



INSTITUT TECHNOLOGIQUE

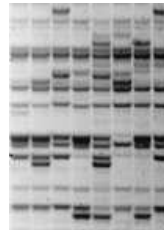
Detect'Armillaire

**Mise au point d'une méthode de détection précoce de champignons
infestant les bois : Cas des bois chablis stockés**





INSTITUT TECHNOLOGIQUE



Detect'Armillaire

**Mise au point d'une méthode de détection précoce de champignons
infestant les bois : Cas des bois chablis stockés**

Rapport Final – Novembre 2012

CONSEIL REGIONAL D'AQUITAINE

Convention n° 09013940-062



Siège social

10, avenue de Saint-Mandé
75012 Paris
Tél +33 (0)1 40 19 49 19
Fax +33 (0)1 43 40 85 65

**Pôle Biotechnologies
Sylviculture Avancée**

71, route d'Arcachon – Pierroton
CS 90120
33612 CESTAS CEDEX
Tél +33 (0)5 56 79 95 00
Fax +33 (0)5 56 10 40 97

www.fcba.fr

Chef de projet : L. Harvengt

Équipe projet :

CAFSA : L. Cotten, E. Beziade

INRA : B. Lung, T. Decourcelle (1 mois)

FCBA : K. Durandeu, T. Decourcelle, J. Moreau, I. Lebayon, M. Kutnik, M.

Gabille, V. Lehn, S. Rodriguez, M. Jequel

Sret 775 680 903 00017

APE 731 Zi

Code TVA CEE : FR 14 775 680 903

Remerciements - Contributeurs

Nous tenons à remercier particulièrement Brigitte Lung (INRA Biogeco) qui nous a aidé tout au long du projet, non seulement sur le plan technique mais également par son écoute et ses conseils à toutes les phases des travaux.

Outre les personnels de la CAFSA (en particulier Loïc Cotten) et de l'INRA Biogeco (Thibaut Decourcelle), les personnels FCBA suivants ont eu un rôle capital dans la conception et la mise en œuvre des tâches de ce projet et l'analyse et la synthèse de leurs résultats.

Karine Durandeau
Marc Jequel
Magdalena Kutnik
Virginie Lehn
Martine Gabille
Isabelle Lebayon
Jérôme Moreau
Patricia Poupeau
Françoise Wan-Fung

Qu'ils soient remerciés de leurs efforts constants pour faire progresser les connaissances sur les champignons du bois, et surtout, le développement de leurs applications à la résolution des problématiques concrètes des professionnels de la filière forêt.

Note liminaire

Les aspects financiers font l'objet d'une annexe transmise séparément (fichier Excel et version papier signée pour déclaration conforme).

Suite à des contraintes administratives internes, l'INRA a choisi de réaliser sa part de travail par l'intermédiaire d'un CDD (Thibaut Decourcelle) qui a été employé pour partie par FCBA, laissant à FCBA la part de financement correspondant.

SOMMAIRE

1. Résumé du projet	5
2. Introduction	5
2.1 Mise en place des stockages de bois – enseignements de la tempête de 1999	5
2.2 Développements de champignons sur les bois stockés par aspersion	7
2.3 Utilisation des outils moléculaires pour l'étude et la détection des champignons du bois - Identification des espèces de champignons	8
3. Objectifs	9
4. Réalisations et Résultats	9
4.1 Tâche 1 : Recherche des champignons lignivores les plus fréquents sur bois arrosés	9
4.2 Tâche 2 : Mise au point de l'outil moléculaire de détection de l'hypholome	11
4.3 Tâche 3 : Test des outils moléculaires et lien entre croissance des champignons et perte de masse du bois infecté en culture pure (essai EN 113)	13
4.4 Tâche 4 : Analyse en vraie grandeur sur le site de stockage CAFSA du Barp	18
5. Conclusions	30
6. Communication, Publication et projets connectés	31
7. Références citées dans le rapport	31

1. Résumé du projet

Suite aux importants dégâts de la tempête de janvier 2009 en Aquitaine, des opérateurs majeurs de la filière Forêt-bois dont l'ONF et la CAFSA, ont mis en place des sites de stockage du bois sur le long terme. La technique de stockage sous aspersion a été choisie d'après les leçons tirées des études menées suite à la tempête de 1999 afin de minimiser la dégradation liée principalement au développement de champignons. Au delà d'actions de suivi direct de la qualité du bois stocké réalisées dans le cadre d'autres projets et actions de consultance, nous avons développé des outils moléculaires (ADN) de détection précoce des champignons lignivores permettant d'anticiper des altérations sensibles du bois par des champignons et d'ajuster les paramètres du stockage afin de limiter les pertes de bois en conséquence. Nous avons démontré la faisabilité de l'emploi de ces outils semi-quantitatifs pour détecter très précocement les armillaires (par une adaptation de protocoles qui préexistaient) et hypholomes (à partir d'un test que nous avons créé *de novo*).

Les perspectives sont d'intégrer facilement, puisque toutes les bases techniques existent, les champignons *Phellinus pini* (synonyme *Xanthochrus pini*) et *Fomes (Heterobasidion annosum)* à l'outil ADN et rendre le test quantitatif afin d'estimer plus précisément le risque de développement ultérieur rapide à un niveau dommageable pour des échantillons où seules des traces ténues de présence de ces champignons auront été mises en évidence.

2. Introduction

2.1 Mise en place des stockages de bois – enseignements de la tempête de 1999

Suite à la tempête de janvier 2009, des stockages de bois sous arrosage ont été mis en place afin de :

- préserver la qualité des bois chablis sur plusieurs années,
- préserver l'activité forestière (reconstitution, limitation des proliférations des développements de champignons et insectes) en évacuant les arbres endommagés,
- tamponner l'afflux de bois (la crise économique mondiale limitant l'utilisation industrielle du bois disponible).

En l'absence de mesure conservatoire les risques de dégradation des chablis dépendent de la conjonction de quatre facteurs : l'humidité du matériau, la température extérieure, le type de chablis (renversé, enraciné, dispersé, cassé) et l'exposition (chablis dispersés sous abris forestier, sur parcelle ensoleillée,...)

Les chablis partiellement enracinés et conservés sur coupe seront victimes d'attaques de champignons et d'insectes xylophages, provoquant des altérations pouvant dégrader leur aspect et/ou leurs qualités technologiques. Les altérations fongiques se développent dans une gamme d'humidité comprise entre 25 et 80 % et sont favorisées par les blessures (fissures, arrachements).

Moreau et Liarçou (2001) suite à la tempête de décembre 1999, ont montré qu'un bleuissement de l'aubier apparaissait dès les premiers beaux jours. Sur les landes humides entre 10 et 20% des chablis sont touchés. Une infestation secondaire de bleu avec des champignons du genre *Ceratocystis* ou des *Dematiaceae* a ensuite eu lieu à la faveur des attaques d'insectes durant l'été 2000 soit six mois après la tempête. 60% des chablis étaient alors touchés sur les landes humides comme sur les landes sèches. Les champignons du bleu dégradent préférentiellement les substances nutritives des rayons ligneux et du parenchyme et de ce fait ne portent pas atteinte au bois et aux fibres.

Après un laps de temps dépendant des conditions de stockage sur coupe (les parcelles de chablis totalement couchés se dégradant plus vite que celles de chablis diffus) et du volume unitaire de la parcelle (les petits bois se dégradant plus vite), apparaissent des échauffures, puis des pourritures dégradant profondément le matériau.

En moyenne, suite à la tempête de 1999, les premières légères dégradations de la fibre apparaissent après un an de stockage sur coupe. Elles sont mises en évidence par la baisse des propriétés papetières (indice d'éclatement et de déchirement) très sensibles à la dégradation des fibres. Les dégradations plus sévères apparaissent après deux ans de stockage avec le début de dégradation du rendement papetier puis se poursuivent avec un début de baisse du pouvoir calorifique après 2,5 années de stockage sur coupe.

Enfin, les larves d'insectes (Sirex, capricornes, scolytes, etc.) peuvent perforer le bois brisé ou façonné (volis et chandelles de préférence), dès lors que les mécanismes naturels de défense de l'arbre ont disparu. Ces attaques favorisent la propagation des champignons.

Les méthodes de conservation couramment pratiquées consistent soit à sécher le bois en dessous de 25 % d'humidité (plus de risque d'attaque de champignons), soit au contraire à l'humidifier pour rester au dessus de 100 % (plus de risque d'attaque d'insectes, très faible risque d'attaque de champignons), éventuellement, de façon plus récente, à les stocker sous atmosphère modifiée (atmosphère pauvre en oxygène). La Figure 1 ci dessous regroupe ces différentes méthodes.




	Bois sec 0 à 20 %	Bois humide 20 à 100 %	Bois saturé > à 100 %
Risques de dégradation	Moyens : Insectes	Importants : Insectes et champignons	Faibles : Bactéries anaérobies
Méthodes de stockage	Bois écorcé stocké en pile	Bois laissé en forêt Bois stocké sous bâche (exclusion d'oxygène)	Aspersion Immersion
			

Figure 1 : Caractéristiques des différentes méthodes de stockage des bois chablis

Les expériences de stockage de pin maritime menées suites à la tempête sont positives, la qualité du bois est maintenue (mais pas améliorée).

- Les bois conservent leur qualité sur plusieurs années (4 à 5 ans) **si l'arrosage est correctement réalisé.**
- Le sciage, voire le séchage sont facilités.
- Il faut néanmoins **rester vigilants** vis-à-vis des attaques possibles de champignons d'armillaires et **analyser l'évolution de la qualité des bois (bois pour la structure en particulier l'expérience de leur stockage faisant défaut).**
- Une surveillance de l'humidité des bois est nécessaire et devra être complétée par des tests réguliers de sciages pour vérifier l'état des bois.

L'aspersion est la méthode de stockage préconisée, avec une expérience positive de nombreux scieurs sur cette technique suite aux différentes tempêtes. La qualité du bois est maintenue (mais pas améliorée). Il faut réaliser un tri rigoureux des billons stockés sur les aires d'aspersion : éviter de stocker les volis et chandelles et ne stocker en aucun cas les billons traités avec des insecticides. Il faudra surveiller l'évolution de la qualité des bois stockés, en particulier le développement de l'armillaire.

L'arrosage des billons est réalisé par le dessus avec des asperseurs hautes pressions (colmatage limité) et un complément d'arrosage est réalisé pour les faces des billons exposées au vent. Le drainage de l'eau est effectué par fossé vers un bassin tampon dans lequel l'eau d'arrosage est puisée, des forages compensent les pertes liées à l'évaporation.

Les suivis de la qualité des eaux des sites d'aspersion ont montré que l'impact sur l'environnement est faible.

2.2 Développements de champignons sur les bois stockés par aspersion

Si dans la plupart des cas aucun problème n'a été constaté sur les sites de stockage du bois de chablis de la tempête de 1999 en Aquitaine, des **attaques de champignons lignivores tels que l'armillaire et l'hypholome** ont été observées, principalement sur le site de Carcans. Ces champignons sont capables de se développer sur des bois saturés en eau (Schumacher et Grosser D, 1995; Johnson et Martin ,1992; Metzler et Hecht 2004). Ces deux champignons sont très présents en forêt landaise, en parasite racinaire et /ou en saprophyte sur souches de pin maritime. Les arbres sont contaminés en forêt par les racines vivantes ou lors du contact avec le sol, les champignons se développant ensuite à l'intérieur des rondins puis des piles arrosées.

Les symptômes signalant le début de ces attaques sont la présence de mycélium blanc sous l'écorce ou de rhizomorphes filandreux sombres le long des grumes avec une visibilité évidente en général constatée après 3 à 4 ans de stockage. La couleur du bois est aussi un indicateur de la dégradation, le bois devenant orangé. L'hypholome est un bien meilleur agent de dégradation du bois que l'armillaire dont il est un bon compétiteur (Gallet et al. 1994). Non seulement ils occupent la même « niche » mais aussi se disséminent soit dans le sol par l'intermédiaire de cordons mycéliens soit par voie aérienne grâce à leurs fructifications automnales.

