

# **PREMIERE PARTIE :**

## ***BIOLOGIE***

<b>1.1-MORPHOLOGIE ET STRUCTURE .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2-CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT .....</b>	<b>29</b>
<b>1.3-REPRODUCTION ET SPORULATION .....</b>	<b>67</b>
<b>1.4-GÉNÉTIQUE .....</b>	<b>91</b>
<b>1.5-SPÉCIATION,ÉVOLUTION ET CLASSIFICATION.....</b>	<b>107</b>

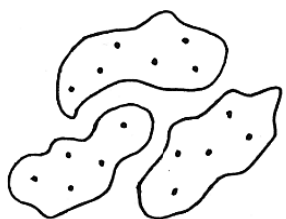


## 1.1 - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE

### 1) Morphologie

Historiquement, les champignons ont été considérés pendant longtemps comme une partie du règne végétal en raison de la ressemblance avec les plantes dans le fait, à quelques exceptions, qu'ils ont des parois cellulaires définies, sont non mobiles et se reproduisent par l'intermédiaire des spores (néo-latin *spora* du grec *spora* : semence, spore). Cependant, les champignons sont hétérotrophes et manquent de chlorophylle. Ils n'ont pas de tissus et par conséquent ils ne possèdent ni racines, ni tiges, ni feuilles, ni système vasculaire. Leur corps **somatique** (ou **végétatif**) est appelé **thalle**. Les thalles fongiques sont généralement filamenteux et multicellulaires, mais pour certains groupes, ils sont unicellulaires ou plasmodiaux. Diverses structures reproductives se différencient à partir de ces thalles et sont utilisées comme critères de classification fongique.

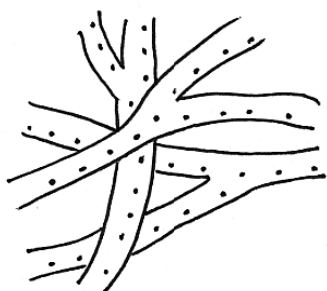
Le thalle filamenteux des champignons est formé par des **hyphes** qui sont des filaments tubulaires microscopiques, souvent ramifiées en différentes directions et se développant à la surface et/ou à l'intérieur du substrat à partir duquel les champignons se nourrissent. La masse des hyphes chez un champignon est appelée mycélium (Figure 1-1). Les hyphes mycéliennes sont de longueur indéterminée et ont souvent un diamètre assez constant, mesurant de 1-2 à 30  $\mu\text{m}$  ou plus (généralement 5-10  $\mu\text{m}$ ), en fonction de l'espèce et des conditions de croissance. Les hyphes croissent seulement au niveau de leurs extrémités derrière lesquelles elles vieillissent progressivement et dans les régions les plus âgées, ces hyphes peuvent dégénérer par autolyse ou être dégradées par d'autres organismes (hétérolyse). Chez la majorité des groupes fongiques, les hyphes ont des **cloisons** transversales, appelées aussi **septums**, disposées à des intervalles plus ou moins réguliers sur toute leur longueur. Ces cloisons divisent chaque hyphe en compartiments individuels ou cellules qui peuvent contenir un, deux ou plusieurs noyaux. Les hyphes de ce type sont dites **septées** et caractérisent les *Ascomycota*, *Basidiomycota* et Deutéromycètes. Les cloisons sont absentes dans les hyphes de la plupart des *Oomycota*, *Chytridiomycota* et *Zygomycota*, excepté quand elles se forment comme des parois totales pour isoler des structures vieilles ou reproductives. Dans ce cas, les hyphes sont dites **aseptées**, **non septées** ou **coenocytiques**.



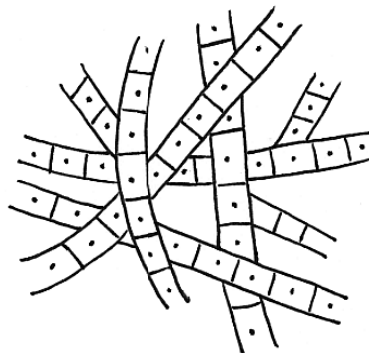
Thalle plasmodial



Thalle unicellulaire



Thalle filamenteux coenocytique



Thalle filamenteux septé

**Figure 1-1** : Principaux types de thalles fongiques.

Le thalle fongique peut aussi être **unicellulaire** comme chez plusieurs *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et Deutéromycètes vivant comme des levures ou des organismes de type levures et aussi chez certains *Chytridiomycota*. Ces thalles sont formés de cellules qui sont d'habitude uninucléées (Figure 1-1). Certains de ces champignons unicellulaires sont **dimorphiques** capables de se développer soit comme mycélium soit comme levure (ou organisme de type levure) en fonction des conditions de croissance. Des exemples de champignons dimorphiques sont des espèces des genres *Taphrina* (*Ascomycota*) et *Ustilago* (*Basidiomycota*) qui se développent comme mycélium sur leurs plantes hôtes et comme colonie de type levures en culture.

Un autre type de thalle fongique est celui qualifié de plasmodial qui caractérise les champignons appartenant au *Protozoa* tels que les *Plasmodiophoromycota*. Il est formé de **plasmodes** qui sont des masses protoplasmiques multinucléées, sans paroi cellulaire (Figure 1-1).

## 2) Structure cellulaire

### Noyau

Les compartiments hyphaux des champignons peuvent contenir un, deux ou plusieurs **noyaux**. Les noyaux fongiques sont d'habitude petits (2-3  $\mu\text{m}$  de diamètre) comparés à ceux des animaux et des plantes et ils ont comparativement de petits chromosomes. Bien que généralement de forme sphérique à ovoïde, les noyaux ont des structures extrêmement plastiques qui sont capables de passer à travers les minuscules pores septaux. La plupart des champignons est haploïde, mais les *Oomycota* sont diploïdes et certains autres champignons peuvent alterner entre des générations haploïdes et diploïdes.

Le noyau est entouré par une enveloppe nucléaire qui consiste en deux unités membranaires séparées par un espace périnucléaire. Plusieurs pores existent où les membranes interne et externe se joignent. L'enveloppe nucléaire peut être en continuité avec le réticulum endoplasmique. Cette enveloppe entoure le nucléoplasme qui contient le nucléole. L'observation de nombreux champignons a montré que leurs génomes sont petits renfermant 12 à 88 pMb. Cet ADN est intermédiaire entre celui des procaryotes et ceux des plantes et animaux eucaryotiques. Cependant, comme l'ADN des autres eucaryotes, celui des champignons peut consister en des séquences de nucléotides de copie simple ou de copie multiple (répétitive). Les séquences de copie simple codent pour l'ARNm tandis que la plupart des séquences

répétitives code pour l'ARNr, l'ARNt et les protéines chromosomiques. Les champignons ont un taux d'ADN répétitif beaucoup plus bas (environ 10 à 20 % représentant environ 100 copies par séquence répétée) que celui trouvé chez les autres eucaryotes (aussi élevé que 80 % représentant de 100 à 1000000 copies par séquence répétée). Chez les champignons, comme chez les autres eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines et forment ensemble la chromatine. Ces protéines renferment les histones qui sont des protéines basiques de même nature que celles rencontrées chez d'autres organismes eucaryotiques, et des protéines acides hétérogènes. Chez les plantes et les animaux, cinq histones majeures existent : quatre d'entre elles (H2A, H2B, H3 et H4) se trouvent dans les nucléosomes semblables à des perles qui sont liées par un brin d'ADN au nucléosome suivant, tandis que la cinquième (H1) se lie au point au niveau duquel l'ADN entre en contact avec le nucléosome. Cette situation a lieu chez les champignons avec la différence que la région de la liaison est plus courte et que H1 n'existe parfois pas.

A cause de leur petite taille, les chromosomes peuvent ne pas être visibles même en microscopie électronique et leur nombre est extrêmement difficile à déterminer. Ils sont alors estimés par les techniques d'analyse électrophorétique. Les estimations des nombres de chromosomes chez les champignons se situent entre 2 et 18 en cellules haploïdes. Cependant, leur nombre et longueur peuvent varier chez une même espèce dans des conditions différentes. L'altération ou le réarrangement des chromosomes fongiques peuvent souvent avoir lieu.

Le nucléole se trouve dans le noyau où il est associé à l'organisateur nucléolaire d'un chromosome particulier où l'ARNt est transcrit. L'évolution ultérieure des ARNr pour former des sous-unités ribosomiques prend place dans le nucléole.

### **Mitochondries**

Les **mitochondries** existent dans le cytoplasme des cellules fongiques. Elles paraissent circulaires, ovales ou allongées, mais sont souvent ramifiées. Leur taille, forme et nombre peuvent varier durant le cycle de la cellule et en réponse aux conditions environnementales. Les cellules fongiques peuvent contenir peu de mitochondries très ramifiées ou plusieurs, plus que vingt, petites mitochondries non ramifiées.

Chaque mitochondrie a une membrane externe lisse et une membrane interne qui se prolonge en crêtes qui pénètrent dans la matrice. Le cycle de l'acide tricarboxylique se déroule dans la matrice alors que le

transport des électrons et la production d'ATP s'effectuent au niveau des crêtes. Ces dernières sont d'habitude tubulaires chez les pseudo-champignons (*Chromista* et *Protozoa*), mais chez les vrai-champignons, elles sont de type plat comme chez les animaux et les plantes.

Les mitochondries contiennent l'ADN qui peut former un nucléoïde au centre de la matrice. Un nucléoïde consiste en une ou plusieurs molécules d'ADN mitochondrial (ADNmt) qui sont généralement circulaires mais dans certains cas, elles sont linéaires. La taille de ces molécules d'ADN varie beaucoup d'un champignon à un autre, se situant souvent à environ 17 à 175 kpb. L'ADNmt forme d'habitude 1 à 20 % de l'ADN total de la cellule. Il contient des gènes qui codent pour la production des protéines essentielles à la fonction mitochondriale, telle que pour le cytochrome b, un composant de la chaîne respiratoire. Cependant, la plupart des protéines existant dans la mitochondrie est codée par l'ADN nucléaire, synthétisée dans le cytoplasme et transportée à l'intérieur de la mitochondrie. Les ribosomes existent aussi dans la matrice de la mitochondrie. Ils sont plus petits, contiennent des molécules d'ARN plus petites et ont des compositions différentes en bases par comparaison aux ribosomes cytoplasmiques. Ils sont impliqués dans la synthèse de certaines protéines produites dans la matrice et au niveau des crêtes.

### **Réticulum endoplasmique**

Le **réticulum endoplasmique**, qui consiste en une paire d'unités membranaires séparées par un espace appelé lumen, existe et est d'habitude peu abondant dans les cellules fongiques. C'est une continuation de l'enveloppe nucléaire mais ce n'est pas, ou rarement, une continuation de la membrane plasmique. Ses unités membranaires sont d'habitude plates, mais parfois elles peuvent être en forme de tubules. Les étranglements membraneux des segments du réticulum endoplasmique produisent fréquemment des vésicules isolées qui sont des organites en forme de bulles entourées par une unité membranaire. Ces vésicules semblent contenir des substances antérieurement présentes dans le lumen dont elles paraissent également effectuer le transport vers d'autres parties de la cellule. Certaines de ces vésicules peuvent être impliquées dans la croissance de la paroi. Généralement, le réticulum endoplasmique est du type lisse, non associé à des ribosomes. Cependant, dans les cellules métaboliquement actives, il est souvent du type granulaire car sa surface est couverte de ribosomes.

### **Appareil de Golgi**

L'**appareil de Golgi** est formé de cisternes en forme de sac qui existent dans le cytoplasme des cellules fongiques. Ces cisternes ou saccules apparaissent bourgeonner des vésicules qui sont des corps ronds entourés par une seule unité membranaire. Dans les cellules fongiques, l'appareil de Golgi peut avoir deux types : empilé ou non empilé. Le type le plus commun chez les champignons est celui qui forme un empilement de deux à cinq cisternes seulement. Ce nombre est plus petit que chez la plupart des autres eucaryotes. Le second type, qui est non empilé, consiste en une seule cisterne dilatée qui peut être facilement confondue avec le réticulum endoplasmique quand ce dernier est du type lisse. Les cisternes individuelles non empilées sont aussi appelées **équivalents de Golgi** et paraissent jouer le même rôle que l'appareil de Golgi empilé. Divers rôles sont attribués à l'appareil de Golgi chez les champignons. Celui-ci réalise le remodelage des protéines (clivage et assemblage), le repliement en une structure tertiaire et l'addition de chaînes de sucre (glycosylation). Les glycoprotéines produites, et d'autres substances secrétées, sont alors emballées et envoyées dans des vésicules bourgeonnantes qui peuvent fusionner entre elles pour former une nouvelle paroi ou fusionner avec la membrane plasmique, libérant ainsi leur contenu à l'extérieur de la cellule.

### **Ribosomes**

Dans les cellules fongiques, les **ribosomes** existent à l'état libre dans le cytoplasme ou peuvent être liés à la surface du réticulum endoplasmique ou l'enveloppe nucléaire. Les ribosomes sont abondants dans les cellules métaboliquement actives puisqu'ils sont les sites où la synthèse des polypeptides se fait. Ils consistent en des parties environ égales d'ARN et de protéine.

### **Microbodies et vésicules**

Les **microbodies** (ou microcorps) sont un groupe spécial de petites vésicules (plus ou moins 1  $\mu\text{m}$  de diamètre) qui existent dans les cellules fongiques. Ils sont d'habitude de forme ronde ou ovale, ont un contenu dense et sont entourés par une seule unité membranaire. Plus de 30 enzymes ont été détectées dans ces microbodies qui ont des rôles distincts. Des vésicules comme les **peroxysomes** renferment la catalase qui détruit le peroxyde d'hydrogène qui est toxique à la cellule et peut s'accumuler comme un produit du métabolisme. Les **hydrogenosomes** contiennent l'hydrogénase et associent les enzymes impliquées dans une voie anaérobie. Les **glyoxysomes** contiennent des enzymes qui sont impliquées dans l'oxydation des acides gras et dans le cycle du glyoxalate. Il existe aussi un autre groupe spécialisé



de vésicules chez les champignons filamenteux septés appelés les **corps de Woronin** qui contiennent des protéines. Leur rôle est de boucher les pores septaux pour isoler les hyphes endommagées.

### **Lysosomes**

Les **lysosomes**, qui sont souvent responsables de la dégradation contrôlée des composants cellulaires, sont des vésicules particulières qui existent aussi dans les cellules fongiques. Elles contiennent des enzymes hydrolytiques telles les phosphatases acides.

### **Plasmides**

Bien qu'ils soient très communs chez les bactéries, les **plasmides** n'ont été détectés que chez certaines levures et quelques champignons filamenteux. Ce sont des morceaux d'ADN capables de se répliquer indépendamment de l'ADN nucléaire et mitochondrial. Ces plasmides peuvent être linéaires ou circulaires et peuvent exister dans le cytoplasme ou à l'intérieur des mitochondries. Dans le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 1 à 5 % environ de l'ADN cellulaire existe sous forme de plasmides qui sont des molécules circulaires d'ADN d'environ 2 µm de circonférence et qui peuvent se répliquer d'une façon autonome.

### **Vacuoles**

Les **vacuoles** sont souvent abondantes dans les cellules fongiques et, comme les vésicules, elles sont entourées par une seule unité membranaire. Dans les hyphes en croissance active, les vacuoles sont généralement petites, de formes diverses avec des contenus finement à modérément granulaires. Cependant, les parties les plus vieilles des hyphes peuvent contenir de grandes vacuoles qui remplissent presque la totalité des cellules hyphales. Les cellules sénescents deviennent d'habitude fortement vacuolisées.

Les vacuoles sont généralement caractéristiques des régions sub-apicales. Un système vacuolaire tubulaire peut cependant être souvent observé à quelques micromètres de l'apex. C'est un système dynamique formé de tubules étroits qui peuvent se dilater et se contracter comme si des éléments gonflables y sont véhiculés de manière péristaltique.

Les vacuoles fongiques ont plusieurs fonctions comprenant le stockage de composés et le recyclage des métabolites cellulaires. Par exemple, elles accumulent les phosphates sous forme de polyphosphate. Les vacuoles paraissent également être les sites majeurs pour le stockage du calcium, qui peut être libéré dans le cytoplasme comme une partie du système de signal

intracellulaire. Les vacuoles contiennent des protéases pour dégrader les protéines cellulaires et recycler les amino-acides. Elles ont aussi un rôle dans la régulation du pH cellulaire. Tous ces rôles physiologiquement importants s'ajoutent au rôle potentiel des vacuoles dans l'expansion cellulaire et le guidage du protoplasme vers l'avant.

### **Cytosquelette**

Comme pour les autres eucaryotes, les cellules fongiques contiennent un **cytosquelette** qui consiste en des **microtubules** et des **microfilaments**. Les microtubules sont de minuscules tubes creux constitués par la polymérisation d'une protéine spéciale appelée **tubuline**. Les microfilaments sont formés par une protéine contractile désignée par **actine**.

Les microtubules sont dispersés au travers de la plus grande partie du cytoplasme et sont orientés principalement dans le sens parallèle à l'axe de la longueur des hyphes. Ils peuvent être régulièrement dispersés dans le cytoplasme ou concentrés en paquets. Lorsque des microtubules adjacents sont liés et croisés, ils forment un réseau. Les microtubules positionnent les organites nucléaires et régulent leurs mouvements. Les microtubules de tubuline sont impliqués dans le transport sur de longues distances des vésicules sécrétrices à partir de l'appareil de Golgi jusqu'à l'extrémité hyphale en croissance où leur contenu est excrété au fur et à mesure que la paroi est synthétisée.

Les microfilaments, qui semblent former un réseau diffus par liaison croisée, sont particulièrement abondants aux extrémités des hyphes en croissance. Certains microfilaments se forment à l'intérieur et à partir du Spitzenkörper (voir plus loin), tandis que d'autres se prolongent en avant vers l'extrémité hyphale où ils sont liés à la membrane plasmique. Certains autres microfilaments se prolongent en arrière à travers le cytoplasme vers le reste de la cellule. Les microfilaments d'actine sont apparemment d'importance vitale pour la croissance normale de l'extrémité.

### **Inclusions de stockage**

Comme les autres organismes eucaryotiques, les champignons accumulent les **lipides** comme réserve de carbone. Les corps lipidiques, qui sont entourés par une seule membrane, sont rencontrés plus fréquemment dans les spores et les hyphes mûres ou sénescents. Une autre source de carbone, très répandue chez les champignons, est le polysaccharide **glycogène** (Figure 1-2). Des agrégats de glycogène se forment principalement dans les parties les plus âgées des hyphes et dans les cellules reproductives.

Les substances de réserve existent aussi chez les champignons comme des carbohydrates solubles de faible poids moléculaire. Les **monosaccharides** sont présents seulement en très faibles concentrations et principalement en un état phosphorylé. Cependant, le disaccharide **tréhalose**, qui consiste en deux molécules de glucose, est une substance commune de réserve chez les champignons (Figure 1-2). D'autres réserves communes sont aussi des alcools sucre, alors appelés alcools polyhydriques ou **polyols**. Ils renferment des composés à trois carbones (glycérol), quatre carbones (érythritol), cinq carbones (arabitol ou ribitol) et six carbones (mannitol). Le mannitol et l'arabitol sont particulièrement très répandus (Figure 1-2). L'excès de **phosphate** peut aussi être stocké dans les vacuoles après leur polymérisation en longues chaînes (Figure 1-2).

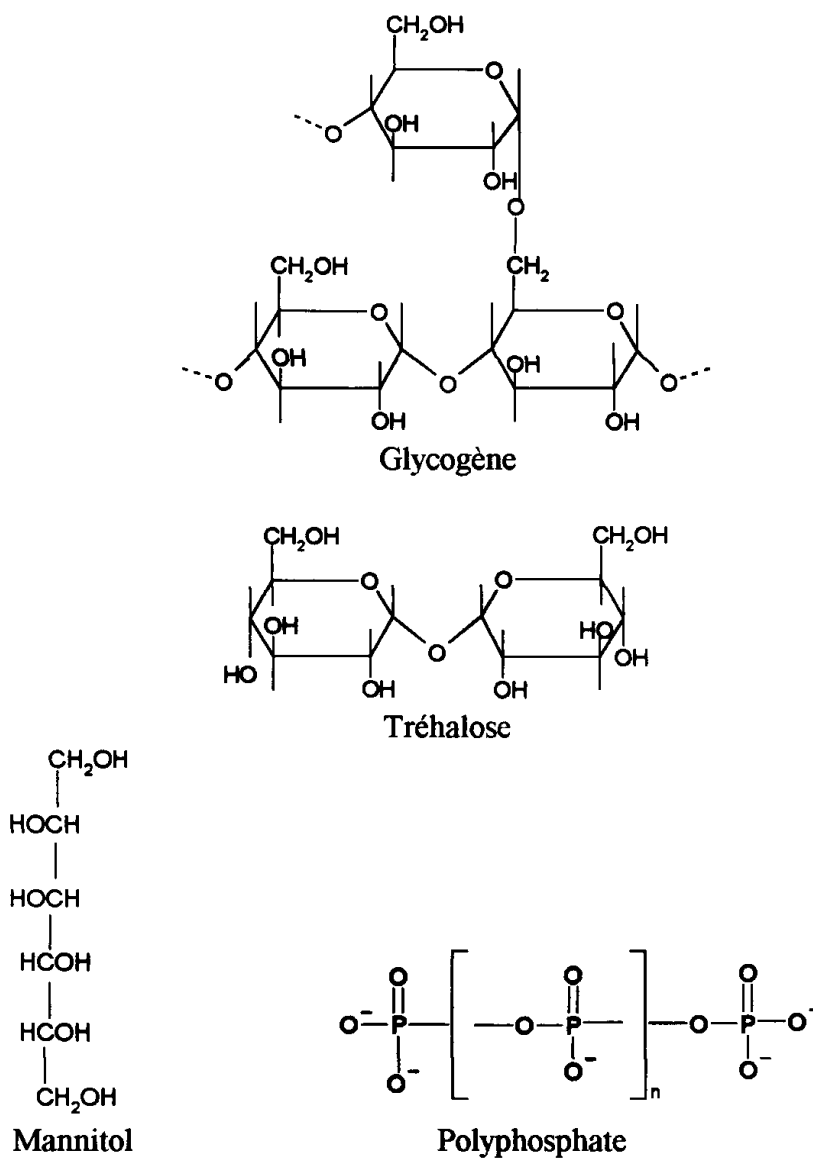
### **Membrane plasmique**

Les champignons ont une **membrane plasmique** (ou **plasmalemme**) similaire à celle des autres eucaryotes, consistant en une bicouche de phospholipides et des protéines et stérols associés. Cependant, le principal stérol membranaire chez les champignons est l'**ergostérol** et non le cholestérol comme chez les animaux et les phytostérols du type cholestérol comme chez les plantes. Seules les *Oomycota* ont des stérols comme ceux des plantes dans leur membrane.

En plus de la régulation de l'absorption et la libération des substances, la membrane plasmique chez les champignons peut aussi servir d'ancrage à certaines enzymes, principalement les enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi, la chitine synthase et la glucane synthase qui sont alors des protéines intégrales de la membrane. Ces enzymes sont ancrées dans la membrane de manière à produire des chaînes de polysaccharides à partir de la face externe de la membrane. Un troisième rôle joué par la membrane plasmique est de transmettre les signaux de l'environnement extérieur vers l'intérieur de la cellule (transmission de signal).

### **Lomasomes**

Les **lomasomes** sont des structures membranaires (tubules, vésicules ou feuilletés parallèles) qui ont été observées entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire chez une variété de différents types de champignons. Les lomasomes semblent être associés à la synthèse de la paroi.



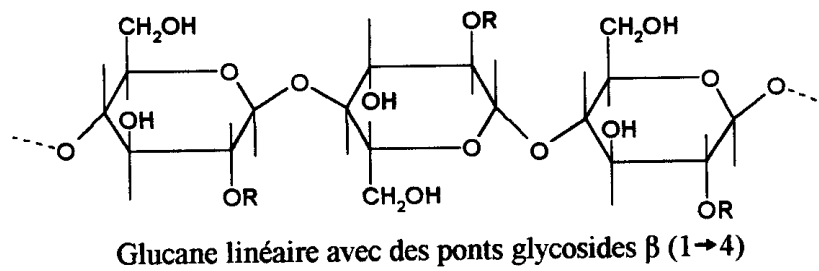
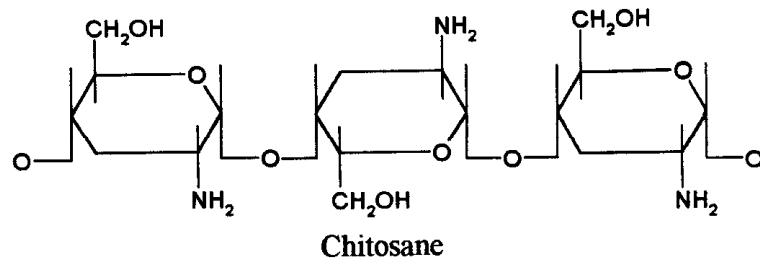
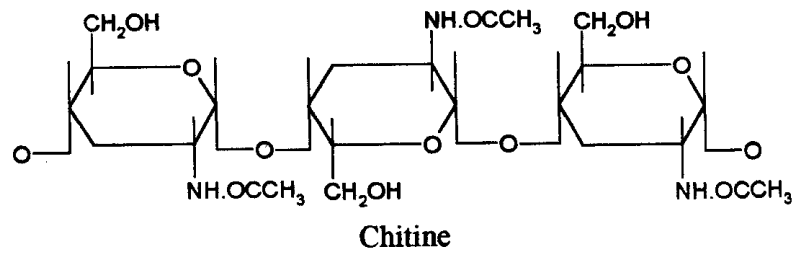
**Figure 1-2** : Structure moléculaire des principales substances de réserve chez les champignons.

## **Paroi**

Etant l'interface entre un champignon et son environnement, la **paroi** protège le corps fongique contre la lyse osmotique et agit comme un tamis moléculaire régulant le passage des grosses molécules à travers les pores. Quand la paroi est pigmentée, le plus souvent avec des mélanines, elle peut protéger les cellules contre la radiation ultraviolette ou les enzymes lytiques des autres organismes. La paroi peut également avoir plusieurs rôles physiologiques tels qu'ayant des sites de liaison pour des enzymes (par exemple invertase et  $\beta$ -glycosidase) ou ayant des propriétés antigéniques qui servent d'intermédiaires dans les interactions entre les champignons et les autres organismes.

La paroi fongique est formée essentiellement de polysaccharides (80 à 90 %), mais aussi de faibles teneurs de protéines et beaucoup moins de lipides. Elle est formée principalement d'une composante squelettique ou microfibrillaire à la face interne de la paroi et d'habitude immergée dans la matrice amorphe qui se prolonge à la face externe de la paroi. La composante microfibrillaire consiste en des substances hydro-insolubles hautement cristallines alors que la matrice consiste en des polysaccharides dont la majorité est hydrosoluble.

Les polysaccharides de la paroi sont différents suivant les grands groupes fongiques. La majorité des vrai-champignons, à l'exception des *Zygomycota*, a typiquement la chitine et les glucanes comme étant les polysaccharides essentiels de leur paroi. La **chitine**, qui est aussi le constituant majeur de l'exosquelette des insectes et d'autres arthropodes, est un polymère linéaire d'amino-sucre acétylé *N*-acétylglucosamine ; les sous-unités étant liées par des ponts  $\beta$ -1,4-glycosidiques (Figure 1-3). Elle est fortement rigide et la rigidité est le résultat des ponts hydrogènes extensifs, tout au long des chaînes, leur donnant cette rigidité au fur et à mesure qu'elles se forment, et ensuite entre les chaînes. Les chaînes de chitine adjacentes s'agrègent d'une façon anti-parallèle conduisant à la formation des microfibrilles. Les **glucanes** sont des polymères ramifiés, consistant essentiellement en une chaîne principale avec des ponts  $\beta$ -1,3 (ou parfois  $\beta$ -1,4) à laquelle sont liées des chaînes latérales avec des liaisons  $\beta$ -1,6 (Figure 1-3). Comme la chitine, les longues chaînes de glucanes forment des microfibrilles. En plus des glucanes hydrosolubles liées par des ponts  $\beta$ , des glucanes hydrosolubles avec des liaisons  $\alpha$  peuvent se trouver dans la paroi.



