séquences introniques ne sont pas conservées et leur présence peut rendre difficile l'amplification du gène par PCR. Chez les champignons, les séquences partielles du gène *cox1* utilisées en phylogénie sont amplifiées par des couples d'amorces différents (Seifert, 2009; Molitor et al, 2009) générant des séquences codantes d'environ 400 – 500 pb.

**Tableau 4: Principaux marqueurs fongiques disponibles dans les bases de données en 2009 (Begerow et al, 2010)**

<b>Marqueurs fongiques</b>	<b>Nombre de séquences disponibles</b>
ITS incluant 5.8S	147 042
SSU	136 588
LSU	115 228
$\beta$ tubuline	14 921
Actin	4 124
RPB2	8 316
EF1a	7235
COI	581

En conclusion, les séquences géniques disponibles dans les bases de données représentent seulement 1% du nombre hypothétique d'espèces fongiques (Nilsson et al, 2009b). Le Tableau 4 ci-dessus rassemble les principaux marqueurs fongiques ayant un grand intérêt pour la phylogénie et le barcoding d'espèces. Le nombre de séquences disponibles dans les bases de données est en perpétuelle évolution, dépendant de l'avancée des connaissances scientifiques et des publications.



## 2. Phylogénie moléculaire

Afin d'étudier la phylogénie moléculaire des Agaricomycetidae et de comparer avec la classification systématique, il s'est avéré nécessaire d'étudier l'évolution de la classification des Basidiomycota.

### 2.1. Evolution de la classification des Basidiomycota

La classification des Basidiomycota a connu de réels changements avec l'introduction des méthodes moléculaires et leur évolution. Les études pionnières effectuées sur 19 espèces (Swann et Taylor, 1993) puis 54 espèces (Swann et Taylor, 1995) et utilisant l'ARNr 18S ont permis de diviser les Basidiomycota en trois grands groupes: les Hyménomycètes, les Ustilaginomycètes et les Urédiniomycètes (Figure 35) qui sont appelés respectivement Agaricomycotina, Ustilaginomycotina et Pucciniomycotina dans la classification actuelle.

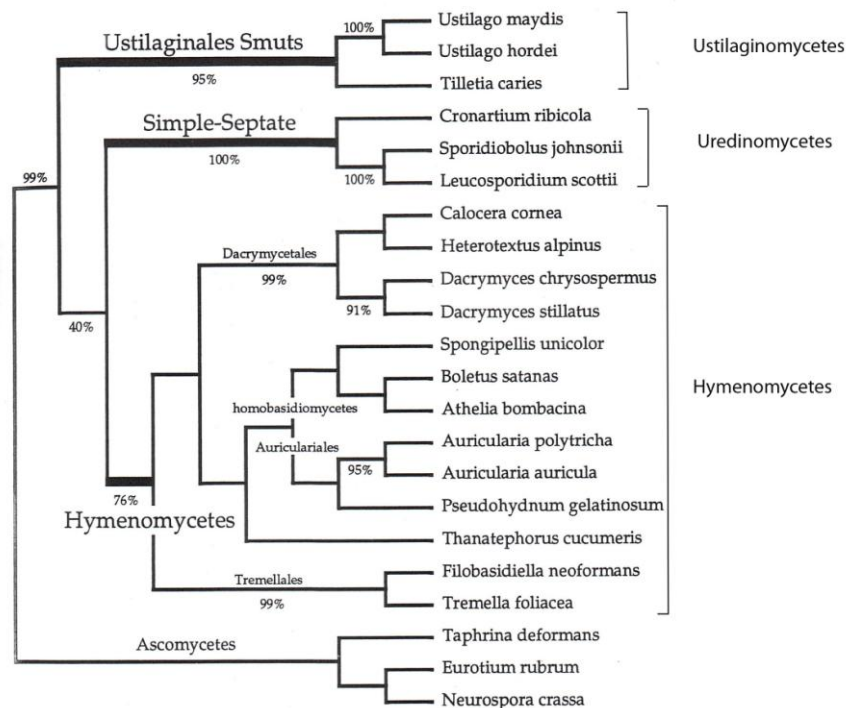


Figure 35: Phylogénie des Basidiomycota selon la méthode de parcimonie et basée sur l'analyse de ARNr 18S (Swann et Taylor, 1993).

La plupart des études ultérieures basées sur l'ARNr nucléaire, ainsi que sur le gène de la  $\beta$ -tubuline, ont montré que ces trois groupes auraient une origine monophylétique (Taylor et al, 2000; Weiss et al, 2004; Begerow et al, 2004), ce qui a été confirmé par les analyses des caractères structuraux (McLaughlin et al, 1995; Lutzoni et al, 2004), notamment la composition de la paroi cellulaire (Prillinger et al, 1993).

L'étude de Swann et Taylor (1995) (Figure 36) a décrit au sein des Hyménomycètes deux sous-classes : les Tremellomycetidae contenant notamment les Trémellales et les Filobasidiales et les Hymenomycetidae contenant les Homobasidiomycètes et certains Hétérobasidiomycètes : les Auriculariales, les Dacrymycetales et *Thanatephorus cucumeris* (Ceratobasidiales). Les résultats de ces travaux ont permis de réfuter l'hypothèse de Patouillard (1900) qui se basait uniquement sur les caractères microscopiques des basides ainsi que le mode de germination des basidiospores pour diviser les Agaricomycotina (anciennement Hyménomycètes) en deux classes : les Hétérobasidiomycètes et les Homobasidiomycètes (Figure 37).

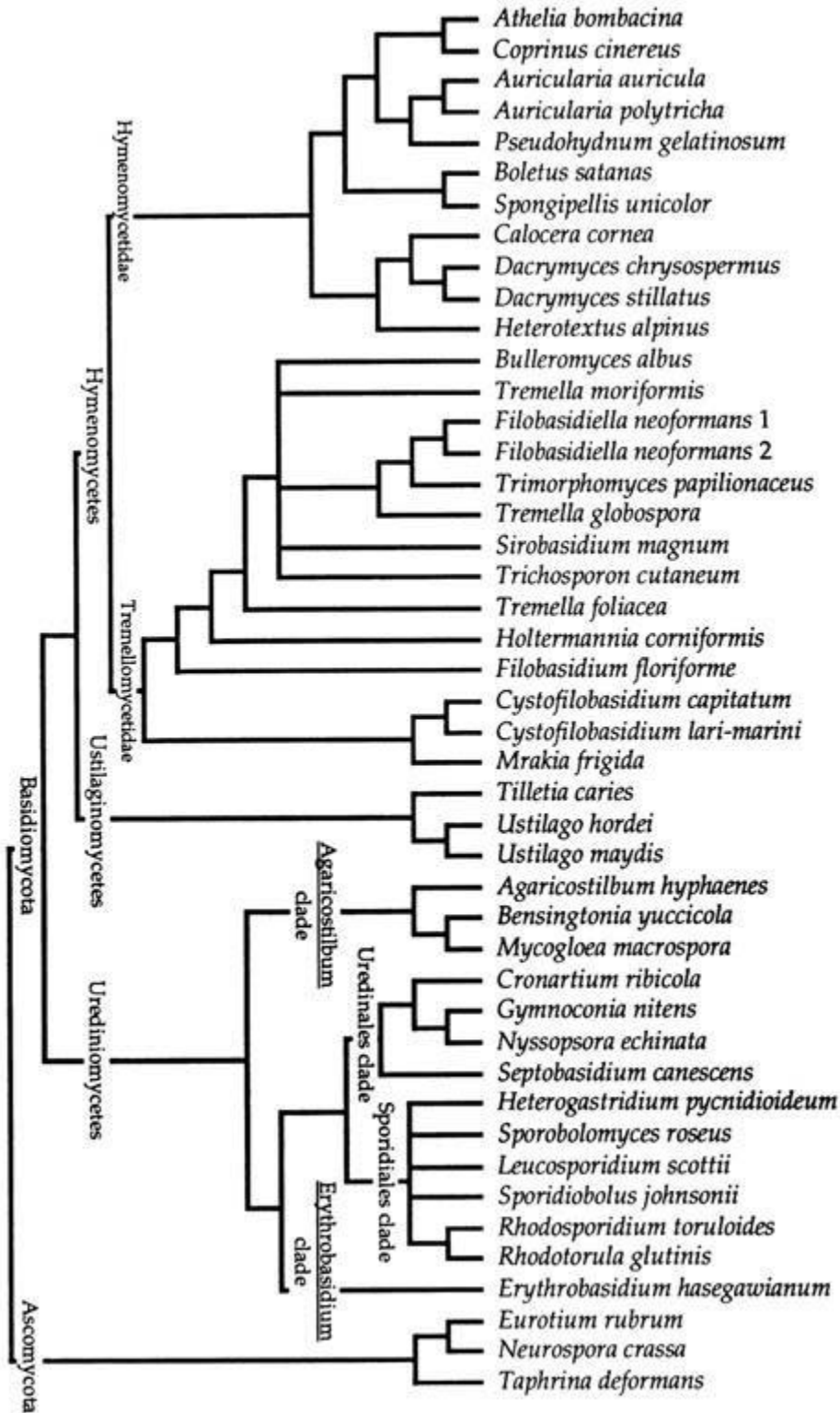
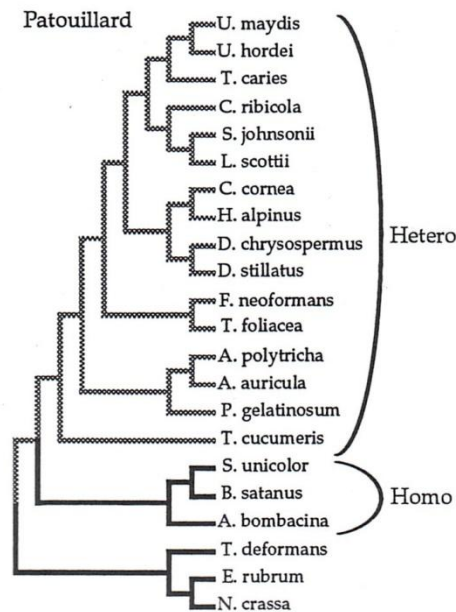


Figure 36: Phylogénie des Basidiomycota (par la méthode de parcimonie) basée sur l'analyse de l'ARNr 18S (Swann et Taylor, 1995).



**Figure 37: Phylogénie des Basidiomycota selon Patouillard (1900)**

Bien que la classification de Swann et Taylor (1995) fût basée uniquement sur un petit nombre de taxons (54 taxons) et sur un seul locus (ARNr 18S), elle a néanmoins été adoptée par les systématiciens et elle s'est avérée remarquablement durable. Cependant, le choix du nom « Hyménomycètes » n'était pas idéal car ce terme était déjà utilisé par Fries (1874) pour désigner tous les champignons du phylum des Basidiomycota qui produisent leurs spores grâce à un hyménium externe non protégé (par opposition aux Gastéromycètes à hyménium interne). C'est pour cette raison, que dans l'ouvrage *Dictionnaire of the fungi 9th ed.* (Kirk et al, 2001), le groupe des Hyménomycètes a été renommé « Basidiomycètes ». Cependant, ce terme portait toujours à confusion car "Basidiomycètes" est le terme général pour désigner tous les champignons produisant des basidiospores. Finalement, dans la classification AFTOL, utilisée actuellement, il a été décidé de les intituler « Agaricomycotina » pour éviter ainsi toute confusion possible. Ainsi, les Hyménomycètes ont été nommés, Basidiomycètes, puis définitivement **Agaricomycotina**, les Urédiniomycètes sont appelés les **Pucciniomycotina** et les **Ustilaginomycotina** conservent leur appellation.