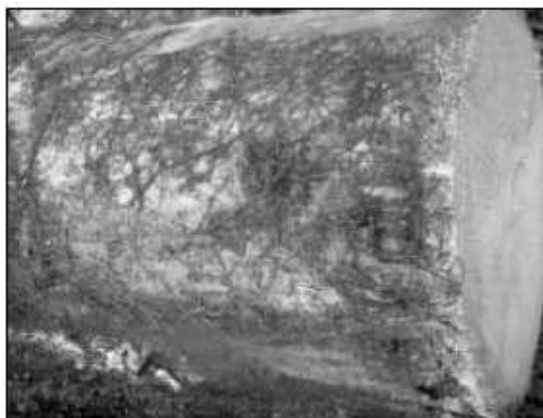
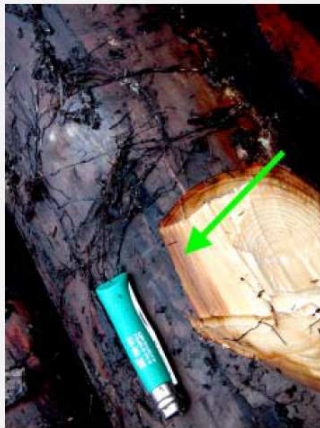


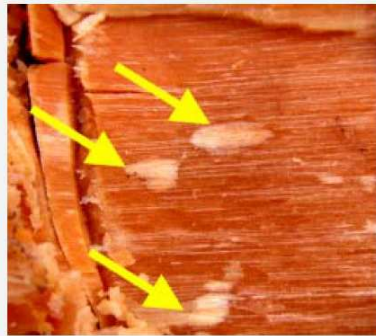
Figure 2 : En haut : grume d'épicéa couverte de rhizomorphes d'armillaire (Pischeda et al., 2004). En bas, de Gauche à droite, Carpophores d'Armillaire, rhizomorphes en chignon, palmettes sur le roulant, rhizomorphes traçants

Attaque d'armillaire aux bois ronds arrosés

Symptômes trahissant la dégradation du bois:



Coloration brunâtre de l'aubier



Taches lenticulaires blanches dans l'aubier (= canaux remplis d'hyphes et d'air)



Lignes de démarcation noires dans le bois (formées par le champignon pour se protéger de la sécheresse et de la concurrence)



Source : WSL 2010 <http://www.wsl.ch/fe/walddynamik/waldschutz/pilze/HallimaschlagerungF.pdf>

2.3 Utilisation des outils moléculaires pour l'étude et la détection des champignons du bois - Identification des espèces de champignons

Il existe différentes méthodes employées pour identifier un champignon lignivore, ces techniques étant principalement utilisées pour la reconnaissance des champignons s'attaquant aux bois mis en œuvre dans le bâtiment. Les diagnostiqueurs ont acquis des connaissances sur la morphologie des champignons lignivores ainsi que sur les aspects macroscopique et microscopique des bois dégradés. Cependant, l'identification macro et microscopique d'un champignon en l'absence de fructifications ou d'éléments fongiques typiques ne permet pas toujours de déterminer l'espèce en cause dans la dégradation. A ce jour, nous connaissons très mal la diversité des champignons responsables des dégâts significatifs occasionnés aux bois mis en œuvre dans la construction sur le territoire français. Aucune étude taxonomique n'a été faite et les seuls éléments d'information exploitables proviennent de diagnostics plus ou moins sommaires réalisés par des experts du bois et de ses pathologies. La bibliographie ne fait par ailleurs état que de quelques démarches similaires à l'étranger (Alfredsen et al. 2007).

L'attribution à une espèce d'éléments fongiques issus le plus souvent de prélèvements « terrain » (champignons et/ou bois dégradés collectés dans des bâtiments sinistrés) ou des souches de référence utilisées pour réaliser des essais biologiques en laboratoire, est généralement basée sur une identification morphologique des carpophores, parfois complétée par l'observation microscopique des spores et des filaments mycéliens. Depuis quelques années, des études ont été initiées en Europe (Norvège, Allemagne, Autriche, Belgique,...) dont une étude réalisée par FCBA en 2007 – Maître et al. 2008) et ailleurs dans le monde afin de développer une méthode d'identification des espèces de champignons basée sur l'analyse de leurs séquences d'ADN (Schmidt et Moreth 1998, 2000; Stahlhut et al. 2008).

La région ITS de l'ADN ribosomal nucléaire est le locus le plus intéressant à utiliser pour l'identification moléculaire d'espèces fongiques. L'ITS n'est cependant pas un outil idéal pour l'étude de la variabilité au sein d'une même espèce, voire au sein d'un même genre, dans la mesure où le polymorphisme de cette région est très pauvre au sein de certains clades.

Un pouvoir discriminant supérieur peut être atteint en le combinant avec d'autres loci tels que les tubulines β - et γ , le facteur d'élongation 1 α (Ef1 α), la polymérase ribosomique B ou

l'ATPase mitochondriale 6 ou encore le domaine V9 de la petite sous unité de l'ADN ribosomique mitochondrial (Bruns et Shefferson 2004, Le Gac et al 2007, Carriconde et al. 2008, Mouhamadou et al. 2008). Mais les exemples de typage moléculaire multi-locus chez les champignons dégradant le bois d'œuvre ne sont pas courants (Aguileta et al 2008).

Le nombre de publications inventoriant les champignons dégradant le bois d'œuvre reste cependant très faible, ce qui pourrait s'expliquer par deux facteurs : d'une part, les équipes intéressées par l'étude de la diversité des espèces dégradant le bois se sont surtout concentrées sur les communautés fongiques du sol et ont privilégié des outils tels que la T-RFLP (variante de la RFLP où seul un des fragments de restriction est pris en compte) qui ne permettent pas de déterminer avec certitude l'identité des organismes détectés ; d'autre part, au-delà et en partie à cause des difficultés d'identification habituelles chez les champignons (existence de formes sexuées - anamorphes - et asexuées – téléomorphes - de morphologie différente, synonymie, difficulté de mise en culture sur milieu nutritif), l'assignation à une espèce fongique d'une fraction importante des données de séquences d'ADN fongique est incorrecte (Bridge et al. 2003). De plus, bien que le nombre total de séquences ITS fongiques présentes dans les bases de données soit élevé, les données concernant spécifiquement les champignons lignivores sont très limitées.

Une étude récente (Nicolotti et al. 2009) a démontré l'applicabilité et l'intérêt pratique de la détection moléculaire d'espèces de champignons lignivores dans le cas des arbres (d'alignement) sur pieds (appartenant aux genres *Armillaria*, *Ganoderma*, *Hericium*, *Ionotus*, *Laetiporus*, *Phellinus*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Stereum*, *Trametes* et *Ustulina*, dont certains sont également impliqués dans les dégâts occasionnés aux bois d'œuvre). Les séquences cibles utilisées sont principalement les ITS1 et 2, ainsi que des portions de la petite unité ribosomale.

3. Objectifs

Il s'agit de mettre au point une méthode permettant de détecter précocement des champignons pouvant altérer les grumes en pin maritime et autres essences de bois conservées sous aspersion.

Cette méthode repose sur la détection dans le bois de champignons (genres ciblés : *Armillaria* et *Hypholoma*), à l'aide de marqueurs moléculaires (empreintes ADN) qui leur sont spécifiques.

Cette méthode vise à :

- identifier de façon spécifique l'armillaire et l'hypholome ;
- détecter ces champignons dès lors qu'ils sont présents (même en quantité faible) de manière à pouvoir appliquer le plus rapidement possible sur le terrain des corrections à la conduite du site de stockage concerné ;
- être applicable en laboratoire (en culture pure) et sur le terrain (prélèvement en forêt).

4. Réalisations et Résultats

4.1 Tâche 1 : Recherche des champignons lignivores les plus fréquents sur bois arrosés

Les prélèvements réalisés dans le cadre du suivi de la tempête assuré par FCBA (en dehors de ce projet) pour les gestionnaires des sites de stockage ont permis d'alimenter cette tâche. Nous nous sommes concentrés sur le site de stockage du Barp géré par la CAFSA (lieu dit Saint Jacques, à proximité de la départementale 1010).

Plusieurs visites d'observation et de prélèvement ont été effectuées en 2010 et 2011 conjointement par l'équipe Pathologie de l'INRA Biogeco (Pierroton), l'équipe du laboratoire de biologie de la dégradation du bois de FCBA Bordeaux et l'équipe Biotechnologie-Sylviculture de FCBA Pierroton.

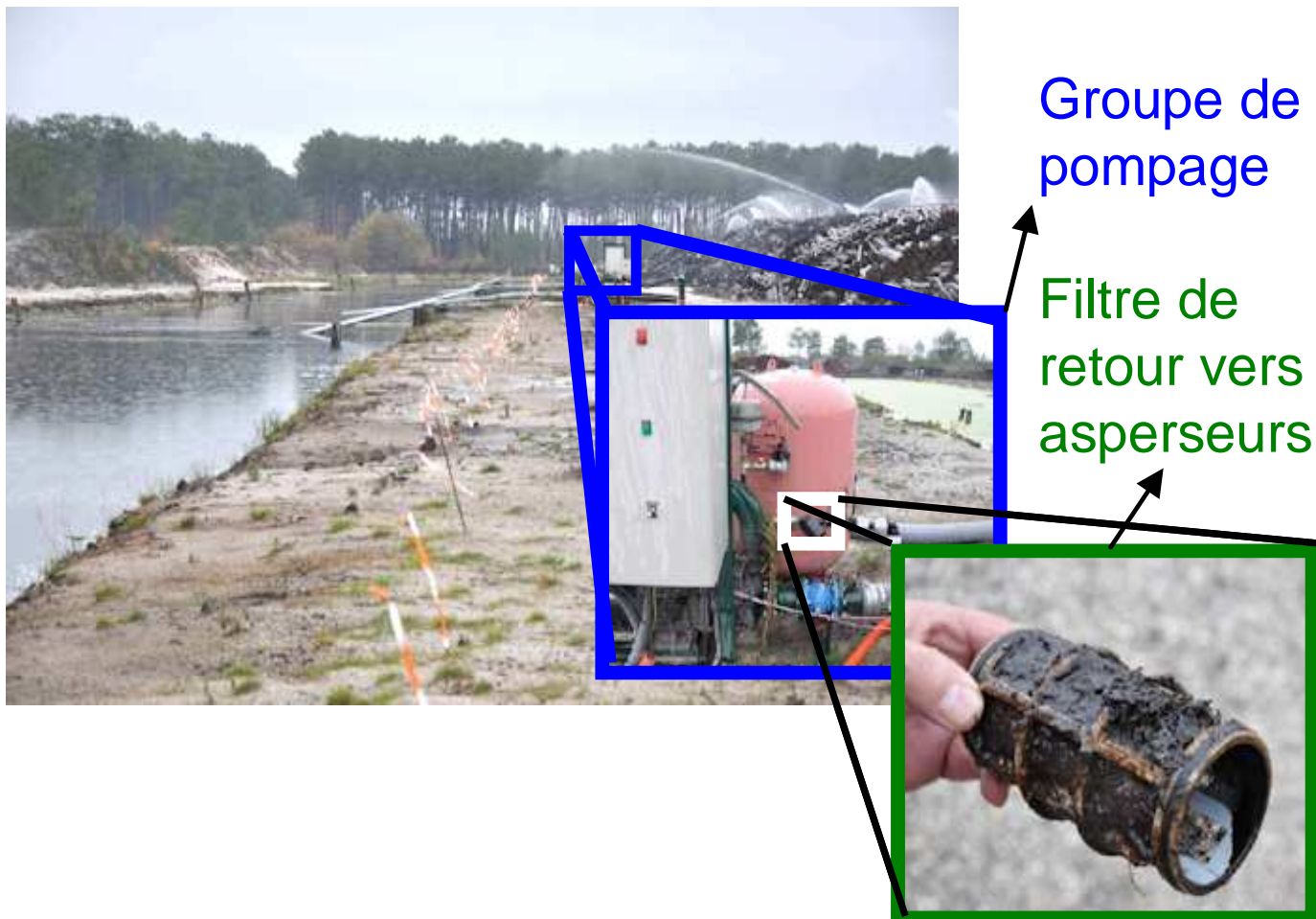


Figure 3 : Aperçu du site de stockage du Barp présentant le système d'arrosage des piles de rondins. Deux vues de détail (encadrements bleu et vert) situent le filtre dans lequel nous avons observé des rhizomorphes qui ont servi à une tentative d'analyse dans le cadre de la tâche 4.