**Figure 1-3 :** Polysaccharides majeurs des parois cellulaires des vrai-champignons.

La paroi des *Zygomycota* est typiquement un mélange de chitine, de chitosane et de polymères d'acides uroniques (par exemple l'acide glucuronique) au lieu du mélange de chitine et de glucanes. Le **chitosane** consiste en une forme de chitine faiblement ou non acétylée, formant un polymère essentiellement de  $\beta$ -1,4-glucosamine (Figure 1-3).

Typiquement, la paroi des *Oomycota* contient la cellulose au lieu de la chitine comme composante majeure de la paroi cellulaire, bien que certains *Oomycota* contiennent de petites quantités de chitine en mélange avec la cellulose. La cellulose, qui est le constituant majeur de la paroi cellulaire des plantes, consiste en un polymère linéaire de  $\beta$ -1,4-glucose.

Les protéines de la paroi chez les champignons peuvent être des enzymes qui peuvent digérer les éléments nutritifs extracellulaires ou sont impliquées dans la modification structurale de la paroi. Les protéines de la paroi peuvent aussi être des glycoprotéines impliquées dans le processus de reconnaissance cellulaire. Parmi les protéines de la paroi les plus étudiées existent les mannoprotéines, les glycosylphosphatidylinositol protéines, les hydrophobines et d'autres. Divers autres composants peuvent être présents dans la paroi cellulaire fongique. Ils renferment des lipides, des polymères de *D*-galactosamine, des polyuronides et des mélanines. Ces dernières sont des pigments foncés consistant en des polymères ramifiés dérivés de métabolites phénoliques tels que la tyrosine, le catéchol et les dihydroxynaphtalènes. Ils sont impliqués dans la photoprotection et dans la résistance à la lyse enzymatique.

### **Architecture de la paroi**

La paroi cellulaire fongique est un assemblage dynamique complexe de plusieurs composants. Typiquement, la paroi apparaît en microscopie électronique comme étant composée de couches. Celles-ci ne sont cependant pas distinctes, mais interconnectées comme un complexe multimoléculaire massif. Bien que la plupart des travaux a été effectuée sur *Saccharomyces cerevisiae*, une évidence considérable montre que le modèle proposé peut être extrapolé non seulement aux autres cellules de levures mais aussi aux hyphes des autres champignons, en tenant compte des différences quantitatives et qualitatives appropriées dans la composition.

Les microfibrilles de chitine sont dans la couche la plus interne et apparaissent agir comme un échafaud primaire. Les fibrilles de  $\beta$ -1,3-glucanes, qui sont prédominantes dans la partie interne de la paroi, sont

attachées aux microfibrilles de chitine par des liaisons glycosidiques. En allant vers la surface de la cellule, les  $\beta$ -1,6-glucanes sont liées par covalence aux microfibrilles de  $\beta$ -1,3-glucanes. Les glycosylphosphatidylinositol-mannoprotéines sont soit ancrées dans la membrane, se prolongeant à travers la paroi, ou séparées de leur ancrage et liées aux  $\beta$ -1,6-glucanes dans la partie externe de la paroi. Des protéines caractérisées par des répétitions internes de séquences d'acides-amino, désignées par les protéines pariétales cellulaires *Pir*, semblent être attachées aux  $\beta$ -1,3-glucanes. Certaines mannoprotéines semblent être liées aux microfibrilles de chitine, à partir desquelles elles se prolongent à travers la paroi. Ainsi, la paroi est en résumé faite de chitine fibreuse et de  $\beta$ -1,3-glucanes qui sont concentrées dans la partie la plus interne de la paroi et des  $\beta$ -1,6-glucanes, des protéines et des mannoprotéines qui prédominent dans la partie la plus externe, mais tous les composants sont en liaisons croisées et interconnectées.

### **Cloison**

La plupart des vrai-champignons (*Ascomycota*, *Basidiomycota* et Deutéromycètes) a des **cloisons** transversales fréquentes divisant les hyphes en compartiments. Les cloisons sont d'habitude perforées.

Les cloisons des *Ascomycota* et des Deutéromycètes ont généralement un seul pore central bien que pour certaines espèces, plusieurs perforations peuvent exister. Les pores permettent une continuité cytoplasmique entre les compartiments adjacents. Certains pores centraux uniques sont suffisamment grands pour permettre le passage des organites cytoplasmiques et des noyaux. Chez plusieurs espèces, une ou plusieurs vésicules, désignées par **corps de Woronin**, ont été observées dans le cytoplasme près du pore. Si un compartiment hyphal est endommagé et le cytoplasme fuit à l'extérieur, un corps de Woronin dans la cellule adjacente se déplace et bloque le pore, stoppant ainsi la fuite. Un nouveau bourgeon hyphal peut alors croître à travers la cloison. Les cloisons hyphales sont formées de chitine couverte de glucanes et de protéines.

Les cloisons les plus complexes sont celles des *Basidiomycota*, appelées alors **cloisons dolipores**. Elles contiennent un canal central étroit lié par deux bourrelets de substance pariétale amorphe prédominante en glucane. Des deux côtés de ces cloisons, il y a des structures membranaires en forme de parenthèses appelées **parenthosomes**, qui ont des pores qui permettent la continuité cytoplasmique mais empêchent le mouvement des organites majeurs.



### **Matrice extracellulaire**

Des substances mucilagineuses, contenant des polysaccharides ou des glycoprotéines, peuvent être secrétées par les champignons. Ces substances peuvent s'accumuler à l'extérieur de la paroi cellulaire comme une **matrice extracellulaire**. L'un des principaux rôles de cette matrice est d'améliorer l'adhésion du champignon à la surface environnementale.

D'autre part, les enzymes extracellulaires produites par les cellules fongiques peuvent être rencontrées dans le mucilage de la matrice. Ces enzymes renferment nombreuses formes hydrolytiques telles que les estérases, comprenant en particulier les cutinases. Chez de nombreux champignons provoquant des pourritures du bois, la matrice peut être un réservoir pour les enzymes digestives qui y sont secrétées. Elle peut alors être le site où le champignon fait le premier contact avec les éléments nutritifs qui vont être absorbés.

La matrice mucilagineuse peut aussi absorber l'eau qui protège le champignon de la dessiccation.

-----



## 1.2 - CROISSANCE ET DÉVELOPPEMENT

### 1) Germination

La croissance fongique commence d'habitude par la germination des spores. Généralement, les spores semblent être capables de germer à partir de n'importe quel point, bien que dans certains cas, tels que les urédospores des agents de rouille (*Basidiomycota*), elles ont un point fixe de germination appelé **pore germinatif**, où la paroi est plus mince qu'ailleurs. Le processus de germination suit un modèle commun. Initialement, la spore gonfle par hydratation, puis elle gonfle encore par un processus métabolique actif et de nouvelles substances de paroi sont incorporées sur la majorité ou la totalité de la surface de la cellule. Finalement, une jeune hyphe, désignée par **tube germinatif**, émerge d'un point localisé sur la surface cellulaire où toute la croissance ultérieure de la paroi est localisée dans cette région. Certains champignons sont caractérisés par ce qui est alors appelé **sporulation microcyclique**. Ce phénomène a lieu chez certaines espèces fongiques, telles que celles de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Septoria* et *Fusarium*, quand la germination des spores dans des conditions d'alimentation pauvre produit directement des spores. Tous ces champignons germent pour former des hyphes dans des conditions d'alimentation riche (**sporulation macrocyclique**).

D'habitude, le tube germinatif émerge quelques heures après l'initiation de la germination. Dans le cas de *Blastocladiella* et *Phytophthora*, quand les zoospores enkystées germent, la paroi du tube germinatif reste en continuité avec la paroi de la cellule. Chez certains autres champignons, tels que *Botrytis cinerea*, la paroi du tube germinatif est une extension de la couche interne de la paroi de la spore. Dans beaucoup de spores, telles que les sporangiospores de *Mucor rouxii* et les ascospores de *Daldinia concentrica*, un stade précoce dans la germination est la synthèse d'une nouvelle paroi en dessous de la paroi existante de la spore, et la paroi du tube germinatif est une extension de cette nouvelle paroi. L'ancienne paroi de la spore est distendue et finalement percée par l'émergence du tube germinatif. Dans les arthrospores de *Geotrichum candidum*, la nouvelle paroi est limitée à la région où l'émergence a lieu. Dans tous ces différents cas, la pression exercée par le tube germinatif en croissance et l'attaque enzymatique semblent être ensemble impliquées.

Quand les spores commencent à germer, les diverses formes de l'activité métabolique commencent à être progressivement restaurées jusqu'au niveau caractéristique de la cellule végétative. Au fur et à mesure que la germination se déroule, le nombre de ribosomes libres diminue et celui des polysomes augmente, indiquant que l'ARNm commence à être traduit. D'autres changements ultrastructuraux ont lieu comprenant des augmentations dans la masse du réticulum endoplasmique et des changements dans le nombre et la forme des mitochondries.

Pendant leur germination, plusieurs types de spores présentent un **tropisme** qui est défini comme une réponse de croissance directionnelle d'un organisme à un stimulus externe. Par exemple, un **autotropisme négatif** est observé chez de nombreuses espèces fongiques quand les tubes germinatifs des spores en germination d'une espèce émergent aux points les plus distants de la surface de la spore et s'éloignent loin les uns des autres. Parfois, l'**autotropisme positif** peut aussi avoir lieu, aboutissant à une anastomose hyphale. Certains autres tropismes sont connus. Ils renferment le **chémotropisme** qui est une réponse à un stimulus de substances chimiques. Par exemple, un chématropisme positif aux amino-acides a lieu avec le tube germinatif d'*Achlya* et *Saprolegnia*. Un **phototropisme** basé sur le stimulus de la lumière existe aussi, comme avec le tube germinatif de *Botrytis cinerea* qui montre un phototropisme négatif, s'éloignant de la lumière. Le **tigmotropisme** (réponse au stimulus de contact) est aussi connu chez plusieurs champignons tels que *Puccinia hordei*. Son tube germinatif croît à 90° par rapport à l'arrangement longitudinal des cellules épidermiques de la feuille de l'hôte. Ceci semble maximiser leur probabilité de rencontrer et pénétrer par les stomates qui sont arrangés en rangs longitudinaux.

## 2) Croissance

### Croissance hyphale

Les champignons mycéliens croissent au fur et à mesure que l'extension de l'extrémité hyphale a lieu, alors que les parties les plus âgées des hyphes sont incapables de s'allonger. L'extension de l'extrémité hyphale par la croissance de la paroi est accompagnée par la synthèse du cytoplasme. Les noyaux existent dans les parties les plus âgées des hyphes et leur division ne semble pas être étroitement corrélée avec l'extension hyphale. D'habitude, les hyphes en développement forment des ramifications en succession acropétale (procédant vers l'extrémité) derrière l'extrémité

hyphale. Cette ramification en retour donne souvent émergence à des systèmes de ramifications secondaire et tertiaire.

#### *Zone d'extension*

La région apicale d'une extrémité hyphale a la forme approximative demi-ellipsoïde. Les hyphes fongiques en extension ont à l'extrémité une région approximativement sphérique connue sous le nom de **Spitzenkörper** ou **corps apicale** qui renferme une masse de vésicules entourant un centre vide de vésicules. Chez *Allomyces macrogynus*, ce centre est riche en composants cytosquelettiques, actine et  $\gamma$ -tubuline, une forme de tubuline. Le Spitzenkörper a une position centrale quand les hyphes continuent à croître dans la même direction mais un changement dans la direction de croissance est précédé par un déplacement du Spitzenkörper vers le côté de l'extrémité hyphale, suivi par son rétablissement dans la position centrale. Une nouvelle ramification est précédée par la formation d'un nouveau Spitzenkörper dans le site tandis que la cessation de croissance est accompagnée par la disparition du Spitzenkörper. Il est alors conclu que le Spitzenkörper a un rôle important dans l'extension hyphale.

Les vésicules associées au Spitzenkörper sont liées par une seule unité membranaire et sont communément divisées en deux classes, les macrovésicules avec un diamètre supérieur à 0,1  $\mu\text{m}$  et les microvésicules moins de 0,1  $\mu\text{m}$ . Ces vésicules sont non seulement associées à la croissance apicale des hyphes mais aussi à tous les processus qui impliquent l'extension de la paroi, tels que l'émergence des tubes germinatifs à partir des spores, la ramification des hyphes et le développement des anses d'anastomose. Chez *Neurospora crassa*, les vésicules occupent environ 80 % du volume à 1  $\mu\text{m}$  de l'extrémité hyphale tandis que le réticulum endoplasmique et les mitochondries sont absents dans l'extrémité et apparaissent seulement à environ 3 et 6  $\mu\text{m}$  de l'extrémité, respectivement. Absents de la zone d'extension, les noyaux n'existent pas dans 40  $\mu\text{m}$  de l'extrémité hyphale.

#### *Extension de la paroi*

L'extension axiale de la paroi est limitée à l'extrême bout tandis que la croissance de la paroi à travers le reste de la zone d'extension est confinée à l'extension circonférentielle. Cette croissance fongique semble être l'une des prodigieuses activités à l'extrémité hyphale où de très nombreuses vésicules délivrent des enzymes lytiques et biosynthétiques à la membrane plasmique à grande vitesse. Quand les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, elles contribuent aussi avec leurs propres composants membranaires à l'extension de la membrane plasmique.

La croissance hyphale implique l'extension de la paroi et ainsi la biosynthèse des composants de la paroi. Beaucoup de travaux ont été faits sur la biosynthèse de la chitine. Des études sur une variété de champignons ont précisé les enzymes et les étapes biosynthétiques impliquées dans la conversion du glucose-6-phosphate en précurseur de chitine, l'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine. Une seule activité enzymatique est impliquée dans l'étape finale, la **chitine synthase**. Chez beaucoup de champignons, cependant, il y a de multiples isozymes de la chitine synthase. Ces enzymes existent sous une forme active étroitement associée avec la membrane plasmique ou sous une forme zymogène inactive à l'intérieur d'une classe spécifique de microvésicules appelées **chitosomes**. Quand elle est insérée dans la membrane plasmique, la forme zymogène de la chitine synthase doit être activée par une protéase. Le substrat est alors délivré du cytoplasme à la partie de l'enzyme qui est sur la face interne de la membrane plasmique, de façon à ce que les chaînes de chitine soient synthétisées et expulsées de la face externe de la membrane vers la paroi.

Une autre enzyme majeure impliquée dans la croissance de la paroi est la **glucane synthase** qui catalyse la synthèse des  $\beta$ -1,3-glucanes. Comme la chitine synthase, elle est supposée arrivée dans des vésicules et est alors insérée dans la membrane plasmique à l'apex. Le substrat fourni à partir du cytoplasme est l'uridine diphosphate glucose, un nucléotide de sucre. L'enzyme est composée de deux sous-unités, l'une est sur la face intérieure et contient le site catalytique et l'autre est une protéine liée à la guanosine triphosphate. Cette dernière semble activer l'enzyme à la surface interne de la membrane et les chaînes de glucanes sont synthétisées et expulsées de la surface externe de la membrane vers la paroi. Ainsi, ces chaînes de glucanes semblent subir des modifications ultérieures dans la paroi, où les liaisons  $\beta$ -1,6 sont ajoutées pour produire les glucanes typiques ramifiées des champignons.

Les mannoprotéines sont parmi les quelques composants de paroi qui se forment auparavant dans l'appareil de Golgi et sont ensuite délivrées dans les vésicules à l'apex. L'addition des chaînes de mannane aux protéines est une partie de la fonction normale de glycosylation de l'appareil de Golgi.

Différents types de liaisons croisées existent entre les polymères majeurs de la paroi après leur insertion dans celle-ci. Ces liaisons croisées semblent se former progressivement derrière l'extrémité hyphale. La chitine et les glucanes sont liées par des liaisons covalentes. Les chaînes individuelles de chitine s'associent l'une avec l'autre par des ponts hydrogène pour former des microfibrilles. Les glucanes s'associent aussi de cette façon. Ces ponts de liaisons additionnels derrière l'apex en croissance

serviraient à convertir la paroi initialement plastique en une structure progressivement plus rigidifiée et liée avec croisement.

Pour que de nouveaux composants soient insérés, il semble que la paroi existante se ramollisse de façon à ce que la croissance de la paroi implique un équilibre entre la lyse pariétale et la synthèse pariétale. En concordance avec ceci, les activités de la chitinase (pour les vrais champignons), de la cellulase (pour les *Oomycota*) et de la  $\beta$ -1,3-glucanase (pour l'ensemble) peuvent être rencontrées dans les fractions de la paroi hyphale, bien que ces enzymes pourraient exister d'habitude sous forme latente. Les enzymes lytiques de la paroi semblent aussi être impliquées dans les ramifications hyphales, quand de nouveaux apex sont créés à partir d'une paroi hyphale existante mûre. Dans des travaux récents, cependant, certains résultats ont montré que les extrémités hyphales en croissance ont un cytosquelette se développant de la paroi, qui fournirait un support structural, de façon à ce que la paroi à l'apex pourrait être réellement plastique et ne nécessite pas des activités d'enzymes lytiques.

#### *Force motrice*

Les travaux récents sur la force motrice de la croissance apicale suggèrent que le cytosquelette, par interaction avec les protéines motrices et le calcium, a un rôle central dans la croissance de l'apex. Cette extrémité pourrait être poussée en avant par la polymérisation de l'actine, le cytoplasme coulerait vers l'extrémité à l'aide des protéines motrices interagissant avec les composants cytosquelettiques et les vésicules pourraient aussi être transportées vers l'extrémité à l'aide des composants cytosquelettiques.

#### *Tropisme hyphal*

Bien que les champignons nécessitent des éléments nutritifs organiques pour leur croissance, les hyphes de la plupart des champignons ne montrent pas de tropisme vis à vis des éléments nutritifs. Seuls certains *Oomycota* montrent ce comportement. Chez certains de ces champignons (*Saprolegnia* et *Achlya*, par exemple), les hyphes, sur un milieu de culture pauvre en éléments nutritifs, montrent un tropisme vers l'hydrolysate de caséine ou autres mélanges d'acides-amino et les hyphes se ramifient aussi à partir du côté le plus proche des mélanges d'acides-amino.

Chez beaucoup de champignons, les hyphes montrent des réponses tropiques à des facteurs non nutritifs. Certains champignons agents de pourriture du bois (*Chaetomium globosum*) s'orientent vers des composés volatils à partir des parties du bois fraîchement coupées. Les hyphes du

pathogène des plantules (*Sclerotium rolfsii*) s'orientent vers le méthanol et les alcools à courtes chaînes à partir de la matière organique en début de décomposition. Des phéromones sexuelles élicitent aussi des réponses d'orientation.

#### *Ramification hyphale*

Les ramifications hyphales émergent par le développement de nouveaux apex. Ces apex peuvent émerger de presque n'importe quel point tout le long d'une hyphe, bien qu'ils se développent rarement près de l'extrémité hyphale. Généralement, ils émergent immédiatement derrière la cloison. Leur développement à partir de la paroi hyphale mûre antérieure doit être précédée par le ramollissement de la paroi. Ceci pourrait impliquer une livraison localisée d'enzymes lytiques de la paroi ou d'enzymes lytiques déjà présentes dans la paroi attendant une activation.

Généralement, la ramification hyphale dépend de l'écologie. Sur des milieux nutritifs pauvres, les colonies ont des ramifications clairsemées, tandis qu'elles sont fortement ramifiées sur des milieux nutritifs riches.

#### *Division nucléaire*

Le compartiment apical des champignons filamenteux est souvent multinucléé. Durant la plupart des stades de la mitose, la membrane nucléaire et le nucléole chez les champignons restent généralement intacts. Il n'y a pas de plaque de métaphase claire, remplacée par des chromosomes dispersés au hasard. A l'anaphase, les chromatides filles se séparent le long de deux directions, sur des fuseaux de fibres de différentes longueurs. Egalement, la plupart des champignons n'a pas des centrioles typiques mais un corps aux pôles du fuseau qui fonctionne à la manière d'un centriole comme un centre d'assemblage de microtubules pendant la division nucléaire. Ce corps a une structure en forme de disque allongé juste à côté de l'enveloppe nucléaire chez les *Ascomycota*, tandis que chez les *Basidiomycota*, il est souvent composé de deux extrémités globulaires liées par un pont.

#### *Formation des cloisons*

Chez la plupart des champignons, les cloisons sont très riches en chitine arrangée en microfibrilles tangentiellles. Le site et la croissance interne des cloisons impliquent la localisation d'un anneau d'actine. Ainsi, comme pour la croissance apicale, les composants cytosquelettiques (microtubules et microfilaments) sont impliqués dans le positionnement de la synthèse de la paroi de la cloison.



### **Croissance cellulaire des levures**

Le processus de croissance cellulaire des levures n'est pas fondamentalement différent de la croissance hyphale. Il est localisé au niveau du site du bourgeonnement, probablement par les mêmes mécanismes comme dans la croissance apicale. En concordance avec ceci, de petites vésicules et des composants cytosquelettiques sont observés à l'extrémité en croissance des sites de bourgeonnement ou quand les cloisons se forment pour séparer un bourgeon de la cellule parentale.

### **3) Différenciation**

Comme tous les autres organismes vivants, la différenciation est un changement régulé d'un état à un autre, morphologiquement et/ou physiologiquement. Ces changements dans la morphologie aboutissent à une large gamme de structures différenciées qui servent à des fonctions particulières. Celles-ci renferment une variété de différents types de structures productrices de spores appelées stromes. Ainsi, un **strome** est une masse compacte de hyphes végétatives, produites par le plectenchyme et sur/dans lequel sont communément produites les hyphes fertiles qui génèrent des structures reproductives sexuées et asexuées. Le **plectenchyme** est une structure qui ressemble au tissu et qui est formée par des hyphes qui deviennent tordues et fixées ensemble. Deux types majeurs de plectenchyme sont connus : le **prosenchyme** dans lequel les éléments hyphaux peuvent être observés individuellement et le **pseudoparenchyme** dans lequel les éléments hyphaux ne peuvent pas être distingués. Le terme parenchyme n'est pas utilisé puisqu'il ne s'agit pas d'un tissu vrai comme chez les plantes.

En plus de la différenciation des stromes et d'autres structures impliquées dans le processus de reproduction, certaines structures sont différenciées durant le développement végétatif. Certaines d'entre elles se forment au niveau cellulaire (appressories, hyphopodes et haustories) tandis que d'autres se forment à un niveau mycélien (sclérotés, rhizomorphes et cordons mycéliens). Un autre type particulier de différenciation est le **dimorphisme** qui caractérise certains champignons capables de changer entre des phases mycélienne et unicellulaire (généralement levure) en réponse au changement des conditions environnementales.

#### **Appressories et hyphopodes**

L'**appressorie** est une cellule terminale gonflée qui se forme à l'apex du tube germinatif de la spore en germination (Figure 1-4). Ces

gonflements sont appelés **hyphopodes** quand ils se développent sur de courtes branches latérales des hyphes. Telles structures différenciées permettent à certains champignons pathogènes de se fixer sur la surface de leurs hôtes avant d'y pénétrer. Les hôtes sont généralement des plantes, mais parfois ils sont aussi des insectes.

### **Haustories**

L'**haustorie** est une structure spécialisée dans l'absorption nutritive développée dans la cellule hôte par certains champignons phytopathogènes durant le processus d'infection (Figure 1-4).

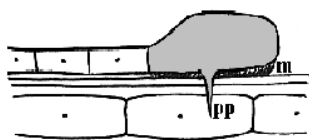
### **Sclérotés**

La production des sclérotés est largement répartie chez les champignons à mycélium septé. Les **sclérotés** se développent initialement par ramification hyphale localisée et répétée, suivie par l'adhésion des hyphes et l'anastomose des branches (Figure 1-4). Durant la maturation des sclérotés, les hyphes externes peuvent être agglutinées et forment une croûte tandis que l'intérieur se différencie en un cortex de cellules à paroi épaisse mélanisée et un médulla central de hyphes avec des réserves substantielles en éléments nutritifs de stockage de glycogène, de lipides et de tréhalose.

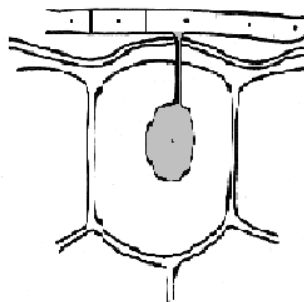
Les sclérotés peuvent survivre pendant de longues périodes, souvent des années, dans le sol. Dans des conditions favorables, ils germent soit en produisant des hyphes (les sclérotés mycélogéniques de *Sclerotium rolfii* et *Rhizoctonia solani*, par exemple) ou en produisant des structures sexuelles de sporulation (comme chez *Claviceps purpurea* et *Sclerotinia sclerotiorum*).

### **Rhizomorphes**

Le **rhizomorphe** est une agrégation qui ressemble aux racines et qui est formée de hyphes caractérisées par un « méristème » apical bien défini (Figure 1-4). Les rhizomorphes, qui sont limités à certains *Basidiomycota*, sont fréquemment différenciés en une écorce de petites cellules de couleur noire entourant un cœur central de cellules allongées sans couleur. Les rhizomorphes s'étendent plus rapidement que les hyphes non différenciées et peuvent croître sur de longues distances à travers le sol. Ils permettent ainsi au champignon de se développer et de coloniser rapidement de grandes superficies. L'exemple remarquable est le rhizomorphe d'*Armillaria mellea*.



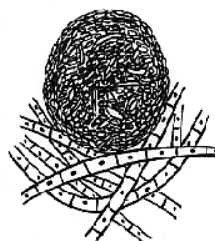
Appressorie à la surface d'une feuille  
avec pointe de pénétration (pp)  
et mucilage collant (m)



Haustorie dans une cellule végétale



Rhizomorphes sous l'écorce  
d'une racine



Sclérote

**Figure 1-4 :** Quelques structures différenciées des thalles fongiques.

### **Cordons mycéliens**

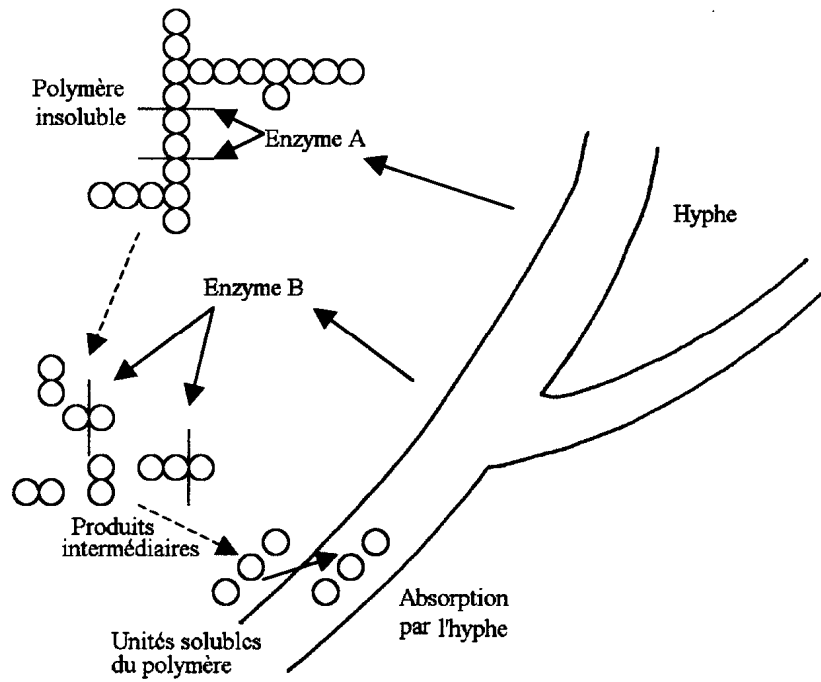
Le **cordon mycélien** est une agrégation hyphale obtenue quand des branches émergent des hyphes et croissent en arrière et en avant tout le long des hyphes parentales. Ces branches produisent des branches ultérieures qui répètent le processus. Ainsi, le cordon devient progressivement plus épais avec beaucoup de hyphes parallèles. La consolidation a lieu par anastomose des hyphes et leur cimentation avec la sécrétion d'une matrice extracellulaire. Les cordons mycéliens permettent aux champignons (*Basidiomycota*) de se propager à travers des surfaces non nutritives jusqu'à atteindre des sites nutritifs plus loin. Le cas le plus intensivement étudié des cordons mycéliens est celui de *Serpula lacrymans*.