Bien que la classification de Swann et Taylor (1995) ait été adoptée, les termes classiques d'Hétérobasidiomycètes et d'Homobasidiomycètes ont continué à être utilisés (McLaughlin et al, 2001b). Des travaux distincts, sur les Hétérobasidiomycètes (Wells et Bandoni, 2001) et sur les Homobasidiomycètes (Hibbett et al, 1997, Hibbett et Thorn, 2001), ont été effectués.

Wells et Bandoni en 2001 ont montré que les Hétérobasidiomycètes étaient divisés en deux sous-classes : (i) les Tremellomycetidae contenant les Tremellales, les Filobasidiales et les Christianseniales, et (ii) les Heterobasidiomycetidae comprenant les Auriculariales, les Ceratobasidiales, les Dacrymycetales et les Tulasnellales (Tableau 5).

Dans le même temps, Hibbett et Thorn (2001), en se basant, uniquement sur les Homobasidiomycètes (Hyménomycètes sensu Swann et Taylor 1995), ont reconnu huit clades majeurs chez les Homobasidiomycètes (Tableau 5), dans un premier temps nommés avec des noms informels: « Euagarics clade », « Russuloid clade », « Polyporoid clade », « Bolete clade », « Gomphoid-phalloid clade », « Cantharelloid clade », « Hymenochaetoid clade » et le « Theleporoid clade ». Les relations phylogénétiques des huit clades sont représentées sur la Figure 38.

**Tableau 5: Classification des Hétérobasidiomycètes et Homobasidiomycètes**

<b>Swann et Taylor 1995</b>	<b>Wells et Bandoni 2001 (excluant les Homobasidiomycetes)</b>	<b>Hibbett et Thorn 2001 (excluant la plupart des Hétérobasidiomycetes)</b>
HYMENOMYCETES	HETEROBASIDIOMYCETES	HOMOBASIDIOMYCETES
Tremellomycetidae	Heterobasidiomycetidae	Euagarics clade
Tremellales	Auriculariales	Bolete clade
Filobasidiales	Ceratobasidiales	Cantharelloid clade
<i>Trichosporon</i>	Dacrymycetales	Gomphoid-phalloid clade
Hymenomycetidae	Tulasnellales	Hymenochaetoid clade
Auriculariales	Tremellomycetidae	Polyporoid clade
Dacrymycetales	Tremellales	Russuloid clade
<i>Thanatephorus</i>	Christianseniales	Theleporoid clade
Homobasidiomycetes	Filobasidiales	<i>Gloeophyllum</i>

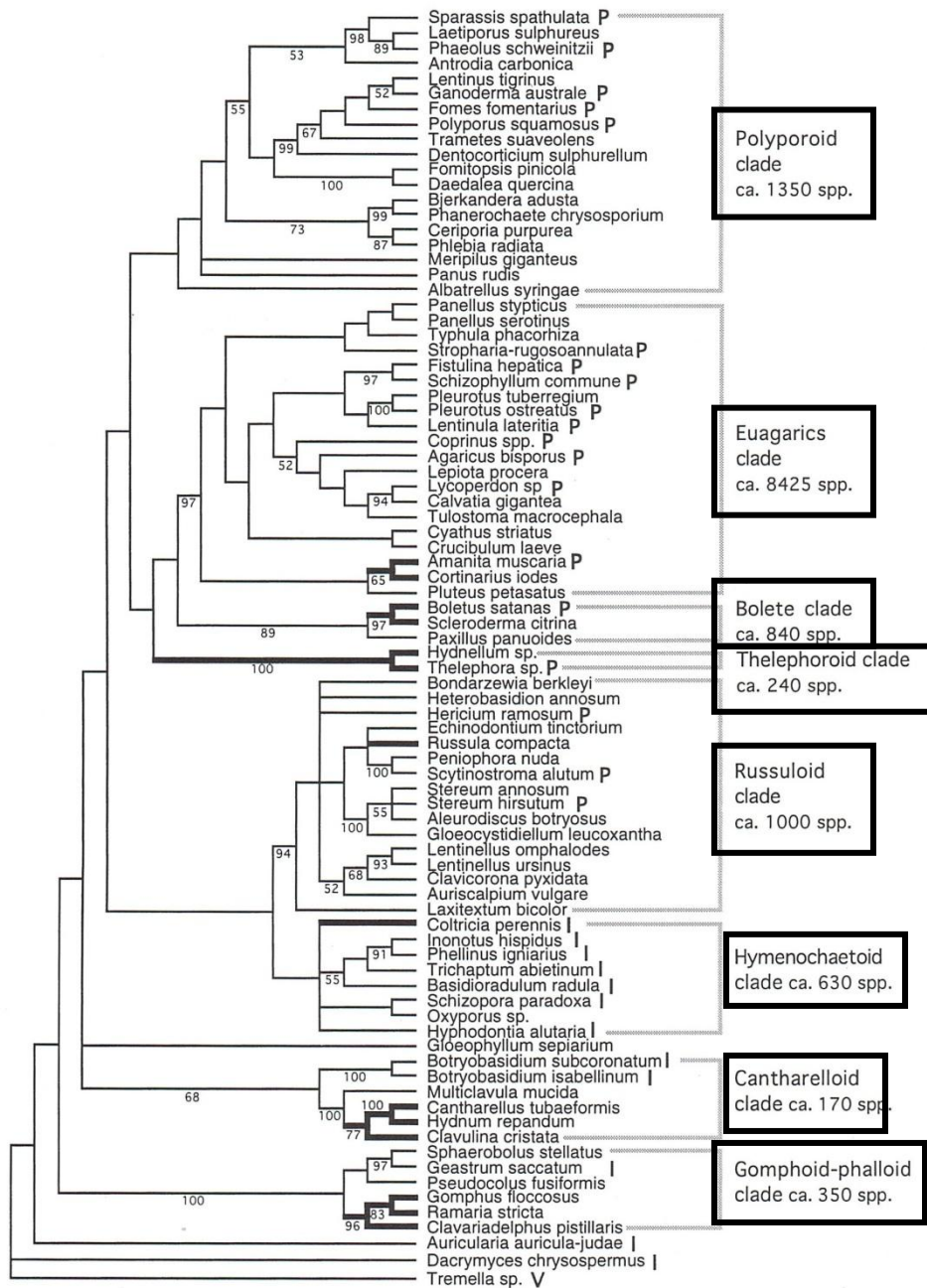


Figure 38: Phylogénie des Homobasidiomycètes avec les 8 "clades" majeurs (Hibbett et al, 1997).

Kirck et al (2001) reprennent dans l'ouvrage *Dictionnaire of the fungi 9th éd.*, les travaux de Hibbett et Thorn (2001) sur les Homobasidiomycètes ainsi que ceux de Wells et Bandoni (2001) sur les Hétérobasidiomycètes pour les compiler et proposer un nouveau niveau de classification. Les « Basidiomycètes » (anciennement Hyménomycètes) ont ainsi été divisés en deux sous-classes : (i) d'une part les Tremellomycetidae, contenant les Hétérobasidiomycètes avec les sept ordres d'Hétérobasidiomycetes proposés par Wells et Bandoni en 2001, plus un ordre: les Cystofilobasidiales et (ii) d'autre part, les

Agaricomycetidae, contenant les huit ordres d'Homobasidiomycètes tels que définis par Hibbett et Thorn (2001) (Tableau 5).

Par la suite, une restructuration de la classification des Agaricomycotina (anciennement Basidiomycètes) a été réalisée (Moncalvo et al, 2002; Hibbett et Binder, 2002; Weiss et al, 2004) et montre que ce groupe est constitué de trois classes : les Tremellomycètes, les Dacrymycètes et les Agaricomycètes (Tableau 6). De plus, cinq nouveaux ordres indépendants qui n'étaient pas reconnus auparavant dans le groupe des Agaricomycotina ont été mis en évidence (Larsson et al, 2004, Binder et al, 2005). Il s'agit des Sebaciales (qui étaient classés dans le groupe d'Hétérobasidiomycètes) ainsi que quatre ordres: Athéliales (anciennement "Atheliod clade" sensu Jülich 1981), Corticiales (regroupant les Vuilleminiales sensu Boidin 1998 et le "corticoid clade"), Gloeophyllales et Trechisporales (regroupant les Hydnodontales selon Jülich 1981 et le "trechisporoid clade"), ordres appartenant au groupe d'Homobasidiomycètes.

Face aux évolutions majeures de la classification, les noms informels des huit clades d'Hyménomycètes donnés par Hibbett et Thorn (en 2001), ont été rebaptisés par des noms taxonomiques formels reconnus par la communauté scientifique. Ainsi, l'appellation retenue à l'heure actuelle pour ces huit clades est la suivante: Agaricales, Boletales, Cantharellales, Hymenochaetales, Phallales, Polyporales, Russulales et les Thelephorales (Tableau 6).

**Tableau 6: Evolution de la phylogénie moléculaire des champignons de 2001 à 2007**

<i>Dictionary of the fungi 9th ed. (2001)</i>	<b>Hibbett et al, 2007 AFTOL</b>
<b>BASIDIOMYCETES</b>	<b>AGARICOMYCOTINA</b>
<b>Tremellomycetidae</b>	<b>Tremellomycetes</b>
Auriculariales	Cystofilobasidiales
Ceratobasidiales	Filobasidiales
Christianseniales	Tremellales
Cystofilobasidiales	<b>Dacrymycetes</b>
Dacrymycetales	Dacrymycetales
Filobasidiales	<b>Agaricomycetes</b>
Tremellales	Sous classe des Agaricomycetidae
Tulasnellales	Agaricales
<b>Agaricomycetidae</b>	Atheliales
Agaricales	Boletales
Boletales	Sous classe des Phallomycetidae
Cantharellales	Geastrales
Hymenochaetales	Gomphales
Phallales	Hysterangiales
Polyporales	Phallales
Russulales	Agaricomycetes incertains
Thelephorales	Auriculariales
	Cantharellales
	Corticiales
	Gloeophyllales
	Hymenochaetales
	Polyporales
	Russulales
	Sebacinales
	Thelephorales
	Trechisporales

De nombreux travaux (Matheny et Bougher, 2006; Matheny et al, 2007; Hibbett et al, 2007) ont confirmé la répartition des espèces appartenant aux Agaricomycotina en 3 classes: les Agaricomycètes, les Dacrymycètes et les Tremellomycètes et ont montré que ce groupe est constitué de 21 ordres dont 17 sont classés chez les Agaricomycètes.

Les études multigéniques de Matheny et al en 2007, utilisant les gènes *rpb2*, *tef1* et l'ARN ribosomique nucléaires 18S, 25S et 5.8S sur 146 espèces, dont 125 d'Agaricomycotina, ont permis de confirmer la position phylogénétique de 16 des 21 ordres d'Agaricomycotina. Le classement des ordres des Cystofilobasidiales, Filobasidiales, Geastrales, Gloeophyllales et Hysterangiales, n'a été possible que grâce aux études de Hibbett et Donoghue, 2001; Lutzoni et al, 2004; Hosaka et al, 2006. Les résultats de ces différents travaux ont abouti à l'arbre phylogénétique indiqué sur la Figure 39.