Des prélèvements d'une trentaine de rondelle de 2 cm d'épaisseur (figure 4) ont été effectués sur le site le 30 novembre 2010. Ces rondelles ont été mises en incubation en hygrométrie saturante en chambre climatique en vue de faire fructifier rapidement les champignons présents à des fins d'identification morphologique. L'évolution de ces échantillons a été observée conjointement par les mycologues INRA et FCBA. L'identification morphologique macroscopique et microscopique aurait permis de vérifier les conclusions de l'analyse moléculaire mais aucun développement n'a été obtenu.



Figure 4 : Echantillonnage de tranches de rondins à la tronçonneuse sur le site de stockage de la CAFSA au Barp

Les zones observées et les échantillons prélevés correspondaient à des zones réparties sur l'ensemble du site de manière à suivre l'évolution moyenne de la qualité des bois stockés. Nous avons prévu de réaliser aussi des prélèvements et observations de manière ciblée sur des zones présentant un aspect inquiétant des bois mais aucun cas de ce genre n'a été

détecté avant la planification en novembre 2011 de la campagne d'échantillonnage finale de janvier 2012 (celle-ci devait initialement être réalisée en novembre).

Nous n'avons donc pu récolter directement sur site ou après incubation de rondelles des isolats spécifique du site pour les espèces ciblées (l'armillaire et l'hypholome) dans la phase préparatoire de ce projet. Pour les tâches ultérieures, nous avons donc travaillé avec des isolats de mycothèques et divers isolats naturels issus d'autres projets.

4.2 Tâche 2 : Mise au point de l'outil moléculaire de détection de l'hypholome.

L'ensemble des analyse ADN réalisées dans ce projet reposent sur le principe de la PCR (détaillé de manière didactique à l'adresse web suivante : <http://www.ilm.pf/PCR>) : deux courts fragments d'ADN synthétiques viennent s'accrocher à une zone cible pour laquelle ils ont été conçus au sein de l'ADN total présent dans l'échantillon à analyser et y amorcent la copie exponentielle de cette zone cible, de sorte qu'elle s'accumule en très grande quantité au point de devenir très aisément visualisable par une simple électrophorèse sur gel en présence d'un colorant de l'ADN.

Des protocoles étant utilisés en routine pour la détection des différentes espèces d'Armillaire par le LNPV (Laboratoire National de la Protection des Végétaux) de Nancy . Ils ont fait l'objet d'un simple ajustement par l'INRA BioGeCo pour rendre leur utilisation plus immédiate, (voir tâche 3).

Une amorce spécifique du genre Hypholome a été définie *in silico* par l'équipe FCBA Biotechnologie au départ de l'alignement des 46 séquences de l'ITS (ADN ribosomal) trouvées dans la banque de données Genbank en 2010. Une séquence consensus global propre au genre *Hypholoma* a été définie en tenant compte de la séquence du génome complet de la levure *S. cerevisiae* et des séquences ITS d'une quarantaine d'espèces de champignon du bois étrangères au genre Hypholome. Une amorce a été recherchée manuellement à l'aide du logiciel BioEdit de manière à donner en conjonction avec l'amorce universelle ITS1-F (Gardes et Bruns, 1993) un produit PCR de 600 à 900 pb chez les diverses espèces d'hypholome. L'amorce obtenue a été pré-validée par interrogation des bases de données (deux analyses avec l'outil PrimerBlast, la première analyse étant faite avec une recherche sur l'ensemble des Basidiomycètes représentés dans la base de données ADN Genbank et la seconde sur tous les champignons, ces requêtes étant réitérées régulièrement pour tenir compte des mises à jour de bases de données et montrant une excellente spécificité pour le genre Hypholome).

Nous avons utilisés les ADN de quatre isolats naturels d'*Hypholoma fasciculare* obtenus de Jennifer A. Evans, (Université de Canterbury, Evans et al. 2008; identifiants JHC002065, GTWV2, DD2 et DD3). La figure 5 montre l'empreinte ADN obtenue, identique pour les quatre isolats et conforme à la prédiction *in silico* basée sur la séquence ADN consensus utilisée pour concevoir l'amorce PCR spécifique du genre Hypholome.

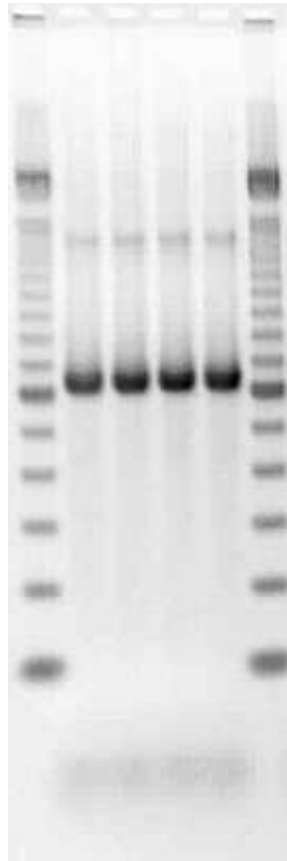


Figure 5 : Empreinte ADN observée après électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR ITS-1F / HyphoRev2010 de 4 souches de références d'*Hypholoma fasciculare* de mycothèques (correspondant aux quatre puits d'allure identique sur la photo). Les deux puits extrêmes contiennent un marqueur de taille comportant un fragment toutes les 100 pb. L'analyse sur séquenceur capillaire de ces produits PCR rendus fluorescents par l'emploi d'une amorce marquée a précisé la taille du fragment majoritaire obtenu (635 +/- 5 pb) et que le fragment mineur observé plus haut vers 1 000 pb est artéfactuel (très léger manque de spécificité pouvant être résolu par ajustement des conditions réactionnelles de la PCR).

4.3 Tâche 3 : Test des outils moléculaires et lien entre croissance des champignons et perte de masse du bois infecté en culture pure (essai EN 113)

4.3.1 Essais d'inoculation d'isolats des espèces cibles sur éprouvettes de bois et culture en laboratoires en conditions normalisées EN113

Afin de préciser la méthodologie de l'analyse ADN en testant l'efficacité des tests disponibles et l'influence de quelques variantes de protocoles, nous avons réalisé l'analyse d'échantillons très divers, provenant à la fois de spécimens fongiques purs et identifiés de manière certaine (spécimens de mycothèques), de bois infecté en conditions contrôlée et de quelques échantillons de terrain. Des isolats fongiques de référence ont été cultivés en chambre climatique en conditions stériles sur milieu de culture mycologique en présence d'une éprouvette de bois (pin sylvestre, bloc de 25 x 50 x 15 mm) stérilisée par irradiation selon les prescriptions de la norme EN113 relative aux essais de capacité de dégradation du bois par des champignons de référence (précisément identifiés et imposés par la norme, dont un isolat FCBA de *Coniophora puteana* que nous avons inclus dans les témoins de notre expérimentation). Dans ce type d'essai normalisé, la perte de masse du bois exposé aux champignons est suivie au cours du temps comme indicateur de la susceptibilité du type de bois (différentes essences, présence ou non d'un traitement de protection du bois) aux différents champignons.

Tableau 1 : Liste des échantillons fongiques de référence utilisés pour l'expérimentation en culture pure selon la norme EN113 afin de fiabiliser l'analyse ADN et observer sa sensibilité en relation avec la perte de masse sèche du bois (indicateur physique standard caractérisant l'altération du bois)

Champignon	Identifiant Souche	Source de l'inoculum
Armillaire	LTU08C7	<i>Armillaria ostoyae</i> , Isolats Aquitaine, B Lung, INRA Biogeco
	LGPM	<i>Armillaria mellea</i> , Isolats Aquitaine, B Lung, INRA Biogeco
	Sore BleuS2	<i>Armillaria ostoyae</i> , Isolats Aquitaine, B Lung, INRA Biogeco
Hypholome (<i>H. fasciculare</i>)	ATCC 34681	Mycothèque ATCC
	JHC 00206S	Jennifer A. EVANS, Université de Canterbury (Evans <i>et al.</i> 2008)
<i>C. puteana</i>	CP 579/1	Isolat de référence collecté sur le terrain et isolé par FCBA, décrit dans la norme européenne EN113

Nous avons réalisés (laboratoire FCBA Boutaut) ce type de culture avec différents isolats de référence des deux champignons cibles de notre projet (Armillaires et Hypholome), en parallèle à un témoin inoculé par un champignon de référence prévu par la norme EN113 (détaillé au tableau 1). Des éprouvettes ont été retirées du dispositif après des durées croissantes d'incubation (1, 3, 6 et 10 semaines) pour être pour moitié utilisées pour l'extraction d'ADN (broyage et congélation immédiate à la sortie de l'enceinte de culture) et, pour l'autre moitié, desséchées pour en déterminer la masse sèche. Quelques échantillons desséchés pour la pesée ont été récupérés pour estimer la facilité de l'analyse de l'ADN sur du mycélium dégradé.

Nous avons pris de multiples **précautions** pour nous mettre en situation de pouvoir fiablement évaluer ce que les méthodes mises en œuvre pourront donner en situation de diagnostic de terrain. Il s'agit plus particulièrement des deux points suivants : (1) tous les ustensiles et équipements utilisés pour le prélèvement, le conditionnement et le broyage des échantillons ont été scrupuleusement nettoyés et décontaminés entre le traitement de deux échantillons successifs (pour les analyses ADN, des consommables à usage unique ont été utilisés) et (2) le bois analysé a été débarrassé par décapage des fragments fongiques "concentrés" en surface de part le développement du champignon qui lui a été inoculé et des éventuelles contaminations par l'environnement.

Tableau 2 : Liste des 90 échantillons ayant fait l'objet de l'analyse ADN ciblant les Armillaires et Hypholome. Il s'agissait de 6 témoins non mis en contact avec du bois (mycélium pur), 3 échantillons de bois (présentant des traces de rhizomorphes d'armillaire) issus du site de stockage du Barp et 81 échantillons issus de la culture en conditions normalisées EN113 d'isolats de référence des différents champignons étudiés.

Type échantillon	Champignon	Nombre d'inoculum testés	Temps d'incubation	Nombre éprouvettes	Nombre total échantillons
Site Stockage	Inconnu (Armillaire suspecté)	3	-	-	3
Epreuves EN113 "vivantes"	Armillaire	3	4	3	36
	Hypholome	2	3	3	18
	<i>C. puteana</i>	1	3	3	9
Epreuves EN113 "étuvées"	Armillaire	3	1	3	9
	Hypholome	2	1	3	6
	<i>C. puteana</i>	1	1	3	3
Cultures pures	Armillaire				3
	Hypholome				2
	<i>C. puteana</i>				1
TOTAL					90

Tableau 3 : Liste des échantillons complémentaires d'Armillaire et Hypholome utilisés pour calibrer les tests ADN ciblant ces champignons (collectés par B. Lung).