## **4) Nutrition**

### **Acquisition de la nourriture**

Pour leur croissance, les champignons nécessitent des substances nutritives avec lesquelles ils sont en contact direct dans l'environnement. Les éléments nutritifs qui sont de petites molécules, telles que les sucres simples et les amino-acides en solution dans le film d'eau entourant les hyphes, peuvent être directement absorbés par le champignon. Par contre, les substances nutritives formées de gros polymères insolubles, tels que la cellulose, l'amidon et les protéines, doivent d'abord être dégradées avant d'être utilisées. Cette digestion est réalisée par des enzymes extracellulaires qui contrôlent les réactions d'hydrolyse qui dissocient les grosses molécules en composants plus simples. La dégradation complète des gros polymères en molécules simples solubles est un processus où différentes enzymes extracellulaires sont impliquées. Une fois la molécule simple est absorbée dans la cellule, elle passe sous l'action des enzymes intracellulaires (Figure 1-5).

Les enzymes digestives (intracellulaires et extracellulaires) peuvent ne pas être présentes tout le temps dans le champignon. Ainsi, la synthèse de certaines de ces enzymes peut être induite par la disponibilité d'un élément nutritif particulier. Un milieu contenant la cellulose, par exemple, peut induire chez un champignon la production de cellulase qui dégrade cette substance. Par contre, l'absorption d'un élément nutritif particulier par les champignons peut être réprimée par la présence d'un autre élément nutritif plus facile à absorber. Par exemple, un champignon peut utiliser préférentiellement le glucose et n'absorbe pas le saccharose, le maltose ou le galactose jusqu'à ce que le glucose soit épuisé. D'autres cas de répression sont connus. Les phosphates peuvent réprimer l'absorption d'autres



**Figure 1-5** : Schéma général de la dégradation et l'absorption chez les champignons.

composants contenant le phosphore, les amino-acides contenant le soufre peuvent réprimer l'absorption des sulfates, et l'ammoniaque ou la glutamine peut réprimer l'absorption des nitrates.

Pour entrer dans la cellule fongique, les molécules et les ions doivent passer à travers la paroi qui est quelque peu poreuse et à travers la membrane plasmique qui est semi-perméable et qui peut réguler le mouvement des solutés dans la cellule. Les molécules et les ions peuvent passer à travers la membrane plasmique par transport passif, se déplaçant d'une plus forte vers une plus faible concentration de solutés. Dans de nombreux cas, cependant, les molécules et les ions s'accumulent dans la direction opposée du gradient de concentration. Ce transport actif est un mécanisme qui implique la liaison du soluté à une molécule transporteuse qui existe dans la membrane plasmique. L'énergie métabolique nécessaire au système transporteur est fournie par l'ATP.

### **Besoins nutritifs**

#### *Eléments aériens*

**Oxygène :** Les champignons peuvent obtenir l'énergie par métabolisme oxydatif (respiration) ou par fermentation. L'oxydant normal pour la respiration est l'oxygène lui-même. Cependant, il est prouvé que sous faibles tensions d'oxygène, certains champignons peuvent utiliser le nitrate comme oxydant. Les champignons qui vivent par respiration oxygénique sont appelés aérobies tandis que ceux vivants par fermentation (sans utiliser l'oxygène) sont appelés anaérobies.

**Dioxyde de carbone :** Les champignons sont hétérotrophes et ne peuvent pas réaliser une fixation du dioxyde de carbone comme les autotrophes. Cependant, ce gaz est un facteur essentiel dans plusieurs réactions métaboliques importantes, et la fixation hétérotrophique du dioxyde de carbone a été démontrée chez certains champignons.

#### *Carbone*

Divers composés organiques peuvent être utilisés comme sources de carbone par les champignons. Ils renferment des carbohydrates, des lipides, des protéines et des acides organiques en plus du dioxyde de carbone qui peut être fixé par certains champignons. Les plus importantes sources de carbone sont les carbohydrates.

**Monosaccharides :** Les monosaccharides sont des sucres simples ayant cinq ou six atomes de carbone (pentoses et hexoses, respectivement). Chaque molécule de sucre a des groupes aldéhyde et cétone. La réduction de ces groupes produit des dérivés alcools et leur oxydation forme des dérivés acides. Parmi tous les sucres, presque tous les champignons utilisent le *D*-glucose qui est un sucre largement répandu occupant une position centrale dans le métabolisme. Plusieurs champignons ont une croissance sur le *D*-fructose ou le *D*-mannose au lieu du *D*-glucose. Le *D*-galactose est aussi utilisé par la plupart des champignons mais seulement peu d'entre eux peuvent y croître aussi bien que sur le *D*-glucose.

Parmi les pentoses, le *D*-xylose semble être utilisé par le plus grand nombre de champignons. Certains d'entre eux peuvent même mieux croître sur ce glucide que sur le *D*-glucose. Le *L*-arabinose est aussi utilisé par certains champignons mais ils croissent moins sur ce sucre que sur le *D*-glucose ou le *D*-xylose. Le reste des pentoses apparaît être des sources pauvres en carbone pour les champignons.

**Polysaccharides :** En fonction de la stéréoconfiguration ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de la liaison glycosidique, les unités de sucre peuvent se combiner pour former deux types de polymères. Ces polymères, qui sont la combinaison de deux ou plusieurs monomères, sont spécifiquement qualifiés par di-, tri-, tetra-, oligo-, ou polysaccharides. Dans le but d'utiliser ces polysaccharides (*sensu lato*), les champignons doivent produire des enzymes digestives extracellulaires qui vont couper la liaison glycosidique entre les monomères. Les monomères libérés (monosaccharides) sont alors absorbés et utilisés de la même façon que les monosaccharides qui se forment librement.

Les disaccharides les plus communs utilisés par les champignons sont le maltose, la cellobiose, le lactose et le saccharose. Leur hydrolyse nécessite la production par les champignons des enzymes maltase, cellobiase, lactase et invertase, respectivement. Les polysaccharides utilisés par les champignons peuvent être les pentosanes (polymères de pentoses), le glycogène, l'amidon, la cellulose, les pectines, les hemicelluloses et les gommages. Parmi ces polysaccharides, l'amidon et la cellulose sont largement utilisés comme sources de carbone par les champignons. Pour la dégradation de tous ces polysaccharides, les champignons doivent produire des enzymes spécifiques telles que l'amylase, la cellulase, les pectinases, les hemicellulases et d'autres.

**Alcools et acides organiques :** Plusieurs alcools sucre, tels que le sorbitol, le glycérol et le mannitol, peuvent être utilisés par les champignons

comme sources de carbone, bien que ces alcools soient utilisés d'une façon moins satisfaisante que leurs correspondants sucres seuls.

Les acides organiques, qui sont caractérisés par un ou plusieurs groupes carboxyle, peuvent être utilisés par les champignons en tant que sources de carbone comme à partir des acides gras, des amino-acides et des acides carboxyliques. Dans plusieurs cas, les champignons produisent des lipases et des protéases pour libérer, respectivement, les acides gras et les amino-acides de leurs grosses molécules.

#### *Azote*

La majorité des champignons assimile l'azote inorganique comme les nitrates, les nitrites et l'ammoniaque en plus de l'utilisation d'une large gamme de composés azotés tels que les amino-acides.

**Nitrates :** Etant une forme inorganique de l'azote, nombreux champignons utilisent les nitrates. L'ion nitrate est absorbé comme nitrate d'ammonium, nitrate de potassium, nitrate de sodium et nitrate de calcium. Après leur absorption par les champignons, les nitrates doivent être réduits en ammoniaque avant d'être utilisés dans la synthèse d'autres composés organiques. Pour cela, la première étape implique la réduction de l'ion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) en ion nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) qui est réalisée par l'intermédiaire de l'enzyme nitrate réductase. Ensuite, l'ion nitrite est réduit en ammoniaque par la participation d'une seconde enzyme, nitrite réductase.

**Nitrites :** Les nitrites peuvent servir comme source d'azote pour certains champignons, bien qu'ils soient toxiques à la plupart des espèces fongiques, spécialement s'ils s'accumulent dans le milieu et ne peuvent pas être utilisés.

**Ammoniaque :** Plusieurs champignons ne peuvent pas utiliser les nitrates comme source d'azote et utilisent à leur place l'ion ammonium et l'azote organique qui sont des formes plus réduites de l'azote. L'ion ammonium peut être fourni sous forme d'un sel d'ammonium. Quand le nitrate d'ammonium est ajouté au milieu, les champignons utilisent souvent préférentiellement l'ion ammonium, bien que l'ion nitrate soit présent.

**Azote organique :** La plupart des champignons assimile l'azote dans sa forme organique telle que les amino-acides, les amines, les amides, les protéines et d'autres. Pour être assimilés, les peptides et les protéines sont d'abord décomposés en leurs composants amino-acides. A ces amino-acides,



les champignons ont différentes réponses. Par exemple, l'asparagine donne d'habitude une bonne croissance fongique tandis que la leucine donne souvent une faible croissance. Une bonne croissance est généralement obtenue aussi avec la glycine, l'acide glutamique et l'acide aspartique. Mais, la croissance des champignons est d'habitude meilleure avec un mélange d'acides-amino qu'avec un seul.

#### *Soufre*

Pour leur croissance, les champignons nécessitent des composés contenant le **soufre** tels que certains acides-amino (cystéine, cystine et méthionine), les peptides qui incorporent ces acides-amino et les vitamines (thiamine et biotine). Dans le milieu, le besoin fongique en soufre est généralement satisfait par l'incorporation de l'ion sulfate ( $\text{SO}_4^-$ ) tel que à partir du sulfate de magnésium. Après son absorption, l'ion sulfate est réduit et incorporé dans les molécules organiques.

#### *Phosphore*

Le **phosphore** est un important élément des macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et les phospholipides aussi bien que des micromolécules telles que le coenzyme A et certaines vitamines. Dans le milieu, le besoin en phosphore est d'habitude satisfait par l'incorporation d'un composé inorganique phosphaté, et les champignons absorbent le phosphore sous forme d'ion orthophosphate ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Pour cela, les phosphatases sont secrétées par plusieurs champignons pour dissocier le groupe phosphate des composés phosphorylés. Après son absorption, l'ion phosphate est incorporé dans les molécules organiques. L'excès de phosphate peut être polymérisé par les champignons en longues chaînes et stocké comme polyphosphate dans les vacuoles.

#### *Calcium*

Le **calcium** a un rôle important chez les champignons, bien qu'il semble ne pas leur être universellement nécessaire. Il a un rôle dans le fonctionnement des microtubules et des microfilaments, dans l'activité des enzymes et dans la maintenance de l'intégrité structurale des membranes.

#### *Potassium*

Le **potassium** est impliqué dans le processus de transport dans la cellule et dans la régulation du potentiel osmotique cellulaire. Il est absorbé par les champignons sous forme inorganique.

### *Magnésium*

Le **magnésium** est impliqué dans la structure et la fonction membranaires. Il est aussi nécessaire comme un cofacteur pour certaines enzymes glycolytiques. Il est absorbé par les champignons sous forme inorganique.

### *Sodium*

Le **sodium** est nécessaire seulement aux champignons vivant dans la mer et les lacs salés. Il est généralement fourni comme chlorure. Chez les autres champignons, cependant, le sodium peut être absorbé et remplace partiellement le potassium, réduisant ainsi la quantité de potassium nécessaire.

### *Microéléments*

Les microéléments sont des éléments traces d'habitude nécessaires en faibles concentrations ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  M). Ils deviennent rapidement toxiques quand ils dépassent les quantités demandées. Certains microéléments, tels le fer, le zinc, le cuivre, le manganèse et le molybdène, sont nécessaires à la majorité des champignons. D'autres microéléments, comprenant le scandium et le cobalt, sont nécessaires à certains champignons et pas à d'autres. Le bore ne semble pas être indispensable aux champignons, malgré son rôle essentiel chez les plantes. Quelques autres microéléments peuvent être absorbés par les champignons. Ils renferment certains éléments métalliques tels que le mercure, le nickel, le plomb, l'uranium et l'arsenic.

Différents rôles sont joués par les microéléments dans la cellule fongique. Ils sont généralement impliqués dans l'activité et/ou la structure des enzymes. Par exemple, le **fer** est contenu dans l'enzyme catalase, dans les cytochromes impliqués dans le transport d'électrons, et dans d'autres métabolites comprenant des facteurs de croissance et des pigments. Le problème rencontré avec le fer est que dans des conditions d'acides faibles, le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en solution subit une oxydation spontanée rapide vers l'état ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) suivie par une précipitation comme hydroxyde ferrique hautement insoluble. Ce problème peut être résolu par l'utilisation d'un agent chélatant, tel que l'EDTA, avec lequel le fer forme un complexe soluble. Egalement, plusieurs champignons, mais pas leur totalité, sont capables de produire des agents chélatants puissants pour le fer, appelés **sidérophores**. Ces composés sont libérés dans le milieu quand l'apport du fer est limitant pour la croissance, et chélatent les ions ferriques. Le complexe fer-sidérophore est alors transporté à travers la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. Chez certains *Zygomycota*, comme

chez les plantes et les animaux, le fer est stocké dans les cellules par l'intermédiaire d'une protéine liée au fer, appelée ferritine.

Le **molybdène** est ajouté au milieu sous forme de molybdate. Il joue un rôle essentiel dans la réduction du nitrate en participant comme un transporteur d'électrons dans la réaction enzymatique. Le **zinc** et le **manganèse** activent normalement les enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique. Le manganèse peut aussi stimuler la sporulation fongique tandis que le **cuivre** semble être impliqué dans la pigmentation des spores de certains champignons.

#### *Vitamines*

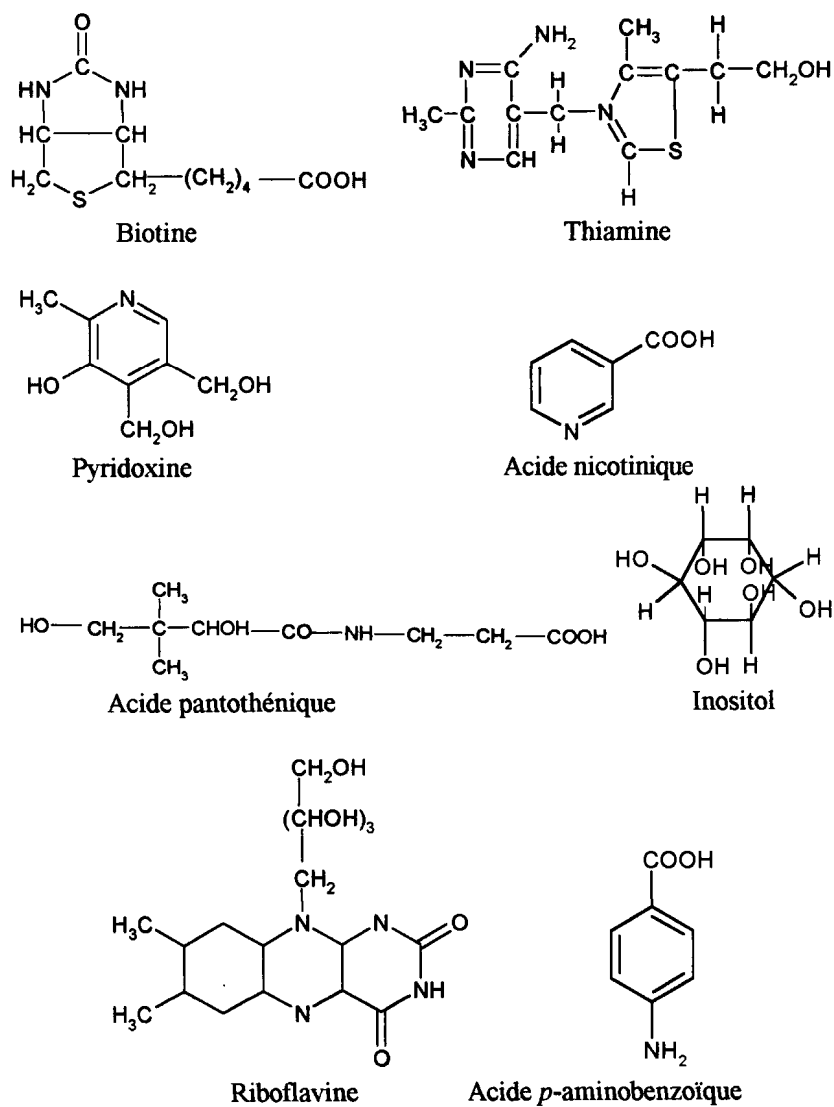
Les vitamines sont efficaces en très petites quantités (souvent de  $10^{-6}$  à  $10^{-10}$  M). Ce sont des composés organiques qui fonctionnent comme des coenzymes ou comme parties constituantes des coenzymes qui catalysent des réactions spécifiques. Certains champignons synthétisent toutes les vitamines qui leur sont nécessaires, tandis que d'autres ont une déficience partielle ou totale pour une ou plusieurs vitamines. Pour avoir une croissance fongique normale, les déficiences en vitamines doivent être compensées par un apport exogène en ces vitamines dans le milieu.

Contrairement aux animaux, les champignons ne nécessitent apparemment pas la vitamine C et les vitamines liposolubles A, D, E et K. Mais les champignons nécessitent les vitamines B hydrosolubles et l'acide *p*-aminobenzoïque. Les vitamines B indispensables sont la thiamine (vitamine B<sub>1</sub>), la biotine (vitamine B<sub>7</sub>), la pyridoxine (vitamine B<sub>6</sub>), l'acide nicotinique (vitamine B<sub>3</sub>), l'acide pantothénique (vitamine B<sub>5</sub>), la riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) et la cyanocobalamine (vitamine B<sub>12</sub>) (Figure 1-6).

La plupart des déficiences fongiques est pour la thiamine. Par exemple, toutes les espèces de *Phytophthora* et certains *Basidiomycota* sont déficients en thiamine. Cette vitamine joue un rôle important dans la régulation du métabolisme des carbohydrates. Une autre vitamine, pour laquelle de nombreux champignons sont déficients, est la biotine. Son rôle est de stimuler l'activité des enzymes qui transfèrent le dioxyde de carbone ou les groupes carboxyle.

#### *Facteurs de croissance*

Contrairement aux vitamines, les facteurs de croissance ne servent pas comme des coenzymes et ils sont efficaces à des concentrations légèrement supérieures. Ils stimulent la croissance fongique. Des exemples de facteurs de



**Figure 1-6 :** Structure chimique de quelques vitamines importantes chez les champignons.

croissance sont la choline, l'hémine, les acides gras, les stérols, les flavonides et différents composés volatils tels qu'alcools, aldéhydes, coumarine et d'autres. Parfois, la ligne de séparation entre vitamines et facteurs de croissance n'est pas évidente. Par exemple, l'inositol, qui a été considéré comme une vitamine, est maintenant connu être incorporé dans la membrane plasmique, agissant ainsi comme un facteur de croissance.

## 5) Métabolisme

Comme pour les autres organismes vivants, les processus métaboliques sont essentiels à la vie des champignons. Les substances nutritives, qui sont absorbées, sont converties par les réactions anaboliques en constituants cellulaires alors que l'énergie est obtenue des substances nutritives par les réactions cataboliques. Dans la plupart des cas, le métabolisme des champignons est comme celui des autres organismes, malgré certaines différences intéressantes qui peuvent avoir lieu. Certaines voies métaboliques uniques, telles que la voie lysine, ont lieu chez les champignons mais sont absentes chez les plantes et les animaux. Dans d'autres cas, les voies métaboliques peuvent être globalement similaires à celles qui ont lieu chez les autres organismes, mais avec des différences mineures dans des enzymes ou des réactions particulières. Une autre spécificité fongique est la production par les champignons de nombreux métabolites sans rôle apparent dans la vie fongique. Des exemples sont les toxines et les antibiotiques. Arbitrairement, les scientifiques décrivent souvent le métabolisme fongique comme **métabolisme primaire** quand il implique les réactions métaboliques nécessaires au maintien de l'organisme et **métabolisme secondaire** quand il implique la production de nombreux composés qui ne sont apparemment pas essentiels au maintien de l'organisme.

### Métabolisme des carbohydrates et de l'énergie

Les carbohydrates, avec la formule empirique  $(CH_2O)_n$ , renferment les monosaccharides, les alcools sucre, les polysaccharides et leurs dérivés. Quand ils sont oxydés, les monosaccharides (glucose et ses dérivés) fournissent l'énergie. Ils sont présents en faibles concentrations chez les champignons quand ils sont comparés avec les autres organismes. Mais, les champignons stockent plus d'énergie dans le disaccharide tréhalose et dans les alcools sucre (glycérol, érythritol, mannitol, arabitol, etc...). Les champignons produisent aussi plusieurs polysaccharides particuliers tels que glycogène (réserve d'énergie) et chitine (composant de la paroi cellulaire).

Les champignons reçoivent l'énergie utile par l'intermédiaire des réactions cataboliques de la respiration et la fermentation à partir des carbohydrates obtenus comme substances nutritives de leur environnement ou de leurs réserves cellulaires. D'autre part, en utilisant de nombreuses réactions anaboliques et synthétiques, les champignons élaborent plusieurs carbohydrates pour les utiliser comme stockage d'énergie ou dans la structure de la paroi.

#### *Réactions d'oxydo-réduction*

L'oxydation et la réduction sont toujours des réactions chimiques couplées. L'oxydation implique la perte d'électrons à partir d'un substrat tandis que la réduction implique le gain d'électrons par un autre substrat. Pour la plupart des composés organiques, l'élimination d'électrons est accompagnée par une perte d'ions hydrogène, et dans ces cas, l'oxydation est équivalente à une déshydrogénation. Ainsi, un substrat oxydé est un donneur d'hydrogène tandis qu'un substrat réduit est un accepteur d'hydrogène. La réaction d'oxydation libère l'énergie sous une forme chimique (généralement des ions hydrogènes et leurs électrons) qu'une réaction de réduction absorbe. Le substrat réduit obtenu peut être oxydé et la réaction d'oxydation libère l'énergie qui est récupérée par une autre réaction de réduction. Ainsi, une séquence d'oxydo-réduction a lieu et se termine seulement quand un accepteur terminal d'électrons est réduit en acceptant des électrons.

Pour la plupart des champignons, l'accepteur terminal d'électrons est l'oxygène et tout le processus est la **respiration**. Ces champignons, qui doivent croître sous des conditions d'aérobie, sont appelés des aérobies obligatoires. Pour certains champignons, qui peuvent croître sous des conditions d'anaérobie, l'accepteur terminal d'électrons et un composé organique dérivé du glucose et tout le processus est la **fermentation**. Ces champignons sont connus comme anaérobies obligatoires. Les espèces fongiques qui sont capables de croître sous les deux conditions d'aérobie (oxygène moléculaire disponible) et d'anaérobie (manque ou insuffisance d'oxygène), sont appelées des anaérobies facultatives.

#### *Glycolyse*

Sous des conditions à la fois d'aérobie et anaérobie, les étapes initiales sont les mêmes pour la respiration et la fermentation. Le processus commence avec la **glycolyse** qui est la conversion du glucose en acide pyruvique qui se trouve dans le cytoplasme. Quand la glycolyse est terminée, la respiration est favorisée sous les conditions d'aérobie tandis que la fermentation est favorisée sous les conditions d'anaérobie.

Comme pour les bactéries, les plantes et les animaux, les principales voies glycolytiques sont les voies d'**Embden-Meyerhof (EM)** et de l'**hexosemonophosphate (HMP)**. La voie EM est la principale voie glycolytique et d'habitude compte pour la plupart du glucose converti. La voie HMP a aussi lieu fréquemment. Chez un champignon donné, la glycolyse peut avoir lieu à travers les deux voies ensemble ou presque exclusivement par l'une ou l'autre.

La majorité de la conversion du glucose en pyruvate a lieu par l'intermédiaire de la voie EM. La voie HMP est par ailleurs la source biosynthétique des pentoses, nécessaires à la synthèse des acides nucléiques. La voie EM génère NADH qui produit l'ATP par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire tandis que la voie HMP produit NADPH qui ne génère apparemment pas d'ATP mais fonctionne comme un donneur d'hydrogène, rendant possible la réduction d'autres composés.

Les voies EM et HMP peuvent avoir lieu sous des conditions à la fois d'aérobie et d'anaérobie, mais la voie HMP devient beaucoup moins active en absence d'oxygène libre. Les deux voies partagent plusieurs caractéristiques biochimiques. Par exemple, la plupart des enzymes nécessaires à la voie EM opère également dans la voie HMP.

### *Respiration*

Sous des conditions d'aérobie, l'acide pyruvique est converti en acétyl-coA qui se combine avec l'acide citrique et entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique (ATC). Ces réactions ont lieu dans la matrice de la mitochondrie et aboutissent à la l'oxydation de l'acide citrique. Le cycle ATC, qui est une voie aérobie nécessitant la présence de l'oxygène moléculaire, a lieu largement chez les champignons comme chez les autres organismes vivants.

La **respiration** est accomplie quand les paires d'hydrogène et leurs électrons, éliminés durant l'oxydation du glucose, passent tout au long de la chaîne respiratoire (un système de transport d'électrons), réduisant finalement l'oxygène en eau. Deux chaînes respiratoires ont lieu chez les champignons et accomplissent la respiration :

- 1 - une chaîne respiratoire, similaire à celle existant chez les autres organismes vivants, contient les cytochromes qui sont des enzymes avec l'hème comme groupe prosthétique transportant les électrons et qui génère l'ATP ; cette chaîne peut être inhibée par le cyanure et elle est généralement la

principale chaîne impliquée dans les étapes terminales de la respiration chez les champignons,

- 2 - une seconde chaîne de respiration manquant les cytochromes ne génère pas l'ATP et n'est pas inhibée par le cyanure ; le rôle de cette chaîne n'est pas encore connu.

#### *Fermentation*

La **fermentation** caractérise certains groupes fongiques, en particulier beaucoup d'espèces de levures et de chytrides. A la fermentation sous conditions d'anaérobiose, un intermédiaire de la glycolyse ou le produit de la glycolyse peut servir comme accepteur terminal d'électrons, et ceci se termine par la production de composés organiques. Concernant les produits, trois principaux groupes de fermentation sont connus : alcools, acide lactique et mélanges d'acides.

#### *Production de polysaccharides*

Le carbone assimilé par les champignons est largement utilisé dans la biosynthèse de substance de la paroi cellulaire (chitine) et du stockage d'énergie (glycogène).

Le schéma de biosynthèse de la chitine est généralement similaire chez les champignons, les crustacées et les insectes. Il commence avec la conversion du glucose en *N*-acétylglucosamine-1-phosphate qui nécessite une série de réactions. Puis le *N*-acétylglucosamine-1-phosphate réagit avec le nucléotide uridine triphosphate (UTP) pour former l'UDP-*N*-acétylglucosamine qui est un nucléoside diphosphate sucre. Finalement, ce sucre transfère la moitié de *N*-acétylglucosamine à la chaîne en croissance, fonctionnant comme une amorce et devient l'un de ses sous-unités. L'enzyme chitine synthase et les ions  $Mg^{2+}$  sont nécessaires pour cette polymérisation. La molécule complète de chitine est une longue chaîne de sous-unités de sucre qui sont liées par des liaisons  $\beta$ -1,4.

Comme chez les animaux, le glycogène produit par les champignons est un polymère ramifié de glucose. Dans la partie principale de la chaîne, les unités de glucose sont liées par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Dans la synthèse du glycogène, l'UTP réagit avec le glucose-1-phosphate pour produire le pyrophosphate et l'UDP-glucose (le nucléoside diphosphate sucre). Ce dernier donne le *D*-glucose en présence de l'enzyme glycogène synthétase, et le *D*-glucose est ajouté à la molécule de glycogène en croissance qui fonctionne comme un accepteur.



### **Métabolisme de l'azote**

Environ les 2/3 de l'azote total de la cellule fongique sont des protéines. L'azote existe aussi dans les acides nucléiques, la chitine, les phospholipides et certains métabolites non essentiels. Les protéines fongiques sont similaires à celles des autres organismes vivants et sont formées par les 20 amino-acides communs. Plusieurs de ces protéines sont liées par covalence aux carbohydrates pour former les glycoprotéines et les peptidoglucanes qui existent dans la membrane plasmique et la paroi cellulaire.