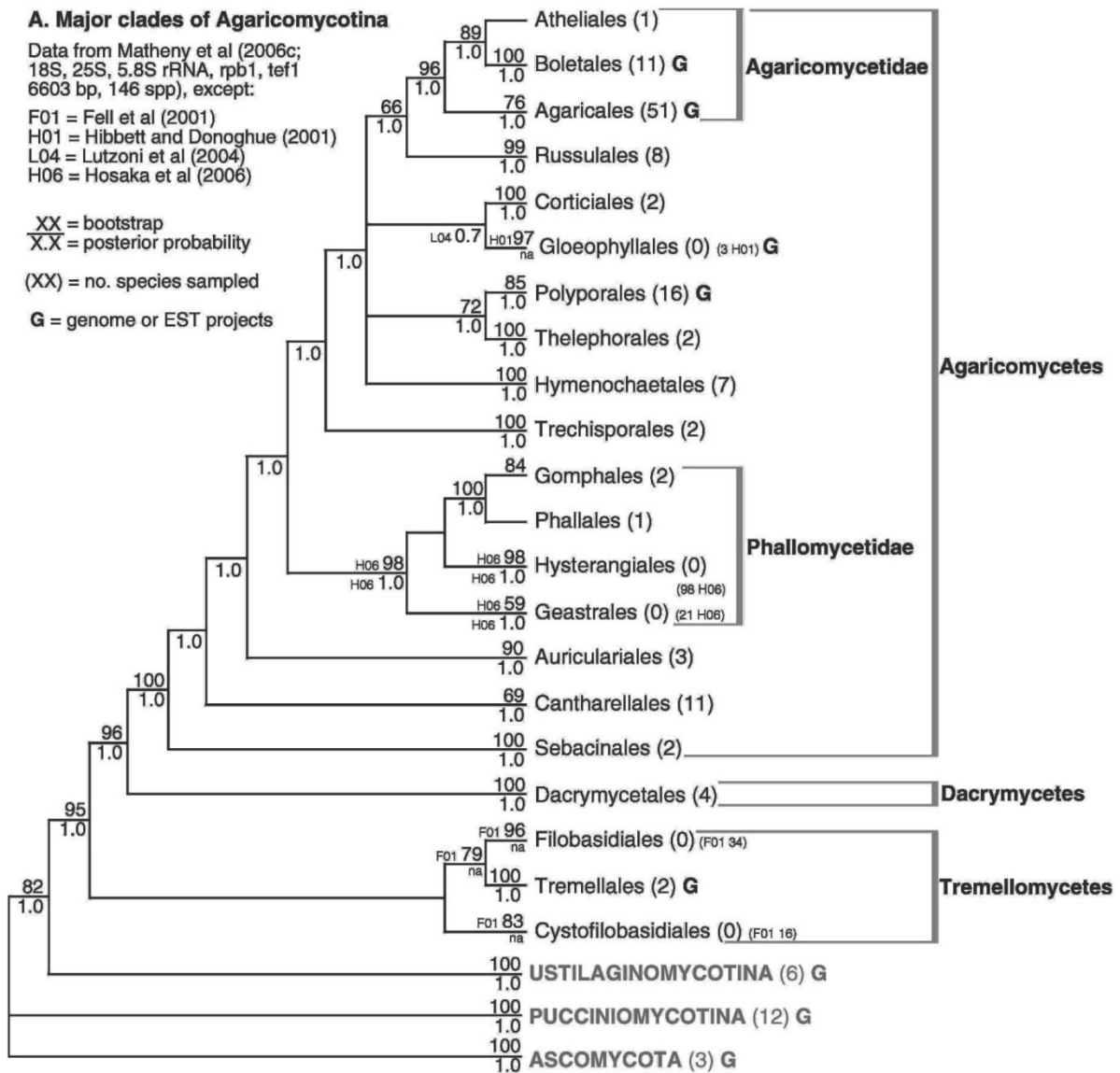


Figure 39: Arbre phylogénétique des Agaricomycotina (Matheny et al, 2007)

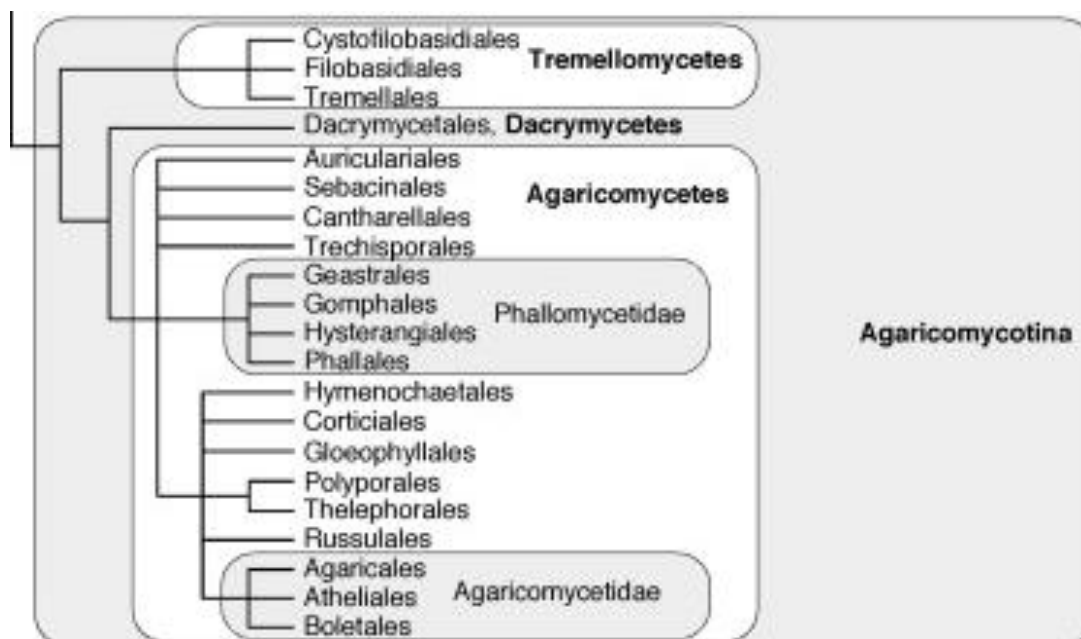
## 2.2. Phylogénie des Agaricomycetidae

Les Agaricomycetidae constituent une des trois sous-classes des Agaricomycètes. En effet, la classe des Agaricomycètes est définie comme constituée des Agaricomycetidae, des Phallomycetidae et une troisième sous-classe nommée Agaricomycètes incertains dont on ne connaît pas encore les relations phylogénétiques précises avec les deux sous-classes précédentes (Binder et al, 2005; Matheny et al, 2007).

Les Agaricomycètes incertains regroupent 10 ordres indépendants: les Auriculariales, Cantharellales, Corticiales, Gloeophyllales, Hymenochaetales, Polyporales, Russulales, Sebacinales, Thelephorales, et les Trechisporales (Figure 40).

Quatre ordres: Geastrales, Gomphales, Hysterangiales, et Phallales, composent la sous-classe des Phallomycetidea (Binder et al, 2007).

La sous-classe des Agaricomycetidae regroupe trois ordres : Agaricales, Boletales, et Atheliales (Matheny et Bougher, 2006; Matheny et al, 2007) (Figure 40) et plus récemment Binder et al (2010) y ont ajouté les ordres des Amylocorticiales et des Jaapiales.



**Figure 40: Phylogénie des Agaricomycetes (Hibbett et al, 2007).**

L'ordre des Agaricales est un groupe monophylétique (Binder et Hibbett, 2002), d'environ 9000 espèces de champignons, comprenant plus de 300 genres et 26 familles (Kirk et al, 2001). Il constitue le plus grand groupe des Agaricomycetidae et regroupe la quasi-totalité des champignons comestibles. Les travaux de Matheny et Bougher (2006), utilisant six marqueurs moléculaires: rpb1, rpb-intron2, rpb2, l'ARNr 18S, 25S et 5.8S, ont permis de diviser l'ordre des Agaricales en six sous-groupes principaux: les Agaricoid, les Tricholomatoid, les Marasmioid, les Pluteoid, les Hygrophoroid et les Plicaturopsidoid. Ensuite, les travaux de Binder et al (2010), sur les gènes nuc-SSU, nuc-LSU, 5.8S, rpb1, rpb2 et tef1, ont permis de restructurer l'ordre des Agaricales. Les cinq premiers sous-groupes de Matheny et al (2007) ont été conservés, mais le groupe anciennement dénommé "plicaturopsidoid clade" a été scindé pour laisser apparaître l'ordre des Amylocorticiales ainsi

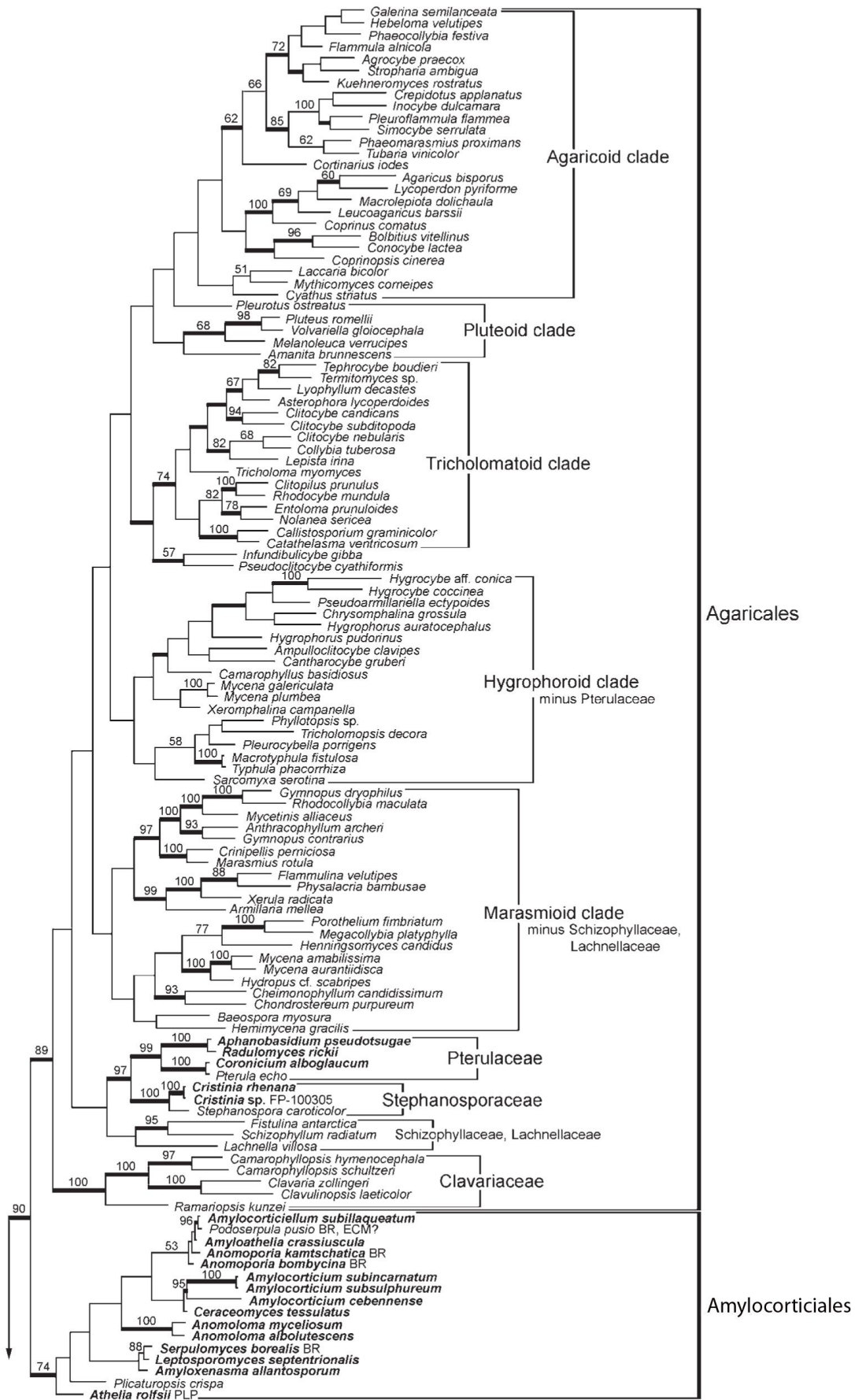
que trois familles indépendantes non incluses dans un sous-groupe: les Pterulaceae, les Stephanosporaceae et les Clavariaceae. L'ordre des Agaricales est détaillé dans l'arbre des Agaricomycetidae ci-après (Figure 41).