Nom échantillon	Lieu de récolte	Date de récolte	Hôte	Champignon	Organe collecté
EARM001	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM002	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM003	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM004	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM005	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM006	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM007	Caguillouse	10/10/2007	pin/chêne	<i>A. gallica</i>	carpophore
EARM008	Trensacq	25/03/2008	pin maritime	<i>A. ostoyae</i>	palmettes
EARM009	Lue	26/03/2008	pin maritime	<i>A. ostoyae</i>	palmettes
EARM010	La Coubre	04/12/2009	pin maritime	<i>A. ostoyae</i>	palmettes
EARM011	La Coubre	04/12/2009	pin maritime	<i>A. mellea</i>	carpophore
EARM012	Campet	20/07/2010	pin maritime	Armillaire	palmettes
EARM013	Ars en ré	01/02/2011	pin pignon	Armillaire	palmettes
EARM014	Fd de Lizay	01/02/2011	pin d'alep	Armillaire	palmettes
EARM017	La Teste	09/12/2009	pin maritime	Armillaire	rhizomorphe
EHYPH001	St Antoine de Breuilh (24)	05/12/2009	prunus	Hypholome	carpophore
EHYPH002	Trensacq (40)	07/12/2009	pin maritime	Hypholome	carpophore
EHYPH003	Pierroton (33)	03/12/2009	pin maritime	Hypholome	carpophore
EHYPH004	Pierroton orphée	08/11/2010	pin maritime	Hypholome	carpophore

4.3.2 Modalités d'extraction de l'ADN (purification physico-chimique)

Manquant de recul sur la méthode d'extraction d'ADN optimale pour ce type d'échantillons, nous avons testés les deux alternatives les plus citées dans la bibliographie.

Chaque éprouvette ou rondelle de bois à échantillonner à été parfaitement décapée en surface par raclage à l'aide d'un scalpel pour supprimer toute trace externe de mycélium. L'obtention de copeaux fins de bois est réalisée à l'aide d'une perceuse (foret à bois de 4 mm de diamètre), l'éprouvette étant maintenue par un étau. Les copeaux sont récupérés sur un papier stérile à usage unique. Les pinces de l'étau, le foret et tout matériel métallique utilisé sont nettoyées (1) avec du détergent (Decon 90), (2) rincés à l'eau, (3) trempés dans l'alcool à 70% et (4) flambés. Les copeaux obtenus sont broyés à l'azote liquide.

Pour chaque échantillon, deux sous-échantillons de 10 mg (de bois ou de fragment fongique) ont été pesés et placés dans deux tubes séparés, l'un faisant l'objet d'une extraction d'ADN par un kit commercial (Invitek, pour extraction d'ADN végétal) selon les instructions du fabricant (mais avec une lyse à 65°C prolongée à 2 heures), sans extraction au chloroforme, L'autre tube a été extrait par une solution CTAB préparée par nos soins (avec une lyse à 55°C prolongée à 2 heures) suivie d'une extraction au chloroforme.

Le dosage des solutions d'ADN obtenues a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre de type Nanodrop à 8 canaux. Sur la base des valeurs obtenues au dosage une dilution est réalisée pour amener aux alentours de 10 ng/μL toutes les solutions d'ADN.

Ces ADN dilués sont utilisés pour la réalisation de PCR amorces spécifiques.

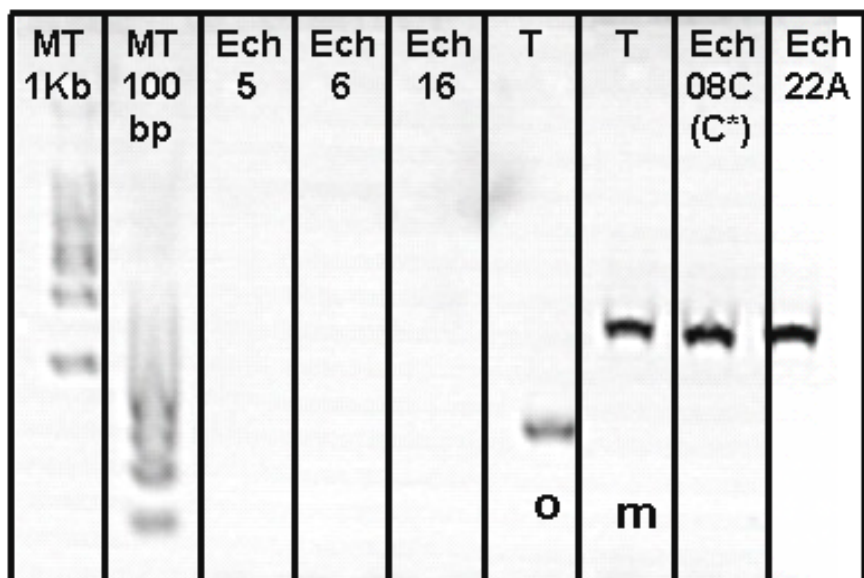
4.3.3 Modalités de l'analyse ADN (PCR) :

- deux alternatives ont été testées pour l'Armillaire :
 - multiplex "complet" (8 amorces : AgPR1F/R - AoPR1F/R – AITSF/R - Amel3/ITS4).
 - multiplex simplifié (4 amorces : AoPR1F/R - Amel3/ITS4).
- les conditions que nous avons décrites précédemment pour *Coniophora puteana* (amorce généraliste ITS1F et amorce spécifique FungMorC; Maitre et al., 2008)
- les conditions mises au point au début de ce projet pour l'Hypholome : ITS1F/HyphoRev2010.

Afin d'éprouver la spécificité de la PCR ciblant l'hypholome, de nombreux échantillons d'ADN fongique les plus divers ont été analysés : échantillons supplémentaires d'Armillaires (isolats INRA), ADN de Fomès, Bois contaminé du Barp, ADN issues du projet INRA "PRATIQUE" (culots de lavage de disques de papier filtre utilisés pour le piégeage de spores sur différentes stations forestières de Gironde).

Les signaux détectés avec les multiplex ciblant l'armillaire ont été calibrés à l'aide d'une quinzaine de témoins constitués de différents types d'échantillons d'Armillaire issus de l'Aquitaine collectés par l'INRA (voir tableau 3).

(1).



(2).

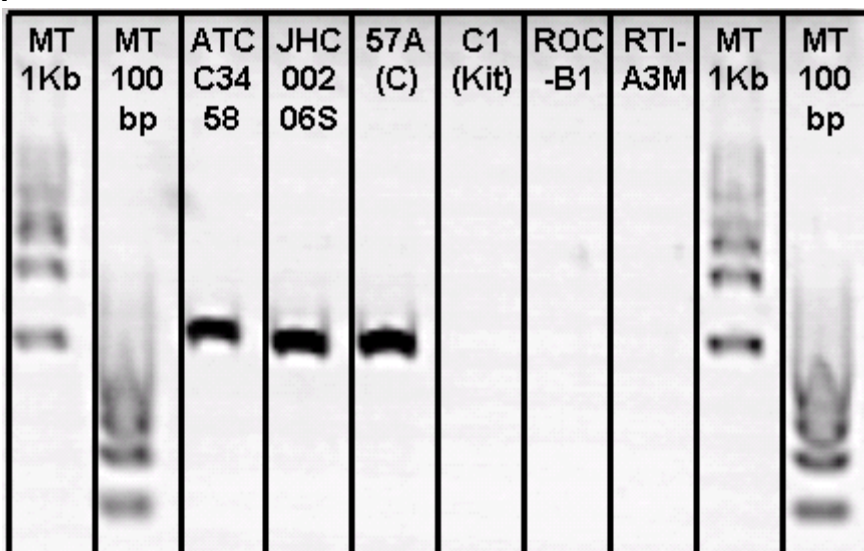


Figure 6 : Exemple de résultats d'analyse ADN : **(1)** Mise en évidence de l'Armillaire (o = *A. ostoyae*, m = *A. mellea*) pour deux témoins positifs (T) et deux échantillons (Ech). **(2)** Hypholome détecté dans les témoins positifs (échantillons de mycothèques ATCC3458 et JHC00206S) ainsi que dans l'échantillon expérimental "57A(C)" mais absent dans les trois suivants. Sur les deux photos, les colonnes marquées MT contiennent des marqueurs de taille permettant d'évaluer la taille des fragments d'ADN détectés par l'analyse.

4.3.4 Résultats

Les 90 échantillons (présentés au tableau 2) issus de l'essai EN113 ont été soumis à l'extraction d'ADN en vue de l'analyse ainsi que 21 témoins complémentaires (tableau 3)

Les résultats de la cinétique de perte de masse sont présentés dans le tableau 4. Les hypholomes et armillaires ne provoquent pas de perte de masse en 6 à 10 semaines bien que cultivés dans des conditions idéales de température, humidité et mise en présence d'un bois peu durable, et ce alors que les champignons couramment trouvés sur des ouvrages en bois détériorés, tels que le *Coniophora* utilisé en témoin dans notre essai, en détruisent 10% après 3 semaines et jusqu'à un tiers en 6 semaines. Visuellement, le mycélium est pourtant en croissance très rapide pour l'hypholome (très peu pour l'Armillaire, non présenté). Par ailleurs, les résultats d'extraction d'ADN à partir des éprouvettes montrent une forte augmentation de la présence de l'ADN de champignon (différence entre ADN total des éprouvettes inoculées et éprouvettes stériles - des témoins non inoculés - incubées dans les mêmes conditions (tableau 5).

Tableau 4 : Résultat du suivi de la perte de masse (en % de matière sèche) réalisé au cours de l'essai EN113 sur les éprouvettes inoculées ou non par un des quatre champignons utilisés (moyennes de 3 éprouvettes, et 3 éprouvettes x 2 inoculums pour *A. ostoyae* et *Hypholoma fasciculare*).

Perte masse %	Nombre de semaines en culture			
	1	3	6	10
<i>A ostoyae</i>	0	0	0	0
<i>A mellea</i>	0	0	0	0
Hypholome	0	0	0	interrompu
<i>Coniophora</i>	0	9	33	interrompu
Témoin	0	0	0	0

Tableau 5 : Progression du contenu en ADN des éprouvettes cultivées en conditions EN113 au cours du temps (teneur moyenne en ADN d'une extraction de 3 échantillons de 100 mg de bois dans 100 microlitres de tampon, déduction faite de la teneur en ADN du bois obtenu à partir des éprouvettes témoins non inoculées comparables).

Concentration moyenne ADN (ng/μl)	Durée d'incubation en culture EN113		
	1 semaine	3 semaines	6 semaines
Champignon			
Armillaires	0,0	4,8	34,3
<i>Coniophora</i>	5,4	10,0	49,8
Hypholomes	4,8	44,8	60,3

Quelques exemples de l'aspect visuel des résultats de l'analyse ADN (PCR) sont présentés en figure 6.

Concernant la première PCR multiplex Armillaire, la lecture des résultats obtenus sur les échantillons de référence (mycéliums purs et isolats naturels) est difficile, en particulier pour la taille des fragments amplifiés, alors que la modalité simplifiée fonctionne bien tout en donnant un résultat facile à interpréter. Elle permet de distinguer un niveau d'amplification haut correspondant à *Armillaria mellea* et un niveau bas correspondant à *Armillaria ostoyae* (cf. figure 6-(1)). Concernant la détection d'*A. mellea* sur les éprouvettes EN113, elle est systématique et de meilleure qualité pour les extractions à partir du Kit commercial. Même les échantillons étuvés (pour la détermination de la perte de masse sèche) présentent une amplification. Concernant la détection d'*A. ostoyae* sur les éprouvettes EN113, elle est moins systématique avec une forte différence entre les deux modalités d'extraction de l'ADN des mêmes échantillons avec le kit et au CTAB (dans une majorité de cas, le résultat est plus mauvais avec la méthode "manuelle" complexe au CTAB qu'avec le kit commercial simplifié). Aucune amplification n'est obtenue pour les échantillons à 1 semaine d'incubation. L'amplification est ensuite systématique (à une exception près) pour les extractions avec le kit pour les temps 3 et 6 semaines.

La détection a été tentée sur un échantillon de rhizomorphes récupérés dans un filtre du système dispersion du site et sur une rondelle de bois présentant des rhizomorphes, mais sans aucun succès (pas de signal ADN obtenu).

Concernant la détection de l'Hypholome, elle est obtenue pour tous les échantillons inoculés avec de l'hypholome et pour les deux méthodes d'extraction de l'ADN. Aucun signal n'a été obtenu pour les extraits d'ADN d'autres champignons.