Les champignons nécessitent des sources organiques et inorganiques d'azote comme substances nutritives pour produire des composés qui contiennent l'azote. L'ion ammonium peut être utilisé directement comme source d'azote. Certaines autres formes inorganiques d'azote sont réduites au niveau de l'oxydation de l'ammonium tandis que les amino-acides produisent l'ammoniaque après désamination. L'ion ammonium est le point de départ pour des réactions anaboliques.

#### *Synthèse des amino-acides*

Le catabolisme de l'azote aboutit à la production d'ammoniaque ou des ions ammonium qui peuvent être utilisés pour synthétiser les amino-acides dans les voies anaboliques. L'acide  $\alpha$ -cétoglutarique (un intermédiaire du cycle ATC) est important directement ou indirectement dans la synthèse des amino-acides. L'une des réactions communes qui existe chez les champignons est quand l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique se lie à l'ammoniaque pour former l'acide, *L*-glutamique. Cette réaction, catalysée par l'enzyme acide glutamique déshydrogénase, est couplée avec l'oxydation du  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Subséquemment, un second ammoniaque peut se lier à l'acide *L*-glutamique pour produire un autre amino-acide, glutamine. L'acide glutamique peut aussi produire d'autres amino-acides. Par exemple, certains réarrangements et réductions de l'acide glutamique aboutissent à la production de l'acide, proline. Ainsi, l'acide glutamique contribue à la formation d'acides par l'intermédiaire de réactions de transamination qui impliquent le transfert du groupe amine d'un composé à un autre. Ceci a lieu entre un amino-acide et un céto-acide, convertissant le céto-acide en l'acide correspondant. Cette réaction est réversible.

#### *Synthèse des amino-acides aromatiques*

Contrairement aux animaux, la voie de l'acide shikimique a lieu chez les champignons, les plantes et les bactéries. Le rôle principal de cette voie est la production des amino-acides aromatiques, tryptophane, tyrosine, et phénylalanine aussi bien que les vitamines acides *p*-aminobenzoïques. La voie

de l'acide shikimique aboutit aussi à la production de plusieurs autres composés phénoliques qui ont aussi le noyau aromatique attaché à des groupes tels que les groupes hydroxyle (OH), carboxyle (COOH) et méthoxyle (OCH<sub>3</sub>).

## **Métabolisme des lipides**

### *Production des lipides*

Les lipides, qui sont produits par les champignons, sont divers composés qui sont solubles dans des solvants organiques non polaires. Nombreux lipides contiennent le glycérol qui peut être estérifié avec une, deux ou trois molécules d'acide gras pour former des mono-, bi- ou triglycérides, respectivement. Les phospholipides contiennent aussi le glycérol tandis que les stérols peuvent en manquer. Les lipides peuvent également être combinés dans la nature avec d'autres composés tels que les protéines, les amino-acides ou les polysaccharides. Les triglycérides et les acides gras qu'ils contiennent sont généralement une grande fraction des lipides produits par les champignons. Parmi les acides gras, les acides à 16 et 18 carbones sont les plus abondants. Comparés aux acides gras saturés, les acides gras insaturés (en particulier les acides oléique et linoléique) prédominent. Parmi les stérols produits par les champignons, le plus abondant est l'ergostérol. Les détails de la synthèse des acides gras sont généralement similaires à ceux des animaux.

### *Catabolisme des lipides*

Les champignons peuvent utiliser les lipides comme source d'énergie et de carbone. Ils sont capables de synthétiser leurs propres lipides qui ne sont d'habitude pas ajoutés aux milieux de culture. Les réserves de lipides (essentiellement glycérides) peuvent servir comme une source d'énergie quand c'est nécessaire, par exemple pendant la germination des spores. Le catabolisme des lipides commence avec l'hydrolyse des triglycérides par les lipases qui libèrent le glycérol et les acides gras. Le glycérol peut subir la glycolyse après sa phosphorylation et son oxydation en 3-phosphoglycéraldéhyde et acides gras. Ces derniers doivent subir une dégradation ultérieure avant de pouvoir être utilisés.

Le catabolisme des acides gras est principalement une séquence d'oxydation des atomes de  $\beta$ -carbone qui sont les seconds atomes de carbone par rapport aux groupes carboxyle. Ce catabolisme est souvent similaire à celui des animaux. La différence majeure est à la fin du processus où, chez les champignons, l'acide gras perd seulement un atome de carbone, au lieu de deux chez les animaux.

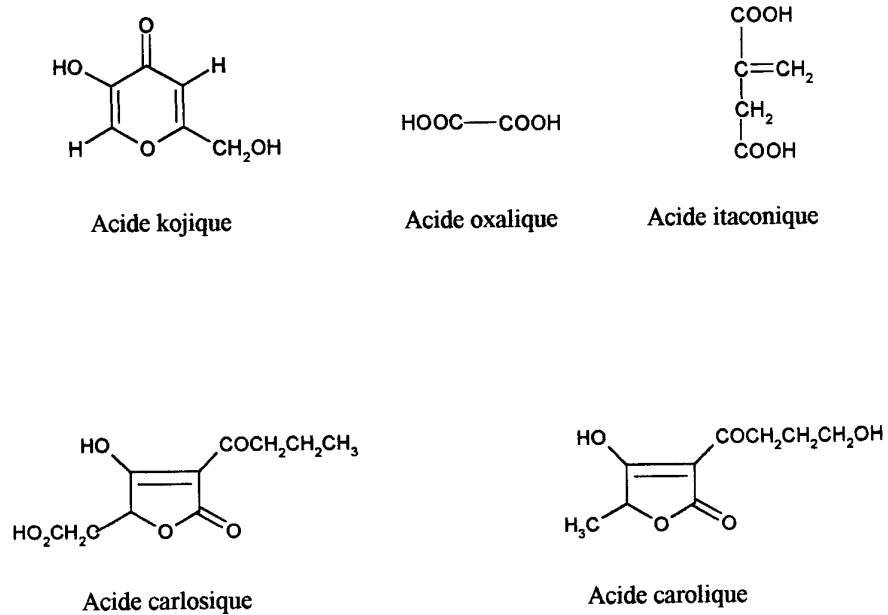
### **Métabolisme secondaire**

En plus des carbohydrates, protéines et lipides (métabolisme primaire), les champignons peuvent produire divers autres composés organiques qui comprennent des substances volatiles libérant des odeurs distinctives, des pigments donnant des couleurs particulières et des antibiotiques et toxines qui sont dangereux pour d'autres organismes vivants. Tels métabolites ne semblent pas être nécessaires aux champignons puisqu'ils ne sont pas impliqués dans l'apport d'énergie à la cellule ou dans ces composantes structurales. Plus encore, ils nécessitent même de l'énergie et des intermédiaires pour être synthétisés. Tels métabolites produits par le métabolisme secondaire sont appelés **métabolites secondaires**. Ce métabolisme secondaire est rare chez les animaux tandis qu'il est commun chez les plantes, les champignons et les bactéries.

Concernant la structure, les métabolites secondaires peuvent être des composés aliphatiques saturés ou insaturés ou des composés aromatiques. Ils varient de petites molécules simples (éthylène) à d'autres élaborées (composés polycycliques). Ils peuvent dériver à partir de plusieurs intermédiaires du métabolisme primaire par différents mécanismes. La voie de l'acide shikimique produisant des amino-acides aromatiques et les voies du polycétide et de l'acide mévalonique initiés à partir de l'acétyl-coA sont des voies spécialisées qui aboutissent à la production de métabolites secondaires. Ces derniers sont globalement considérés comme apparentés au métabolisme primaire des carbohydrates, de l'azote et des lipides.

#### *Rôle des carbohydrates*

Les métabolites secondaires peuvent dériver à partir des sucres comme dans le cas de l'acide kojique qui est synthétisé directement à partir du glucose par oxydation et élimination de l'eau (Figure 1-7). D'autres acides formés directement à partir des sucres sont l'acide mannonique (à partir du mannose), l'acide galactonique (à partir du galactose) et l'acide glucuronique (à partir du glucose). Les métabolites secondaires peuvent aussi dériver à partir des acides 4-carbone dicarboxyliques qui sont intermédiaires dans le cycle ATC. Ceux-ci comprennent l'acide oxalique dérivé à partir de l'acide oxaloacétique et l'acide itaconique dérivé à partir de l'acide *cis*-aconitique (Figure 1-7). Certains autres métabolites secondaires ont un noyau dérivé à partir d'un acide 4-carbone dicarboxylique qui comporte une chaîne saturée dérivée à partir d'un acide gras. Ces métabolites renferment l'acide carlosique et l'acide carolique (Figure 1-7).



**Figure 1-7 :** Métabolites secondaires dérivés du métabolisme des carbohydrates.

*Rôle de l'azote*

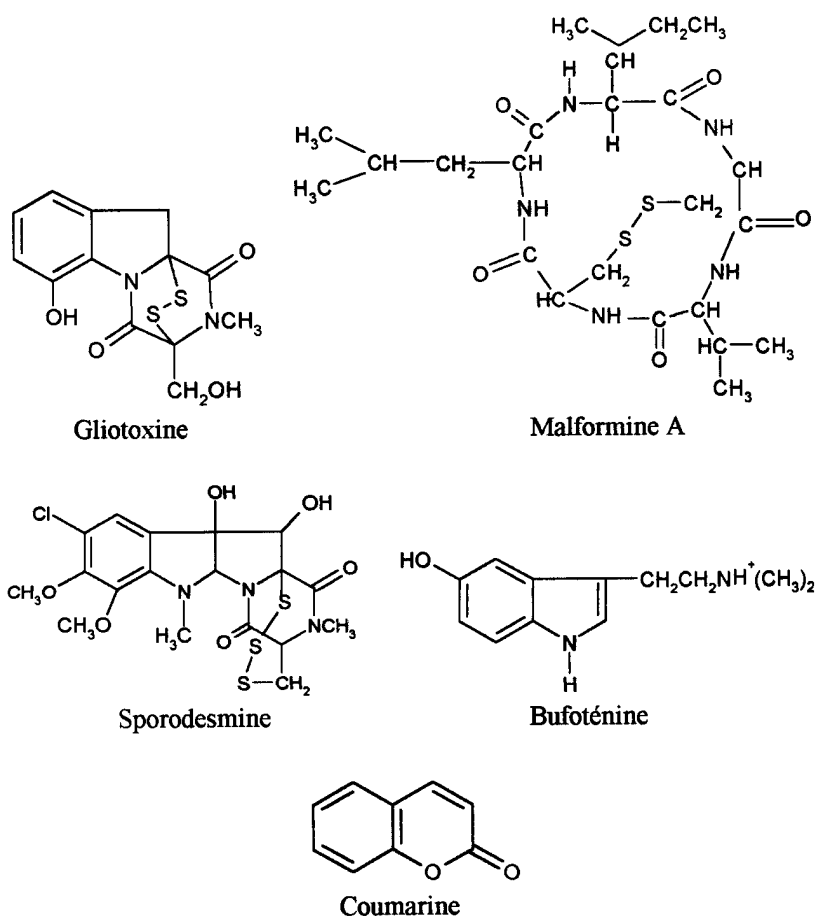
Plusieurs métabolites secondaires contenant l'azote dérivent de l'ammoniaque, des amino-acides ou de la voie de l'acide shikimique qui est responsable de la production des amino-acides aromatiques.

Les dérivés d'ammoniaque sont caractérisés par le fait d'avoir un ou plusieurs atomes d'hydrogène remplacés par des groupes amines. Plusieurs amines sont dérivées par décarboxylation d'un amino-acide. Le plus simple de ces amines est le méthylamine. Les odeurs distinctives de certains *Basidiomycota* sont dues à des amines volatils tandis que les poisons muscarine et muscardine, du champignon *Amanita muscaria* sont des amines.

Les amino-acides peuvent dériver non seulement à partir de certains amines mais aussi à partir de certains métabolites dans lesquels le squelette carboné des amino-acides est largement ou totalement gardé. Ces modifications peuvent être dues à des réactions de méthylation, oxydation, transamination et décarboxylation. Un exemple d'un métabolite secondaire dérivé de cette façon est l'hadacidine qui est un agent antitumeur formé par certaines espèces de *Penicillium*.

Certains amino-acides et leurs dérivés peuvent devenir une partie d'une molécule plus élaborée. Par exemple, la gliotoxine (Figure 1-8) est le résultat de l'union de deux amino-acides, phénylalanine et sérine. Un autre exemple est l'antibiotique pénicilline qui dérive des amino-acides *L*-cystéine et *L*-valine. Trois ou plusieurs amino-acides ou leurs dérivés peuvent être conjugués par des liaisons peptidiques ou ester pour former des structures élaborées avec noyaux telles que malformine A (une toxine formée par des champignons phytopathogènes) (Figure 1-8), sporodesmine (mycotoxine transmise par la nourriture) (Figure 1-8) et amanitines et phalloïdines (poisons fongiques).

Les métabolites hétérocycliques d'azote peuvent être dérivés à partir des amino-acides aromatiques tryptophane, phénylalanine ou tyrosine. Les dérivés du tryptophane gardent les noyaux indole, appelés aussi alcaloïdes. Un exemple de mycotoxine indole est la bufoténine qui existe chez les espèces d'*Amanita* (Figure 1-8). D'autres mycotoxines importantes qui causent des hallucinations sont la psilocine et la psilocybine produites par les espèces de *Psilocybe*. Divers alcaloïdes, qui entraînent les convulsions et la gangrène quand ils sont consommés, sont produits dans les sclérotés



**Figure 1-8** : Métabolites secondaires dérivés des amino-acids ou de la voie de l'acide shikimique.

de *Claviceps purpurea*. Ces amino-acides aromatiques sont eux-mêmes dérivés à partir de la voie de l'acide shikimique. Cependant, il y a plusieurs métabolites secondaires aromatiques dérivant à partir de la voie de l'acide shikimique qui manque l'azote. Par exemple, les dérivés volatils du cinnamyl, coumarine (Figure 1-8) et *cis*-fêrulate, produits par les urédospores des champignons de la rouille, inhibent leur germination quand elles sont présentes en forte concentration.

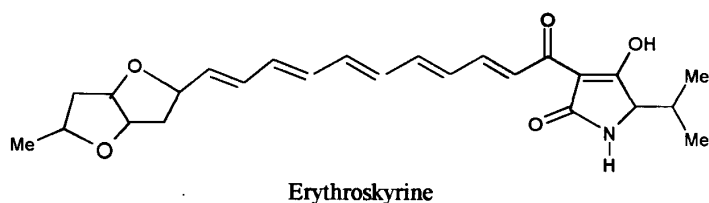
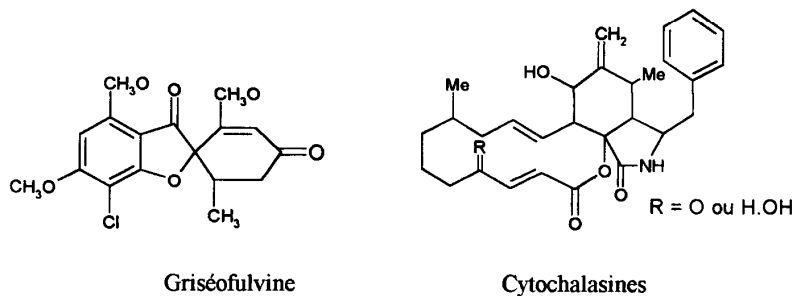
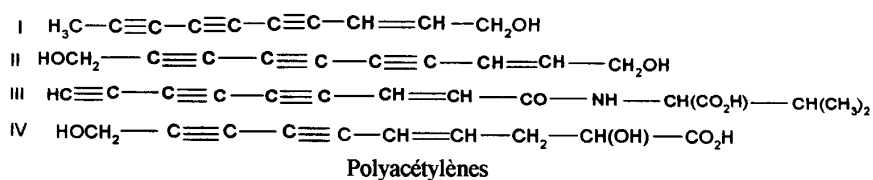
#### *Rôle des lipides*

L'acétate est le plus important composé dans le métabolisme des lipides. Il est directement impliqué dans la synthèse des acides gras et joue aussi un rôle dans la synthèse d'un très grand nombre de métabolites secondaires. Ces métabolites peuvent être synthétisés dans des voies similaires à celles des acides gras. Ils peuvent être divisés en trois groupes : polyacétylènes, polycétides et terpènes.

Les **polyacétylènes** sont abondants chez les champignons et les plantes mais ne sont pas connus chez les bactéries et les animaux. Ce sont des composés en chaînes droites contenant des triples liaisons qui sont dérivés par dénaturation et raccourcissement des chaînes (Figure 1-9). Quatre vingt polyacétylènes fongiques sont connus et la plupart d'entre eux a été isolée à partir des *Basidiomycota*.

La plupart des métabolites secondaires produits par les champignons est formée de **polycétides**. La majorité d'entre eux est connue seulement chez les champignons, particulièrement les *Ascomycota* et les Deutéromycètes. Un polycétide est le résultat de la condensation tête à queue de l'acétate.

Divers antibiotiques, mycotoxines et pigments sont des polycétides. Certains d'entre eux sont liés avec un composant non cétidique. D'importants antibiotiques renferment la griséofulvine (Figure 1-9) produite par *Penicillium griseofulvum* et les cytochalasines (Figure 1-9) qui sont des chaînes de polycétides liées avec les amino-acides aromatiques (phénylalanine et tryptophane) dérivés à partir de la voie de l'acide shikimique. L'érythroscyryne (Figure 1-9), un pigment orangé rouge, est formé par *P. islandicum* à partir de l'acide-amino valine et un cétide. L'aflatoxine B<sub>1</sub> est une puissante mycotoxine transmise par la nourriture qui est dangereuse pour l'homme.



**Figure 1-9 :** Métabolites secondaires polyacétylènes ou polycétides.



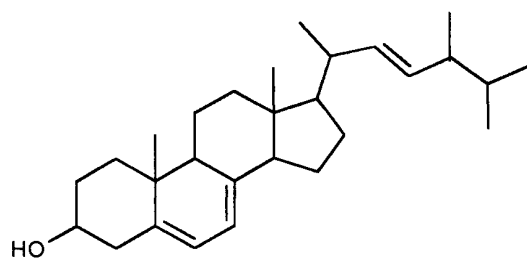
Les **terpènes** sont des métabolites secondaires qui dérivent de l'unité 5-carbone isopoprène ramifiée qui se forme par l'intermédiaire de la voie de l'acide mévalonique. Les terpènes produits peuvent être de type chaîne ou devenir cyclique comme ils sont dans les stéroïdes. Ces stéroïdes sont des composés importants des membranes plasmiques et l'ergostérol est l'un des stérols fongiques les plus communs (Figure 1-10). Les terpènes peuvent être des pigments. Deux types importants sont connus : mélanines et carotènes. Les **mélanines** sont déposées dans les parois des hyphes et spores de plusieurs champignons, leur donnant une couleur noire à brun foncé. Plusieurs sclérotas et stromes sont noirs à cause de la présence des mélanines. Les **carotènes** sont des pigments jaunes à orangés qui se forment dans les vésicules cytoplasmiques (Figure 1-10). La couleur jaune des gamètes d'*Allomyces* et de beaucoup d'ascomes et basidiomes est due aux carotènes. Un autre terpène important est l'**acide gibbérélique** qui fonctionne comme un régulateur de croissance des plantes et est produit par *Gibberella fujikuroi*.

## 6) Conditions environnementales

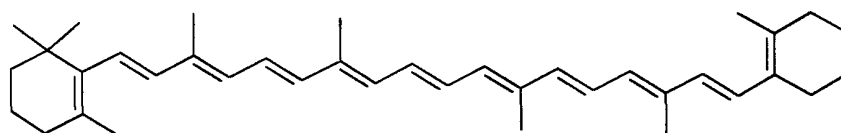
La croissance et le développement des champignons dépendent des conditions de l'environnement. Les principaux facteurs qui influencent toutes les activités fongiques sont la disponibilité de l'eau, la température, le pH (concentration en ions hydrogène), l'aération et la lumière.

### Eau

Les champignons nécessitent la présence physique de l'eau pour la diffusion des substances nutritives dans les cellules et pour la libération des enzymes extracellulaires. Les champignons doivent aussi absorber l'eau pour maintenir leur cytoplasme. Cependant, bien que l'eau puisse être présente dans l'environnement, elle peut rester non disponible pour les champignons parce qu'elle est retenue par des forces extérieures. Ces forces renferment le potentiel osmotique (forces de liaison des solutés), potentiel matriciel (forces physiques de liaison), potentiel de turgescence et potentiel gravimétrique. Leurs effets sont additifs et englobés alors par le terme général de **potentiel hydrique**. Pour retenir son eau existante, le champignon doit générer un potentiel égal au potentiel hydrique externe et, pour gagner de l'eau, il doit générer un potentiel supérieur à ce potentiel hydrique externe. Généralement, les champignons sont hautement capables d'absorber l'eau, même quand les forces externes sont élevées, et ainsi ils peuvent croître en restant turgescents.



Ergostérol



$\beta$ -carotène

**Figure 1-10** : Métabolites secondaires, composés terpènes.

Dans l'ancienne littérature, la disponibilité en eau était définie par l'équilibre de l'humidité relative (HR). Sur cette base, presque la totalité des champignons nécessitent pour croître un minimum de 70 % d'HR. Maintenant, pour la plupart des travaux environnementaux, le terme potentiel hydrique est préféré. Il est mesuré en mégapascals (MPa), avec 1 MPa l'équivalent de 9,89 atm ou 10 bar. Sachant que l'eau de mer normale a un potentiel d'environ -2,5 MPa et celui de la majorité des plantes atteint le 'point de flétrissement permanent' dans les sols d'environ -1,5 MPa, la plupart des champignons terrestres peut croître facilement dans des milieux de -2 MPa. Plusieurs champignons croissent à -4 MPa et ne sont pas considérés être tolérants aux stress. Certains champignons croissent en dessous de -10 MPa et la plupart des champignons tolérants aux stress peut croître à des vitesses proches du maximum à -20 MPa et restent capables de croître à -50 MPa. Les unités sont négatives car l'environnement exerce une rétention sur l'eau.

Généralement, les champignons en croissance ont un potentiel hydrique un peu plus faible que celui de l'extérieur, permettent à l'eau d'entrer dans la cellule et la croissance d'avoir lieu. Cependant, le potentiel hydrique externe peut tomber après évaporation augmentant ainsi la concentration des solutés dans le milieu ambiant. Si la valeur tombe en dessous de celle du champignon, l'eau va alors quitter au lieu d'entrer dans la cellule, la croissance va cesser, le protoplaste peut se détacher de la paroi cellulaire et se rétrécit (plasmolyse) et la dessiccation et la mort peuvent s'en suivre. Par contre, si le milieu ambiant est dilué par la pluie ou la rosée, un accroissement du potentiel hydrique externe peut avoir lieu. Ceci peut entraîner un influx d'eau vers la cellule, aboutissant à une pression hydrostatique interne élevée avec rupture possible de la paroi cellulaire et la mort. Par conséquent, les champignons dans leurs environnements sont exposés à la possibilité de dessiccation ou de rupture cellulaire à cause des fluctuations du potentiel hydrique externe. En fonction de ces fluctuations, les champignons doivent ajuster leur propre potentiel hydrique. Ils peuvent effectuer cela en augmentant ou diminuant le potentiel osmotique des contenus cellulaires. Un moyen de diminuer le potentiel osmotique par les champignons est d'absorber un soluté à partir du milieu ambiant. Mais pour la plupart des champignons, de fortes concentrations de solutés peuvent interrompre les activités enzymatiques. Dans une telle situation, beaucoup de champignons synthétisent des polyols qui sont des solutés compatibles ayant un effet faible sur les activités enzymatiques, même en fortes concentrations. Ces polyols, tels que glycérol, mannitol et arabitol, peuvent être produits soit à partir de sucres absorbés du milieu soit à partir de produits de dégradation des réserves insolubles de carbohydrates. Quand un accroissement du

potentiel osmotique interne est nécessaire, les champignons peuvent le faire par la perte ou l'exportation d'un soluté vers l'environnement ou par la conversion du soluté en substances de réserve insolubles.

L'adaptation aux changements du potentiel hydrique externe par un changement dans le potentiel osmotique des contenus cellulaires prend un minimum de plusieurs minutes, tandis que le flux d'eau entrant ou sortant d'une cellule qui suit un changement du potentiel hydrique externe se réalise en quelques secondes. Une diminution dans le potentiel hydrique externe va alors causer la plasmolyse, le protoplaste avec sa membrane semi-perméable se retire partiellement de la paroi cellulaire jusqu'à ce que l'adaptation a lieu. Un accroissement dans le potentiel hydrique externe avec un flux rapide d'eau vers la cellule entraîne une augmentation dans la pression hydrostatique à l'intérieur de la cellule qui aboutit à un étirement de la paroi cellulaire et un accroissement du volume cellulaire. L'étirement de la paroi va entraîner un accroissement dans la force qu'elle exerce sur les contenus cellulaires et cet accroissement dans le potentiel de turgescence va augmenter le potentiel hydrique de la cellule. Si l'augmentation du potentiel hydrique externe n'est pas trop forte, il va être égalisé par l'accroissement du potentiel hydrique de la cellule dû à une augmentation de la turgescence et l'influx d'eau va cesser. Par contre, si l'accroissement du potentiel hydrique externe est fort, l'augmentation de la pression hydrique de la cellule peut alors aboutir à un stress mécanique excessif dans la paroi cellulaire et sa rupture.

Dans les cas des cellules manquant de paroi (par exemple les zoospores), il y a des vésicules d'expulsion d'eau (vacuoles contractiles) qui se remplissent d'eau à partir du cytoplasme adjacent et ensuite le déchargent à l'extérieur. Le remplissage prend normalement quelques minutes et le déchargement moins d'une minute.

### **Température**

Trois grandes catégories de champignons peuvent être groupées concernant les exigences en température de croissance : psychrophiles (croissance à basses températures), mésophiles (croissance à des températures moyennes) et thermophiles (croissance à fortes températures).

La grande majorité des champignons est **mésophile**, croissant à des températures moyennes entre 10 et 35 °C, avec des optimums allant de 20 à 30 °C. Seuls environ 100 champignons sont connus être **thermophiles**, avec une température minimale autour de 20 °C, un optimum près de 40 °C et un maximum s'étendant à 50-60 °C. Ces champignons sont communs dans le

fumier et le composte où la chaleur augmente naturellement à cause de l'activité microbienne. Quelques champignons sont **psychrophiles**, capables de croître en dessous de 0 °C, avec des limites supérieures d'environ 20 °C et des optimums de 10 °C ou en dessous. Ces champignons renferment des levures et des espèces mycéliennes vivant en permanence dans les régions froides du monde et également les espèces provoquant la spoliation de la nourriture en stockage froid.

Comme pour tous les autres organismes vivants, la température est extrêmement importante pour la croissance des champignons. Généralement, l'accroissement de la température augmente les activités enzymatiques et chimiques. D'habitude, l'activité enzymatique augmente deux fois pour chaque 10 °C, mais elle décroît et s'arrête aux hautes températures. Certaines enzymes sont déjà inactivées à une température de 30 °C.

Pour continuer à croître, la fluidité de la membrane plasmique doit être maintenue à l'intérieur de certaines limites. Tous les microorganismes semblent réaliser ceci en variant la composition des lipides membranaires. Les acides gras saturés sont moins fluides que ceux insaturés à n'importe quelle température. Des études sur certains champignons thermophiles ont montré qu'ils ont souvent un rapport élevé des lipides saturés sur ceux insaturés, mais quand ils croissent près de leurs températures inférieures, ils changent leur composition en lipides membranaires de façon à ce que la portion de lipides insaturés soit plus élevée.

Comparés aux mésophiles, les champignons thermophiles sont caractérisés par des enzymes et composants ribosomiques plus thermostables quand ils sont extraits et testés dans des systèmes hors-cellule. La thermostabilité des enzymes est due aux nombreuses liaisons entre amino-acides près du site actif de l'enzyme, comprenant des liaisons autres que les ponts hydrogène qui sont thermosensibles. Les facteurs thermostabilisateurs dans le cytoplasme peuvent aussi contribuer à la thermostabilité des enzymes.

Généralement, les champignons psychrophiles ont une grande quantité d'acides gras insaturés dans leur membrane plasmique. Leurs ribosomes sont moins stables que ceux des mésophiles quand la température augmente dans des systèmes hors-cellule. Aux faibles températures autour de 0 °C, les champignons psychrophiles continuent à synthétiser les protéines tandis que les mésophiles arrêtent la synthèse.