L'ordre des Boletales est composé de cinq sous-ordres: les Boletineae, Sclerodermatineae, Suillineae, Coniophorineae et Tapinellineae.

L'ordre des Atheliales comprend 22 genres et 106 espèces (Kirck et al, 2008).

Cette classification moléculaire des Agaricomycetidae est celle retenue par AFTOL.

AFTOL (Assembling the Fungal Tree Of Life) est un projet international fondé en 2002, ayant pour but de retracer la phylogénie du règne fongique. Il regroupe une cinquantaine de coauteurs et une importante contribution de systématiciens, avec plus de 20 pays, qui ont travaillé sur six gènes (5 100 séquences). La dernière version d'AFTOL a été publiée en mai 2007 dans *Mycological Research, A higher-level phylogenetic classification of the Fungi* (vol. 111, p. 509-547) (Hibbett et al, 2007).



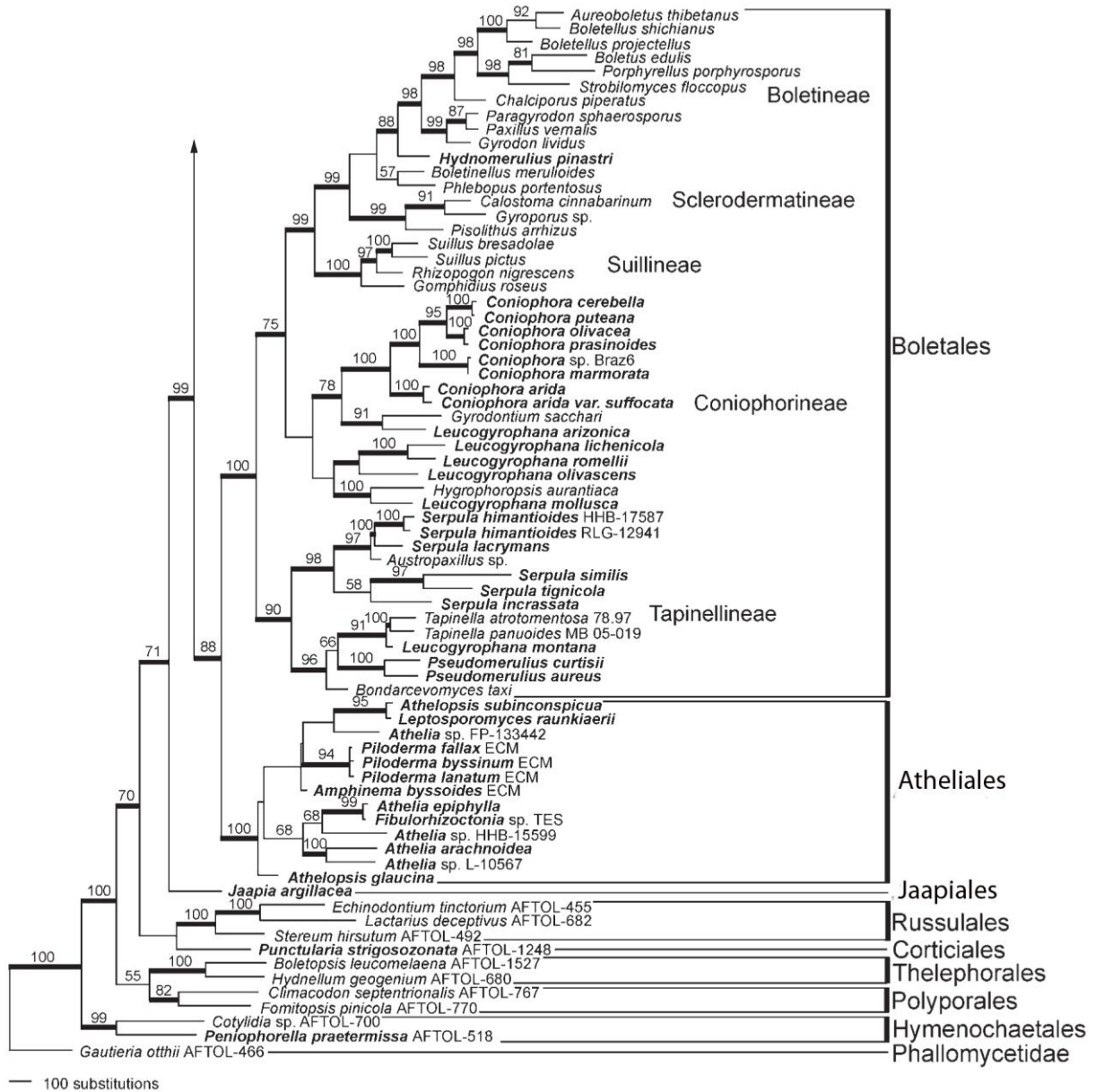


Figure 41: Phylogénie des Agaricomycetidae (Binder et al, 2010)

# **DISCUSSION GENERALE**

# 1. Comparaison des deux types de classification

Les travaux de cette thèse concernent l'étude comparative des classifications systématique et moléculaire des Agaricomycetidae regroupant la plupart des champignons comestibles. Nous avons basé notre étude sur la classification définie par Pierre Roux concernant l'approche systématique dans son ouvrage, Mille et un champignons, (éd. Roux, 2006, 1125p) et celle définie par les travaux de Hibbett et al (2007) et Binder et al (2010) pour la classification moléculaire.

Tout d'abord, rappelons qu'au sein des Agaricomycotina (Tableau 7), la classification moléculaire se compose des classes des Agaricomycetidae, Phallomycetidae et Agaricomycetidae incertains. En systématique, les Agaricomycotina ne sont constitués que par les champignons appartenant à la classe des Agaricomycetidae. Les espèces regroupées dans les classes des Phallomycetidae et des Agaricomycetidae incertains sont classées en systématique comme appartenant aux Aphylophoromycetidae (hyménophore non lamellé, carpophore généralement nu et dépourvu de voile générale, souvent de consistance dure et coriace), Gasteromycetidae (groupe peu homogène dont la fructification est de forme plus ou moins globuleuse sans pied différencié, non lamellé) et Phragmobasidiomycètes (basides cloisonnées longitudinalement pour les Auriculariales et transversalement pour les Tremellales) (Tableau 7).

La comparaison de ces deux classifications au sein des Agaricomycetidae a permis de mettre en évidence deux grandes divergences.

La première divergence concerne l'organisation des Agaricomycetidae. La classification systématique définit six ordres au sein de cette classe: les Agaricales, Boletales, Cortinariales, Entolomatales, Russulales et les Tricholomatales. D'un point de vue moléculaire, la classe des Agaricomycetidae ne comporte plus que cinq ordres parmi lesquels les Agaricales et les Boletales. Les trois autres ordres, Atheliales, Jaapiales et Amylocorticiales n'existent pas en systématique. Une restructuration importante des espèces fongiques appartenant aux ordres des Russulales, Cortinariales, Entolomatales et les Tricholomatales a été mise en évidence par l'approche moléculaire.

Tout d'abord, les Russulales ne semblent pas avoir de proximité phylogénétique avec les champignons de la classe des Agaricomycetidae et ils ont été regroupés dans une autre classe, celle des Agaricomycètes incertains (Tableau 7). Ensuite, les ordres des Cortinariales, Entolomatales et Tricholomatales n'existent plus dans la classification moléculaire ; les espèces appartenant à ces ordres ont été réparties au sein de l'ordre des Agaricales. Plus précisément, les quatre familles constituant l'ordre des Cortinariales (Bolbitiaceae, Crepidotaceae, Cortinariaceae et Strophariaceae), les six familles constituant l'ordre des Tricholomatales (Hygrophoraceae, Pleurotaceae, Tricholomataceae, Marasmiaceae, Mycenaceae et Dermolomataceae) et les familles de Macrocystidiaceae et Entolomataceae de l'ordre des Entolomatales se retrouvent dans l'ordre des Agaricales.



Tableau 7: Classifications des Agaricomycotina

Classification systématique	Classification moléculaire
Agaricomycotina	
<b>Classe Agaricomycetidae</b>	<b>Classe Agaricomycetidae</b>
<b>Agaricales</b> Amanitaceae Lepiotaceae Pluteaceae Agaricaceae Coprinaceae	→ <b>Agaricales (32 familles au total)</b>
<b>Cortinariales</b> Bolbitiaceae Crepidotaceae Cortinariaceae Strophariaceae	→
<b>Entolomatales</b> Macrocystidiaceae Entolomataceae	→
<b>Tricholomatales</b> Hygrophoraceae Pleurotaceae Tricholomataceae Marasmiaceae Mycenaceae Dermolomataceae	→
<b>Boletales</b> Omphalotaceae Boletaceae Paxillaceae Gomphidiaceae Hygrophoropsidaceae	<b>Boletales (+ 18 autres familles):</b>  Boletaceae Paxillaceae Gomphidiaceae Hygrophoropsidaceae
<b>Russulales</b>	<b>Atheliales</b> <b>Amylocorticiales</b> <b>Jaapiales</b>
<b>Classe Aphylophoromycetidae</b>	<b>Classe Agaricomycetes incertains</b>
<b>Classe Gasteromycetidae</b>	Russulales Auriculariales Cantharellales Corticiales Gloeophyllales Hymenochaetales Polyporales Sebacinales Thelephorales Trechisporales
<b>Classe Phragmobasidiomycetes</b>	
	<b>Classe Phallomycetidae</b> Geastrales Gomphales Hysterangiales Phallales

Le deuxième niveau de divergence concerne l'organisation des ordres des Agaricales et Boletales.

En ce qui concerne les Agaricales, la classification systématique regroupe au sein de cet ordre cinq familles: Amanitaceae, Lepiotaceae, Pluteaceae, Agaricaceae et Coprinaceae. Toutes ces familles possèdent des caractéristiques morphologiques communes, c'est-à-dire des basides non cloisonnées, un hyménium à lames, une chaire fibreuse à cassure franche et des lames libres (généralement, pied et chapeau séparables). Par l'approche moléculaire, l'ordre des Agaricales regroupe la plupart des champignons à lamelles comprenant en plus des cinq familles précédentes, 27 autres familles réparties dans d'autres ordres définis en systématique. Ainsi, les Agaricales constituent un ordre très hétérogène constitué de plus de 80% des Agaricomycetidae.

La systématique regroupe au sein de l'ordre des Boletales cinq familles: Boletaceae, Paxillaceae, Gomphidiaceae, Hygrophoropsidaceae et Omphalotaceae. Par l'approche moléculaire, cet ordre, regroupe quatre des cinq familles précédentes plus 18 autres familles (Tableau 8). La famille des Omphalotaceae a été reclassée dans l'ordre des Agaricales.