La détection de *Coniophora* a été obtenue pour tous les points de la cinétique de développement (dès 1 semaine d'incubation), mais elle n'est pas systématique. Plusieurs échantillons extraits au CTAB n'ont rien donné. Un seul des échantillons étuvés a donné un signal et celui-ci était très faible.

L'ensemble des résultats est résumé au tableau 6.

Tableau 6 : Résumé des résultats de détection ADN dans les éprouvettes de bois cultivées dans l'essai EN 113 (données de perte de masse : voir tableau précédent) avec ou sans inoculation par les champignons indiqués dans la première colonne. 0 = absence de signal, +/- = détection d'un signal faible pour certaines répétitions et absent ou trop faible pour être détecté dans les autres répétitions, + = détection d'un signal clair de présence du champignon recherché.

Détection ADN Résultat PCR	Semaines d'incubation		
	1	3	6
<i>A. ostoyae</i>	+/-	+	+
<i>A. mellea</i>	+/-	+	+
Hypholome	+	+	+
<i>Coniophora</i>	+	+	+
Eau	0	0	0

4.4 Tâche 4 : Analyse en vraie grandeur sur le site de stockage CAFSA du Barp

4.4.1 Echantillonnage sur site

Le plan d'échantillonnage a été discuté avec Loïc Cotten, responsable technique de la CAFSA puis expliqué par L. Cotten et FCBA sur place à l'équipe des contremaîtres et ouvriers assurant le fonctionnement quotidien du site. Un protocole écrit par L. Cotten et FCBA leur a été transmis. Il s'agissait de prélever différents lots de bois pour chacun des types de bois (niveaux de qualité correspondant à différents niveau de dégradation du bois à son arrivée sur le site de stockage et à différents usages prévus par les acheteurs du bois). Dans chaque cas, il a été prévu de prélever et marquer des rondelles issues de rondins prélevés au moment du déstockage de la pile dans laquelle ils se trouvaient. Le tableau 7 détaille ces modalités. Dans le cas de prélèvements faits à une extrémité, une fois la première rondelle (celle dont une section était exposée à l'atmosphère pendant toute la durée du stockage, E1 en figure 7) découpée, une seconde rondelle (E2 en figure 7) était prélevée afin d'avoir un échantillon ne présentant pas de surface directement en contact avec l'atmosphère pendant le stockage. Pour les billons prélevés au sein des piles (par opposition à ceux prélevés en extrémités de piles), une rondelle a également été prélevée au centre du rondin afin de constituer un échantillon représentant le cœur du centre des piles (M1 en figure 7).

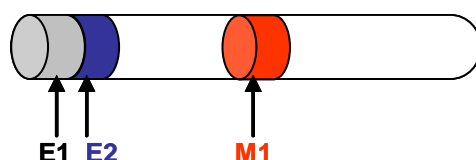


Figure 7 : Représentation schématique des différents types de rondelles découpées dans les rondins. E1 : extrémité "vraie" du rondin, présentant une section exposée à l'atmosphère pendant la durée du stockage. E2 : "sous-extrémité" ; rondelle immédiatement proche de E1 mais ne présentant aucune section exposée à l'atmosphère pendant le stockage; M1 : rondelle prélevée au centre du billon.

115 rondelles ont été prélevées sur 55 billons correspondant :

à trois catégories de bois à échantillonner (résumé au tableau 7) :

1. Le bois de qualité, arrosé (bois de qualité – BQ).
2. Le bois arrosé présentant des signes de bleuissement (bois bleui – BB).
3. Les rémanents stockés sur le même site sans arrosage (souches – S et bois pour plaque – Bp).

et trois localisations des billons dans la pile :

1. Extrémité de la pile (EP) : 30 billons prélevés (15 BQ et 15 BB)
2. Milieu/Centre de la pile (MP) : 15 billons prélevés (10 BQ et 5 BB)
3. Tas de bois rémanents (R) : 10 billons prélevés (5 S et 5 Bp)

Pour chaque rémanent présentant une forme éloignée de celle d'un billon, à défaut de rondelle, un morceau de quelques centimètres d'épaisseur a été découpée à la tronçonneuse.

Tableau 7 : Récapitulatif du plan de prélèvement des échantillons sur site. Qualité : BQ = bois de qualité ; BB = bois bleui ; S = souches ; Bp = bois pour plaquettes. Localisation sur le site : EP = *Extrémité de pile* ; MP = cœur de pile ; R = tas de bois rémanents (s'agissant de différents types de fragments de bois, ils forment un tas désordonné plutôt que des empilements).

Zone Pile	Qualité Bois	Propriétaire	n° secteur	Nbre billons		Numeros billon	Rondelles	Total Ligne	
EP	BQ	Audy	J2	3	15	1-2-3	E1-E2-M1	9	45
EP	BQ	Mourlan	J1	3		6-7-8	E1-E2-M1	9	
EP	BQ	Mourlan	I3	3		9-10-11	E1-E2-M1	9	
EP	BQ	Sif	I1	2		16-17	E1-E2-M1	6	
EP	BQ	Sif	H1	2		18-19	E1-E2-M1	6	
EP	BQ	Goujon	B2	2		22-23	E1-E2-M1	6	
EP	BB	Beynel	G2	3	15	26-27-28	E1-E2-M1	9	45
EP	BB	Beynel	E2	4		29-30-31-32	E1-E2-M1	12	
EP	BB	SKCDP	C2	4		38-39-40-41	E1-E2-M1	12	
EP	BB	SKCDP	D1	2		42-43	E1-E2-M1	6	
EP	BB	SKCDP	D2	2		44-45	E1-E2-M1	6	
MP	BQ	Audy	J2	2	10	4-5	M2	2	10
MP	BQ	Mourlan	J1	2		12-13	M2	2	
MP	BQ	Mourlan	I3	2		14-15	M2	2	
MP	BQ	Sif	H1	2		20-21	M2	2	
MP	BQ	Goujon	B2	2		24-25	M2	2	
MP	BB	Beynel	G2	3	5	33-34-35	M2	3	5
MP	BB	Beynel	I5	2		36-37	M2	2	
R	S			5	10	1-2-3-4-5	E1	5	10
R	Bp			5		6-7-8-9-10	E1	5	
									115

L'ensemble des rondelles ont été prélevées par la CAFSA en début de matinée le 03 février 2012 (période de gel). Les échantillons ont été stockés sous un hangar non chauffé de la CAFSA jusqu'au 7 février 2012 et ce pour cause de déménagement côté FCBA. Puis, ils ont été transférés dans une chambre froide à 2°C du site FCBA de Pierroton.

Les échantillons ont été vérifiés avant d'effectuer le sous-échantillonnage (prélèvement de sciure). Ce qui a permis de constater (tableaux 8 et 9) que des rondelles étaient absentes, ou identifiées de manière ambiguë (plusieurs rondelles distinctes portant un même numéro). Les rondelles ambiguës ont été retirées du dispositif. Il en résulte donc que des 115 rondelles prévues, seulement 103 ont été utilisées pour l'analyse ADN (115 – 8 absentes – 4 ambiguës = 103 rondelles).

Tableau 8 : Récapitulatif des résultats de la vérification effectuée en préalable à l'analyse ADN sur les prélèvements effectués sur site par la CAFSA. Aspects relatifs au conditionnement en sacs. Les mentions "-1" et "+1" correspondent à la correction du décompte par ligne des rondelles de type E1 et E2 suite à la présence d'une rondelle E2 dans un sac ne devant contenir que des rondelles E1.

Sacs	Nombre de rondelles/sac						Total
6 sacs de rondelles E1 dont 1 sac contenant une rondelle E2	5 (-1)	2	5	9	7	10	38 rondelles E1
4 sacs de rondelles E2	13	2	6	6	(+1)		28 rondelles E2
6 sacs de rondelles M1	6	2	6	5	5	4	28 rondelles M1
3 sacs de rondelles M2	6	4	3				13 rondelles M2
19 sacs	107 rondelles						107 rondelles

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats de la vérification effectuée en préalable à l'analyse ADN sur les prélèvements effectués sur site par la CAFSA. Aspects relatifs au marquage des échantillons à la peinture forestière.

Rondelles absentes	31.E1	31.E2	31.M1	32.E1	32.E2	32.M1	33.M2	34.M2	8
Rondelles ambiguës	20.M2	21.M2	24.M2 noté 20.M2		25.M2 noté 21.M2				4
TOTAL									12

Le fait de mettre dans un même sac toutes les rondelles de même type (E1, E2, M1 et M2) peut mener à avoir des contaminations croisées entre échantillons. L'ensachage aurait idéalement du être fait individuellement pour chaque rondelle. Le prélèvement par temps de gel et le stockage en chambre froide (les champignons du bois ciblés, particulièrement l'Armillaire, ne poussent pas de manière significative lorsque la température est en dessous de 10°C) a permis de limiter fortement l'évolution des échantillons entre leur prélèvement sur le terrain et leur analyse. Le décapage de la surface des échantillons avant le prélèvement de sciure a permis d'éliminer les éventuelles contaminations liées au contact physique entre échantillons.

4.4.2 Sous-échantillonnage des rondelles sous forme de sciure de bois :

Les prélèvements sur les rondelles se sont réalisés individuellement. Tous les instruments et les surfaces ont été nettoyés entre deux échantillons. Passage à l'alcool à 70% et instruments flambés (alcool 95% + flamme). Après le prélèvement de la sciure, les rondelles sont ensachées individuellement dans des sacs propres, et étiquetées à l'extérieur du sac. Sur chaque rondelle, une observation des deux faces de la rondelle est effectuée pour déterminer la zone de prélèvement. Une photo de chaque face de la rondelle est faite ainsi qu'une photo après prélèvement. Cela permettra de revenir sur les photos et les rondelles en cas de présence de champignon.

La zone de prélèvement (zone de forage) est déterminée de la façon suivante (modalités définies sur avis de B Lung au cours d'un examen préalable des échantillons de bois bruts) :

- Présence de mycélium sur la surface.
- Présence de lignes noires (black lines, voir figure 10-B3). Ces lignes noires sont produites par l'Armillaire (trait noir fin et irrégulier).
- Evitement des zones complètement bleues voire noires, ainsi que les zones où le bois est fortement ramolli.

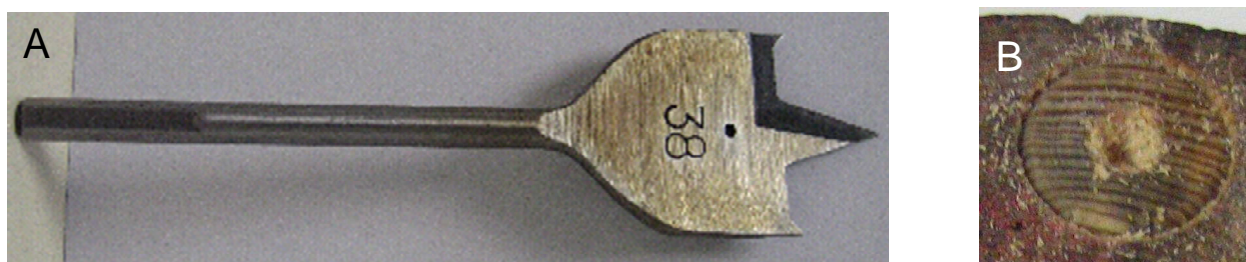


Figure 9 : A Mèche large de 38 mm utilisée pour le décapage de la surface de travail autour du point d'échantillonnage de la sciure destinée à l'analyse ADN.

B Présentation de l'état de surface obtenu après le décapage par la mèche large de 38 mm. Le trou central formé sera utilisé pour produire et récupérer la sciure à partir de laquelle l'ADN sera extrait puis analysé (cf. figure 10).

Un premier forage, avec des forets bois large de 35 mm ou 38 mm, est effectué au départ pour éliminer le bois en surface de la rondelle (cf. figure 9). Cette première étape permet d'obtenir une zone de travail propre pour effectuer le prélèvement.

