



MISE AU POINT DE L'IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PAR ANALYSE MOLECULAIRE

De par ses propriétés physiques et mécaniques, le matériau bois est utilisé entre autres pour les constructions, l'ameublement et la papeterie. Cependant c'est un matériau biodégradable, constitué de sucres, de lignine, de cellulose et d'hémicelluloses, ce qui en fait une cible privilégiée pour les insectes xylophages et les champignons. La dégradation du bois d'oeuvre par ces agents biologiques met alors en péril la structure de celui-ci. Il est donc important de mettre en place des traitements préventifs pour prévenir une éventuelle attaque ou des traitements curatifs en cas d'infestation. Ces traitements doivent tenir compte de l'essence de bois utilisée, de sa classe d'emploi, c'est-à-dire de l'environnement et du taux d'humidité dans lequel il est utilisé, et du type de pathogène responsable des dégâts (Rayzal, 2002).

Contexte

Une étude sur les champignons lignivores a été menée par Anaëlle STUM de l'Université de Bordeaux (master II - janvier à juillet 2017). Elle a travaillé sur les champignons lignivores qui sont des champignons saprophytes qui assimilent les constituants de la paroi cellulaire.

Le but d'une partie du stage était de mettre au point une méthode d'extraction d'ADN sur échantillons de bois secs et dégradés par des champignons pour pouvoir les identifier par séquençage suite à une amplification PCR. Actuellement, l'identification des champignons dégradant le bois est majoritairement réalisée par analyse microscopique. L'analyse par PCR permet une plus grande précision du résultat. Les identifications par analyse moléculaire sont peu réalisées dans ce domaine. Elles ont donc été développées ici et ont nécessité une mise au point importante de l'extraction ADN. En effet, les échantillons à identifier sont très secs, présentent souvent peu de champignons et sont souvent dégradés depuis plusieurs années.



Photo 1 : Exemple de dégât de pourriture

Démarche

Maintien du pouvoir pathogène des champignons lignivores

✓ Tests de cryoconservation

Dans le but d'améliorer les conditions de conservation des souches de la mycothèque, 3 protocoles de cryoconservation dans le glycérol à -80°C ont été testés. Après 6 mois de cryoconservation à -80°C , selon les trois modalités, les souches ont été repiquées. Seulement 25% des souches sont reparties après conservation dans du GYEP par rapport à 54% et 71% des souches conservées dans l'eau stérile avec 25% et 50% de glycérol respectivement.

A la suite de cette régénération, des tests de croissance en boîtes ont été réalisés. Pour ces tests, seules les souches cryoconservées dans de l'eau stérile avec 25% ou 50% de glycérol ont été utilisées en raison du faible résultat obtenu pour les souches conservées dans le milieu GYEP. Les tests de croissance réalisés sur les souches sélectionnées ont démontré des différences de croissances entre les deux protocoles de cryoconservation. Après 3 jours, l'inoculum se régénère plus rapidement pour 8 souches sur 10 lorsqu'elles ont été cryoconservées dans 50% de glycérol. En revanche, une fois le mycélium régénéré, les souches conservées dans 25% de glycérol ont une croissance plus rapide et la taille de la colonie devient plus importante après 8 jours d'inoculation.

Des tests de sporulation ont ensuite été réalisés sur les souches d'ascomycètes. La sporulation est plus importante pour les souches cryoconservées dans 25% de glycérol que pour les souches conservées dans 50% de glycérol. Enfin des tests de virulence sur bois avec les basidiomycètes ont été réalisés et n'ont pas démontré de différence significative sur le pourcentage de pertes de masse engendré en fonction des deux protocoles de cryoconservation utilisés.

✓ Extraction d'ADN à partir de souches pures et gradient de température en PCR avec des amorces spécifiques

Les extractions avec le kit « Dneasy plant mini », ont permis d'identifier des champignons frais et isolés mais n'étaient pas adaptées à des échantillons secs ou à des bois dégradés, échantillons dits « difficiles » (résultats non présentés). Après extraction, une amplification PCR de la région ITS. Les amplifications obtenues ont été séquencées pour vérifier le genre et l'espèce de nos souches pures. Toutes nos souches de référence ont été identifiées correctement.

Avant la réalisation de la PCR spécifique sur des échantillons d'expertises secs et « hétérogènes », une mise au point des conditions de PCR a été réalisée avec des couples d'amorces spécifiques ciblant les principales espèces fongiques liées à des dégâts sur bois sur ADN de souches pures. Pour tous les gradients testés, les amplifications ont été maximales entre 58 et 62°C.

✓ Extraction d'ADN à partir d'échantillons d'expertise et amplification PCR

Les trois protocoles définis durant l'étude ont été testés sur 8 échantillons d'expertises pour extraire au mieux l'ADN de ces échantillons. Différentes quantités, puretés et amplifications d'ADNs ont été obtenues en fonction de la modification de certains paramètres. Les modifications ont porté sur les concentrations en réactifs, les temps d'incubations, les solvants utilisés et la méthode de rinçage du culot d'ADN. La 3ème version du protocole après amplification et séquençage, a permis d'identifier les champignons des 4 échantillons. Un jeu de dilutions a été réalisé au moment de la PCR afin d'avoir une quantité d'ADNs suffisante pour une amplification par PCR mais avec des inhibiteurs en quantité suffisamment faible pour ne pas interférer avec la polymérase.

✓ Réaction de PCR avec les amorces spécifiques sur ADN issus d'échantillons d'expertises

Afin de tester la spécificité des amorces précédemment mise au point sur l'ADN de souches pures, des échantillons d'expertises déjà caractérisés par microscopie ont été utilisés. Après extraction de l'ADN, une amplification PCR avec les différents couples d'amorces a été réalisée, en utilisant les températures d'hybridation optimales développées.

Les résultats ont démontré que les amorces testées manquent de spécificité.

Perspectives

L'identification de champignons sur des échantillons de bois dégradés en ciblant les régions ITS de l'ADN codant pour les ARN ribosomiques nous a aidés à identifier des champignons impossibles à reconnaître par analyse macroscopique ou microscopique. Les différents protocoles d'extractions testés, nous ont permis de conclure que le 3ème protocole était le mieux adapté à nos échantillons dits « difficiles », nous permettant de récupérer en quantité suffisante l'ADN tout en évitant d'extraire trop de polyphénols et autres contaminants issus du bois. Après les extractions, les amplifications PCR avec amorces spécifiques ont révélé que ces dernières n'étaient pas réellement spécifiques des espèces considérées. Par conséquent, l'étape du séquençage, à l'heure actuelle ne peut être évitée. Le nouveau

design d'amorces spécifiques des principales espèces retrouvées en expertises pourrait permettre de s'affranchir du séquençage.

Pour en savoir plus

> Rapport de stage de Anaëlle STUM – janvier à juillet 2017 « Identification par analyse moléculaire et cryoconservation des champignons dégradant le bois d'œuvre »

Etude réalisée en partenariat avec

université
de BORDEAUX

Contact

Anaëlle STUM

Mathilde MONTIBUS ● mathilde.montibus@fcba.fr

Tél. 05 56 43 63 67



Pôle Laboratoires Bois
Laboratoire Biologie
Allée de Boutaut – BP 227
33028 Bordeaux Cedex