### Concentration en ions hydrogène (pH)

La plupart des champignons croît dans une gamme de pH 4-8,5 et certains d'entre eux peuvent croître entre pH 3 et 9. Leurs pH optimaux sont d'habitude 5 à 7. Plusieurs champignons sont **acide-tolérants** (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*) et croissent aux pH aussi bas que 2. Seuls certains champignons sont réellement **acidophiles**. L'exemple le plus cité est *Acontium velatum* qui peut croître dans l'acide sulfurique à 1,25 M. Il peut commencer à croître au pH 7, mais il diminue rapidement le pH l'entourant à environ 3. D'autre part, quelques champignons sont tolérants aux environnements fortement alcalins. Quelques exemples de ces champignons sont *Fusarium oxysporum* et *Penicillium variable*, capables de croître aux pH aussi élevés que 10-11.

Tous les champignons étudiés ont montré un pH cytoplasmique autour de 7, même quand ils croissent à des pH extrêmes. Cette situation suggère que le cytoplasme fongique a un grand pouvoir tampon. Quand le pH externe change de plusieurs unités, le pH cytoplasmique change généralement de 0,2-0,3 unités. Ceci peut être réalisé de différentes façons :

- par absorption ou libération sélective d'ions,
- par échange de substances entre les vacuoles (d'habitude acide) et le cytoplasme, et/ou
- par interconversion des sucres et polyols tels que le mannitol qui implique la séquestration et la libération des ions H<sup>+</sup>.

Le pH environnant peut avoir différents effets. Par exemple, le pH peut affecter la charge nette sur les protéines membranaires, avec des conséquences sur l'absorption des substances nutritives. Il affecte aussi le degré de dissociation des sels minéraux et l'équilibre entre le dioxyde de carbone dissout et les ions bicarbonate. Les sols à pH faible peuvent avoir des niveaux potentiellement toxiques d'éléments traces disponibles tels que les ions aluminium (Al<sup>3+</sup>), manganèse (Mn<sup>2+</sup>), cuivre (Cu<sup>2+</sup>) ou molybdène (Mo<sup>3+</sup>). Par contre, les sols à pH élevé peuvent avoir des niveaux faiblement disponibles d'éléments nutritifs essentiels tels que le fer (Fe<sup>3+</sup>), le calcium (Ca<sup>2+</sup>) et la magnésium (Mg<sup>2+</sup>).

Plusieurs champignons altèrent le pH entourant, créant ainsi leur propre environnement immédiat. La méthode la plus générale pour faire ceci est moyennant l'absorption et l'échange d'ions. Par exemple, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> est absorbé en échange avec H<sup>+</sup> et le pH externe peut alors être diminué à 4 ou moins, aboutissant à l'inhibition de la croissance des champignons les plus acide-sensibles tels que *Pythium* spp. Par contre, l'absorption de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> peut

augmenter le pH externe par une unité. Les champignons peuvent aussi libérer des acides organiques qui diminuent le pH externe.

### **Aération**

Sur la base du besoin en oxygène, les champignons peuvent être groupés en quatre catégories : aérobies obligatoires, aérobies facultatifs, fermentatifs obligatoires et anaérobies obligatoires.

Différents champignons sont **aérobies obligatoires**. Leur croissance est fortement réduite si la pression partielle d'oxygène est diminuée beaucoup moins que celle de l'air (21 %). Par exemple, certaines espèces de *Gaeumannomyces* ont leur croissance réduite déjà à 18 % d'oxygène dans leur environnement.

Nombreuses levures et plusieurs champignons mycéliens tels que *Fusarium oxysporum*, *Mucor hiemalis* et *Aspergillus fumigatus*, sont des **aérobies facultatives**. Ils croissent normalement dans des conditions d'aérobies, mais peuvent aussi croître en absence d'oxygène en fermentant les sucres. L'énergie produite par fermentation est beaucoup moindre.

Quelques champignons aquatiques sont **fermentatifs obligatoires**. Ils croissent en présence ou en absence d'oxygène, mais toujours par fermentation. Des exemples sont *Aqualinderella* et *Blastocladiella*.

Quelques autres champignons, tels que *Neocallimastix* spp., sont des **anaérobies obligatoires**. Plusieurs d'entre eux sont des *Chytridiomycota* fermentatifs vivants dans le rumen des bovins et des ovins. Leurs cellules somatiques sont tuées par exposition à l'oxygène.

### **Lumière**

La croissance de la plupart des champignons est apparemment non affectée par la lumière visible (longueurs d'onde environ 380-720 nm), bien qu'elle peut causer une zonation de plusieurs cultures fongiques sur milieu nutritif. Pour certains champignons, cependant, l'illumination peut accroître ou plus communément décroître la vitesse de l'expansion fongique à travers la surface d'un milieu de culture. Un effet métabolique commun de la lumière est l'induction de biosynthèse de caroténoïdes. Ceci donne un mycélium, par exemple de *Neurospora crassa* et *Fusarium aquaeductum*, qui devient orangé quand il croît sous la lumière, mais sans couleur s'il est cultivé à l'obscurité. Le mycélium de *Phycomyces blakesleeanus* contient des caroténoïdes même sous obscurité, mais la quantité est augmentée par

exposition à la lumière. Ce sont les longueurs d'onde du fin-bleu et de l'ultraviolet du spectre visible qui stimulent la biosynthèse des caroténoïdes et il a été suggéré que le photorécepteur impliqué est communément une flavine. Les cellules fongiques contiennent plusieurs enzymes flavoprotéines qui sont des photorécepteurs potentiels. La biosynthèse de pigments autres que les caroténoïdes comme une conséquence de l'action de la lumière a aussi été démontrée. Par exemple, chez *Aureobasidium pullulans*, la production du pigment noir mélanine est stimulée par la lumière.

-----



## 1.3 - REPRODUCTION ET SPORULATION

### 1) Reproduction

La **reproduction** est la formation de nouveaux individus ayant toutes les caractéristiques typiques de l'espèce. Les champignons se reproduisent principalement par l'intermédiaire des **spores** qui sont des structures uni- ou multicellulaires avec diverses formes et tailles, capables de reproduire l'espèce fongique après germination. Les spores peuvent se former à travers une voie asexuée (ressemblant à des bourgeons qui se forment sur des branches) ou à travers une voie sexuée après fécondation. En outre, certains phénomènes parasexuels peuvent aussi être observés chez les champignons.

La **production asexuée** n'implique pas de caryogamie (fusion des noyaux) et de méiose. D'autre part, la **reproduction sexuée** est caractérisée par l'union de deux noyaux suivie par la méiose. Cette reproduction sexuée mène à une très grande incidence de recombinaison et formation de nouveaux génotypes qui permettent aux champignons de s'adapter facilement à une multitude de conditions environnementales.

Chez certains champignons, quand les organes de reproduction asexuée se forment, le thalle entier peut être converti en une ou plusieurs structures de reproduction, de façon à ce que les phases végétative et reproductrice ne peuvent pas exister ensemble chez le même individu. Ces champignons sont désignés comme étant **holocarpiques**. Cependant, chez la plupart des champignons, les organes reproductifs se développent à partir seulement d'une partie du thalle, tandis que le reste continue ses activités végétatives normales. Dans cette catégorie, les champignons sont qualifiés d'**eucarpiques**.

Généralement, les champignons se reproduisent à la fois asexuellement et sexuellement, bien que non nécessairement en même temps. La reproduction asexuée est d'habitude plus importante pour la colonisation de l'espèce parce qu'elle mène à la production de grands nombres d'individus, particulièrement quand le cycle asexuel est répété plusieurs fois durant une saison, tandis que le stade sexué de nombreux champignons peut être produit une fois par an. L'existence de deux (ou plus)

morphologies chez beaucoup de champignons (stade asexué et stade sexué), a conduit les mycologistes, depuis longtemps, à créer dans les plus importants groupes fongiques (principalement *Ascomycota* et secondairement *Basidiomycota*) deux sections dans lesquelles ils classifient et dénomment les formes asexuées et les formes sexuées. Cette situation particulière a abouti à une double appellation et une double classification de nombreuses espèces fongiques. Les champignons qui présentent un stade asexué ont été appelés *Fungi Imperfecti* ou **Deutéromycètes**.

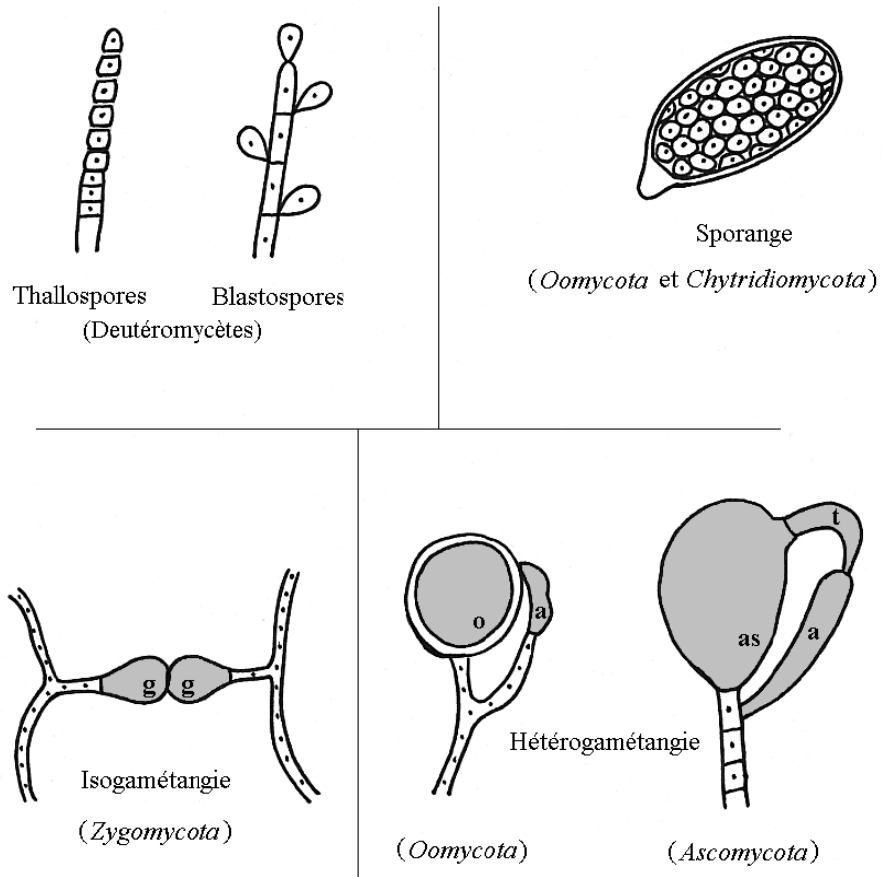
Le fait que beaucoup d'espèces peuvent être rencontrées dans un stade et/ou dans un autre complique énormément l'identification des champignons. Par exemple, deux espèces avec des stades asexués morphologiquement similaires peuvent avoir des stades sexués totalement différents et vice versa. Une situation rencontrée même très communément est celle des champignons avec un stade asexué mais pas de stade sexué connu. Egalement, plusieurs champignons n'ont pas de stade asexué distinctif. Cette nature pléomorphique des champignons a longtemps conduit à une confusion dans la terminologie utilisée pour décrire les stades des cycles biologiques des champignons. Pour standardiser la terminologie, trois termes ont été proposés et maintenant largement acceptés : **anamorphe** utilisé pour le stade asexué des champignons, **téléomorphe** utilisé pour le stade sexué et **holomorphe** utilisé pour décrire le champignon entier avec toutes ses facettes, formes et potentialités, latentes ou exprimées.

### **Reproduction asexuée**

La reproduction asexuée est la production non sexuée des spores (sans fécondation). Les méthodes de reproduction asexuée communément rencontrée chez les champignons peuvent être :

- fragmentation d'une partie du thalle en fragments,
- scission (ou scissiparité) ou bourgeonnement du thalle en cellules-filles,
- bourgeonnement *de novo* de spores mitotiques « vraies » à partir du thalle.

Certains champignons utilisent la fragmentation des hyphes comme un moyen normal de propagation. La fragmentation peut avoir lieu accidentellement par l'arrachement de parties du mycélium sous l'action de forces externes. Les hyphes de certains autres champignons se fragmentent habituellement en ses composants cellulaires qui se comportent alors comme des spores. Ces spores sont connues sous le nom de **thallospores** ou **spores thalliches** (Figure 1-11).



**Figure 1-11 :** Quelques structures typiques de reproduction (asexuée et sexuée) chez les champignons (a : anthéridie, as : ascogone, g : gamétange, o : oogone, t : trichgyne).

Chez la plupart des champignons unicellulaires, tels que les levures, la reproduction asexuée a lieu par l'intermédiaire de la scission ou du bourgeonnement. La scission et le partage simple d'une cellule en deux cellules-filles par étranglement et la formation d'une paroi cellulaire. D'autre part, le bourgeonnement implique la production d'une petite excroissance (bourgeon) à partir d'une cellule. Le bourgeon s'accroît en taille quand il est encore attaché à la cellule-mère et éventuellement se détache et forme un nouvel individu. Chez certaines espèces de levures, les bourgeons forment des chaînes ressemblant à un court mycélium, appelé **pseudomycélium**.

Chez la majorité des champignons, la méthode commune de reproduction asexuée est par l'intermédiaire de spores « vraies ». Ces spores sont produites *de novo* moyennant un processus de bourgeonnement et sont appelées **blastospores** ou **spores blastiques** (Figure 1-11). Elles varient énormément en morphologie, couleur, taille, nombre de cellules, arrangement des cellules, etc...

Les spores qui peuvent se former ou non à partir de **cellules sporogènes**, se développent directement sur de simples hyphes ou sur diverses structures spécialisées appelées **sporophores**.

Chez les Deutéromycètes, les spores sont appelées **conidies** et les termes de cellules sporogènes et sporophores sont remplacées par **cellules conidiogènes** et **conidiophores**, respectivement. Ces conidiophores peuvent être libres ou groupés en structures conidifères portées par un strome appelé alors **conidiome**.

Les spores produites asexuellement par les champignons autres que les Deutéromycètes sont portées dans des sporanges et sont alors appelées sporangiospores ou sont produites à l'extrémité ou sur les côtés des hyphes de diverses façons et sont assimilées à des conidies et appelées aussi ainsi. Un **sporange** est une structure du type sac dont le contenu entier est converti par clivage en nombreuses **sporangiospores**, rarement en une seule sporangiospore (Figure 1-11). Les sporangiospores des *Zygomycota* ne sont pas mobiles et sont appelées **aplanospores** tandis que les sporangiospores des *Oomycota* et des *Chytridiomycota* sont mobiles et sont appelées **zoospores**. Ces zoospores sont équipées avec un ou deux flagelles leur permettant de nager dans l'eau liquide.

## Reproduction sexuée

Comme chez les autres organismes vivants, la reproduction sexuée chez les champignons implique la copulation et la fécondation aboutissant à l'union de deux noyaux compatibles. Le processus de la reproduction sexuée consiste en trois phases distinctes. D'abord, la **plasmogamie** qui est l'union de deux protoplastes mettant les noyaux près l'un de l'autre à l'intérieur de la même cellule. Ensuite en deuxième phase, la **caryogamie** qui est l'union de deux noyaux rassemblés ensemble par la plasmogamie. Chez certaines espèces, la caryogamie suit la plasmogamie presque immédiatement tandis que chez d'autres, ces deux étapes sont séparées dans le temps et l'espace, avec la plasmogamie aboutissant à une cellule binucléée contenant un noyau de chaque parent. Cette paire de noyaux est appelée **dicaryon**. Les deux noyaux peuvent ne pas fusionner jusqu'à considérablement plus tard dans le cycle biologique du champignon. Pendant la croissance et la division cellulaire de la cellule binucléée, l'état dicaryotique peut être perpétué de cellule en cellule par la division simultanée des deux noyaux étroitement associés mais qui restent toujours séparés dans chacune des deux cellules filles. Tôt ou tard, la fusion nucléaire a lieu et est suivie par la **méiose**, qui de nouveau réduit le nombre de chromosomes au stade haploïde et constitue la troisième phase de la reproduction sexuée. Cette reproduction sexuée aboutit à la production de spores spécialisées ayant des noms particuliers tels que oospores, zygosporos, ascospores et basidiosporos.

Certaines espèces de champignons produisent des structures sexuelles mâle et femelle distinctes sur chaque thalle. Ces espèces sont **hermaphrodites** ou **monoeciques**. Chaque thalle unitaire d'une espèce hermaphrodite peut s'auto-reproduire sexuellement s'il est auto-compatible. D'autres espèces, appelées alors **dioeciques**, consistent en des thalles mâles et femelles, avec certains thalles produisant seulement des structures sexuelles mâles et d'autres seulement des structures sexuelles femelles. Un seul thalle d'une espèce dioecique ne peut pas s'auto-reproduire sexuellement normalement puis que l'individu est soit mâle ou femelle.

Généralement, les structures sexuelles des champignons sont appelées **gamétanges**. Elles peuvent porter des cellules sexuelles appelées **gamètes** ou peuvent contenir simplement des noyaux qui sont des gamètes fonctionnels. Les termes **isogamétanges** et **isogamètes** sont utilisés pour désigner, respectivement, les gamétanges et les gamètes qui sont morphologiquement semblables (Figure 1-11). Par contre, les termes **hétérogamétanges** et **hétérogamètes** sont utilisés pour désigner, respectivement, les gamétanges et les gamètes mâles et femelles qui sont

morphologiquement distincts. Dans ce dernier cas, le gamétange mâle est appelé **anthéridie** et le gamétange femelle est appelé **oogone** chez les *Oomycota* ou **ascogone** chez les *Ascomycota* (Figure 1-11). Cependant, nombreux champignons (principalement les *Basidiomycota*) n'ont pas de structures sexuelles différenciées ; les hyphes et les noyaux fonctionnent, respectivement, comme des gamétanges et des gamètes. Chez certaines espèces fongiques, un phénomène **parasexuel** peut avoir lieu et consiste en la fusion de deux hyphes.

## 2) Contrôle hormonal de la copulation

Des hormones impliquées dans la reproduction ont été détectées chez les champignons. Ces hormones fongiques peuvent réguler la différenciation des gamétanges, servir comme des attractifs dans le processus de copulation et avoir un rôle durant le développement du sporocarpe.

### Attraction des gamètes

Chez le champignon aquatique *Allomyces macrogynus*, la première hormone fongique qui été isolée et caractérisée est la sérénine (Figure 1-12). Cette hormone est libérée des gamétanges transparents du champignon avant et durant la libération de leurs gamètes transparents, attirant des gamètes orangés plus petits du même champignon.

Rapidement, les gamètes orangés nagent vers les gamètes transparents. Quand ils se mettent en contact, la libération de l'hormone cesse. La sérénine peut attirer les gamètes orangés à des concentrations aussi basses que  $10^{-10}$  M.

Chez les levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, les hormones sont aussi impliquées dans la copulation des gamètes qui ont un hétérothallisme à deux facteurs impliquant la copulation entre deux cellules ayant des facteurs de copulation  $\alpha$  et  $a$  (Figure 1-12). Les cellules haploïdes de chaque type sexuel produisent des hormones peptidiques hydrophobes et ont des récepteurs d'hormones produits par le type sexuel opposé. Après que les hormones se lient aux récepteurs, divers changements se réalisent transformant les cellules somatiques en gamètes qui finalement fusionnent. Une fois les gamètes liés forment un zygote, la nouvelle cellule diploïde est incapable de répondre aux hormones produites par les cellules haploïdes.

### **Fonction des gamétanges**

Certaines espèces du genre fongique aquatique *Achlya* portent des anthéridies et des oogones sur des thalles séparés. Leur processus sexuel est contrôlé par une série d'hormones hautement spécifiques. Le thalle oogonien produit l'hormone anthéridiol (Figure 1-12) qui induit la formation des hyphes anthéridiennes sur le thalle anthéridien. Ce thalle anthéridien produit alors l'oogoniol (Figure 1-12). Cette hormone diffuse en retour vers le thalle oogonien, augmentant la production de l'anthéridiol et induisant la formation des débuts oogoniens. L'anthéridiol induit les hyphes anthéridiennes pour croître le long d'un gradient de concentration vers l'oogone jusqu'à ce que le contact physique se réalise. Ensuite la formation et la délimitation de l'anthéridie sont induites. L'anthéridiol induit la formation des hyphes anthéridiennes à une concentration aussi basse que  $10^{-13}$  M.

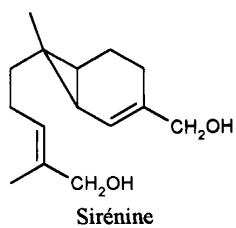
Plusieurs espèces de Mucorales (*Zygomycota*) sont hétérothalliques et leur gamétanges sont produits par des hyphes de différents types sexuels. Les hyphes de chaque type sexuel produisent un composé volatil qui passe dans l'air et induit une réponse dans les hyphes du type sexuel opposé. Les substances volatiles actives produites par des souches (+) sont les 4-hydroxyméthyltrisorates, tandis que celles produites par les souches (-) sont les trisporines. Ces composés volatils actifs induisent la formation des progamétanges.

Chez les *Ascomycota* tels que les Pézizales, le contrôle hormonal a été démontré chez *Ascobolus stercorearius*. Une hormone induisant l'ascogone est produite par la spermatie dans un rayon d'environ 0,5 mm. Ensuite, le trichogyne apparaît et montre une forte réponse chémotropique positive à la spermatie. Quand le trichogyne fait contact avec la spermatie, la plasmogamie a lieu et le développement de l'ascogone se termine. Le contrôle hormonal des *Ascomycota* est aussi connu se produire chez *Nectria haematococca* et *Neurospora crassa*. Ces deux champignons ont des hormones contrôlant l'attraction entre les trichogynes et les spermaties.

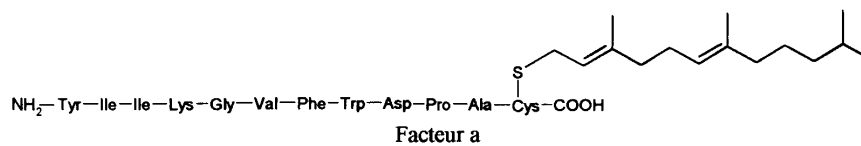
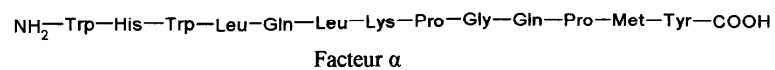
### **3) Sporulation**

La présence de nourriture abondante est exploitée chez la plupart des champignons par une croissance végétative vigoureuse. Quand la nourriture est épuisée et par conséquent la croissance végétative arrêtée, un champignon doit survivre en se disséminant ou en entrant dans un état latent. Pour la majorité des champignons, la dormance et la dissémination sont

\* *Allomyces macrogynus*



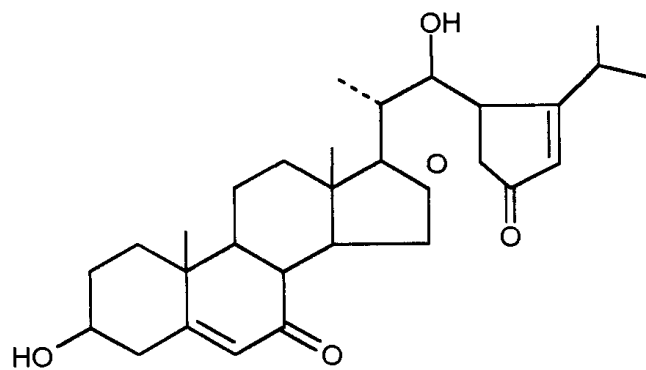
\* *Saccharomyces cerevisiae*



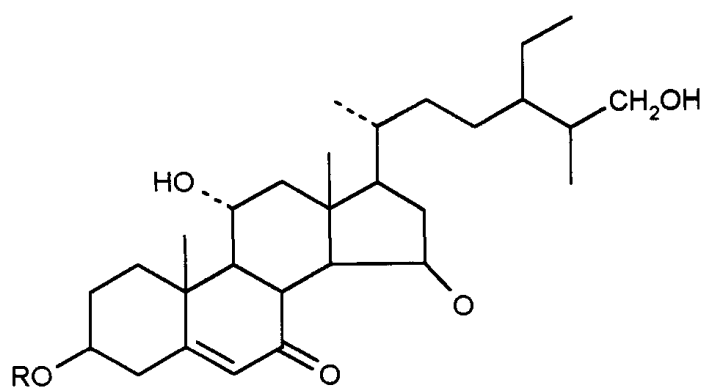
**Figure 1-12 :** Quelques hormones fongiques impliquées dans la copulation.



\* *Achyla* spp.



**Anthéridiol**



**Oogoniols**

**Figure 1-12 (suite) :** Quelques hormones fongiques impliquées dans la copulation

réalisées par l'intermédiaire de la production des spores. Ainsi, pour beaucoup de champignons, l'épuisement de la nourriture entraîne une sporulation, tandis que la nourriture abondante entraîne une croissance végétative vigoureuse. Les conditions optimales de nutrition pour la sporulation et pour la croissance végétative sont ainsi d'habitude différentes. La sporulation a lieu communément sous une gamme plus restreinte de conditions environnementales que la croissance végétative. Elle est sensible à différents facteurs environnementaux tels que la nutrition, la température, l'illumination, l'humidité, etc...

### **Effet de la nutrition**

Généralement, la sporulation a lieu quand la croissance mycélienne vigoureuse épuise la nourriture disponible ou quand le mycélium est transféré dans un milieu plus dilué. Un milieu de culture favorisant la sporulation est souvent formulé pour fournir une faible concentration en substances nutritives qui ne peut pas soutenir une croissance mycélienne.

### *Rôle du carbone*

Différentes sources de carbone sont utilisées par les champignons pour leur reproduction. Comme la croissance mycélienne, la reproduction asexuée est souvent favorisée par un monosaccharide, tandis que la reproduction sexuée est d'habitude favorisée par un disaccharide ou un polysaccharide. La cellulose, qui n'est généralement pas favorable à la croissance mycélienne, peut induire une sporulation abondante chez les champignons. Par contre, le glucose est souvent une source insatisfaisante de carbone pour la reproduction sexuée bien que d'autres hexoses peuvent être satisfaisants.

En plus de la source de carbone qui est très importante, sa concentration dans le milieu est aussi critique en déterminant si oui ou non la sporulation va avoir lieu. Généralement, de faibles concentrations de glucose favorisent la reproduction sexuée tandis que de fortes concentrations l'inhibent complètement et soutiennent une croissance végétative maximale. Par exemple, *Ophiobolus graminis* produit des pseudothèces fertiles avec un minimum de 0,75 % de glucose dans le milieu et un optimum de 1,5 % de glucose. Mais, les périthèces ne sont pas produits sur un milieu avec 10 % de glucose, bien que le maximum de croissance végétative et la pigmentation ont lieu à cette concentration.

*Rôle de l'azote*

Différentes sources d'azote sont utilisées par les champignons pour la sporulation et la source d'azote qui donne une bonne croissance mycélienne peut ne pas favoriser la sporulation. Par exemple, l'asparagine et les composés d'ammonium sont d'habitude de bonnes sources d'azote pour la croissance mycélienne mais généralement suppriment la reproduction. *Venturia inaequalis* ne forme pas de pseudothèces sur un milieu contenant des sels d'ammonium. Chez certaines espèces de *Phytophthora*, l'ammoniac sous forme de gaz est toxique et inhibe la formation de l'oogone tandis que les ions d'ammonium dans le milieu n'ont pas d'effet sur la reproduction.

L'urée, les nitrates et les amino-acides semblent être une source d'azote pour la sporulation. Les champignons peuvent être capables d'utiliser toutes ces sources d'azote ou seulement certaines d'entre elles. Ils utilisent souvent un amino-acide particulier ou seulement quelques uns. Les amino-acides particuliers qui sont favorables varient d'un champignon à un autre. Un mélange d'amino-acides est d'habitude meilleur qu'un seul amino-acide. Certaines espèces de *Sporormiella* utilise les nitrates et quelques amino-acides mais pas l'urée pour la formation des pseudothèces. *Cordyceps militaris* a une formation de stromes de périthèces favorisée par un complexe de composés azotés (hémoglobine, caséine ou peptone) et non pas les amino-acides. Les pycnides de *Phyllosticta antirrhini* sont presque deux fois plus grandes quand la croissance est sur un milieu contenant un sel d'ammonium et non sur un milieu contenant l'alanine.