**Tableau 8: Comparaison des classifications de l'ordre des Boletales**

<b>Classification systématique</b>	<b>Classification moléculaire</b>
<b>Ordre des Boletales</b>	<b>Ordre des Boletales</b>
<b>(1) Famille des Boletaceae</b>	Sous-ordre Boletineae
<i>Gyroporus</i>	<b>(1) Boletaceae</b>
<i>Boletus</i>	Diplocystaceae
<i>Boletinus</i>	Leucogastraceae
<i>Suillus</i>	Sous-ordre Coniophorineae
<i>Chalciporus</i>	Coniophoraceae
<i>Xerocomus</i>	<b>(4) Hygrophoropsidaceae</b>
<i>Leccinum</i>	Serpulaceae
<i>Tylopilus</i>	Gastrosporiaceae
<i>Porphyrellus</i>	Melanogastraceae
<i>Strobilomyces</i>	Sous-ordre Paxillineae
<i>Phylloporus</i>	Gyrodontaceae
<i>Gyrodon</i>	<b>(2) Paxillaceae</b>
<i>Uchwaldoboletus</i>	Sous-ordre Sclerodermatineae
<i>Aureoboletus</i>	Astraeaceae
<b>(2) Famille Paxillaceae</b>	Boletinellaceae
<i>Paxillus</i>	Calostomataceae
<b>(3) Famille Gomphidiaceae</b>	Gyroporaceae
<i>Gomphidus</i> ,	Pisolithaceae
<i>Chroogomphus</i>	Sclerodermataceae
<b>(4) Famille Hygrophoropsidaceae</b>	Stephanosporaceae
<i>Hygrophoropsis</i>	Sous-ordre Suillineae
<b>(5) Famille Omphalotaceae</b>	<b>(3) Gomphidiaceae</b>
<i>Omphalotus</i>	Rhizopogonaceae
	Suillaceae
	Truncocolumellaceae
	Sous-ordre Tapinellineae
	Tapinellaceae

## **2. Avantages et limites des approches**

### **2.1. Approche systématique**

La classification systématique permet une identification des espèces qui se base sur des éléments phénotypiques rapidement remarquables qui sont très souvent homogènes au sein d'un groupe phylogénétique. Cependant, les caractères morpho-anatomiques des champignons sont évolutifs, permettant aux champignons de s'adapter aux contraintes écologiques et environnementales auxquelles ils sont soumis (géographie, nature du sol...). Les champignons possèdent donc un haut degré de polymorphisme et d'adaptabilité. Ainsi, le phénotype de deux individus d'une même espèce peut varier énormément. De plus, la convergence de certains caractères morphologiques peut parfois rapprocher des organismes d'origine évolutive différente, tandis qu'elle peut séparer des espèces proches. Dans ce cas, l'utilisation seule des critères morphologiques peut rendre l'identification incertaine, pouvant avoir des conséquences importantes dans le domaine de la toxicologie alimentaire.

La systématique permet de donner un nom de genre avec précision, mais les confusions se font généralement au niveau des espèces. De plus, le classement systématique ne prend en compte aucun caractère évolutif et n'aborde pas les liens de parenté entre espèces, ni l'appartenance phylogénétique.

La classification systématique est remaniée par l'arrivée des techniques moléculaires qui reclassent les espèces, non plus sur les critères d'identifications incontournables, mais sur les bases d'une appartenance phylogénétique. Ainsi, au sein des Agaricales, on retrouve maintenant des champignons à sporée rouille (Cortinariales), ou à pied et chapeau non séparable (Tricholomatales).

### **2.2. Approche moléculaire**

Contrastant avec la classification systématique, la phylogénie moléculaire permet de retracer l'évolution des espèces fongiques. Elle est basée sur des séquences génétiques qui subissent des fortes contraintes fonctionnelles.

Cependant, en raison de l'évolution différente des marqueurs moléculaires, les arbres phylogénétiques obtenus peuvent être le seul reflet de l'évolution des marqueurs et non pas forcément de la phylogénie de l'espèce. Par exemple, les études monogéniques utilisant deux

marqueurs différents (mt-SSU et mt-LSU) pour un même groupe d'espèces ne donnent pas la même phylogénie car chaque marqueur évolue distinctement dans le temps. Les résultats de différentes études phylogéniques mettent en évidence l'importance d'avoir une approche multi-génique qui combine plusieurs types de marqueurs moléculaires.

En tenant compte uniquement de liens de parenté entre les espèces ou les groupes phylogénétiques, l'approche moléculaire rassemble dans un seul groupe phylogénétique des espèces possédant des caractères morpho-anatomiques distincts. En revanche, la distinction entre des espèces proches morphologiquement est aisée.

De nombreuses applications découlent des méthodes moléculaires, en particulier l'identification précise des espèces, l'étude de leur biodiversité, en alimentant les bases de données avec de nouvelles séquences fongiques. Mais ces études sont en partie précédées d'une étape d'identification systématique de l'échantillon que l'on étudie.

L'approche moléculaire va permettre de conforter une identification systématique douteuse par comparaison avec les séquences déjà disponibles dans les bases de données. Cette identification moléculaire sera par conséquent dépendante des bases de données, en particulier des séquences disponibles et de leur exactitude (séquences d'espèces non identifiées: "uncultured fungi").

Ainsi, les deux approches sont complémentaires: l'approche moléculaire permet de confirmer une identification et de retracer la phylogénie exacte des champignons, quant à la systématique, elle permet aisément, à partir d'un échantillon visuel, d'identifier son groupe phylogénétique d'appartenance.

### **3. Applications: méthodes moléculaires dans l'identification d'espèces de champignons**

Une des applications des méthodes moléculaires est utilisée au cours de cette thèse pour identifier trois groupes de champignons. A l'intérieur de chaque groupe, nous avons utilisé des espèces qui sont proches morphologiquement et dont l'identification morphologique peut être ambiguë.

Nous avons utilisé pour nos analyses, un total de dix spécimens de champignons, cinq souches de *Tricholoma*, deux souches de *Lepista*, un *Clitocybe* et deux *Amanita*.




Afin de pouvoir réaliser les identifications moléculaires, l'ADN de chaque souche a été extrait. Deux marqueurs moléculaires ont été amplifiés par PCR. Il s'agit d'ITS (nucléaire)

et de V9 (mitochondrial). Les produits de PCR ont été séquencés, puis les séquences ont été comparées deux par deux pour mettre en évidence les mutations ponctuelles ou insertions/délétions pouvant les distinguer.

### 3.1. *Tricholoma equestre* (n°354) / *Tricholoma frondosae* (n°110936) / *Tricholoma auratum* (n° 2000-00-3516, souche 1: n°91-11-139, souche 2: n°97-11-2992)

L'espèce *T. equestre* est un champignon toxique entraînant un syndrome de rhabdomyolyses (douleurs et raideurs musculaires, sueurs, arythmies) pouvant être mortel (trois décès répertoriés en 2001). Cependant, il existe une espèce auparavant considérée comme "comestible", *T. auratum*, qui est morphologiquement très proche de *T. equestre* (Tableau 9), rendant leur distinction délicate. Une troisième espèce, *T. frondosae* qui pousse souvent sous les peupliers, est aussi un sosie élancé et à petites spores de *T. equestre*.

Tableau 9: Critères de différenciation systématique des *Tricholoma*

<i>Tricholoma equestre</i>	<i>Tricholoma frondosae</i>	<i>Tricholoma auratum</i>
<p><b>Chapeau:</b> jaune à olivâtre, se colorant en roux quand exposé au soleil, mèches brunes roussâtres vers le centre</p> <p><b>Lames:</b> échancrées assez serrées, jaune vif</p> <p><b>Pied:</b> jaune, parfois des mèches comme sur le chapeau</p> <p><b>Chair:</b> blanche avec des teintes jaunes plus vives dans le pied, saveur farineuse</p> <p><b>Odeur:</b> farineuse</p> <p><b>Habitat:</b> sous les pins, sol sablonneux et peu calcaire</p> <p><b>Spores:</b> ellipsoïdes et lisses</p>	<p><b>Chapeau:</b> Chapeau squameux et de couleur jaune à roussâtre</p> <p><b>Lames:</b> échancrées assez serrées, jaunes</p> <p><b>Pied:</b> jaune, parfois des mèches comme sur le chapeau</p> <p><b>Chair:</b> blanche un peu jaune</p> <p><b>Odeur:</b> farineuse</p> <p><b>Habitat:</b> sous les peupliers</p> <p><b>Spores:</b> ellipsoïdes et lisses (plus petites, ne dépassant pas 6.5 µm de long)</p>	<p><b>Chapeau:</b> roussâtre ou orangé, à peine squamuleux vers l'extérieur, jaune plus vif.</p> <p><b>Lames:</b> échancrées, peu serrées, jaune soufre</p> <p><b>Pied:</b> trapu, blanchâtre ou à base jaune</p> <p><b>Chair:</b> jaune pâle ou plus vif à l'extérieur, saveur de noisette</p> <p><b>Odeur:</b> fongique</p> <p><b>Habitat:</b> sous les pins, sol sablonneux et peu calcaire</p> <p><b>Spores:</b> ellipsoïdes et lisses</p>
 <p>(Photo: Roux)</p>	 <p>(Photo: Borgarino)</p>	 <p>(Photo: Roux)</p>

<i>T. auratum</i> b	TTGAGGG--AACTGCCGCAAG-ATTATCACT-TTAAACAAGGAATAC
<i>T. frondosae</i>	TTGAGGG--AACTGCCGCAAG-ATTATCACT-TTAAACAAGGAATAC
<i>T. auratum</i> s1	TTGAGGG-AACTCGCCGCAAG-ATTATCACT-TTAAACAAGGAATAC
<i>T. auratum</i> s2	TTGAGTATGAGCTGCCGCAAGCATTATCACTCTTAGCACAGGAATAC
<i>T. auratum</i> b	TTCATTTAATAATATCAATTTTGAAATATAATTATATTATAATATTTAAATTAAGTC
<i>T. frondosae</i>	TTCATTTAATAATATCAATTTTGAAATATAATTATATTATAATATTTAAATTAAGTC
<i>T. auratum</i> s1	TTCATTTAATAATATCAATTTTGAAATATAATTATATTATAATATTTAAATTAAGTA
<i>T. auratum</i> s2	TTCATTTAATAATATCAATTTTGAAATATAATTATATTATAATATTTAAATTAAGTA
<i>T. auratum</i> b	TTAATTATATTTAATTTAATAGTAGTTTGTATGCTAATATTAATAACAATAGTTTAA
<i>T. frondosae</i>	TTAATTATATTTAATTTAATAGTAGTTTGTATGCTAATATTAATAACAATAGTTTAA
<i>T. auratum</i> s1	TTAATTATATTTAATTTAATAGTAGTTTGTATGCTAATATTAATAACAATAGTTTAA
<i>T. auratum</i> s2	TTAATTATATTTAATTTAATAGTAGTTTGTATGCTAATATTAATAACAATAGTTTAA
<i>T. auratum</i> b	TATTGTAATTAGTCTTTTATAATAAAACACTTTTGTTAAGCTAATTAGTTTCAGTTAACT
<i>T. frondosae</i>	TATTGTAATTAGTCTTTTATAATAAAACACTTTTGTTAAGCTAATTAGTTTCAGTTAACT
<i>T. auratum</i> s1	TATTGTAATTAGTCTTTTATAATAAAACACTTTTGTTAAGCTAATTAGTTTCAGTTAACT
<i>T. auratum</i> s2	TATTGTAATTAGTCTTTTATAATAAAACACTTTTGTTAAGCTAATTAGTTTCAGTTAACT
<i>T. auratum</i> b	CATTTAAATAACATCTCAAAAGTCATAGCAAGGTAGCTGGTACTGGAAA
<i>T. frondosae</i>	CATTTAAATAACATCTCAAAAGTCATAGCAAGGTAGCTGGTACTGGAAA
<i>T. auratum</i> s1	CATTTAAATAACATCTCAAAAGTCATAGCAAGGTAGCTGGTACTGGAAA
<i>T. auratum</i> s2	CATTTAAATAACATCTCAAAAGTCATAGCAAGGTAGCTGGTACTGGAAA

**Figure 42: Alignement des séquences V9. En vert apparaissent les mutations ponctuelles et en rouge les zones de délétion. "T. auratum b" correspond à la souche *Tricholoma auratum* à pied blanc**

L'alignement de la région V9 se fait ici sur 277 nucléotides, on observe six zones de délétions (Figure 42) allant de un à deux nucléotides et neuf zones de mutations ponctuelles.