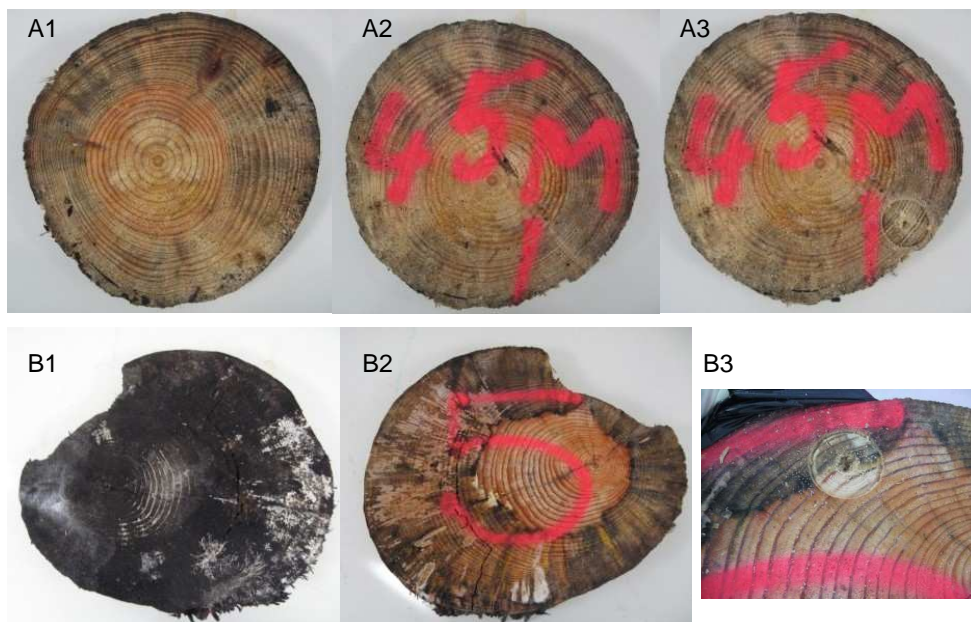


Figure 10 : Aspect des rondelles échantillonnées en janvier 2012 pour l'analyse ADN. A1 à A3 : cas d'une rondelle prélevée au centre d'un billon. A1 = recto ; A2 = verso portant la marque à la peinture forestière, avant le prélèvement de sciure ; A3 = idem A2 mais après prélèvement de la sciure effectué à la frontière entre une auréole pâle et une zone de bois sombre (cercle de décapage et trou central en bas à droite juste à côté du trait de peinture vertical). B1 à B3 : cas d'une rondelle prélevée à l'extrémité d'un rémanent. B1 = recto = face extérieure exposée aux intempéries, noircie par l'humidité et portant des marques de mycélium blanchâtre (la photo est bien en couleurs !) ; B2 = verso = face interne protégée des intempéries avant prélèvement de sciure et B3 = idem B2 après prélèvement (gros plan sur la zone du prélèvement située à la frontière entre le bois clair et le bois sombre).

La sciure produite par ce premier foret est projetée naturellement à l'extérieur de la zone de travail et elle est ensuite aspirée à l'aide d'un aspirateur.

Trois autres forages, avec un foret à bois de 4 mm, sont ensuite réalisés, parallèlement à la surface, dans le trou central produit par le foret bois large (cf. figure 11). Un premier forage est fait puis le sens de rotation du foret est inversé pour dégager délicatement le foret de la zone de travail et ainsi éviter que la sciure ne s'échappe de la zone de travail propre.

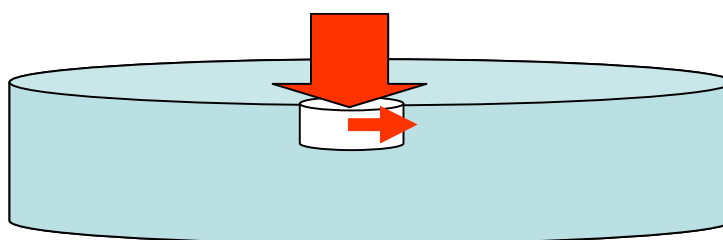


Figure 11 : Représentation schématique de l'orientation des deux types de mèche à bois utilisées sur la perceuse produisant la sciure destinée au broyage en vue de l'extraction puis de l'analyse de l'ADN des rondelles (une rondelle représentée en bleu) de billons issus du site de stockage sous aspersion. Un premier foret large (flèche rouge verticale) est utilisé pour décaper la surface extérieure de la rondelle. Ensuite, un foret à bois de 4 mm (flèche rouge horizontale) est utilisé pour prélever de la sciure dans une direction perpendiculaire à partir du trou central (cylindre blanc) laissé par le décapage.

La sciure est récoltée dans la zone de travail grâce à une pince stérile et disposée dans un tube 15 ml immédiatement plongé dans l'azote. Les trois forages sont réalisés les uns après les autres en récoltant la sciure entre chaque forage, car sinon la sciure déborde de la zone de travail et pourrait être contaminée.

Le foret utilisé est pour « bois normal » et non pour « bois dur » car avec un foret spécial bois dur, la sciure est plus grossière et donc moins facile à broyer.

4.4.3 Sous-échantillonnage de la sciure pour analyses moléculaires :

Pour chaque échantillon de sciure de rondelle, un sous-échantillon de 150 mg de sciure est réalisé. Pour chaque échantillon, la sciure est déposée dans un tube safe-lock de 2 ml (Eppendorf) en présence de 2 billes en inox de 5 mm de diamètre (Qiagen). La spatule est nettoyée à l'alcool 70% et flambée à l'alcool 95% entre 2 échantillons.

Les tubes 2 ml sont plongés dans l'azote liquide et un broyage est effectué grâce à un vibro-broyeur (MM301, Retsch) pour obtenir une poudre fine. Il est possible d'avoir de temps en temps des morceaux plus ou moins grossiers en fonction de la finesse de la sciure prélevée au départ.

4.4.4 Extraction de l'ADN

Les 103 sous-échantillons ont été extraits avec le kit d'extraction « DNeasy Plant mini Kit » (Qiagen), en utilisant le robot QIACUBE.

Le volume de tampon AP1 a été ajusté proportionnellement au poids de l'échantillon (4 µl de tampon pour chaque mg d'échantillon de bois extrait). Le temps de lyse est passé à 30 min au lieu de 10 min. L'élution finale a été faite avec deux fois 50 µl de tampon AE.

Le dosage de l'ADN n'a été effectué que pour un sous-ensemble de 26 échantillons tirés au hasard par un spectrophotomètre Nanodrop monocanal (résultats présentés au tableau 10). Les concentrations obtenues sont en moyenne inférieures à 10 ng/µl et donc les échantillons ADN sont utilisés bruts pour la réalisation de PCR.

La pureté de l'ADN est très variable avec un ratio d'absorbance à 260/280 nm variant de 2 à un peu moins de 1 (la valeur doit idéalement être proche de 1,8 à 2 pour un ADN qui pourra avec certitude être analysé par PCR).

4.4.5 Résultats de l'analyse ADN

Différents types de PCR ont été réalisés selon les modalités décrites au tableau 11.

Les produits PCR ont été observés à l'issue d'une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, TBE 0,5 X, à 4 V/cm, pendant 2 heures.

Malgré la qualité très variable de l'ADN, la très grande majorité des extraits ont pu être amplifiés avec le couple d'amorces généralistes ITS1 – ITS4 mettant en évidence l'ADN ribosomal de tous les eucaryotes (champignons et arbre ...) et servant donc de contrôle qualité pour les ADN. Seuls 13 échantillons n'ont rien donné (38.E2, 43.E1, 43.E2, 45.E2, 01.RS, 02.RS, 03.RS, 04.RS, 05.RS, 06.RBp, 07.RBp, 08.RBp, 10.RBp). La presque totalité des échantillons issus des rémanents n'ont pas amplifiés.

Une autre PCR a été réalisée avec les amorces ITS1-F – ITS4-B pour tester la présence d'ADN de champignons Basidiomycètes (toutes espèces confondues, y compris armillaire et hypholome) sur l'ensemble des échantillons. Une grande partie des échantillons (71 échantillons) ont été amplifiés (32 sans amplification).

Tableau 10 : Résultat de dosage spectrophotométrique des 26 premiers échantillons d'ADN obtenus à partir du site de stockage du Barp

Echantillons	Concentration en ADN (ng/µl)	A260	A280	Ratio 260/280
1_E1	6,2	0,124	0,061	2,04
1_E2	7,8	0,156	0,078	2,01
1_M1	5,9	0,118	0,064	1,86
2_E1	7,6	0,151	0,074	2,03
2_E2	5,2	0,103	0,051	2,02
2_M1	4,2	0,083	0,046	1,81
3_E1	9,4	0,187	0,142	1,32
3_E2	6	0,12	0,059	2,03
3_M1	5,4	0,108	0,071	1,53
6_E1	8,2	0,163	0,086	1,9
6_E2	3,9	0,078	0,039	2,01
6_E2	3,7	0,073	0,045	1,64
6_M1	4	0,081	0,054	1,51
01_R	27,7	0,553	0,391	1,42
01_R	27,6	0,551	0,392	1,4
01_R	28,9	0,578	0,421	1,37
02_R	8,8	0,176	0,134	1,32
03_R	21,6	0,432	0,322	1,34
03_R	7,6	0,151	0,146	1,03
04_R	8,1	0,161	0,164	0,98
05_R	11,3	0,226	0,162	1,39
06_R	40,1	0,801	0,638	1,26
07_R	6,8	0,136	0,09	1,5
08_R	6,9	0,138	0,1	1,38
09_R	4,8	0,096	0,067	1,45
10_R	16,1	0,321	0,251	1,28

Tableau 11 : Matrice = ADN utilisé au départ de la PCR. Pour les lignes 6 à 10, il s'agit des produits d'une première PCR. Le nombre total d'échantillons testés est de 103. Le nombre total d'échantillons positifs est indiqué dans la dernière colonne. Les points d'interrogation signalent les lignes du tableau correspondant à des cas de signaux positifs au moins partiellement artéfactuels (faux positifs) avec entre parenthèses le nombre de cas positifs probables (correspondant en majorité à une présence du champignon ciblé en très faible quantité).

PCR	Matrice	Amorce Forward	Amorce Reverse	Espèce(s) cible	Tailles attendues (pb)	Nombre positifs
1	extraits bruts	ITS1	ITS4	Eucaryotes	600	90
2	extraits bruts	ITS1-F	ITS4-B	Basidiomycètes	600 à 850	71
3	extraits bruts	ITS1-F	HyphoRev2010	Hypholome	600 à 800 +1000	9
4	extraits bruts	AMEL3	ITS4	<i>Armillaria mellea</i>	631	0
5	extraits bruts	AoPR1F	AoPR1R	multiplex Armillaire simplifié (<i>ostoyae + mellea</i>)	283	0
		AMEL3	ITS4		631	0
6	Produits PCR ITS1/ITS4	AR1	AR2	Armillaires multiples	690-724	94 ??
7	Produits PCR ITS1/ITS4	ITS1-F	HyphoRev2010	Hypholome	600 à 800 +1000	94 ??
8	Produits PCR ITS1/ITS4	AoPR1F	AoPR1R	multiplex Armillaire simplifié (<i>ostoyae + mellea</i>)	283	91 ??
		AMEL3	ITS4		631	91 ??
9	Produits PCR ITS1-F/ITS4-B	ITS1-F	HyphoRev2010	Hypholome	600 à 800 +1000	97 ?? (26)
10	Produits PCR ITS1-F/ITS4-B	AoPR1F	AoPR1R	multiplex Armillaire simplifié (<i>ostoyae + mellea</i>)	283	99 ?? (2)
		AMEL3	ITS4		631	99 ?? (22)

Références bibliographiques des tests PCR:

- AR1 + AR2 sur produits ITS1/ITS4 : Lochman *et al.* 2004
- ITS1-F + HyphoRev2010 : ce travail
- AoPR1F + AoPR1R sur produits ITS1-F/ITS4-B : Prodorutti *et al.* 2009
- AMEL3 + ITS4 : Sicoli *et al.* 2003

Une **PCR secondaire utilisant les produits PCR ITS1/ITS4** comme matrice a été réalisée **avec les amorces AR1/AR2**. Le taux de positifs est sensiblement identique à celui de la PCR primaire ITS1/ITS4 sauf que **cette fois, certains échantillons issus de rémanents ont été amplifiés (05.RS, 07.RBp, 08.RBp, 09.RBp, 10.RBp)**.