La concentration en azote permettant la sporulation est généralement au-dessus de celle pour la croissance végétative clairsemée, mais à des concentrations élevées d'azote, la croissance devient vigoureuse et inhibe la sporulation. Chez *Pyronema domesticum*, l'hydrolysate de caséine contenant un mélange d'amino-acides favorise la maturation des apothécies aux concentrations jusqu'à 0,1 %, mais des concentrations supérieures (environ 0,35 %) répriment la maturation des ascogones et des hyphes ascogènes. La concentration optimale d'azote peut aussi varier avec la source d'azote. Par exemple, les nitrates et l'urée sont les plus efficaces pour la reproduction de *Venturia inaequalis* à une concentration de 30 ppm d'azote, tandis que la concentration la plus efficace en amino-acides varie. La production de pseudothèces est favorisée par 100 ppm d'azote d'acide glutamique et de valine mais elle est inhibée par la même concentration d'azote d'acide aspartique.

### *Rôle des minéraux*

Typiquement, la formation des structures reproductives nécessite une plus grande concentration que celles qui permettent une croissance végétative. Certains minéraux particuliers sont nécessaires pour la reproduction et non pour la croissance. Ceci est le cas de *Cyathus stercoreus* qui peut croître sur un milieu manquant d'ions calcium mais nécessite leur apport pour la formation des basidiomes.

### *Rôle des vitamines*

Généralement, les concentrations en vitamines nécessaires à la reproduction sont plus élevées que celles pour la croissance végétative. *Sordaria fimicola* peut croître sur un milieu sans biotine mais ne peut pas former de périthèces sauf si la biotine est ajoutée. D'habitude, les vitamines qui favorisent la croissance mycélienne favorisent aussi la reproduction.

### *Rôle des facteurs de croissance*

L'apport de facteurs de croissance au milieu stimule parfois la sporulation. *Pythium* et *Phytophthora*, par exemple, nécessitent des stérols pour les reproductions asexuée et sexuée mais non pour la croissance végétative. Certains *Ascomycota* répondent positivement à l'apport des stérols et des acides gras tels que l'acide linoléique.

## **Effet de la température**

La reproduction est fortement affectée par la température qui peut influencer plusieurs processus métaboliques et physiologiques impliqués dans la reproduction. Par exemple, chez *Schizophyllum commune*, le rythme de la migration nucléaire dans le dicaryon et la recombinaison peuvent être augmentés en augmentant la température à environ 32 °C. La culture de *Neurospora tetrasperma* à une haute température (37 °C) inhibe la formation des périthèces.

La réponse de la production asexuée des spores à la température ne diffère pas de celle de la croissance mycélienne, mais la reproduction sexuée de la même espèce a généralement des besoins très précis en température.

La plupart des champignons est mésophile, croissant entre 10 et 35 °C. La température optimale pour leur reproduction sexuée se situe fréquemment entre 20 et 25 °C. Les températures minimale et maximale pour leur reproduction sont dans les 5-10 °C des deux côtés de la gamme optimale. Cependant, certains *Ascomycota* ont une basse température optimale inhabituelle. Par exemple, le développement des apothécies de

*Monilinia* est favorisé par des basses températures comme 10-15 °C tandis que la production des apothécies de *Thelebolus* peut avoir lieu même à 0 °C, bien que la gamme optimale est 15-20 °C.

Certains *Ascomycota*, tels que *Pleospora herbarum*, nécessitent une longue période de froid pour induire la formation des pseudothèces. Chez *Hypomyces solani*, l'activité tyrosinase semble réguler l'induction des périthèces. La tyrosinase oxyde la tyrosine pour former la mélanine, le pigment noir existant dans les parois des périthèces. L'exposition à une basse température augmente à la fois le développement du primordium et l'activité tyrosinase.

### **Effet de la lumière**

La lumière affecte la sporulation des champignons par la stimulation ou l'inhibition de la formation des structures reproductives et des spores. Les effets de la lumière sur la reproduction des champignons sont très complexes. Des espèces étroitement liées peuvent différer dans leurs réponses. L'intensité, la durée et la qualité de la lumière jouent un rôle sur l'effet général de la lumière sur la reproduction.

Généralement, les longueurs d'ondes affectant la reproduction sont dans les régions de l'ultraviolet proche, le violet et le bleu (environ 320 à 490 nm), bien que dans certains cas, des longueurs d'ondes plus longues dans les gammes du jaune, du rouge et du rouge lointain peuvent aussi affecter la reproduction. Parfois, un champignon peut avoir plus d'une photoréponse. Ainsi, l'ultraviolet proche stimule la formation des pycnides chez l'anamorphe de *Mycosphaerella ligulicola* tandis que le rouge lointain stimule la formation des pseudothèces chez le téléomorphe. Dans certains cas, une photoréponse à une longueur d'onde peut être inversée par une exposition consécutive à une autre longueur d'onde. Par exemple, la lumière bleue inhibe la formation des conidies de *Botrytis cinerea*, mais l'inhibition peut être inversée par exposition à la lumière rouge lointain.

Chez les champignons, la lumière doit être absorbée par un pigment spécial, le photorécepteur, qui existe dans les cellules. Des preuves appuient l'idée que les flavines sont photorécepteurs pour les photoréponses à l'ultraviolet proche et le bleu. Les flavines sont des pigments jaunes qui absorbent fortement les lumières de l'ultraviolet proche et du bleu.

La dose de lumière exigée par beaucoup de champignons à une longueur d'onde donnée reste généralement constante puisque le temps

d'exposition pour la photoréponse décroît quand l'intensité augmente. Ainsi, *Neurospora crassa* nécessite 12 sec d'exposition à  $1,05 \text{ W/m}^2$  d'énergie à partir de la lumière bleue pour produire des périthèces mais nécessite 20 fois plus de temps d'exposition à  $5,25 \cdot 10^{-2} \text{ W/m}^2$  d'énergie à partir de la même lumière. D'autres champignons peuvent demander plusieurs heures ou même jours d'exposition à la lumière. Par exemple, les périthèces de *Magnaporthe* sont induites seulement après exposition à la lumière pendant au moins 6 heures quotidiennement durant 5 à 10 jours.

Bien que la lumière soit nécessaire pour la reproduction des champignons, seules certaines phases de développement peuvent être dépendantes de la lumière ou peuvent répondre différemment aux effets de la lumière. Ainsi, les gamétanges de *Pyronema domesticum* nécessitent environ 12 heures d'exposition à la lumière pour leur développement complet. Quelques hyphes ascogènes et asques peuvent se développer ultérieurement à l'obscurité, mais la lumière est nécessaire pour le développement optimal des hyphes ascogènes, asques et ascospores. L'exposition à la lumière constante inhibe la maturation des ascospores tandis que la lumière alternée stimule leur maturation.

Pour certains champignons qualifiés de sporulants diurnes, la lumière a des effets à la fois inhibiteur et stimulateur. Ils nécessitent l'alternance normale du jour et de la nuit pour la sporulation. Ceci est le cas de *Coprinus congregatus* qui nécessite une période de lumière qui initie la morphogenèse. Ensuite, une période d'obscurité de plusieurs heures est nécessaire pour l'élongation du stipe et le développement de la baside, qui sont inhibés par la lumière. Après la période obscure, une seconde période de lumière est demandée pour la maturation normale des basidiospores et l'ouverture du piléus nécessaire à la décharge des basidiospores. *Stemphylium botryosum* est aussi un sporulateur diurne et produit des conidies abondantes seulement sous lumière et obscurité alternées. Il ne sporule pas ou produit seulement peu de conidies sous obscurité constante et sous lumière constante où il forme des conidiophores stériles. Ce champignon nécessite la lumière ultraviolette pour la production des conidiophores tandis que la seconde phase de développement, durant laquelle les conidies sont formées, demande l'obscurité.

### **Effet du complexe aérien**

La plupart des champignons nécessite l'oxygène pour la sporulation même ceux, tels que *Saccharomyces cerevisiae*, qui sont capables de croître sous des conditions anaérobies.

Des concentrations élevées en dioxyde de carbone peuvent affecter la sporulation des champignons. Ainsi, une concentration de 5 % de dioxyde de carbone inhibe l'initiation de la structure sporulante chez *Schizophyllum commune* et l'expansion du piléus chez *Collybia velutipes*. Cependant, la formation des périthèces de *Chaetomium globosum* est stimulée par le dioxyde de carbone aux concentrations de plus de 10 %.

L'humidité relative de l'atmosphère adjacent à un sporophore détermine le rythme avec lequel l'eau est perdue dans l'atmosphère. Chez *Polyporus brumalis*, une forte humidité relative, et donc un faible rythme de perte d'eau par transpiration, donne des structures sporulantes de forme anormale, avec des stipes allongés et des piléus rudimentaires.

Les substances volatiles existant dans l'environnement affectent la reproduction des champignons. La formation des apothécies par *Pyronema domesticum* est très sensible aux substances volatiles auxquelles il est exposé. Ces produits volatils émis par certaines bactéries et champignons peuvent inhiber, ou au moins réduire, le développement de ses apothécies.

### **Changements accompagnant la sporulation**

Les facteurs nutritionnels et environnementaux sont importants dans la reproduction. Une déficience de l'un d'entre eux est suffisante pour maintenir le champignon dans un état végétatif. Le passage de la croissance végétative à la reproduction est affecté par toutes les conditions culturales et est génétiquement régulé.

#### *Transcription et traduction*

Plusieurs études sur différents champignons ont démontré que les changements dans la transcription et la traduction accompagnent la reproduction. Chez *Schizophyllum commune*, la transition de la phase monocaryotique à celle dicaryotique est marquée par la production d'une classe d'ARNm (transcription) associée avec la reproduction seulement et cette classe entraîne la production de polypeptides (traduction) qui se forment durant la morphogénèse. La formation du basidiome est accompagnée par un important accroissement dans la transcription de ces ARN dans le dicaryon, bien qu'elles représentent seulement 5 % de l'ARN total. Chez *Sordaria brevicollis*, des polypeptides spécifiques au développement des périthèces ont été détectés. Environ 15 % des polypeptides isolés ont été trouvés dans les périthèces en cours de développement mais pas dans le mycélium.

### *AMP cyclique*

Dans la reproduction de certains champignons, les niveaux du nucléotide cyclique AMP sont connus jouer un rôle régulateur. Ceci est le cas de la morphogenèse des cléistothèces du téléomorphe d'*Aspergillus nidulans* aussi bien que la formation des oospores et zoospores de *Lagenidium giganteum*. Chez *Coprinus cinereus*, la morphogenèse du basidiome est accompagnée par un accroissement dans le niveau de l'AMP cyclique et l'adényl cyclase qui est responsable de la synthèse de ce nucléotide. L'AMP cyclique peut aussi jouer un rôle dans la photoinduction. *Saccobolus platensis* nécessite la lumière pour l'induction de la formation des apothécies, mais les apothécies sont produites à l'obscurité si l'AMP cyclique est ajouté au milieu de culture.

### *Métabolisme*

Un accroissement dans la concentration en glycogène dans les basidiomes en maturation a été démontré chez beaucoup de champignons tels que *Sphaerobolus stellatus*. Chez *Coprinus cinereus*, le glycogène s'accumule quand la caryogamie est initiée. Subséquemment, le glycogène est enzymatiquement dégradé, fournissant de l'énergie pour la maturation des basidiospores.

Le métabolisme est impliqué dans le contrôle métabolique de la morphogenèse chez *Coprinus cinereus*. Durant l'accroissement du piléus, l'activité de quatre enzymes impliquées dans le métabolisme de l'azote augmente fortement. Le cycle de l'urée augmente également en activité aboutissant à une accumulation de l'urée dans le piléus.

## **4) Libération des spores**

Les spores de dissémination doivent être libérées le plus tôt possible de façon à ce que la dissémination peut avoir lieu et de nouvelles colonies peuvent s'établir. Les spores de conservation sont libérées par la lyse des hyphes ou les structures sporulantes sur lesquelles elles sont portées. Cette lyse peut durer longtemps. La libération des spores peut être accomplie par l'intermédiaire de différents mécanismes de lancement. Certains sont passifs, utilisant l'énergie de l'environnement, tandis que d'autres sont actifs, utilisant l'énergie générée à l'intérieur du champignon. Les spores passivement lancées peuvent avoir une surface hydrophobe et sont difficiles à mouiller (spores sèches) ou peuvent être mouillées facilement (spores mouillables).



**Libération passive des spores mouillables**

Certaines spores facilement mouillables sont retenues sur les sporophores jusqu'à ce qu'elles soient libérées, tandis que d'autres forment une masse visqueuse sur le substrat ou une gouttelette pédicellée de spores.

Divers champignons forment une gouttelette pédicellée de spores (*Mucor*, *Ceratocystis*, *Cephalosporium*, *Graphium*, etc...). La longueur du pédicelle (50  $\mu\text{m}$  à 1 mm) rend la goulette capable d'adhérer au corps d'un insecte passant ou d'être lancée par les éclaboussures de pluie ou par le vent.

La rosée ou la pluie couvre la végétation par une fine couche d'eau. Le mucilage des spores se dilue et ces spores en masse visqueuse deviennent suspendues dans le film d'eau. Une goutte d'eau qui tombe dans le film projette des centaines de gouttelettes plus petites de tailles variables contenant des spores. Ces spores vont passer dans l'air et se disséminer par la pluie ou le vent.

**Libération passive des spores sèches**

Il y a essentiellement deux façons avec lesquelles les spores sèches peuvent être projetées : perturbation mécanique et répulsion électrostatique.

La perturbation mécanique peut prendre une grande variété de formes et lancer les spores. Ainsi, un animal se déplaçant dans la végétation, une machine qui récolte roulant dans une culture ou le vent peuvent secouer les plantes et libérer les spores que les courants d'air transportent plus loin.

Les charges électrostatiques sur les plantes et les champignons varient durant le jour au fur et à mesure que l'humidité relative et la quantité de radiation infrarouge changent. Puisque les spores et les sporophores portent la même charge, la répulsion a lieu entre eux et une forte augmentation de la charge entraîne la rupture de la connexion entre la spore et son sporophore et la projection de la spore dans l'air.

**Décharge active des spores**

Chez beaucoup d'*Ascomycota* tels que *Pyronema*, *Sordaria*, *Neurospora* et *Claviceps*, les ascospores sont éjectées de forces à partir des asques. Il semble que lorsque la maturité des asques approche, le potentiel osmotique de cet asque chute et ainsi sa pression hydrostatique s'accroît et ouvre ou emporte de force un couvercle à l'apex de l'asque, finissant par l'éjection d'un jet de fluide et d'ascospores. La distance parcourue par les ascospores est entre quelques millimètres à environ 30 cm. Cette décharge

violente de spores par éclatement d'une cellule turgescente existe aussi chez certains *Zygomycota* (*Pilobolus*) et Deutéromycètes (*Nigrospora*).

Les spores peuvent aussi être activement déchargées par un changement soudain dans la forme des cellules. Par exemple, chez *Puccinia*, les écidiospores forment une masse compacte dans laquelle les écidiospores individuelles sont polyédriques. Quand les écidiospores à l'extérieur de la masse absorbent l'eau, elles deviennent soudainement sphériques et une force est exercée à partir de la masse, détachant et projetant ces écidiospores. Pour d'autres champignons, le changement dans la forme des cellules a lieu dans le conidiophore (*Deightoniella*) ou le basidiome (*Sphaerobolus*).

Chez plusieurs *Basidiomycota* et certaines levures, les spores peuvent être activement tirées dans l'espace. Ces spores, appelées ballistospores, sont attachées à l'extrémité du stérigmate. L'eau de l'atmosphère se condense sous forme d'un ménisque mince autour du corps apical de la spore et une gouttelette séparée se développe à partir d'une projection hygroscopique à la base de la spore. La gouttelette en accroissement fait que le centre de la masse de la spore se déplace du centre de la spore vers juste au dessus du stérigmate. Il est supposé que lorsque la gouttelette croissante fusionne avec le ménisque du liquide au dessus du corps de la spore, l'énergie libre à la surface du liquide décroît et déplace rapidement le centre de la masse vers le centre de la spore. Ainsi, la spore et le liquide gagnent de l'énergie cinétique et prennent de la vitesse dans la même direction du déplacement du centre de la masse, exerçant une force sur le stérigmate, coupant la connexion entre la spore et le stérigmate, et déchargeant la spore. Chez *Intersonilia*, tout le processus prend 30-45 sec, les spores atteignent une vitesse d'environ 1 m/sec dans environ 1 µsec, d'où le vol de 1 mm dure 1 msec.

### **Libération des zoospores**

Différents mécanismes semblent être impliqués dans la libération des zoospores. Chez *Phytophthora* et *Pythium*, les zoospores sont transférées par la pression hydrostatique générée osmotiquement dans une vésicule à paroi mince qui par la suite se rompt. Chez *Saprolegnia*, les zoospores semblent d'abord être déchargées de force à partir du sporange par la pression hydrostatique et ensuite elles nagent vers l'extérieur. Chez *Allomyces*, la nage semble être responsable de la libération des zoospores.

## 5) Dissémination des spores

Toutes les spores fongiques activement ou passivement déchargées dans l'air sont passivement disséminées. Plusieurs vecteurs peuvent disperser les spores : l'air, l'eau, les animaux, les semences, etc....

### Dissémination par l'air

Les courants d'air disséminent les spores sitôt qu'elles sont libérées. Par temps calme, cependant, le soleil chauffe la surface de la terre provoquant des courants de convection qui portent les spores verticalement vers le haut. Ces spores sont par la suite véhiculées horizontalement par le vent. Elles sont généralement transportées en diffusion par tourbillon plutôt qu'en ligne droite.

Quand une goutte de pluie frappe un film d'eau contenant des spores, ceci entraîne la projection de nombreuses gouttelettes qui contiennent les spores. Ainsi, un grand nombre de spores sont lancées dans l'air. Ce mécanisme agit comme un facteur de dissémination des spores aussi bien qu'un agent qui projette les spores.

### Dissémination par courant d'eau

Les zoospores de plusieurs champignons, tels que *Phytophthora*, sont capables de nager dans des films d'eau. Cependant, les changements dans la direction de la nage sont fréquents de façon à ce qu'elles ne se déplacent pas loin. C'est l'eau courante dans/sur le sol qui véhicule ces zoospores plus loin. Certains Hyphomycètes aquatiques produisent des conidies qui sont aussi transportées par l'eau courante.

### Dissémination par animaux

Les animaux, particulièrement les insectes, jouent un rôle important dans la dissémination de beaucoup de champignons. Les spores sont disséminées à la surface ou dans l'intestin des insectes. Ceci est le cas des champignons tels qu'*Ophiostoma novo-ulmi* et *Puccinia graminis*. Les animaux plus grands disséminent aussi les champignons. Ils peuvent consommer des plantes infectées avec des champignons et déposent des spores viables dans le fumier, probablement à des distances considérablement loin. Ceci a été observé chez *Pilobolus* avec les bovins et les truffes avec les rongeurs.

### **Dissémination par semences**

Généralement, les semences sont efficacement disséminées dans différentes régions. Puisqu'elles peuvent véhiculer à leur intérieur ou sur leur surface des spores ou du mycélium, elles sont un moyen efficace de dissémination des champignons. Plusieurs champignons, tels que *Tilletia* et *Ustilago*, sont essentiellement transmis par les semences.

## **6) Déposition des spores**

### **Déposition à partir de l'air**

La déposition des spores transportées par l'air est la plus importante près du site de libération des spores. La grande majorité des spores est déposée dans les 100 m. Seule une petite proportion de spores voyage loin, mais ceci reste important dans la transmission des champignons sur de grandes distances.

### **Déposition à partir de l'eau**

Plusieurs composés semblent exister comme des gradients de diffusion dans l'eau du sol adjacente aux racines. Les zoospores répondent à ces composés, nagent vers le gradient (chémotaxie positive) et atteignent la surface de la racine. La chémotaxie positive aux exudats des racines et à plusieurs de ces composants, tels que les amino-acides et l'éthanol, a été démontrée avec les zoospores de nombreuses espèces de *Phytophthora* et *Pythium*. Une autre réponse, l'électrotaxie, est aussi d'une grande importance juste à proximité de la racine. Des courants et champs électriques externes sont générés par les racines des plantes et sont dus au flux de protons et d'autres ions entrant et sortant des régions blessées ou en croissance. Les zoospores de *Phytophthora palmivora* et *Pythium aphanidermatum* ont été montrées capables de répondre électrostactiquement en nageant vers l'anode ou le cathode, respectivement, dans des champs aussi bas que 2-5 mV/cm.

Les conidies des Hyphomycètes aquatiques ayant des formes non habituelles parfois avec de long bras, peuvent adhérer par leur multiples contacts aux objets dans l'eau et échapper au détachement par les courants d'eau.

## 7) Dormance et conservation des spores

la dormance des spores est l'état entre l'achèvement de la sporulation et le commencement de la germination. Durant la dormance, l'activité métabolique est beaucoup plus basse que dans les cellules végétatives des espèces fongiques et il n'y a pas de changements morphologiques. Deux types de dormance sont connus : **dormance exogène** qui est imposée par le manque d'un environnement favorable pour la germination et **dormance endogène** qui dépend des caractéristiques structurales ou métaboliques de la spore. La distinction entre les deux dormances exogène et endogène n'est pas si claire.

### Auto-inhibition de la germination des spores

Généralement, les spores en grand nombre ou en suspension dense ne germent pas. Plusieurs composés inhibiteurs qui auto-inhibent la germination des spores ont été isolés à partir d'espèces fongiques. Par exemple, les spores d'*Uromyces phaseoli* contiennent un dérivé d'acide cinnamique qui inhibe l'émergence du tube germinatif à de très faibles concentrations. Un composé très similaire existe dans les spores de *Puccinia graminis* dont le tube germinatif émerge à travers un pore dans la paroi cellulaire. Il semble que l'inhibiteur empêche la dissolution enzymatique du complexe protéine-mannane qui bouche le pore. Chez *Peronospora tabacina*, la dormance est maintenue par un dérivé de  $\beta$ -ionone appelé quiesone qui semble inhiber la synthèse des protéines. Le stade de gonflement lors de la germination des spores de *Dictyostelium discoideum* est inhibé par un dérivé d'adénine appelé discadénine.

### Métabolisme des spores en dormance

Diverses réserves nutritives existent dans les spores. Les réserves communes renferment le tréhalose comme dans les sporangiospores de *Phycomyces* et les ascospores de *Neurospora*, des polyols comme dans les conidies de *Penicillium* et des lipides comme dans toutes les spores. Les réserves de lipides sont souvent particulièrement utilisées durant la dormance des spores tandis que le métabolisme des autres réserves peut être inhibé jusqu'à ce que la germination des spores commence. Ainsi, dans les sporangiospores dormantes de *Phycomyces*, l'enzyme tréhalase est dans un état inactif tandis que dans les ascospores dormantes de *Neurospora*, elle est active mais elle est gardée à l'extérieur de la membrane plasmique dans la paroi cellulaire loin du tréhalose qui est dans le cytoplasme. En outre, le tréhalose semble jouer un important rôle en maintenant l'intégrité structurale

du cytoplasme fongique sous les conditions d'un stress environnemental. Il peut exercer un puissant effet stabilisateur sur les protéines et assurer une protection contre la dessiccation. Dans les spores en dormance, l'activité métabolique est très faible. Ainsi, dans les ascospores en dormance de *Neurospora*, les vitesses de consommation d'oxygène et de production de dioxyde de carbone sont 1-4 % des vitesses normales dans les cellules végétatives.

### **Conservation des spores**

Chez *Sordaria macrospora*, les ascospores peuvent résister aux forts stress environnementaux. Jusqu'à 10 % de ces spores survivent à une congélation rapide, un dégel, une lyophilisation, des conditions de grand vide, une irradiation dans un rayon d'électrons et des fixateurs chimiques.

Dans la nature, les spores en dormance sont exposées à un environnement hostile : radiation solaire, dessiccation et attaque par d'autres organismes. Les spores qui survivent sont d'habitude sphériques pour avoir une surface minimum en relation avec le volume et pour être facilement disséminées. Leur cytoplasme contient souvent de très hautes concentrations de tréhalose. Les mélanines contenues dans la paroi cellulaire de plusieurs types de spores de conservation semblent aussi jouer un rôle clé. Ces mélanines résistantes à la dégradation par les microorganismes confèrent une protection contre les attaques microbiennes aussi bien que la radiation solaire. Des exemples renferment des sporangiospores et zygosporos de *Mucor mucedo*, des conidies d'*Alternaria* et d'*Aspergillus nidulans* et des basidiospores d'*Agaricus bisporus*.

### **Levée de la dormance des spores**

La fin de la dormance des spores et par conséquent le début de leur germination impliquent une initiation des activités biochimiques, un accroissement progressif des vitesses métaboliques et des changements morphologiques tels que l'émergence d'un tube germinatif.

L'activation des spores nécessite certains besoins communs. La plupart des espèces fongiques nécessite de l'eau liquide ou une humidité relative élevée, l'oxygène, le dioxyde de carbone et des limites acceptables de température. Pour continuer la germination, les champignons nécessitent également des substances nutritives, particulièrement celles qui sont hydrosolubles et ont un poids moléculaire faible. Plusieurs autres stimulus

physique et chimique peuvent induire ou stimuler la germination des spores. Par exemple, les ascospores de *Neurospora* germent après une courte exposition (10-20 min) à une forte température (50-60 °C). La germination des téliospores de *Puccinia carthami* est stimulée par les polyacétylènes.

-----





## 1.4 - GÉNÉTIQUE

Les champignons ont des caractéristiques qui ont fait d'eux des outils majeurs pour la recherche en génétique. La plupart des champignons est facile à cultiver dans les conditions de laboratoire où beaucoup d'entre eux terminent leurs cycles biologiques en un temps court. Les champignons sont majoritairement haploïdes ce qui rend facile de provoquer chez eux des mutations et de sélectionner des mutants. La taille de leur génome est petite et le nombre de leurs chromosomes est faible. Quelques espèces d'*Oomycota*, cependant, ont leur taille du génome plus grand que pour certaines plantes. La plupart des champignons produit des spores asexuellement ce qui fait que des populations génétiquement uniformes peuvent être maintenues. La majorité des ces caractéristiques existe chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans*. Ces champignons sont ainsi parmi les organismes les plus compris génétiquement.

### 1) Génome fongique

Le génome fongique consiste en quatre composants : gènes chromosomiques, gènes mitochondriaux, plasmides/éléments transposables, et gènes viraux.

#### Gènes chromosomiques

La taille du génome nucléaire des champignons est très petite en comparaison avec d'autres eucaryotes. En outre, les chromosomes sont petits et fortement condensés. La plupart des champignons a entre 6 et 17 chromosomes haploïdes (Tableau 1-1). Ce petit génome distribué sur plusieurs chromosomes rend relativement facile le séquençage de l'ADN de tous les chromosomes.

Une quantité substantielle de l'ADN nucléaire est transcrite par les champignons en ARNm. Ainsi, comparés avec d'autres eucaryotes, ils ont relativement peu de séquences non codantes d'ADN (introns). Ces introns sont très courts chez les champignons (d'habitude environ 50-200 pb) en comparaison avec les eucaryotes supérieurs (d'habitude 10 kpb ou plus).

**Tableau 1-1** : Nombres de chromosomes haploïdes chez quelques champignons représentatifs (Deacon, 1997).

<b><i>Oomycota</i></b>	
<i>Achlya</i>	3, 6, 8
<i>Phytophthora</i>	9-10
<i>Pythium</i>	10, 20
<i>Saprolegnia</i>	8-12
<b><i>Chytridiomycota</i></b>	
<i>Allomyces arbuscula</i>	16
<i>Allomyces javanicus</i>	14
<b><i>Ascomycota</i></b>	
<i>Aspergillus nidulans</i>	8
<i>Neurospora crassa</i>	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
<b><i>Basidiomycota</i></b>	
<i>Coprinus cinereus</i>	13
<i>Puccinia kraussianna</i>	30-40
<i>Schizophyllum commune</i>	11

### **Gènes mitochondriaux**

Les mitochondries contiennent une petite molécule circulaire d'ADN. La taille du génome mitochondrial chez les champignons est similaire à celle des autres eucaryotes. L'ADN mitochondrial code pour certains composants du transport d'électrons (y compris le cytochrome c et les sous-unités d'adénosine triphosphatase), pour certains ARN structuraux des ribosomes mitochondriaux et pour une gamme d'ARNt mitochondriaux.