Le Tableau 10, montre que *T. auratum* (souche 1: n°91-11-1390) ne diffère que de 2 nucléotides avec *T. frondosae* mais de quatre nucléotides avec *T. auratum* (souche 2: n°97-11-2992). Par contre, *T. auratum* à pied blanc (n° 2000-00-3516), diffère nettement des trois autres *Tricholoma*. Lors de nos manipulations, nous n'avons pas pu obtenir la séquence V9 pour *T. equestre* (n°354), afin de la comparer aux autres espèces.

Ensuite, nous avons effectué la phylogénie avec le gène V9 pour les quatre *Tricholoma* (Figure 43). On peut observer que les deux souches, s1 et s2 sont bien deux espèces proches et similaires, alors que *T. frondosae* (n°110936) serait une autre espèce proche de *T. auratum* à pied blanc.

Tableau 10: Différences (en nombre de nucléotides) pour la séquence V9 de *T. auratum* / *T. frondosae*

V9	<i>T. auratum</i> à pied blanc	<i>T. frondosae</i>	<i>T. auratum</i> (souche 1)	<i>T. auratum</i> (souche 2)
<i>T. auratum</i> à pied blanc	ID			
<i>T. frondosae</i>	5	ID		
<i>T. auratum</i> (souche 1)	5	2	ID	
<i>T. auratum</i> (souche 2)	9	6	4	ID

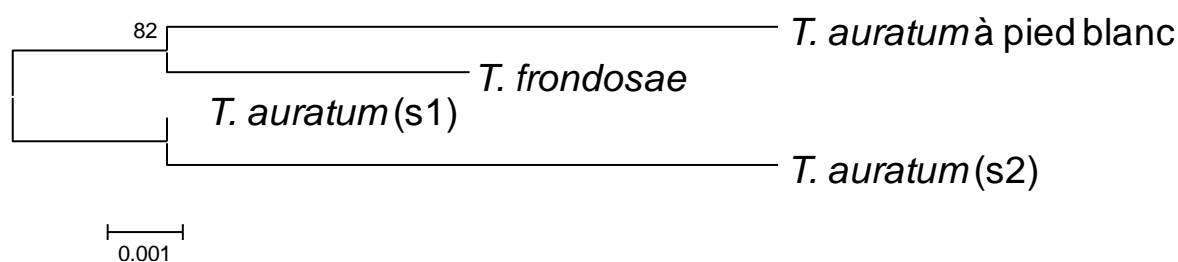


Figure 43: Phylogénie moléculaire réalisée par la méthode "Neighbor-Joining" utilisant les séquences V9 des quatre *Tricholoma*

Concernant le marqueur ITS, l'observation des pourcentages de similarités (Tableau 11) montre que *T. equestre* et *T. frondosae* ont 99% d'identité commune, ce qui permet de les définir comme une seule et même espèce (mais retrouvés dans des habitats différents). Par contre, *T. auratum* (souche 2) est une espèce à part entière, bien différente de *T. equestre* et *T. frondosae* (car on retrouve plus de 3% de différence entre leurs séquences). Lors de nos manipulations, nous n'avons pas pu obtenir des résultats exploitables pour les séquences ITS de *T. auratum* à pied blanc (n°2000-00-3516) ainsi que pour *T. auratum* (souche 1) (n°91-11-139), afin de les comparer aux autres espèces (ce qui explique pourquoi ils n'apparaissent pas dans le Tableau 11).

Tableau 11: Pourcentage de similarité des *Tricholoma* pour le gène ITS

ITS	<i>T. frondosae</i>	<i>T. auratum</i> (souche 2)	<i>T. equestre</i>
<i>T. frondosae</i>	ID		
<i>T. auratum</i> (souche 2)	0.56	ID	
<i>T. equestre</i>	0.99	0.56	ID



Ainsi les méthodes moléculaires permettent d'affirmer que :

- *T. equestre* et *T. frondosae* correspondent à une même espèce
- *T. auratum* et *T. equestre* sont donc deux espèces bien distinctes.

### 3.2. *Clitocybe amoenolens* (n°20092006) / *Lepista inversa* (souche 1: n°99-10-3307, souche 2: n°96-10-2694)

*Lepista flaccida* (var. *inversa*) est un champignon comestible qui est très voisin de *Clitocybe amoenolens* toxique, ce qui doit inciter à la plus grande prudence. Celui-ci est responsable d'un syndrome acroméalgique (paresthésies, œdèmes, rougeurs et violentes douleurs des extrémités, crises paroxystiques) (Saviuc et al, 2001). Cependant, *L. inversa* peut se différencier par ses lames plus serrées et des spores non lisses de forme bien différentes ainsi qu'une odeur beaucoup plus faible (Tableau 12).

Tableau 12: Critères de différenciation systématique

<i>Clitocybe amoenolens</i>	<i>Lepista inversa</i>
<p><b>Chapeau:</b> lisse, mamelonné, un peu creusé au centre, bord enroulé, beige crème puis roux</p> <p><b>Lames:</b> très décourantes, peu serrées, crèmes puis jaune ocre</p> <p><b>Pied:</b> blanc à crème rosé puis fauve roux</p> <p><b>Chair:</b> blanche, saveur douce</p> <p><b>Habitat:</b> conifères</p> <p><b>Spores:</b> ellipsoïdes, lisses</p>	<p><b>Chapeau:</b> très creusé au centre voire en entonnoir, lisse et brillant, ocre orangé à beige ochracé avec reflet orangeâtre</p> <p><b>Lames:</b> très décourantes, serrées, crèmes</p> <p><b>Pied:</b> blanchâtre puis ochracé</p> <p><b>Chair:</b> blanche, saveur douce</p> <p><b>Habitat:</b> conifères parfois sous feuillus</p> <p><b>Spores:</b> globuleuses avec de petites épines</p>
 <p>(Photo: Moreau)</p>	 <p>(Photo: Roux)</p>



Concernant l'alignement de la séquence ITS pour *C. amoenolens* et *L. inversa*, l'observation des pourcentages de similarité (Tableau 13) montre que les deux échantillons de *L. inversa* sont deux souches appartenant à la même espèce avec 99% d'identité commune. Par contre, *C. amoenolens* est bien une espèce différente.

L'alignement du gène V9 (Tableau 14 et Tableau 15), confirme la proximité phylogénétique des deux *Lepista* et la différenciation avec *C. amoenolens*.

**Tableau 13: Pourcentage de similarité pour le gène ITS**

Gene ITS	<i>L. inversa</i> (souche 1)	<i>L. inversa</i> (souche 2)	<i>C. amoenolens</i>
<i>L. inversa</i> (souche 1)	ID		
<i>L. inversa</i> (souche 2)	0.99	ID	
<i>C. amoenolens</i>	0.82	0.82	ID

**Tableau 14: Différences (en nombre de nucléotides) pour le gène V9 entre *C. amoenolens* / *L. inversa***

Gene V9	<i>L. inversa</i> (souche 1)	<i>L. inversa</i> (souche 2)	<i>C. amoenolens</i>
<i>L. inversa</i> (souche 1)	ID		
<i>L. inversa</i> (souche 2)	2	ID	
<i>C. amoenolens</i>	86	87	ID

**Tableau 15: Différences (en nombre de nucléotides) pour le gène ITS entre *C. amoenolens* / *L. inversa***



Gene ITS	<i>L. inversa</i> (souche 1)	<i>L. inversa</i> (souche 2)	<i>C. amoenolens</i>
<i>L. inversa</i> (souche 1)	ID		
<i>L. inversa</i> (souche 2)	2	ID	
<i>C. amoenolens</i>	112	110	

### 3.3. *Amanita ovoidea* (n°637) / *Amanita proxima* (n°90-10-902)

*A. ovoidea* (Bull.) Link est un champignon de la famille des Amanitaceae considéré comme comestible mais qui n'a cependant aucun intérêt culinaire. En revanche, cette amanite peut être confondue avec *A. proxima* Dumée, qui elle, est toxique. *A. proxima* se différencie par une forme plus élancée, un anneau plus membraneux et persistant (non crémeux comme *A. ovoidea*) ainsi qu'une volve roux ochracé (Tableau 16).

Cependant, lors de nos manipulations (extraction, amplification et séquençage), nous n'avons pas réussi à obtenir les séquences du marqueur ITS et de V9 pour ces deux *Amanita*. En conséquent, nous n'avons pas pu faire leur comparaison moléculaire.

Tableau 16: Critères de différenciation systématique des deux *Amanita*

<i>Amanita ovoidea</i>	<i>Amanita proxima</i>
<p><b>Chapeau:</b> lisse, blanchâtre à coquille d'œuf, bord habillé de lambeaux de voile blanc crémeux</p> <p><b>Lames:</b> libres, blanches ou crèmes, arêtes floconneuses</p> <p><b>Pied:</b> blanc recouvert de flocons crémeux, anneau typiquement crémeux (qui reste sur les doigts), volve blanchâtre à crème puis ochracé</p> <p><b>Chair:</b> blanche, saveur douce</p> <p><b>Odeur:</b> iodée</p> <p><b>Habitat:</b> sous les chênes, espèce calcicole</p> <p><b>Spores:</b> ellipsoïdes, amyloïdes</p>	<p><b>Chapeau:</b> lisse, blanc de lait un peu ochracé au centre, parfois reste de voile colorés</p> <p><b>Lames:</b> libres, blanches</p> <p><b>Pied:</b> blanc avec lambeaux de voile blanc crémeux, anneau membraneux blanc, volve ample ocre orangé roussâtre</p> <p><b>Chair:</b> blanche, saveur douce</p> <p><b>Odeur:</b> + ou - iodée</p> <p><b>Habitat:</b> sous les chênes, espèce calcicole</p> <p><b>Spores:</b> ellipsoïdes, amyloïdes</p>
 <p>(Photo: Roux)</p>	 <p>(Photo: Roux)</p>

### **3.4. Conclusion**

Ainsi, la biologie moléculaire permet, par un choix judicieux de marqueurs, d'identifier des espèces dont l'aspect peut énormément varier du fait du caractère polymorphe des champignons et de caractériser des spécimens dont la détermination systématique reste limitée (comme pour le *Tricholoma* à pied blanc). Ici, la biologie nous a permis de caractériser *T. equestre* et *T. frondosae* comme une seule espèce alors que la systématique les considérait comme différentes. De plus, elle nous a permis de confirmer que *L. inversa* et *C. amoenolens* sont deux espèces différentes.

## IMPACT DE L'APPROCHE MOLECULAIRE SUR LA CLASSIFICATION DES AGARICOMYCETIDAE

### CONCLUSION

L'apparition des méthodes moléculaires, notamment la PCR et le séquençage, a permis une avancée majeure dans le domaine de la phylogénie des champignons. La classification systématique qui se base uniquement sur les principaux caractères morphologiques en a été considérablement remaniée, laissant apparaître plusieurs niveaux de classification avec des divergences profondes entre les approches moléculaires et systématiques.