La **PCR ciblant l'Hypholome** utilisant les amorces ITS1-F – HyphoRev2010, a montré une amplification assez faible et ce uniquement pour neuf échantillons. En ce qui concerne le billon n°19, le résultat est particulièrement significatif puisque l'hypholome est détecté à la fois à l'extrémité du billon et au centre du billon.

Une **PCR spécifique de l'*Armillaria mellea*** avec les amorces AMEL3/ITS4 a été réalisée mais n'a donné aucune amplification. Cette PCR a été effectuée pour pouvoir distinguer les cas où le traitement en multiplex avec *A. ostoyae* affecterait le diagnostic (interaction aspécifique des amorces modifiant le signal obtenu).

Tableau 12 : Détail simplifié des résultats (1/0 = présence/absence de fragment ADN amplifié par les PCR effectuées sur extrait d'ADN bruts ou produits d'une première PCR (pdts ITS1/ITS4 ou ITS1F/ITS4B). Les signaux faibles ou flous ont pu être considérés, éventuellement à tort, comme négatifs ou positifs considérant l'information de base plus détaillée (multiplicité, netteté et position des bandes ADN).

(partie 1 de 2)

Zone	Qualité	Secteur	Numero	Type	extraits bruts		extraits bruts				Pdts ITS1/ITS4		Pdts ITS1F/ITS4B	
					ITS1	AR1	ITSF	ITS1F	AMEL3	AoPR 1F/1R	ITS1F	AoPR 1F/1R	ITS1F	AoPR 1F/1R
					ITS4	AR2	ITS4B	Hypho	ITS4	AMEL3 ITS4	Hypho	AMEL3 ITS4	Hypho	AMEL3 ITS4
EP	BQ	J2	01	E1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	02	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	03	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	06	E1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	07	E1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	08	E1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	09	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	10	E1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
EP	BQ	I3	11	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I1	16	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I1	17	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	H1	18	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	H1	19	E1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	B2	22	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	B2	23	E1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	26	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	27	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	28	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	E2	29	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	E2	30	E1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	38	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	39	E1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	40	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	41	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D1	42	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D1	43	E1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
EP	BB	D2	44	E1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D2	45	E1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	01	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	02	E2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	03	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	06	E2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	07	E2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	08	E2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	09	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	10	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	11	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I1	16	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I1	17	E2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	H1	18	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	H1	19	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	B2	22	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	B2	23	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	26	E2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	27	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	28	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	E2	29	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	E2	30	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	38	E2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
EP	BB	C2	39	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	40	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	41	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1

Tableau 12 : suite et fin (partie 2 de 2)

Zone	Qualité	Secteur	Numero	Type	extaits bruts		extaits bruts				Pdts ITS1/ITS4		Pdts ITS1F/ITS4B	
					ITS1	AR1	ITSF	ITS1F	AMEL3	AoPR 1F/1R	ITS1F	AoPR 1F/1R	ITS1F	AoPR 1F/1R
					ITS4	AR2	ITS4B	Hypho	ITS4	AMEL3 ITS4	Hypho	AMEL3 ITS4	Hypho	AMEL3 ITS4
EP	BB	D1	42	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D1	43	E2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
EP	BB	D2	44	E2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D2	45	E2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EP	BQ	J2	01	M1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	02	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J2	03	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	06	M1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	07	M1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	J1	08	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	09	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	10	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I3	11	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I1	16	M1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	I1	17	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	H1	18	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	H1	19	M1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	B2	22	M1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BQ	B2	23	M1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	26	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	27	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	G2	28	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	E2	29	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	E2	30	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	38	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	39	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	40	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	C2	41	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D1	42	M1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D1	43	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D2	44	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
EP	BB	D2	45	M1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
MP	BQ	J2	04	M2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
MP	BQ	J2	05	M2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
MP	BQ	J1	12	M2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
MP	BQ	J1	13	M2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
MP	BQ	I3	14	M2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
MP	BQ	I3	15	M2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
MP	BB	G2	35	M2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
MP	BB	I5	36	M2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
MP	BB	I5	37	M2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
R	Bp	r	06	RBp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R	Bp	r	07	RBp	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
R	Bp	r	08	RBp	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
R	Bp	r	09	RBp	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
R	Bp	r	10	RBp	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
R	RS	r	01	RS	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
R	RS	r	02	RS	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
R	RS	r	03	RS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
R	BQ	r	04	RS	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
R	BQ	r	05	RS	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Total positifs apparents					90	94	71	9	0	0	94	91	97	99

Une **PCR multiplex spécifique de l'*Armillaria mellea*** (niveau d'amplification haut) **et l'*Armillaria ostoyae*** (niveau d'amplification bas) avec les amorces AoPR1F – AoPR1R et AMEL3 – ITS4 a été réalisée mais il n'y a aucune amplification.

Deux PCRs secondaires ont ensuite été réalisées avec les produits PCR ITS1/ITS4 :

- Une PCR **secondaire ciblant l'hypholome** dont les résultats sont sensiblement les mêmes que pour la PCR ITS1/ITS4 en taille (ce qui est attendu en présence d'hypholome) mais aussi de patron (nombre de bandes, figure 12), ce qui est troublant et en faveur d'une simple recopie des ADN issus de la première PCR plutôt que d'une réelle mise en évidence de l'hypholome. Et comme pour la PCR AR1/AR2, les rémanents ont donné un signal.
- Une PCR **multiplex spécifique des Armillaires *mellea* et *ostoyae*** : les résultats sont les mêmes que pour la PCR primaire ITS1/ITS4 sauf pour l'échantillon 08.RBp **qui a été négatif dans toutes les PCR primaires et positif dans toutes les PCR secondaires (pour l'ensemble des champignons cibles).**

Pour ces deux dernières PCR, le reste des produits PCR de quelques échantillons (30) a été ré-analysé sur gel avec un temps de migration plus long pour mieux discriminer la taille des bandes. Les résultats sont plus précis. Le nombre de bandes observées pour chaque échantillon est semblable ou supérieur à celui des bandes observées lors de la première migration sur gel. Ainsi deux bandes qui étaient très proches après la première migration peuvent être discriminées grâce à l'augmentation du temps (et donc de la distance) de migration.

Les huit échantillons suivants n'ont montré aucune amplification pour l'ensemble des PCR primaires et secondaires citées plus haut: 32.E2, 43.E1, 43.E2, 45.E2, 02.RS, 03.RS, 04.RS, 06.RBp.

Deux PCRs secondaires ont enfin été réalisées avec les produits PCR ITS1-F/ITS4-B :

- Une PCR **secondaire ciblant l'hypholome** pour laquelle seuls 6 échantillons n'ont donné aucun signal (01.RS, 45.E2, 03.RS, 05.RS, 06.RBp, 10.RBp). Il y a 26 échantillons qui ont amplifié une bande correspondant à l'hypholome. Les 6 individus qui avaient amplifiés à la bonne taille lors de la PCR spécifique de l'*Hypholome* avec les extraits ADN bruts sont parmi les 26 précités. Il est plus facile de faire la distinction entre les résultats de la PCR ITS1-F/ITS4-B et ceux de la PCR secondaire ciblant l'hypholome car les tailles attendues sont plus contrastées qu'avec la PCR ITS1/ITS4.
- Une PCR **multiplex spécifique des Armillaires *mellea* et *ostoyae***, pour laquelle la quasi-totalité des échantillons donnent un résultat positif. Deux individus donnent un signal à la bonne taille pour *Armillaria ostoyae* (01.M1 et 23.E1). Et 22 échantillons ont une bande d'environ 630 pb correspondant à *Armillaria mellea* : 01.E1, 08.M1, 22.M1, 23.E1, 23.E2, 27.E1, 27.E2, 27.M1, 39.E2, 29.E1, 29.M1, 40.M1, 41.M1, 42.E1, [43.E1](#), 15.M2, 44.E1, 35.M2, 44.E2, 45.E1, [01.RS](#), 08.RBp. Remarquons que parmi ces derniers échantillons positifs pour l'*Armillaria mellea*, il y en a deux ([43.E1](#) et [01.RS](#)) qui n'avaient jamais donné aucun signal lors des analyses PCR précédentes ciblant les Armillaires.

4.4.6 Discussion des résultats

La plupart des résultats positifs de PCR secondaires sont probablement complètement artefactuels. En effet, au moins pour les tests basés sur le couple d'amorces ITS1 – ITS4, les échantillons ont systématiquement donné des produits PCR similaires à ceux de départ (ceux des PCR "primaires" dont les produits ont servis de "substrat" aux PCR secondaires, cf. figure 12) alors que les produits "primaires" n'étaient pas du type "tout ou rien" (1/0; présence/absence) mais présentaient une certaine diversité entre échantillons (quoique cette diversité soit faible, ce qui était attendu).

De plus ces produits PCR sont identiques quelles que soient les amorces utilisées en PCR secondaire ! Dans le cas des échantillons où l'amplification (primaire) spécifique de l'hypholome est positive à partir des extraits d'ADN (non issus de PCR), l'amplification secondaire à partir des produits ITS1 – ITS4 donne un produit clairement différent de celui de l'amplification primaire (pour rappel, l'hypholome est amplifié à partir d'une amorce spécifique et de l'amorce ITS1-F. ITS1-F est située à l'extérieur de la zone amplifiée par ITS1 et ITS4 et donc ne devrait pas s'y amorcer de manière spécifique), ce qui plaide pour une amplification non spécifique lors des PCR secondaires.

Le fait d'avoir des produits en PCR secondaires alors qu'il n'y avait rien (absolument aucun signal) lors de la PCR "primaire" ayant servi de base à la PCR secondaire, cas rencontré quasi exclusivement pour les tests basés sur les amorces ITS1-F – ITS4-B plaide par contre pour la réalité de la présence des champignons concernés.

Considérant la présence de bandes de taille attendue, les cas assurément positifs sont les suivants :

- 26 échantillons révélant la présence d'hypholome.
- 22 échantillons révélant la présence d'Armillaire *mellea*.
- 2 échantillons révélant la présence d'Armillaire *ostoyae*.

Le séquençage de bandes isolées des produits PCR permettrait de confirmer si les bandes observées correspondent ou non au champignon ciblé mais cette opération reste relativement prohibitive. Nous la réaliserons sur quelques échantillons en vue de confirmer les résultats lors des prochains développements techniques et de la préparation d'une publication scientifique internationale.

Le fait de ne pas avoir eu de produit (signal ADN) en PCR directe sur l'extrait d'ADN brut d'un échantillon mais d'avoir obtenu un produit en PCR secondaire doit très vraisemblablement être interprété comme résultant de la présence d'un très faible inoculum.

Le recours à un instrument de PCR "quantitative" (avec adaptation *ad hoc* du protocole de PCR) et l'utilisation d'un ADN témoin permettrait de vérifier cette hypothèse et éventuellement de préciser la quantité d'inoculum présente dans les échantillons analysés en routine (notons qu'aucune relation claire n'a été établie entre quantité d'inoculum et niveau de dégât, en dehors bien sûr des extrêmes : aucun champignon = aucun dégât et énormément de champignon = dégâts importants).