### **Plasmides et éléments transposables**

Généralement, les plasmides sont des molécules circulaires fermées ou linéaires d'ADN capables de se répliquer dans la cellule d'une façon autonome. Ils peuvent exister dans le cytoplasme, dans les mitochondries et même dans le noyau. Les plasmides ont été observés chez certaines levures et champignons filamenteux.

Les éléments transposables (transposons) sont de courtes régions répétées de l'ADN qui restent dans le chromosome, mais codent les enzymes pour leur propre réplification. Deux types de ces éléments ont été décrits chez les champignons. Le premier est celui des transposons qui peuvent se déplacer dans le génome par le mécanisme de l'excision et l'insertion qui est réalisé moyennant l'enzyme transposase. Le second concerne les retrotransposons qui produisent des copies d'ARN d'eux-mêmes et ils codent une enzyme, reverse transcriptase, qui synthétise de nouvelles copies d'ADN à partir de cette matrice ARN. Les nouvelles copies d'ADN peuvent ainsi s'insérer à divers points dans les mêmes ou d'autres chromosomes, aboutissant à l'alternance de l'expression des gènes. Il y a plusieurs types de transposons chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez les champignons filamenteux (*Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*). Les transposons sont considérés comme étant des outils importants dans les études des structures de populations et dans le clonage des gènes.

### **Gènes viraux des champignons**

Les virus ont été détectés dans plus de 150 espèces fongiques appartenant à tous les grands groupes des champignons. Dans presque tous les cas, ces virus ne sont associés à aucun désordre évident, de façon à ce que la plupart des virus fongiques est sans symptômes. Ces virus n'ont pas de vecteurs naturels de transmission externe. Ils peuvent ainsi être considérés comme des éléments génétiques réellement résidents des champignons, juste comme les gènes mitochondriaux et nucléaires. Leur taille de génome est extrêmement variable. Ce sont des particules isomériques de 25-50 nm de

diamètre, ayant un génome d'ARN double brins et ayant une capsid composée d'un polypeptide majeur.

## 2) Cycle biologique et ploïdie

Le processus sexuel est basé sur trois étapes universelles : plasmogamie, caryogamie et méiose. Mais les organismes diffèrent beaucoup dans ce qui se passe entre ces étapes, aboutissant à une variété de cycles biologiques. Il y a cinq types essentiels de cycles biologiques chez les champignons.

### Haploïdie

Chez beaucoup de champignons, particulièrement des *Ascomycota* mycéliens, la plasmogamie est vite suivie par la caryogamie. Rapidement après cette fusion des noyaux, la méiose a lieu donnant un cycle biologique presque complètement haploïde.

### Haploïdie-dicaryose

Chez de nombreux *Basidiomycota*, le mycélium haploïde se développe bien. Ensuite, quand il rencontre un autre mycélium haploïde compatible, ils fusionnent leurs cytoplasmes mais pas leurs noyaux, aboutissant à un mycélium dicaryotique qui peut aussi croître longtemps. La phase diploïde est brève car la caryogamie et la méiose ensemble ont lieu dans les basides immédiatement avant la formation des basidiospores.

### Haploïdie-diploïdie

Chez divers champignons, tels que les Myxomycètes, les Chytridiomycètes et les levures, la caryogamie n'est pas rapidement suivie par la méiose qui n'est pas vite suivie par la plasmogamie. Cette situation aboutit à une alternance de phases haploïde et diploïde pendant lesquelles la croissance végétative peut avoir lieu.

### Diploïdie

Chez les *Oomycota*, la méiose a lieu dans les anthéridies et les oogones et est rapidement suivie par la plasmogamie et la caryogamie qui restaurent le stade diploïde, aboutissant à un cycle biologique diploïde. Ceci est aussi le cas de certaines levures.

### **Asexualité**

Chez beaucoup de Deutéromycètes, le processus sexuel n'a pas été observé et tout le cycle biologique est haploïde.

### **3) Variation somatique**

Généralement, la variabilité génétique peut être obtenue par l'intermédiaire du cycle sexuel chez la plupart des organismes car la reproduction non sexuée aboutit à la procréation de nouveaux individus qui sont généralement identiques au parent. Cependant, chez beaucoup de champignons, la variation génétique peut avoir lieu en absence de la reproduction sexuée. Cette flexibilité génétique est possible à travers l'hétérocaryose, la parasexualité et l'hérédité cytoplasmique.

#### **Hétérocaryose**

L'**hétérocaryose** est un phénomène qui permet aux champignons d'acquérir des mélanges de types nucléaires génétiquement différents dans le cytoplasme des hyphes. Un champignon qui montre ceci est ainsi appelé un **hétérocaryon**, contrairement à un **homocaryon** avec un seul type nucléaire.

Deux voies peuvent causer l'hétérocaryose :

- par une mutation de l'un des noyaux dans une hyphes et le noyau muté prolifère tout le long des noyaux du type initial,
- par fusion aux points de contact (anastomose) des hyphes de n'importe quel couple de souches compatibles de façon à ce que leurs noyaux deviennent présents dans le cytoplasme commun.

L'hétérocaryose semble être un phénomène potentiellement puissant qui rend les champignons capables de s'adapter à diverses conditions environnementales. Par exemple, un mycélium qui nécessite des apports exogènes de thiamine, mais pas de leucine, fusionne avec un second mycélium qui nécessite des sources exogènes de leucine, mais peut élaborer sa propre thiamine. L'hétérocaryon résultant a ainsi des noyaux qui peuvent contrôler la biosynthèse de la thiamine et la leucine, mais pas les deux. Chaque noyau va compenser la déficience de l'autre rendant le champignon capable de croître sans avoir besoin d'apports exogènes de thiamine ou de leucine. Une situation similaire peut avoir lieu par l'intermédiaire de la mutation nucléaire. Un hétérocaryon avec une telle complémentation aurait une large flexibilité physiologique.

L'état hétérocaryotique peut disparaître de deux manières :

- quand par hasard, une branche qui contient seulement un génotype nucléaire, produit des branches ultérieures qui se développent dans un secteur homocaryotique de la colonie fongique,
- quand la reproduction asexuée produit des conidies à partir de phialides dans lesquels un seul noyau entre dans chaque phialide. Ce noyau se divise par la suite pour produire à partir du phialide des conidies uninucléées (*Penicillium*, *Aspergillus*) ou multinucléées (*Fusarium*).

### **Parasexualité**

Certains Deutéromycètes ont développé des moyens non sexués pour recombinaison leurs gènes par un processus appelé **parasexualité** qui a lieu dans les hétérocaryons.

Occasionnellement, deux différents noyaux haploïdes dans un hétérocaryon fusionnent pour former un noyau diploïde (**diploïdisation**). Ce noyau est stable et se divise pour donner des noyaux diploïdes ultérieurs, tout au long des noyaux haploïdes normaux. Ainsi, l'hétérocaryon contient un mélange de deux différents types nucléaires, aussi bien haploïdes que diploïdes.

Le crossing-over peut avoir lieu durant la mitose bien qu'en très faible fréquence comparée à la méiose. Ceci aboutit à la création de chromosomes qui sont hybrides des chromosomes parentaux.

Une restauration à partir de l'état diploïde vers l'état haploïde (**haploïdisation**) peut avoir lieu durant la division des noyaux diploïdes. Cette division donne l'un des noyaux filles avec  $2N+1$  chromosomes et l'autre avec  $2N-1$  chromosomes. Les noyaux obtenus qui ont des multiples incomplets du nombre haploïde sont appelés **aneuploïdes**, contrairement aux noyaux **euploïdes** avec des multiples complets de  $N$ . Ces noyaux aneuploïdes tendent à être instables et à perdre des chromosomes ultérieurs durant les divisions subséquentes. Ainsi, le noyau  $2N+1$  retournerait à  $2N$  tandis que le noyau  $2N-1$  retournerait progressivement à  $N$ .

Bien que la parasexualité semble être un processus moins efficace de recombinaison génétique que le mécanisme sexué, elle peut cependant avoir lieu à n'importe quel moment durant la croissance végétative normale et sans préconditions comme celles nécessaires pour la production des stades sexués. Le processus parasexuel est relativement rare, mais avec des millions de noyaux dans une seule colonie, les chances de recombinaisons génétiques par

l'intermédiaire de la parasexualité dans toute la colonie peuvent être assez élevées.

### **Hérédité cytoplasmique**

Quand la plasmogamie a lieu entre des gamètes et des hyphes somatiques, les déterminants génétiques de chaque cytoplasme seront mélangés. Avec la division cellulaire, le matériel génétique est transmis des parents à la progéniture. Ce matériel consiste en l'ADN mitochondrial, les plasmides et les virus. L'altération de toute composante de ce matériel génétique peut entraîner des changements génotypiques des progénitures comparées à leurs parents.

## **4) Variation sexuelle**

La reproduction sexuée est le mécanisme majeur produisant des recombinaisons génétiques. L'étendue de la variabilité génétique qui en résulte, cependant, dépend du degré avec lequel l'inbreeding ou l'outbreeding a lieu. L'inbreeding implique la reproduction sexuée entre individus qui sont plus étroitement liés que ceux d'un échantillon pris au hasard dans la population qui existe naturellement, tandis que l'outbreeding a lieu entre des individus qui sont moins étroitement liés. L'inbreeding tend à créer une population homogène tandis que l'outbreeding entraîne une plus grande hétérogénéité génétique, fournissant la variabilité nécessaire pour l'évolution. Un grand nombre de génotypes dans une population rend possible une meilleure adaptation aux changements des conditions environnementales que dans une population ayant seulement quelques génotypes. La valeur de la reproduction sexuée est ainsi la plus grande quand l'outbreeding est stimulé ou même obligatoire chez certaines espèces fongiques. L'inbreeding caractérise l'homothallisme tandis que l'outbreeding caractérise l'hétérothallisme chez les champignons.

### **Homothallisme**

Un champignon est **homothalique** quand il accomplit son cycle de reproduction sexuée avec un thalle qui dérive à partir de la germination d'une seule spore uninucléée, sans avoir besoin d'introduire un second type nucléaire. Le seul type nucléaire contient alors tout le nécessaire génétique pour l'expression sexuelle totale. Ainsi, la caryogamie et la méiose peuvent avoir lieu sans impliquer un second partenaire sexuel. Quand une copulation avec un second partenaire devrait avoir lieu, il n'est pas nécessaire que les noyaux représentent des types sexuels différents.

La plupart des champignons semble être homothallique puisque l'homothallisme prédomine parmi les champignons zoosporés, les *Ascomycota* et quelques *Basidiomycota*. Bien que la caryogamie a lieu d'habitude entre des noyaux identiques, des variations génétiques peuvent se développer à travers la mutation ou parfois quand deux colonies (et non des types sexuels) se mettent en contact physique, effectuent une plasmogamie et ensuite une caryogamie entre des noyaux génétiquement différents. Ces variations génétiques sont très lentes, mais il y a l'avantage que les risques sont minimes car il n'y aura pas de développement de grandes déviations par rapport aux types parentaux.

### **Hétérothallisme**

Un champignon est **hétérothallique** quand il ne véhicule pas tout le matériel génétique nécessaire au développement sexuel dans un seul noyau. Ainsi, l'hétérothallisme implique une copulation obligatoire entre deux individus homocaryotiques. La copulation entre deux cellules compatibles ou thalles homocaryotiques est nécessaire pour produire un zygote ayant le complément total des déterminants génétiques. L'hétérothallisme est généralement contrôlé par des facteurs génétiques incompatibles, mais peut être contrôlé par le dimorphisme sexuel chez quelques champignons.

#### *Mécanismes d'incompatibilité*

En fonction du nombre des loci génétiques impliqués et des allèles qui peuvent exister à chaque locus, les systèmes d'incompatibilité chez les champignons peuvent être distincts en différents types.

**Hétérothallisme à deux facteurs** : Chez certains champignons hétérothalliques, deux types sexuels sont régulés par deux facteurs à un seul locus génétique contrôlant l'incompatibilité. Ces types sexuels sont d'habitude désignés par (+) et (-) ou (A) et (a). Ils se séparent à l'extérieur en deux types de spores résultant de la méiose et après la germination, chaque type de spore produit un clone de cellules uninucléées ou un thalle avec un seul type nucléaire. Dans ce type de sexualité, le type sexuel (A) ne peut pas copuler avec un autre (A) mais peut copuler avec un type sexuel (a). Ceci peut avoir lieu chez les champignons qui manquent de différenciation morphologique sexuelle (*Ustilago*) ou qui ont des gamètes ou des gamétanges différenciés (*Neurospora*). Dans le cas des structures sexuelles différenciées sur le même thalle, une copulation fertile peut avoir lieu seulement entre gamètes ou gamétanges de types sexuels opposés, nécessairement produits par des thalles séparés.



**Hétérothallisme à multiples facteurs** : Chez certains champignons hétérothalliques, il y a de multiples facteurs à chaque locus génétique contrôlant l'incompatibilité. Ceci inclue un type bipolaire produisant deux types sexuels et un type tétrapolaire produisant quatre types sexuels comme un produit de la méiose. Ce type d'hétérothallisme existe chez beaucoup de *Basidiomycota*.

*L'hétérothallisme bipolaire à multiples facteurs* est caractérisé par un seul locus génétique, désigné par (A), qui contrôle la compatibilité. Plusieurs facteurs du locus (A) existent et peuvent être désignés par  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_n$ . Le croisement compatible est possible seulement si les mycéliums homocaryotiques partenaires de copulation portent différents facteurs. Ainsi, un mycélium portant le facteur ( $A_1$ ) ne peut pas copuler avec un mycélium portant aussi ( $A_1$ ), mais il peut copuler avec un mycélium contenant n'importe quel des facteurs restants.

*L'hétérothallisme tétrapolaire à multiples facteurs* est caractérisé par deux loci génétiques (A) et (B), qui contrôlent la compatibilité. Ces loci sont portés sur des chromosomes séparés et se séparent indépendamment à la méiose. Pour chaque locus, un grand nombre de facteurs existent. Le croisement compatible a lieu seulement si les facteurs (A) et (B) diffèrent chez les deux homocaryons partenaires de copulation. Ainsi, un mycélium portant les facteurs  $A_1B_1$  ne peut pas copuler avec  $A_1B_1$ , mais peut copuler avec  $A_2B_2$  car les facteurs des deux loci sont différents. Un autre exemple est un mycélium ayant des facteurs  $A_1B_2$  qui peut copuler seulement avec un mycélium  $A_2B_1$ .

Comparé à l'homothallisme, l'hétérothallisme a l'avantage d'accroître l'outbreeding et ainsi le potentiel pour une plus grande variabilité. Par exemple, chez un champignon ayant l'hétérothallisme à deux facteurs, parce qu'il y a seulement deux types sexuels, n'importe quel thalle donné a le potentiel pour l'outbreeding avec approximativement 50 % des thalles existants, qui seraient du type sexuel opposé. Pour les champignons ayant l'hétérothallisme à multiples facteurs, un seul locus d'incompatibilité avec seulement 10 facteurs augmenterait le potentiel de l'outbreeding à 90 % ou plus.

#### *Dimorphisme sexuel*

Quelques champignons, tels que les chytrides et certaines espèces d'*Achlya*, sont sexuellement dimorphiques. La séparation des structures mâle et femelle sur des thalles différents rend ces champignons automatiquement

auto-stériles nécessitant une fécondation croisée pour mettre différents types nucléaires ensemble.

## 5 - Génétique moléculaire

### Application de PCR en Mycologie

#### *Importance de PCR*

Une puissante méthode qui a de très grandes applications en biologie moléculaire est la réaction de polymérisation en chaîne ou en anglais ***polymerase chain reaction (PCR)***. C'est une réaction enzymatique en chaîne qui permet une amplification *in vitro* de fragments spécifiques d'ADN à partir de faibles concentrations d'échantillons complexes d'ADN (de l'ordre de  $\mu\text{g}$ ) et qui peut générer des quantités de quelques  $\mu\text{g}$  de l'ADN cible. Ainsi, toute séquence cible d'acide nucléique peut être clonée, analysée ou modifiée. La spécificité, la sensibilité et la vitesse de cette technologie ont aboutit au développement de plusieurs méthodes pour une large gamme de recherches biologiques y compris la mycologie.

#### *Principes de PCR*

PCR consiste en une amplification exponentielle de fragments spécifiques d'ADN par synthèse d'ADN *in vitro*. La méthode standard nécessite une matrice d'ADN contenant la région à amplifier, quatre désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et deux amorces oligonucléotidiques flanquant cette région cible. L'amplification nécessite l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, isolée à partir de *Thermus aquaticus*, appelée *Taq* polymérase. Tous les composants de la réaction PCR sont mélangés et la procédure consiste en une succession de trois étapes qui sont déterminées par les conditions de température : dénaturation de la matrice, hybridation de l'amorce et extension. Dans la première étape, la dénaturation de la matrice d'ADN double brins est obtenue par l'incubation du mélange réactionnel à une haute température (90-95 °C). Ensuite, la seconde étape consiste en un refroidissement du mélange jusqu'à atteindre une température d'hybridation qui est typiquement d'environ 55 °C, les amorces oligonucléotidiques complémentaires s'hybrident à l'extrémité 5' des deux matrices simple brin. Finalement, la troisième étape est l'extension durant laquelle la température monte à 72 °C et les hybridations de l'amorce cible servent comme points d'initiation pour la synthèse de nouveaux brins d'ADN. Chaque étape dure d'habitude 1-2 min d'incubation et cette séquence des trois étapes correspond à un cycle de PCR. Dans les cycles successifs, les brins d'ADN nouvellement synthétisés sont séparés des brins

d'origine par dénaturation et chaque brin sert de nouveau comme matrice dans les étapes d'hybridation et d'extension. Théoriquement,  $n$  cycles de PCR permet  $2^n$  fois amplifications de la séquence de l'ADN cible. Typiquement, PCR est effectuée en 30-40 cycles. La procédure d'amplification peut être automatisée et réalisée dans un thermocycleur avec chauffage et refroidissement programmés.

#### *Méthodes dérivées de PCR*

A partir de la première description de PCR, plusieurs modifications de la procédure originale ont été développées. La spécificité et la sensibilité de l'amplification ont été améliorées, le nombre des séquences cibles d'ADN a été estimé, le type de matrice a été changé (ARN au lieu d'ADN), etc...

**Reverse transcription-PCR (RT-PCR) :** Originellement, la méthode **reverse transcription-PCR (RT-PCR)** ou transcription inverse-PCR a été basée sur la transcription inverse de l'ARN en ADNc par une reverse transcriptase avant l'amplification par la *Taq* polymérase. Une polymérase particulière (*Tth*) originaire de *Thermus thermophilus* peut aussi effectuer une amplification directe d'ADN car elle a une activité reverse transcriptase en présence d'ions manganèse et une activité polymérase d'ADN en présence d'ions magnésium. RT-PCR qui est une méthode hautement sensible a été développée pour mesurer l'expression des gènes.

**Random PCR et fingerprinting PCR :** Contrairement à PCR développée au début, les approches aléatoires PCR ou d'emprunts digitales PCR ne nécessitent aucune information sur la séquence des nucléotides pour le type d'amorce et permet l'amplification des fragments d'ADN qui ont une longueur et une séquence non identifiées. L'une des premières méthodes développées est l'amplification aléatoire du polymorphisme de l'ADN ou **random amplified polymorphic DNA (RAPD)**. Elle permet de détecter les polymorphismes entre organismes malgré l'absence d'informations sur la séquence, pour produire des marqueurs génétiques et construire des cartes génétiques. RAPD est une méthode hautement sensible basée sur l'amplification PCR de l'ADN génomique avec une seule amorce courte ayant une séquence arbitraire de nucléotides.

La technique du polymorphisme des longueurs des fragments amplifiés ou **amplified fragment length polymorphism (AFLP)** est une autre approche aléatoire de PCR qui a été développée pour des emprunts digitales d'ADN et des cartes génétiques. Elle permet une amplification PCR très rigoureuse de fragments d'ADN choisis d'une façon aléatoire à partir de

fragments de restriction. Dans cette technique, d'abord l'ADN génomique est digéré avec une endonucléase de restriction et les adaptateurs d'oligonucléotides sont liés aux extrémités des fragments de restriction. Ensuite, une première amplification non sélective moyennant PCR est réalisée par l'utilisation d'amorces correspondant aux séquences de l'adaptateur, la partie de la séquence du site de restriction restante sur le fragment. Une seconde PCR est adoptée en utilisant les mêmes amorces mais avec des nucléotides supplémentaires (entre un et trois) qui sont aléatoirement choisis. Cette étape rend possible l'amplification sélective des fragments de restriction dans lesquels les nucléotides qui bordent le site de restriction sont complémentaires aux nucléotides supplémentaires des amorces. La méthode AFLP a aussi une haute résolution.

**PCR *in situ*** : L'approche de **PCR *in situ*** est l'utilisation d'une combinaison PCR et une hybridation *in situ*. C'est une puissante technique qui permet l'identification et la localisation de séquences rares d'ADN ou de séquences d'ARN (après RT-PCR) dans toutes les cellules ou les échantillons du tissu. Cette méthode inclue les étapes suivantes : fixation de l'échantillon, perméabilisation de l'échantillon pour permettre la pénétration des réactifs de PCR, amplification *in situ* et visualisation des produits PCR par hybridation *in vitro*.

### **PCR en temps réel**

Récemment, la technologie PCR a été révolutionnée par le concept de PCR en temps réel ou ***real time PCR***. Actuellement, il n'est plus nécessaire de faire une réaction PCR dans un thermocycleur puis l'analyser sur un gel d'agarose. Toute la réaction a lieu dans un appareil qui est connecté à un ordinateur et le résultat est visualisé dans des minutes (environ 30 min). En utilisant des amorces fluorescentes spécifiques à une espèce fongique, il est maintenant possible de détecter jusqu'à quelques  $\mu\text{g}$  d'ADN. PCR en temps réel a ainsi beaucoup d'application dans la détection quantitative des champignons dans les plantes, le sol ou tout autre matière.

### **Méthodes alternatives à PCR**

Pour l'amplification des acides nucléiques, différentes méthodes, autres que PCR, ont été récemment développées. C'est le cas de :

- la réaction de liaison en chaîne ou ***ligase chain reaction (LCR)*** impliquant quatre amorces oligonucléotidiques et une ADN ligase thermostable,
- l'amplification d'acides nucléiques sur la base de sa séquence ou ***nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)*** nécessitant deux amorces et

trois différentes enzymes (reverse transcriptase, T7 ARN polymérase et RNase H),

- l'amplification de la réplication du bactériophage Q-béta ou ***Q-beta replicase amplification (Qβ)***, ou
- l'amplification des brins déplacés ou ***strand displacement amplification (SDA)***.

### **Transformation génétique**

Différentes méthodes de transformation génétique ont été développées pour les champignons (chimique, biolistique ou par électroporation) et consistent en trois étapes :

- la production du matériel convenable recevant l'ADN exogène (tel que les protoplastes),
- l'introduction d'un vecteur convenable contenant l'ADN cloné et un marqueur sélectif (tel que la résistance aux antibiotiques),
- la régénération d'une cellule et du mycélium montrant l'intégration stable et l'expression de l'ADN.

Chez beaucoup de champignons, la production de protoplastes peut être réalisée en incubant de jeunes colonies, avec plusieurs extrémités hyphales à paroi mince, dans des solutions osmotiquement stabilisées contenant des mélanges d'enzymes dégradant les parois. Quand ces protoplastes sont transférés dans des milieux sans enzymes, ils régénèrent partiellement les parois et donnent des hyphes viables.

Les protoplastes absorbent facilement l'ADN en présence de chlorure de calcium et de polyéthylène glycol. Contrairement aux bactéries, la transformation chez les champignons nécessite d'habitude que l'ADN soit ajouté à une plus forte concentration. Ensuite, l'ADN introduit peut soit rester libre dans le cytoplasme soit s'intégrer dans le génome de l'hôte.

Actuellement, il devient possible de transformer certains champignons à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, surtout quand les autres méthodes sont inefficaces.

### **Clonage des gènes**

La méthodologie pour le clonage des gènes a été révolutionnée par l'invention de PCR. Pour cloner un gène, seule l'information sur les séquences de deux régions distinctes du gène (ou de la protéine) est nécessaire pour permettre au type d'amorces d'amplifier la séquence en question. Après l'amplification, le produit de PCR séquencé obtenu peut être

utilisé comme une sonde homologue ou hétérologue pour le clonage du gène complet à partir d'une banque de gènes disponible du champignon.

#### *Amplification de l'acide nucléique*

Pour amplifier l'ARN, l'ADNc est d'abord synthétisé par la reverse transcriptase et ensuite amplifié par PCR car l'amplification directe de l'ARN par les ADN polymérases commerciales n'est pas possible. Une autre technique appelée amplification rapide des extrémités des ADNc ou ***rapid amplification of cDNA ends (RACE)*** est une méthode efficace pour le clonage de l'ADNc à partir d'un gène quand la séquence d'une seule position dans le gène (ou la protéine) est connue.

#### *Clonage des fragments PCR*

L'une des méthodes les plus largement utilisées pour le clonage des fragments PCR est l'incorporation sur les amorces des séquences reconnues par les enzymes de restriction. Ainsi, cette méthode permet au fragment d'être cloné dans un vecteur et placé précisément à l'endroit désiré. Tout site non contenu à l'intérieur du fragment lui-même peut être incorporé dans l'amorce employée pour l'amplification. Différents sites cibles de restriction sur chaque amorce sont d'habitude utilisés pour garantir la direction de l'insert à cloner. L'approche la plus simple qui n'a pas d'effet sur la réaction PCR est l'addition de bases à l'extrémité 5' de l'amorce. Les enzymes de restriction, qui sont des endonucléases ne coupent généralement pas l'extrémité d'un brin de nucléotide où un site de restriction est créé par l'addition de séquences à l'extrémité 5' d'une amorce. Ainsi, le site de restriction inclus doit être prolongé par addition de plusieurs bases. Trois pb de nucléotides supplémentaires sont généralement suffisants pour agir comme un brin d'hybridation et permettre alors une coupure efficace.

Une seconde méthode de clonage de fragments PCR est le clonage T/A qui repose sur l'activité de la désoxynucléotide transférase terminale de certaines polymérases utilisées en PCR. Certaines ADN polymérases et reverse transcriptases contiennent une activité désoxynucléotidyl transférase terminale ou ***terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)*** qui aboutit à l'apport d'un ou plusieurs nucléotides aux extrémités 3' des molécules d'ADN à bout franc, qui sont les deux spécifiques aux nucléotides et polymérases.

Une autre méthode est le clonage des extrémités à bout franc qui, comme avec le système T/A, ne nécessite pas l'apport de bases supplémentaires aux groupes d'amorces. Les fragments PCR générés par *Taq* polymérase ou toute autre polymérase ajoutant un nucléotide non ciblé à

l'extrémité 3' doit être traitée avec T4 ou *Pfu* polymérase pour générer des extrémités franches. Le clonage subséquent du fragment est facilement réalisé dans n'importe quelle coupe franche d'une séquence du vecteur.

### **Evaluation de l'expression des gènes**

Différentes procédures récentes d'analyse différentielle d'expression des gènes ont été développées. L'une d'elles est l'expression différentielle des gènes par transcription inverse-PCR ou ***differential display reverse transcriptase-PCR (DDRT-PCR)***. Avec cette méthode, il est possible de mettre en évidence l'ensemble des ARNm dans un type particulier de cellule et de comparer leur profil d'expression, soit avec d'autres types de cellules soit avec des cellules sujettes à d'autres conditions expérimentales.

La technique DDRT-PCR est désignée pour l'identification et l'isolement des gènes qui sont différentiellement exprimés dans diverses populations de cellules sous des conditions définies. Les techniques communément utilisées en biologie moléculaire sont combinées dans la technique DDRT-PCR : transcription inverse, PCR et électrophorèse sur des gels de polyacrylamide. Cette technique commence par la transcription inverse d'une sous-population d'ARNm en ADNc en utilisant une amorce ancrée à son extrémité 3', profitant de l'avantage de la présence d'une queue poly (A) dans l'ARNm. L'amorce ancrée contient de nombreux résidus thiamine (généralement 11), qui les lient à la queue poly (A) de l'ARNm, plus deux nucléotides à son extrémité 3' externe qui donne la spécificité à l'hybridation. Cette amorce s'hybride sélectivement aux ARNm contenant deux nucléotides complémentaires aux nucléotides de l'extrémité 3' de l'amorce se trouvant immédiatement en amont de la queue poly (A). Au total, 12 amorces ancrées peuvent être utilisées. Ainsi, 12 sous-populations d'ADNc nécessitent d'être générées si la population d'ARNm entière doit être analysée. C'est une étape essentielle dans la procédure pour réduire la complexité de la matrice en utilisant des amorces ancrées sélectives pour la synthèse de l'ADNc.