Ainsi, la sous-classe des Agaricomycetidae, qui rassemble la plupart des champignons comestibles ne présente que deux ordres communs aux deux classifications, les Agaricales et les Boletales. Les espèces appartenant aux ordres des Tricholomatales, Entolomatales et Cortinariales définies par leurs caractères morpho-anatomiques se retrouvent au sein des Agaricales. L'ordre des Boletales devient également plus important et regroupe, en plus des familles définies en systématiques, des espèces ne possédant pas de caractères bolétoïdes.

Bien que l'approche moléculaire rassemble dans un seul groupe phylogénétique des espèces possédant des caractères morpho-anatomiques distincts, elle permet aisément la distinction entre des espèces proches morphologiquement et dont la confusion peut entraîner des intoxications alimentaires. Ainsi, par la mise en évidence de mutations ponctuelles et d'insertions/délétions dans les séquences nucléotidiques, la biologie moléculaire nous a permis de distinguer des espèces des genres *Tricholoma*, *Lepista* et *Clitocybe* dont l'identification systématique peut être ambiguë. En revanche, ces méthodes ne sont pas applicables sur le terrain où les critères morpho-anatomiques, environnementaux et des clefs d'identification sont incontournables.

Au cours de son exercice officinal, le pharmacien sera amené à expertiser des cueillettes, en ayant à sa disposition que l'approche systématique. En cas de doute, il conseillera toujours de rejeter la cueillette et pourra réorienter le cueilleur vers des confrères spécialisés ou faire appel aux sociétés mycologiques pour plus de précisions.

Certes, les travaux moléculaires ont déjà beaucoup évolué, mais il reste encore énormément à faire dans ce domaine afin de pouvoir référencer un maximum de séquences

fongiques, d'alimenter les bases de données et de trouver de nouveaux marqueurs géniques toujours plus performants. Seules les avancées dans le domaine moléculaire permettront de faire évoluer la classification systématique.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 7/2/2013

LE DOYEN



LE PRESIDENT DE LA THESE

Docteur Lucile SAGE

## BIBLIOGRAPHIE

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.

Andersson SG, Karlberg O, Canback B, Kurland CG. 2003. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 165-177.

Baard D, 1996, Observations microscopiques des Macromycètes (mémoire), 47p.

Bataille F, 1969. Les réactions macrochimiques chez les champignons, Cramer.

Begerow D, John B, Oberwinkler F, 2004. Evolutionary relationships among  $\beta$ -tubulin gene sequences of basidiomycetous fungi. *Mycol Res* 108:1257–1263.

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W, 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures, *Appl Microbiol Biotechnol* 87:99–108.

Berbee ML, Taylor JW, 2001. The Mycota VII, part B: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research, éd. Springer.

Binder M, Hibbett DS, 2002. Higher-level phylogenetic relationships of homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 76-90.

Binder M, Hibbett DS, Larsson KH, Larsson E, Langer E, Langer G, 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Syst. Biodiversity* 3: 113-157.

Binder M, Larsson KH, Matheny PB, Hibbett DS, 2010. *Amylocorticiales* ord. nov. and *Jaapiales* ord. nov.: Early diverging clades of *Agaricomycetidae* dominated by corticioid forms, *Mycologia* 102 (4): 865–80.

Bon M, 2004. Champignon de France et d'Europe occidentale, Editions Flammarion.

Bowe LM, Coat G, De Pamphilis CW, 1999. Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *PNAS* 97, 4092–4097.

Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings KW, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR., Kretzer A, Garbelotto M, Li Y, 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Mol. Ecol.* 7: 257-272.

Carriconde F, Gardes M, Jargeat P, Heilmann-Clausen J, Mouhamadou B, Gryta H, ref sous press, 2008. Population evidence of cryptic species and geographical structure in the cosmopolitan ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma scalpturatum*. *Microbiol. Ecol.*

Champon B, 2009. Clef d'identification systématique.

- Corradi N, Gerrit K, Sanders IR, 2004. Monophyly of b-tubulin and Hb-ATPase gene variants in *Glomus* intraradices: consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal genes, *Fungal Genetics and Biology* 41, 262-273.
- Courtecuisse R, 2007. Guide des champignons de France et d'Europe, éd Delachaux et Niestlé, 479p.
- Damon C, Barroso G, Ferandon C, Ranger J, Fraissinet-Tachet L, Marmeisse R, 2010. Performance of COX1 gene as a marker for the study of metabolically active Pezizomycotina and Agaricomycetes fungal communities from the analysis of soil RNA. *FEMS Microbiology Ecology* 74 : 693-705.
- Einax E, Voigt K, 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organism, Diversity and Evolution* 3, 185–194.
- Fayod V, 1889. Prodrôme d'une histoire naturelle des Agaïcinés, *Annales des sciences naturelles. Botanique et biologie végétale*, 1<sup>er</sup> éd.
- Ferandon C, Moukha S, Callac P, Benedetto J-P, Castroviejo M, Castroviejo M, Barroso M, 2010. The *Agaricus bisporus* *cox1* Gene: The Longest Mitochondrial Gene and the Largest Reservoir of Mitochondrial Group I Introns. *PLoS ONE* 5(11): e14048. doi:10.1371/journal.pone.0014048.
- Fries EM, 1874. *Hymenomycetes Europaei. Upsaliae.*
- Gardes M, Bruns TD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118.
- Gardes M, Bruns TD, 1996. ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: *Methods in Molecular Biology*. Eds. Clapp J. Humana Press, Inc : Totowa, New Jersey 50: 177-186.
- Gonzalez P, Barroso G, Labarere J, 1998. Molecular analysis of the split *cox 1* gene from the basidiomycota *Agrocybe aegerita*: relationship of its introns with homologous Ascomycota introns and divergence levels from common ancestral copies. *Gene* 220, 45–53.
- Gray MW, Burger G, Lang BF, 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476–1481.
- Hawksworth DL, 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Mycological Research* 50: 9–18.
- Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM, 2004. Free in PMC Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.* 2, e312.
- Hibbett DS, Pine EM, Langer E, Langer G, Donoghue MJ, 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (22):12002-12006.

- Hibbett DS, Donoghue MJ, 2001. Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Syst. Biol.* 49: 215–242.
- Hibbett DS, Thorn RG, 2001. Basidiomycota: Homobasidiomycetes. In “The Mycota VII Part B, Systematics and Evolution” (DJ McLaughlin, EG McLaughlin et PA Lemke, Eds.), pp 121–168. Springer-Verlag, Berlin.
- Hibbett DS, Binder M, 2002. Evolution of complex fruiting body morphologies in homobasidiomycetes. *Proc Roy Soc London Ser B* 269:1963—1969.
- Hibbett DS, Binder M, 2003, oligonucleotides:  
[http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols\\_Folder/Primers/Primers.pdf](http://www.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols_Folder/Primers/Primers.pdf).
- Hibbett DS, 2006. A Phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia* 98: 917-925.
- Hibbett DS, ref sous press, 2007. After the gold rush, or before the flood? Evolutionary morphology of mushroom-forming fungi (Agaricomycetes) in the early 21st century. *Mycological Research*.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*; 111(5):509-548.
- Hillis DM, Bull JJ, 1993. An empirical test of bootstrapping as a method assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42, 182–192.
- Hopple JS, Vilgalys R, 1999. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups and monophyly. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 1–19.
- Hosaka K, Bates ST, Beever RT, Castellano MA, Colgan III W, Dominguez LS, Nouhra ER, Geml J, Giachini AJ, Kenney SR, Simpson NB, Spatafora JW, Trappe JM, 2006. Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia* 98: 949–959.
- Jülich W. 1978. A new lichenized *Athelia* from Florida. *Persoonia* 10:149–151.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (eds), 2001. *Ainsworth & Bisby’s Dictionary of the Fungi*, ninth ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA, 2008. *Dictionary of the Fungi.*, 10th ed.
- Kuzoff RK, Sweere JA, Soltis DE, Soltis PS, et Zimmer EA, 1998. The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15:251–263.
- Lang BF, Gray MW, Burger G, 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryote. *Ann Rev Genet* 33: 351-97.



- Larsson KH., Larsson E, Kõljalg U, 2004. High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. *Mycol. Res.* 108: 983-1002.
- Liu YJ, Hall BD, 2004. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(13):4507-4512.
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung G-H, Lücking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim Y-W, Matheny PB, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R, 2004. Assembling the Fungal Tree of Life: progress, classification and evolution of subcellular traits. *Am J Bot* 91:1446–1480.
- Martin W, Muller M, 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41.
- Matheny PB, Bougher NL, 2006. The new genus *Auritella* from Africa and Australia (Inocybaceae, Agaricales): molecular systematics, taxonomy and historical biogeography. *Mycol. Progress* 5: 2-17.
- Matheny PB, Curtis JM, Hofstetter V, Aime MC, Moncalvo JM, Ge Z-W, Yang Z-L, Slot JC, Ammirati JF, Baroni TJ, Bougher NL, Hughes KW, Lodge DJ, Kerrigan RW, Seidl MT, Aanen DK, DeNitis M, Daniele GM, Desjardin DE, Kropp BR, Norvell LL, Parker A, Vellinga EC, Vilgalys R, Hibbett DS, 2007. Major clades of Agaricales: a multi locus phylogenetic overview. *Mycologia* 98: 984–997.
- McLaughlin DJ, Frieders EM, Lü H. 1995. A microscopist's view of heterobasidiomycete phylogeny. *Stud Mycol* 38: 91–109.
- Michot B, Hassouna N, Bachellerie JP, 1984. Secondary structure of mouse 28S rRNA and a general model for the folding of the large rRNA in eucaryotes. *Nucleic Acids Res.* 12:4259–4279.
- Michot B, Hu Qu L, Bachellerie JP, 1990. Evolution of large-subunit ribosomal RNA structure: The diversification of divergent D3 domain among major phylogenetic groups. *Eur. J. Biochem.* 188:219–230.
- Molitor C, Inthavong B, Sage L, Geremia RA, Mouhamadou B, 2009. Potentiality of the *cox1* gene in the taxonomic resolution of soil fungi. *FEMS Microbiol Lett* 302:76–84.
- Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, Johnson JE, James TY, Aime MC, Hofstetter V, Verduin SJW, Larsson E, Baroni TJ, Thorn RG, Jacobsson S, Clemençon H, Miller Jr OK, 2002. One hundred seventeen clades of euagarics. *Mol Phylogenet Evol* 23:357–400.
- Mullis K, Saiki R, Scharf S, Faloona F, Horn G, Erlich H, 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-54.