L'échec des tests effectués sur de vieux rhizomorphes (cf. 4.3.4) s'explique probablement par la dégradation de l'ADN de ces échantillons puisque nous avons pu par la suite obtenir un signal ADN à partir de bois très endommagé. Idéalement, il faudrait cibler l'ARN au lieu de l'ADN ribosomal afin de ne détecter que les champignons vivants (rémanents Rajala *et al.*, 2011 ; Purahong et Krüger, 2012) mais cela implique la mise en œuvre de techniques (extraction des ARN et RT-PCR) beaucoup plus sensibles aux impuretés, plus longues et plus coûteuses à la fois en consommables et en main d'œuvre.

5. Conclusions

Nous avons adapté les outils disponibles pour la détection ADN des armillaires et créé un outil de détection des hypholomes. Nous avons validé ces outils sur de multiples isolats fongiques issus du terrain, sous forme de mycélium pur et sur éprouvettes de bois inoculé en laboratoire, démontrant une détection des champignons après seulement quelques jours d'infection du bois.

Par ailleurs; les résultats du projet de recherche ANR Blanc éthérase que nous avons mené en parallèle, ont montré que les armillaires et Hypholomes sont parmi les champignons lignivores les plus représentés dans les bois en décomposition au contact du sol, ce qui valide l'intérêt pour ces espèces (Mathieu 2012, thèse CIFRE FCBA).

Nous avons ensuite testé ces méthodes en situation de terrain à partir de fragments de bois prélevés au début février 2012 sur un site de stockage de la CAFSA dans de multiples tas correspondant aux divers niveaux de qualité en entrée de stockage (et donc aux divers usages du bois). Suite à des problèmes d'infrastructure, l'analyse de ces échantillons n'a pu débuter qu'en juin.

Un signal ADN a pu être obtenu pour l'ADN "total" du bois (bois + micro-organismes divers et éventuellement insectes présents dans le bois) à partir d'une grande majorité des échantillons (96 sur 103), y compris une partie des plus abimés (les rémanents). La proportion est légèrement plus faible (72 sur 103) pour la détection de traces de tous les champignons basidiomycètes confondus (comprenant en principe une majorité de champignons anodins).

Le test a démontré la présence probable à des niveaux très faibles des armillaires et hypholomes dans une majorité des échantillons mais à un niveau significatif dans un très petit nombre d'entre eux.

Les fréquences observées dans les différents lots de bois et zones du site de stockage pour les résultats ADN sont cohérentes avec les comptages effectués de décembre à février par la CAFSA à l'aide d'un protocole d'observation développé par L Cotten (quelques % de billons contaminés qui en conséquence ont été destockés)..

Ces résultats ne reflètent bien entendu que le niveau de développement des champignons du bois lors du prélèvement des échantillons qui ont été analysés et n'ont aucune sorte de pouvoir prédictif sur l'évolution ultérieure après plusieurs semaines ou mois.

Vu le temps écoulé depuis la tempête de janvier 2009 et l'absence d'écorçage systématique des billons stockés, un fort développement ultérieur, lorsque les conditions climatiques seront favorables, de ces champignons est très probable.

En cas de besoin, nous pouvons facilement étendre notre outil à deux autres champignons se développant régulièrement sur les stocks de bois et susceptibles d'être confondus par des observateurs inexpérimentés avec l'Armillaire et l'hypholome car des tests ADN ont été définis pour eux : *Phellinus pini* (synonyme : *Xanthochrus pini*) et le Fomes (*Heterobasidion annosum*, test quantitatif) ainsi qu'un test quantitatif pour l'armillaire. Un test existe également pour le *Trichoderma* qui pourrait être utilisé comme agent de lutte biologique contre l'Armillaire (Hietala *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2006; Savazzini *et al.*, 2008; Guglielmo *et al.*, 2010; Baumgartner *et al.*, 2010; Hamedani *et al.*, 2012).

6. Communication, Publication et projets connectés

Les résultats intermédiaires de ce projet ont fait l'objet de présentations (diaporama) lors des deux événements suivants :

- Réunion FCBA – Conseil régional du 5 octobre 2011
- Colloque ouvert au public «l'innovation au service de la forêt d'Aquitaine», organisé à l'Hôtel de Région le 25 Novembre 2011

La publication des résultats du Projet DetectArmillaire dans une revue internationale à comité de lecture ne pourra être envisagée qu'après avoir effectué les dernières vérifications mentionnées dans le chapitre consacré à la discussion des résultats. Cet article serait d'autant plus publiable que nous aurions intégré et testé sur le terrain les évolutions discutées en perspectives.

Les activités de ce projet sont connectées au projet ANR blanc "Etherase" (ANR-09-BLAN-012) coordonné par E Gelhaye (UMR 1136 INRA-Université de Lorraine à Nancy).

Avec en particulier une thèse CIFRE FCBA ayant produit 4 publications rédigées en 2012 (dont les 3 suivantes ont déjà été acceptées) :

Mathieu Y, Prosper P, Buée M, Dumarçay S, Favier F, Gelhaye E, Gérardin P, Harvengt L, Jacquot J-P, Lamant T, Meux E, Mathiot S, Didierjean C and Morel M (2012) Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. *JBC* 287:46:39001-39011.

Mathieu Y, Gelhaye E, Dumarçay S, Gerardin P, Harvengt L and Buée M (2012) Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in fungal community ecology: etherase and other enzymes involved in wood degradation. *J Microbial Methods* (accepté):

Morel M, Meux E, Mathieu Y, Thuillier A, Chibani K, Harvengt L, Jacquot J-P and Gelhaye E (2012) Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *J Microbial Biotechnology* (accepté)

Et la soutenance le 11/12/2012 de la thèse CIFRE-FCBA suivante :

Mathieu Y. (2012) Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme. UFR Sciences et Technologies, Ecole doctorale ressources, procédés, produits et environnement, Biologie végétale, Université de Lorraine, 295 pages.

7. Références citées dans le rapport

Aguileta G., Marthey S., Chiapello H., Lebrun M.-H., Rodolphe F., Fournier E., Gendrault-Jacquemard A. and Giraud T. (2008)-Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies. *Syst Biol*,57:1-15

Alfredsen, G, Hietala, A, Fossdal, C G, Solheim, H.(2007): Molecular methods as a tool within the field of wood protection available methods and new possibilities. The international research group on wood protection, Paper prepared for the 38 th annual meeting Wyoming, USA. IRG/WP-07- 20361

Baumgartner, K., Bhat, R. and Fujiyoshi, P. (2010) A rapid infection assay for *Armillaria* and real-time PCR quantitation of the fungal biomass in planta. *Fungal Biol* 114: 107-119

- Blaich R and Esser K (1975) Functions of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Journal Arch Microbiol* 103:271-277.
- Bridge, P D, Roberts, P J, Spooner, B M, Panchal, G (2003): On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist* 160, 43–48.
- Bruns, T D, Shefferson, R P (2004): Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Canadian Journal of Botany* 82, 1122–1132.
- Carriconde F, Gardes M, Jargeat P, Heilmann-Clausen J, Mouhamadou B and Gryta H (2008) Population Evidence of Cryptic Species and Geographical Structure in the Cosmopolitan Ectomycorrhizal Fungus, *Tricholoma scalpturatum*. *Microb Ecol* 56(3):513-24
- Evans JA, Eyre CA, Rogers HJ, Boddy L and Muller CT (2008) Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecology* 1:2-3:57-68.
- Evans JA, Eyre CA, Rogers HJ, Boddy L and Muller CT (2008) Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecology* 1:2-3:57-68.
- Gallet, J. P. (1994) Sélection et mode d'action de *Trichoderma* et de Basidiomycètes lignivores, antagonistes de l'Armillaire (*Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink) en vue de leur utilisation comme agents de lutte biologique contre le pourridie du pin maritime. *Biologie-Santé, Bordeaux 2, Bordeaux*, 190 pages.
- Gardes M and Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:2:113-118.
- Guglielmo, F., Gonthier, P., Garbelotto, M. and Nicolotti, G. (2010) Optimization of sampling procedures for DNA-based diagnosis of wood decay fungi in standing trees. *Lett Appl Microbiol* 51: 90-97
- Hamedani, E. Y., Sharifnabi, B. and Bahar, M. (2012) Application of classical and molecular techniques in detection of *Armillaria mellea*, the causal agent of root and crown rot disease from soil and wood. *Iran. J. Plant Path* 48: 81-82
- Hietala AM, Eikenes M, Kvaalen H, Solheim H and Fossdal CG (2003) Multiplex Real-Time PCR for Monitoring *Heterobasidion annosum* Colonization in Norway Spruce Clones That Differ in Disease Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:8:4413-4420.
- Johnson GC and Martin AK (1992) Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Canadian Journal of Microbiology* 38:8:861-864.
- Le Gac M, Hood ME, Fournier E, and Giraud T (2007)-Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* ,61:15-26
- Lochman J, Sery O and Mikes V (2004) The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiol Lett* 237:1:105-110.
- Maître M, Kutnik M, Bayon IL and Harvengt L (2008) Molecular Methods: a Reliable Tool for the identification of Wood Decay Fungi in Construction Timber. Jermer J (ed) Proceedings of the International Research Group on Wood Preservation, Istanbul, Turkey, 24-29 th May 2008, IRG/WP-08- 20386:1-14
- Metzler B. and Hecht U. (2004) Three-dimensional structure of tubular air channels formed by *Armillaria* spp. in water-saturated logs of silver fir and Norway spruce. *Can. J. Bot.* 82: 1338-1345.
- Moreau J. et Liarçou J.R. (2001) Le bleuissement des chablis dans le massif landais. Fiche Information Forêt AFOCEL-FCBA n°2-2001, n°627, 6 pages
- Mouhamadou B, Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Manzi S and Gardes M (2008) Molecular evolution of mitochondrial ribosomal DNA in the fungal genus *Tricholoma*: Barcoding implications. *Fungal Genet Biol* 45(9):1219-26
- Nicolotti G, Gonthier P, Guglielmo F and Garbelotto MM (2009) A Biomolecular Method for the Detection of Wood Decay Fungi: A Focus on Tree Stability Assessment. *Arboriculture & Urban Forestry* 35:1:14-19.
- Pischedda D. (2004) STODAFOR Guide Technique sur la récolte et la conservation des Chablis, par l'équipe de spécialistes de l'Action concertée QLK5-CT2001-00645, coordination D Pischedda, CTBA, 106 pages

- Prodorutti D, Vanblaere T, Gobbin D, Pellegrini A, Gessler C and Pertot I (2009) Genetic diversity of *Armillaria* spp. infecting highbush blueberry in northern Italy (Trentino region). *Phytopathology* 99:651-658.
- Purahong, W. and Krüger, D. (2012) A better understanding of functional roles of fungi in the decomposition process: using precursor rRNA containing ITS regions as a marker for the active fungal community. *Ann For Sci* 69: 659-662
- Rajala, T., Peltoniemi, M., Hantula, J., Mäkipää, R. and Pennanen, T. (2011) RNA reveals a succession of active fungi during the decay of Norway spruce logs. *Fungal Ecology* 4: 437-448
- Savazzini, F., Longa, C. M. O., Pertot, I. and Gessler, C. (2008) Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *Journal of Microbiological Methods* 73: 185-194
- Schmidt O and Moreth U (1998) Detection of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Intern. Res. Group on Wood Preserv. (IRG) IRG/WP/98-10245:
- Schmidt O and Moreth U (2000) Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*. *Mycological Research* 104:69-72.
- Schumacher P and Grosser D (1995) *Armillaria*-attack on logs water-sprinkled for several years. *Holz als Roh- und Werkstoff* 53:1:137-145.
- Sicoli G, Fatehi J and Stenlid J (2003) Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathol* 33:5:287–297.
- Stahlhut D, Farrell RL, Wakeling R and Hedley M (2008) Wood decay fungi from New Zealand leaky buildings– PCR identification (Part 2) and aerial spore trapping. IRG/WP 08-10649:1-14.
- Yen T-B, Six DL and Burke EJ (2006) Evaluation of rapid DNA extraction and identification of *Phellinus pini* associated with *Pinus contorta* by rDNA assay. *Forest Products Journal* 56:11/12:107-110.