Subséquentement, PCR est effectuée sur chacune des sous-populations de l'ADNc, en utilisant la même amorce ancrée employée dans la synthèse d'ADNc en combinaison avec une petite amorce en amont de la queue. Les produits amplifiés obtenus représentent seulement des parties d'une espèce particulière d'ARNm 3' et les produits dérivés des divers ARNm seront différents du point de vue longueur. Si PCR est effectuée en présence d'un nucléotide marqué, les produits amplifiés peuvent être observés sur un gel de polyacrylamide et visualisés comme des bandes discrètes par autoradiographie. Le profil des bandes d'échantillons dérivés à partir de

différents types de cellules ou à partir de cellules cultivées dans différentes conditions est analysé en parallèle. Les fragments d'ADNc représentant des ARNm différenciellement exprimés peuvent être récupérés à partir du gel et utilisés pour caractériser ultérieurement les gènes correspondants.

La méthodologie DDRT-PCR a été appliquée pour analyser l'expression différentielle des gènes dans le système d'interaction plante-champignon tel que tomate-*Botrytis cinerea*. Puisque ces deux organismes sont présents dans l'interaction, leurs ADNc vont être détectés par leur différence d'expression. La majorité de ces ADNc représente les gènes du champignon ou de la plante qui sont induits pendant l'interaction. Leur origine peut être discriminée par la comparaison entre les profils d'expression des deux organismes affichés durant l'interaction, celui du champignon développé *in vitro* et celui d'une plante de tomate non infectée. Les ADNc d'interaction spécifique sont alors détectés et représentent soit les gènes du champignon induits dans l'infection de la plante ou les gènes de la plante induits dans la réponse au pathogène.

### **Génomique des champignons**

Le séquençage de tout le génome des organismes devient de plus en plus commun ces dernières années. En faite, après la levure *Sacchromyces cereviciae*, au moins cinq espèces fongiques bien connues ont été séquencées maintenant. Cette liste inclut non seulement des organismes modèles tels que *Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans*, mais aussi des champignons phytopathogènes comme *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis* et *Magnaporthe grisea*. D'autres espèces d'importance économique sont actuellement en cours de séquençage. Les données des séquences sont soit disponible gratuitement dans le domaine publique quand ils sont obtenues par des chercheurs des institutions académiques, soit dans des sites privés quand elles sont obtenues par des compagnies privées.

Toutes les séquences qui sont disponibles ont contribué à une très intéressante base de données qui pourrait être atteinte de n'importe où. C'est une importante ressource qui permet de mieux comprendre la composition et la complexité du génome.

-----



## 1.5 - SPÉCIATION, ÉVOLUTION ET CLASSIFICATION

### 1) Espèce

L'**espèce** est l'unité fondamentale de la classification biologique. Pour la génétique, le concept de l'espèce définit les limites normales de l'échange génétique. Ainsi, chez un champignon, l'espèce consiste en toutes les populations entre lesquelles ont lieu une copulation réussie et une production d'une progéniture viable. Une **population** est un groupe d'individus qui, à cause de leur proximité et similarité génétique, peuvent facilement s'interféconder et échanger des gènes. Les **individus** sont clairement définis dans le cas des champignons unicellulaires et plasmodiaux, où chaque cellule ou plasmode est un individu. Mais pour les champignons filamenteux, les individus sont définis sur la base de deux facteurs, identité génétique et continuité physique. Ainsi, une colonie développée à partir d'une seule spore est un individu. Egalement, les spores séparées à partir d'une colonie-parent sont considérées des individus.

Divers champignons sont connus mais leur majorité n'a pas reçu l'étude détaillée nécessaire pour la délimitation sûre de l'espèce. Cependant, des considérations pratiques nécessitent que ces champignons doivent être assignés à des espèces existantes ou nouvellement créées. Un champignon nouvellement découvert est accepté comme une nouvelle espèce seulement après avoir été décrit et dénommé suivant le Code International de la Nomenclature Botanique. Un binôme latin doit être donné, consistant en un nom générique suivi d'un nom spécifique. Généralement, une nouvelle espèce est suffisamment similaire à une autre déjà connue pour être assignée dans un genre existant, mais parfois, il est nécessaire de créer un nouveau genre pour l'adapter.

### 2) Variation intraspécifique

Les espèces fongiques varient dans la nature et cette variation peut être déterminée en étudiant beaucoup de souches provenant de différentes

localités. Cette variation peut affecter tous les aspects de la biologie d'un champignon.

Les souches isolées dans la nature peuvent différer en morphologie. Par exemple, les souches d'*Aspergillus nidulans* diffèrent dans la forme de la croissance de la colonie et dans la teneur de la sporulation sexuée et asexuée. La différence peut aussi être physiologique avec différentes vitesses de croissance et différents niveaux de production des produits métaboliques. Plusieurs différents groupes végétatifs compatibles existent chez les *Ascomycota* (*Aspergillus nidulans*) et les Myxomycètes (*Didymium iridis*) tandis que différents allèles de types sexuels ont été observés chez les *Basidiomycota* (*Schizophyllum commune*).

Des différences entre des souches d'espèces fongiques peuvent aussi exister dans le nombre des chromosomes aboutissant à la polyploïdie (*Allomyces*, *Saccharomyces*) ou l'aneuploïdie (*Neurospora*, *Aspergillus*). Les chromosomes fongiques sont d'habitude petits et difficiles à compter. Mais, cette situation a maintenant été changée par l'avènement de l'**électrophorèse sur gel à champ pulsé** ou ***pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)**. Les méthodes douces d'extraction sont utilisées pour isoler l'ADN sans fragmentation de façon à ce que les molécules extraites d'ADN représentent les chromosomes entiers. L'ADN est appliqué à un gel d'agarose et l'électrophorèse est réalisée avec des pulsations électriques alternées à partir de deux directions. La vitesse de migration et l'orientation vont dépendre de la rapidité avec laquelle les molécules d'ADN vont se réorienter avec chaque pulsation. Plus la molécule est longue, plus la résistance à la réorientation est grande et plus la migration est lente. Ainsi, les ADN de différentes longueurs se séparent sur le principe que les chromosomes les plus courts vont se déplacer le plus vite. La technique PFGE permet ainsi de révéler des variations à l'intérieur de l'espèce au niveau du nombre, de la taille et de la structure des chromosomes.

L'étude de la variation entre des souches d'espèces fongiques peut concerner des gènes qui peuvent être séquencés. Les méthodes de biologie moléculaire telles que RFLP et RAPD sont largement utilisées dans ce cas. Des enzymes spécifiques de différentes souches peuvent aussi être comparées quand les protéines extraites des champignons sont soumises à une électrophorèse sur gel. Une activité enzymatique particulière est souvent contrôlée par des gènes à plusieurs différents loci entraînant des formes légèrement différentes de cette enzyme ayant différentes mobilités électrophorétiques. Ces formes, distinguables par électrophorèse sur gel, sont

appelées isozymes. L'électrophorèse sur gel permet aussi de détecter ce qu'on appelle allozymes qui sont des formes altérées d'enzymes produites par les allèles après maturation au niveau de leur locus spécifique d'enzyme.

La variation chez beaucoup de champignons peut être continue ou discontinue. La **variation continue** fait référence à la situation où les caractéristiques varient en importance entre des souches comme par exemple les vitesses de croissance. La variation continue est observée quand l'importance d'une caractéristique est influencée par plusieurs gènes, chacun avec un effet relativement réduit. Par contre, la **variation discontinue** fait référence à la situation où une caractéristique est soit présente, soit absente. Par exemple, une isozyme est soit présente ou manquante. La variation discontinue a lieu quand un seul gène a un effet décisif. Chez *Aspergillus nidulans*, la variation continue (comme l'intensité de sporulation) et la variation discontinue (comme le type de compatibilité végétative) ont été observés dans les populations naturelles.

Certains petits changements génétiques dans les populations fongiques, qui sont généralement réversibles, peuvent avoir lieu avec suffisamment de rapidité pour être accessibles à l'observation et l'expérimentation. Ces changements génétiques sont désignés par **microévolution** et prennent la forme de modifications dans la fréquence des allèles. Un allèle peut s'accroître en fréquence et peut remplacer tous les allèles alternatifs. Par contre, un allèle peut diminuer en fréquence et même disparaître d'une population.

### 3) Spéciation

La **spéciation** est l'évolution vers une nouvelle espèce. C'est un processus qui commence avec une population relativement homogène qui vit dans une région particulière et possède un grand pool de gènes. Chez certains individus, de nouvelles combinaisons de gènes apparaissent rendant possible pour ces individus de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. Par une sélection naturelle, les individus dans le groupe ayant des combinaisons de gènes favorables aux conditions environnementales prévalentes survivent et leur reproduction est favorisée. Un isolement supplémentaire de sous-groupes peut avoir lieu. Cet isolement peut être dû à des barrières génétiques à la reproduction, à des préférences écologiques pour un habitat particulier, à la migration vers une autre région ou à un autre mécanisme d'isolement. Avec l'isolement, l'inbreeding à l'intérieur du sous-

groupe est favorisée et accompagnée par des changements génétiques distinctifs ultérieurs. Si le processus continue, les sous-groupes peuvent éventuellement devenir incapables de s'échanger des gènes l'un avec l'autre, évoluant ainsi en espèces distinctes. La spéciation fongique est essentiellement sympatrique, prenant origine à partir des mécanismes d'isolement qui se développent par inbreeding dans une population et secondairement allopatrique, résultant de l'isolement géographique. Généralement, ces processus de divergence se développent progressivement. Parfois, la spéciation peut avoir lieu soudainement comme un résultat d'hybridation interspécifique, mais ce processus est rare chez les champignons.

### **Spéciation sympatrique**

Des barrières écologiques ou génétiques peuvent se développer à l'intérieur d'une seule population entraînant une spéciation sympatrique. Ces barrières empêchent le flux de gènes entre les groupes, aboutissant éventuellement à la divergence d'espèces sympatriques. Ces espèces deviennent incapables de s'échanger des gènes bien qu'ils vivent dans le même habitat.

Les barrières génétiques peuvent se développer chez les champignons entraînant une interruption du flux de gènes dans une population à inbreeding, aboutissant à un isolement reproductif de groupes dans la population et par conséquent à la spéciation. Parmi les mécanismes d'isolement conduisant à la spéciation, les plus communs sont ceux qui interrompent soit la formation d'hétérocaryon soit des étapes dans la formation du sporocarpe.

Des barrières écologiques peuvent aussi se développer entre des groupes d'une population fongique aboutissant à une spécialisation sympatrique. Dans l'habitat naturel, plusieurs facteurs écologiques agissent sur les champignons. Ces facteurs incluent la disponibilité de substrats ou d'hôtes convenables, l'interaction avec des organismes compétitifs, les prédateurs et parasites, les facteurs abiotiques tels que la température et l'humidité et les pratiques agricoles de l'homme. La combinaison particulière de ces facteurs créant une niche écologique particulière, peut opérer dans la sélection naturelle d'une souche fongique particulière par rapport à une autre.

### **Spéciation allopatrique**

La séparation géographique de groupes de la population d'origine suivie par un isolement reproductif et une divergence génétique entraîne une

spéciation allopatrique. La dissémination à travers le monde des champignons par l'intermédiaire des spores qui peuvent généralement être véhiculées par l'air sur de longues distances réduit l'importance de la spéciation géographique.

### **Spéciation par hybridation**

Bien que rare chez les champignons, il est possible pour de nouvelles espèces fongiques de se développer par hybridation d'espèces existantes. Un exemple est le développement naturel de l'hybride *Allomyces javanicus*, qui est un type d'espèce intermédiaire entre *A. macrogynus* et *A. arbuscula*. Cette espèce fongique, *A. javanicus*, a été recréée expérimentalement en copulant les deux espèces parentales.

## **4) Évolution**

### **Habitats et relations écologiques**

Concernant les habitats et les aspects écologiques, la grande majorité des champignons est terrestre, bien que la présence des zoospores dans certains groupes indiquent un ancêtre aquatique. Les champignons étaient parmi les premiers organismes terrestres. Certaines caractéristiques morphologiques fondamentales, telles l'asque et la baside, sont associées à la projection des spores dans l'air indiquant que la plus grande diversification fongique a lieu sur la terre.

La relation de symbiose ou de parasitisme chez les champignons est une relation spécialisée. Elle semble avoir dérivé à partir de l'état saprobique des champignons. Quand les défenses des plantes sont faibles (tissus sénescents ou endommagés), les champignons qui sont normalement des saprobes peuvent attaquer ces plantes et vivre comme des parasites nécrotiques tuant les cellules et se nourrissant de leurs contenus. S'il y a un inoculum suffisamment massif, ces parasites facultatifs non spécialisés peuvent réussir à envahir des tissus sains. Si les tissus vivants de la plante montrent une importante source comparés aux tissus morts de la plante, un parasite facultatif va subir une sélection pour une activité parasitique plus efficace. Cette situation peut aboutir à une meilleure spécialisation, une gamme d'hôtes plus limitée et une capacité compétitive saprobique réduite. Le parasitisme facultatif peut ainsi évoluer en parasitisme obligatoire, avec le champignon incapable de croître sauf sur son hôte. Certains autres champignons ont évolué pour devenir des partenaires symbiotiques dans d'importantes associations telles les mycorhizes et les lichens.

### **Morphologie et structure**

La plupart des groupes fongiques est filamenteuse. Cependant, leurs hyphes ont évolué indépendamment et ont abouti à différentes formes et compositions des parois (pseudo-champignons comparés aux vrai-champignons). Chez les champignons terrestres, les hyphes peuvent initialement avoir été utiles pour la propagation et la pénétration dans le sol humide, mais ensuite elles se sont montrées d'une grande utilité dans la pénétration dans les restes morts ou dans les tissus vivants des plantes.

Chez les vrai-champignons filamenteux, les hyphes sont normalement divisées en compartiments par des cloisons, bien que des pores à travers les cloisons maintiennent la continuité protoplasmique entre les compartiments. La présence des cloisons permet aux régions endommagées d'être rapidement isolées avec une limitation efficace des dégâts.

Certains vrai-champignons sont capables d'exister sous forme d'hyphes ou sous forme unicellulaire (levures). Les hyphes sont bien adaptées pour la pénétration dans les tissus des plantes tandis que les levures semblent adaptées à la vie sur des surfaces où il peut y avoir des fluctuations dans le potentiel hydrique.

### **Cycle biologique et sexualité**

Pour les champignons produisant des spores qui ont un rôle crucial dans la survie d'une espèce, une forte sélection pour l'auto-stérilité à lieu, rendant plus probable la production de ces spores. Cependant, le grand développement de l'auto-stérilité et des systèmes complexes de copulation indiquent que l'outbreeding a d'importants avantages.

Beaucoup de champignons produisent des spores asexuellement. Si les spores produites sexuellement deviennent relativement non importantes dans la conservation et la dissémination, la pression de sélection pour maintenir le processus sexuel sera faible et le champignon concerné peut devenir totalement asexué. Ceci est probablement le cas de nombreux Deutéromycètes.

## **5) Phylogénie**

Les schémas phylogénétiques sont basés sur des relations vraisemblables. Les champignons ayant des caractéristiques similaires sont classés ensemble dans un genre, une famille, un ordre, une classe ou un

phylum. Leur possession de caractéristiques similaires est basée sur l'hypothèse qu'ils ont eu un ancêtre commun. Le rapprochement et l'éloignement en phylogénie se réfère à l'importance du changement génotypique qui peut avoir lieu dans le passé quand les espèces divergeaient à partir d'une lignée parentale commune.

L'aspect morphologique a été et reste la base de la phylogénie et de la classification. En expression simple, plus deux espèces fongiques ont des caractéristiques morphologiques communes, plus elles seraient étroitement liées. La morphologie est basée sur les caractéristiques aussi bien macroscopiques que microscopiques. En plus de la morphologie, d'autres éléments de comparaison, basés sur la physiologie, la biochimie et la biologie moléculaire, sont de plus en plus utilisés.

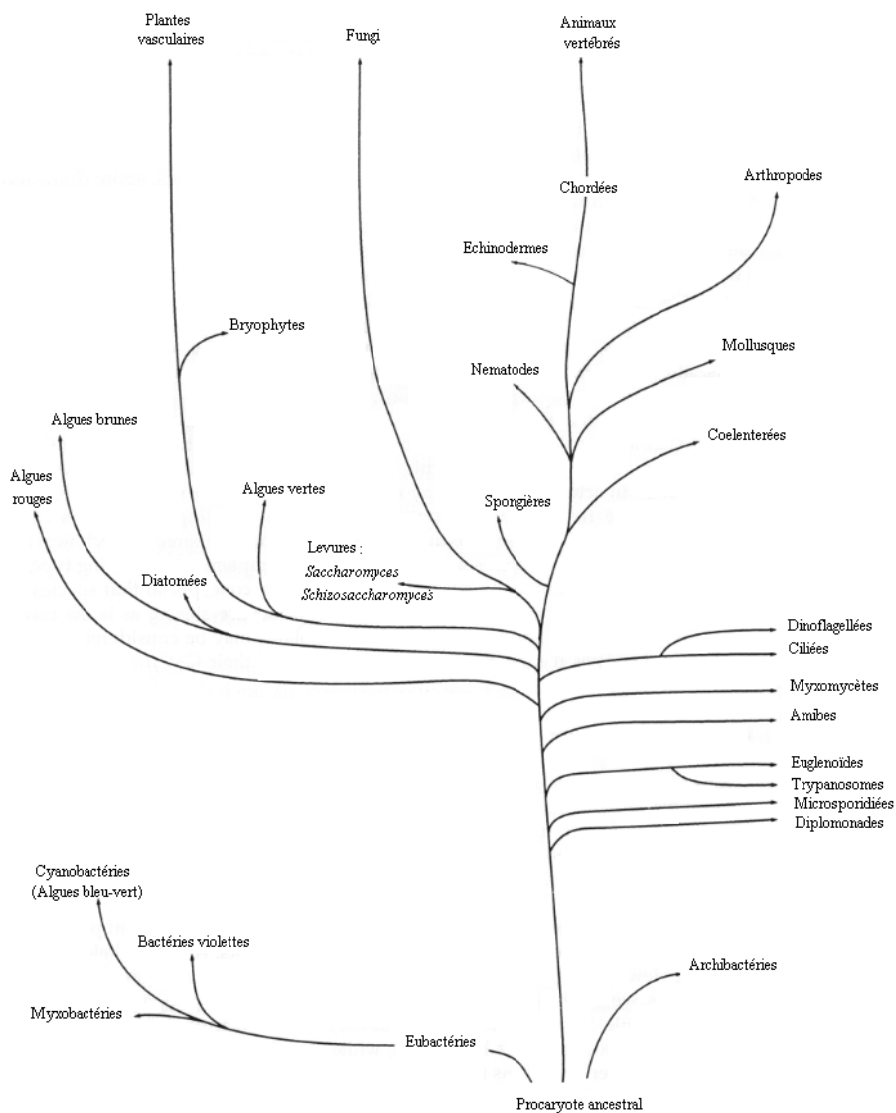
Antérieurement, les champignons ont été placés dans le règne des végétaux avec les plantes photosynthétiques. Actuellement, les champignons appartiennent à trois règnes (*Protozoa*, *Chromista* et *Fungi*) mais aucun n'est considéré comme végétal. Ainsi, les champignons apparaissent représenter différentes lignées phylogénétiques qui ont évolué à partir d'ancêtres différents. Pour la phylogénie fongique, il est supposé que les chytrides et les organismes qui leur sont similaires étaient des ancêtres aux vrai-champignons (règne des *Fungi*). Ces vrai-champignons et les animaux multicellulaires ont un ancêtre commun, un protozoaire flagellé similaire aux choanoflagellés existants. La divergence des vrai-champignons des animaux a eu lieu rapidement après la divergence des autres lignées majeures des eucaryotes (comprenant les végétaux, les *Chromista* et les *Protozoa*). Ce concept a été récemment confirmé par l'analyse de l'ARNr, mais aussi antérieurement où il a été noté que les chytrides et les choanoflagellés partagent des caractéristiques telles que des crêtes mitochondriales du type plat, un seul flagelle postérieur et des voies métaboliques communes comme la voie DAP. La divergence des choanoflagellés a donné les spongiaires et d'autres animaux multicellulaires aussi bien que les vrai-champignons (Figure 1-13).

## 6) Classification

### Types de classification

#### *Classification traditionnelle*

La plus ancienne classification est la taxonomie traditionnelle où les espèces sont examinées et ensuite celles qui sont similaires sont groupées ensemble. L'une des classifications traditionnelles est la **classification**



**Figure 1-13 :** Schéma proposé pour les relations phylogénétiques entre certains groupes de champignons dans le monde des êtres vivants (Moore-Landecker, 1996 ; traduit).



**naturelle**. Elle est basée sur la totalité des similarités morphologiques et nécessite beaucoup d'informations permettant une bonne estimation de la similarité. Par contre, la **classification artificielle** est une autre classification traditionnelle qui est basée sur quelques caractéristiques, sélectionnées parce qu'elles sont d'un intérêt particulier. Par exemple, les champignons peuvent être divisés en phytopathogènes et ceux qui n'attaquent pas les plantes. Les phytopathogènes peuvent être ensuite subdivisés sur la base des types de plantes infectées.

#### *Classification numérique*

La **taxonomie numérique** est basée sur l'utilisation d'aussi nombreuses caractéristiques que possible et de les traiter toutes avec une importance égale. Au début, la taxonomie numérique a été utilisée pour produire strictement des **classifications phénétiques**, basées seulement sur la similarité sans impliquer aucune autre considération. Par exemple, deux organismes pourraient être liés par le fait d'être les deux dérivés d'un ancêtre avec un ensemble intermédiaire de caractères. Une classification phénétique produit alors un arbre dans lequel les taxons sont liés à ceux les plus similaires, avec la longueur des branches indiquant l'étendue des différences.

Une autre vue de la taxonomie numérique est que puisque les taxons actuels sont le produit de l'évolution, les classifications doivent être basées sur le modèle de la divergence évolutionnaire (phylogénie). Cette classification est appelée **classification phylogénétique** ou **cladistique**, avec un clade comme étant un groupe monophylétique. Une gamme de logiciels informatiques pour la classification cladistique existe et différents types d'arbres peuvent être construits. Des exemples d'arbres sont l'arbre additif sans racines qui montre la parenté et le taux de changement sans localiser l'ancêtre commun, l'arbre additif avec racines qui indique l'origine du processus en plus de la parenté et le taux de changement ou l'arbre ultramétrique (ou dendrogramme) qui donne, au lieu du taux de changement, les temps relatifs de la divergence. Le dendrogramme peut être fourni avec une échelle de temps si, en plus, il y a des informations sur la vitesse avec laquelle l'évolution a eu lieu ou s'il y a des fossiles comme preuves adéquates.

#### **Caractéristiques de la classification**

Dans la plupart des cas, la classification fongique est essentiellement traditionnelle plutôt que numérique et basée sur les caractéristiques morphologiques facilement observables. Cependant, certains groupes de champignons d'importance pratique ont été étudiés plus profondément en

utilisant non seulement la morphologie mais aussi différentes autres caractéristiques de classification.

### *Morphologie*

Les caractéristiques morphologiques identifiables à l'œil nu ou à la loupe de main sont d'une grande importance dans la classification de certains champignons ayant de grandes structures sporulantes (*Ascomycota* et *Basidiomycota*). Mais, pour la plupart des autres champignons qui sont microscopiques, l'étude de leur morphologie nécessite l'utilisation du microscope photonique. C'est la morphologie, telle que révélée par la microscopie photonique, qui est la base pour la plupart des classifications fongiques, bien que la microscopie électronique à balayage soit parfois utilisée pour une meilleure observation des détails morphologiques.

La classification morphologique des champignons est basée sur les détails abondants associés avec leur sporulation sexuée. En absence de sporulation sexuée, moins de détails morphologiques associés à la reproduction asexuée sont utilisés. Quand la sporulation est absente, la classification morphologique devient difficile à utiliser, malgré l'aide de l'observation de certaines structures particulières telles que les sclérotés chez les champignons filamenteux et la forme cellulaire et le type de bourgeonnement chez les levures.

### *Nutrition et physiologie*

Les critères nutritionnel et physiologique utilisés dans la classification concernent principalement les levures puisqu'elles croissent rapidement en culture pure. Les plus importantes caractéristiques étudiées sont les conditions de fermentation et de croissance, les sources d'azote, le métabolisme des sucres, l'action des composés antifongiques, etc...

### *Composés de faible poids moléculaire*

L'utilisation de composés à faible poids moléculaire est appelée **chemotaxonomie**. Elle est basée sur la caractérisation des composés spécifiques non communs, des pigments, des métabolites secondaires, ... Pour cela, différentes techniques sont utilisées : chromatographie en couche mince, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, chromatographie en phase liquide de haute performance et résonance magnétique nucléaire.

### *Propriétés antigéniques*

Les protéines spécifiques et les carbohydrates d'un champignon peuvent être injectés, comme des antigènes, dans un vertébré tel qu'un lapin,

pour induire chez lui la formation d'anticorps. Un sérum extrait du sang de lapin contenant des anticorps est connu sous le nom d'antisérum. Deux champignons étroitement liés vont différer seulement légèrement dans les antigènes qu'ils contiennent qui vont précipiter avec les antisérums dans le gel gélosé. D'autres méthodes pour déterminer la similarité antigénique sont utilisées. L'une des plus utilisées est l'immunoélectrophorèse où la préparation d'antigènes est sujette à une électrophorèse sur gel.

#### *Carbohydrates*

Quand elles sont hydrolysées, les parois des levures produisent généralement du glucose et du mannose, mais les espèces peuvent différer par la présence de quantités plus faibles de sucres tels que le fructose, le galactose, le rhamnose et le xylose. Les parois des Oomycètes sont connues contenir de la cellulose alors que les parois des vrai-champignons sont riches en chitine.

#### *Protéines*

La composition des protéines peut être utilisée pour déterminer les relations entre les espèces et les genres. Elle est basée sur l'électrophorèse sur gel des extraits de protéines ou des enzymes isolées des champignons.

#### *Acides nucléiques*

La séquence des nucléotides dans les acides nucléiques dans le noyau ou les mitochondries, représente une quantité énorme d'informations dans chaque cellule. En utilisant des programmes informatiques appropriés, l'étude des séquences des acides nucléiques correspondants d'un groupe d'organismes rend possible la construction d'un arbre indiquant comment les séquences ont évolué à partir d'une séquence ancestrale. Cette **phylogénie moléculaire** est maintenant de plus en plus utilisée dans la classification fongique. La comparaison des séquences d'ADNr a été montrée particulièrement utile quand la technologie PCR est utilisée.

### **Utilisation de PCR dans la classification**

Le passage des caractéristiques morphologiques à celles moléculaires est très important dans la systématique fongique. L'introduction des méthodes PCR a sensiblement augmenté le niveau de connaissance dans la classification fongique. Ces techniques, couplées avec l'utilisation générale de régions particulières dans le génome, ont donné une grande avancée dans notre compréhension des groupages taxonomiques aussi bien que les histoires évolutives et les propriétés fonctionnelles associées à ces techniques. Les méthodes PCR utilisées au niveau des espèces fongiques sont essentiellement celles développées à partir des ARNr d'un groupe de gènes et de RAPD.

Pendant longtemps, la phylogénie fongique a été expliquée en utilisant des critères phénotypiques (caractères morphologiques et physiologiques) et/ou des composants chimiques tels que les métabolites secondaires. Le récent développement des techniques moléculaires a permis de développer la ramification des phylogénies fongiques basées sur l'analyse des protéines (analyse des isozymes) et des acides nucléiques (hybridation ADN-ADN, caryotypage électrophorétique, RFLP et séquençage d'ADN). Les techniques PCR ont rendu possible la construction des phylogénies moléculaires d'un grand nombre de champignons, comprenant des parasites obligatoires et des taxons rares.

-----