- Neefs JM, Van de Peer Y, De Rijk P, Chapelle S, De Wachter R, 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.* 21, 3025–3049.
- Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E, 2009b, The ITS region as target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol Lett* 296:97–101.
- Patouillard N, 1900. Essai taxonomique sur les familles et les genres des Hyménomycètes (Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris, École Supérieure de Pharmacie), 184 p., fig. Lons-le-Saunier; Declume.
- Prillinger H, Oberwinkler F, Umile C, Tlachac K, Bauer R, Dörfler C, Taufrazthofer E, 1993. Analysis of cell wall carbohydrates (neutral sugars) from ascomycetous and basidiomycetous yeasts with and without derivatization. *J Gen Appl Microbiol* 39:1–34.
- Roux P, Eyssartier G, 2011. *Le guide des champignons France et Europe*, éd. Belin.
- Roux P, 2006. *Mille et un champignons*; éd. Roux, 1125p.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Saraste M, 1999. Oxidative Phosphorylation at the "fin de siècle". *Science* 283: 1488-1493.
- Saviuc P, De Matteis M, Bessard J, Mézin P, Moreau PA, Chane-Yene Y, Mallaret M, Guez D, Danel V, 2001. Erythromelalgia and mushroom poisoning (*Clitocybe amoenolens*), *European Journal of Emergency Medicine - Volume 8 - Issue 1 - p 74*.
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Resour* 9: 81–89.
- Stiller JW, Hall BD, 1999. Long-branch attraction and the rDNA model of early eukaryotic evolution. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1270–1279.
- Swann EC, Taylor JW, 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85:923–936.
- Swann EC, Taylor JW, 1995. Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics: evidence from the 18S rRNA gene. *Can J Bot* 73:S862–S868.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC, 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 31(1):21-32.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.

Truscott KN, Brandner K, Pfanner N, 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* 13: 326-337.

Vialle A, Feau N, Allaire M, Didukh M, Martin F, Moncalvo JM, Hamelin RC, 2009. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Mol Ecol Resour* 9 (suppl 1):99–113.

Weiss M, Bauer R, Begerow D, 2004. Spotlights on heterobasidiomycetes. In: Agerer R, Piepenbring M, Blanz P, eds. *Frontiers in basidiomycete mycology*. Eching, Germany: IHW-Verlag. p 7–48.

Wells K, Bandoni RJ, 2001. Heterobasidiomycetes. In: McLaughlin DJ, McLaughlin EJ, Lemke P (eds), *The Mycota*. Vol. VII. Part B, Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin, pp. 85–120.

Woese CR, Balch WE, Magrum LJ, Fox GE, Wolfe RS, 1977. « An ancient divergence among the bacteria », *Journal of Molecular Evolution*, vol. 9, p. 305–311.

# ANNEXES

## Annexe 1: Valeurs moyennes nutritives des champignons (Courtecuisse, 2007)

- Apporte de 100 à 800 kcal/ 1000g
- 80 à 90% d'eau
- 2 à 4% de protéines dont une partie seulement serait assimilable
- 0.2 à 1 % de lipides
- 2 à 13% de glucides (la plupart non assimilable)
- 0.5 à 1.5% de matière minéral (phosphate et potassium)
- Certaines espèces apportent des oligoéléments (zinc, cuivre, aluminium, fer...) et des vitamines (A sous forme de carotènes, B, C, D et acide pantothénique)

## Annexe 2: Code couleur Romagnesi

L'observation de la couleur de la sporée est cruciale dans l'étude des russules. Cette couleur entre en particulier dans les clés de détermination (élément stable pour de nombreuses espèces).

Les couleurs ont été codifiées par les mycologues, pour en rendre le résultat moins dépendant de l'observateur. Le code couleur Romagnesi compare la sporée à une échelle colorée qu'il gradue en 14 nuances.

Les degrés I-II-III-IV représentent respectivement les spores blanches, crèmes, ochracées ou jaunes (ensuite il y a les divisions a, b, c, d, e)

- sporées blanches ou pâles *Ia et Ib*
- sporées crèmes *II a, II b, II c et II d*
- sporées ocres *III a, III b, et III c*
- sporées jaunes *IV a, IV b, IV c, IV d et IV e*

x	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ton	Ia	Ib	IIa	IIb	IIc	IId	IIIa	IIIb	IIIc	IVa	IVb	IVc	IVd	IVe

## Annexe 3: Principaux réactifs chimiques et colorants

### • Réactifs Chimiques:

- **Le sulfate de fer (FeSO<sub>4</sub>)** sous forme de petits cristaux verts: il suffit de frotter le cristal sur la chair du champignon (ou alors d'utiliser une solution aqueuse à 10%). Surtout employé pour la détermination des russules avec des réactions variées, exemple chez *Russula nigricans*, la chair vire au vert sombre (réaction assez lente), le genre *Leccinum* donne des réactions gris-verdâtres à bleutées au sulfate de fer.
- **Le phénol**, solution aqueuse à 2% (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH): la coloration brun chocolat (voir un peu plus vive rougeâtre) avec les Russules, Amanites et Cortinaires
- **L'ammoniaque** (solution aqueuse NH<sub>3</sub>) : il suffit des vapeurs pour déclencher la réaction. Réaction rouge ou jaune voire violette.
- **La soude** (NaOH) à 10% ou la potasse (KOH): NaOH très utilisée pour les Cortinaires. Exemple : coloration noire sur le stipe de *Cortinarius semisanguineus* (Bataille, 1969). KOH utilisé pour réagir avec le lait des lactaires (le lait de *Lactarius glaucescence* passe de blanc à orange au contact d'une goutte de potasse).

- **La teinture de Gaïac à 10%** dans l'alcool à 80°: réaction bleu violacé voir turquoise sur la chair des Bolets, ce qui importe, c'est l'intensité et la vitesse de réaction. Exemple : coloration rapide bleue intense sur le pied de *Russula ochroleuca*.
  - **Le formol** (aldéhyde formique) : il provoque l'apparition d'un rougissement plus ou moins vif. Exemple : coloration rougeâtre sur la chair de *Leccinum scabrum* (d'après BATAILLE, 1969).
  - **L'iode** : utilisé sous forme de teinture d'iode ou de réactif de Melzer (solution aqueuse d'iode + iodure de potassium) donne des réactions plus ou moins bleu violacé sur la chair de certains bolets. Surtout utilisé pour la réaction dite "amyloïde" des spores: réaction bleu noire des spores si elles sont amyloïdes (partie microscopique).
  - **Le sulfoformol** (solution de formol dans l'acide sulfurique) : donne des colorations vives (jaune, bleu, verte) ; utilisé notamment pour les genres *Lactarius*, *Russula* et *Tricholoma*.
- Colorants:
    - **Rouge congo ammoniacal** (solution à 1%): colorant qui permet de colorer la cellulose, et de faire ressortir les spores moins colorées sur un fond teinté.
    - **Bleu Crésyl:** utilisé pur
    - **Bleu lactique:** solution à 1% de bleu coton dans de l'acide lactique, il est utilisé pour la réaction cyanophile. La spore est dite cyanophile si la paroi se colore très nettement en bleu contrairement au cytoplasme.
    - **Carmin Acétique:** utilisé pur

## Annexe 4: Amorces pour amplification

### Amplification du gène mt-SSU (Gonzalez et al., 1998):

- Pour amplifier V4: *V4U/V4R*

*V4U* : CTTACTATAAGTGTTGTC

*V4R* : TATTCTACTTAGTATCTT

- pour amplifier V6: *V6U/V6R*

*V6R* : TGACGACAGCCATGCAAC

*V6U*: TTAGTCGGTCTCGGAGCA

- Pour amplifier V9 : *V9U/V9R*

*V9U*: CCGTGATGAACTAACCGT

*V9R*: TTCCAGTACAAGCTACCT

### Amplification du gène cox1:

Deux amorces ont été créés (*Ucox1* et *Ucox2*) et une amorce sens inverse (*Reversecox*) :

- *Ucox1* (ACAAATGCTAAAGATATAGG)
- *Ucox2* (ATGATTTTCTTTATGGTTATGCC)
- *Rcox* (CACCGGCTAATACAGGTAA)

### Amplification du gene mt-LSU (Bruns et al, 1998):

Loc.	Primer	Sequence	Position relative to introns
	ML5	ctcggcaaattatcctcataag	interrupted by intron a
	ML6	cagtagaagctgcatagggtc	3' to intron e
1	MLIN3	cgacacaggttcgtaggtag	5' to target fragment
2	ML5.5	gatcctcatagttaagaccgc	3' to intron a, 5' to others
3	CML5.5	tagcggctttaactatgagg	5' to intron b
4	MLIN5R	ttattgataccggaccac	3' to intron c, 5' to d
5	MLIN4	ggtagcaaaataaattggcc	5' to intron c, 3' to b
6	MLIN1R	agttgtagagacagtgaagc	3' to intron d, 5' to e
7	MLIN2	ggccattaaatgtggtccgg	interrupted by intron c
8	CML7.5	ccgccccagtcaaactgcc	3' to target fragment
9	MLIN1F	gcttcaactgtctctacaact	5' to intron e, 3' to others

Remarque: ML5 est exclu des analyses car cette portion varie de plus de 100 pb

### Amplification de RPB:

RPB1(regions A–D , 1.2 kb):

RPB1-AFasc: 5\_-ADTGYCCYGGYCATTTYGGT-3\_

RPB1-AFlecan: 5\_-TGYCCYGGYCATTTYGGTGTAT-3\_

RPB1-AFpelt: 5\_-TGYCCYGGYCATTTYGGTTCAYAT-3\_

RPB1-6Rlasc: 5\_-ATGACCCATCATRGAYTCCTTRTG-3\_

RPB1-6R2asc: 5\_-ATGACCCATCATRGAYTCCT-3\_

RPB1(régions D–Gb, 2.1 kb):

RPB1-DF2asc: 5\_-CAYAAGGARTCYATGATGGGTCAT-3\_

RPB1-DF2asc: 5\_-CAYAAGGARTCYATGATGG-3\_

RPB1-GIRasc: 5\_-ACNCCNACCATYTCNCCNGG-3\_

RPB1FR-seq1c 5\_-TANCCNGTYTCNGCNGTYTT-3\_

RPB1FR-seq2 5\_-CGYTGRATRTANCCNGTYTC-3\_

RPB2 (regions 5–7b):

RPB2-5Fpelt: 5\_-TTCAACAARCTBACVAARGATGT-3\_

RPB2 (regions 7–11)

RPB2-7Fpelt: 5\_-GAAGAAACBGTVATGATTGTSATGAC-3



# SERMENT DE GALIEN



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque ».**



IMPACT DE L'APPROCHE MOLECULAIRE SUR LA CLASSIFICATION  
DES AGARICOMYCETIDAE

## RESUME

Apparues dans les années 90, les méthodes moléculaires notamment la PCR et le séquençage, ont permis une avancée majeure dans le domaine de la phylogénie des champignons. La classification systématique, qui se base uniquement sur les principaux caractères morphologiques, en a été considérablement remaniée, laissant apparaître plusieurs niveaux de classification avec des divergences profondes entre les approches moléculaires et systématiques.

Ainsi, après un rappel sur les principaux critères de classification systématique et les différents marqueurs moléculaires, la sous-classe des Agaricomycetidae, qui rassemble la plupart des champignons comestibles et toxiques, est comparée selon chaque type d'approche.

Bien que l'approche moléculaire rassemble dans un seul groupe phylogénétique des espèces possédant des caractères morpho-anatomiques distincts, elle permet aisément la distinction entre des espèces proches morphologiquement et dont la confusion peut entraîner des intoxications alimentaires. Ainsi, par la mise en évidence de mutations dans les séquences nucléotidiques, la biologie moléculaire nous a permis de distinguer des espèces des genres *Tricholoma*, *Lepista* et *Clitocybe* dont l'identification systématique peut être ambiguë. En revanche, l'approche systématique reste encore incontournable sur le terrain pour les identifications (critères morpho-anatomiques, environnementaux, clefs d'identification).

## MOTS-CLES

Agaricomycetidae  
Classification systématique  
Phylogénie moléculaire  
Champignons

Macroscopique  
Marqueurs moléculaires  
Séquençage  
Identification

Adresse:

20 Chemin du Bachais  
38240 Meylan  
adrienchaboud@hotmail.fr