

S'INITIER ET SE PERFECTIONNER
À L'ÉTUDE DES
DISCOMYCÈTES



René Dougoud

en collaboration avec
Jean-Paul Priou & Nicolas Van Vooren

Préface de
Michel Hairaud

Ascomycete.org



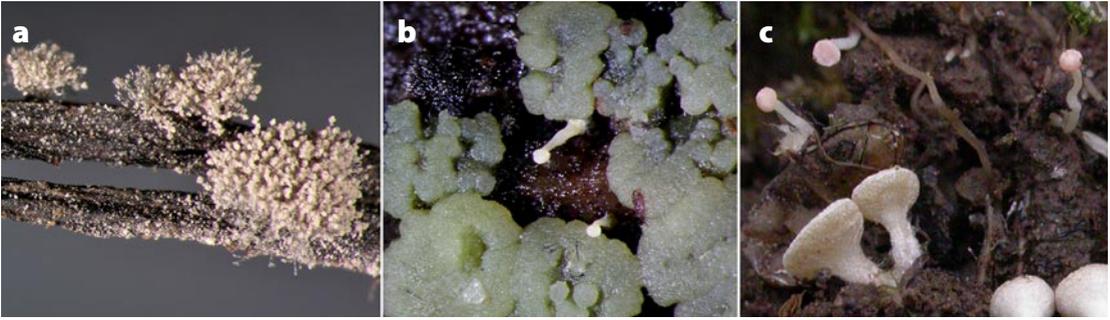


Fig. 16 • a : conidiophores de type *Botrytis*, croissant associés aux espèces du genre *Botryotinia* ; b : conidiomes de *Dendrostilbella prasinula* avec son téléomorphe, *Claussenomyces prasinulus* ; c : conidiome de *Symphysisira* (en haut) avec son téléomorphe, *Symphysisirinia chaerophylli*, sur graines de *Chaerophyllum*.

aussi nommés corémies, sont parfois visibles à l'œil nu (fig. 16). Dans certains cas, les conidies se forment par segmentations d'hyphes et prennent alors le nom d'arthrospores. Dans d'autres cas, elles naissent aux extrémités de phialides, sortes de bouteilles microscopiques.

Le développement d'autres types d'anamorphes est concentré en structure superficielle sans paroi, les sporodochies, alors que d'autres types sont confinés à l'intérieur de corps sphériques recouverts d'une membrane, les pycnides, ou encore à l'intérieur de locules, qui sont de petites logettes à parois internes stromatisées.

Parmi les formes de reproduction asexuées, il faut aussi citer les chlamydo-spores qui naissent autour d'une paroi épaissie, à l'intérieur de sections d'hyphes mycéliennes ou elles peuvent former de courtes chaînes.

Si des téléomorphes peuvent produire des anamorphes aboutissant à la formation de mycéliums, certains téléomorphes engendrent également d'autres formes asexuées, les microconidies, qui ne germent pas, mais qu'on suppose jouer le rôle de spermaties, c'est-à-dire d'organes mâles féconda-

teurs. Ces conidies se rencontrent notamment dans la famille des *Sclerotiniaceae* ou elles se produisent, en culture, sur le mycélium, sur les sclérotés et les stromas, par l'intermédiaire des ascospores encore dans les asques ou retombées et souvent germées sur la surface de l'hyménium (fig. X). *Botrytis*, *Dendrostilbella prasinula* et *Symphysisira* sont des anamorphes que l'on peut assez facilement rencontrer dans la nature. La première, forme de minuscules buissons blanchâtres, le plus souvent à proximité des apothécies, par exemple de *Botryotinia* Whetzel, la deuxième dresse de courtes tiges pâles, à têtes arrondies, très proche du téléomorphe, *Claussenomyces prasinulus* (P. Karst.) Korf & Abawi, la troisième ressemble à un rivet à tête hémisphérique, de couleur rose, que l'on peut trouver à côté des espèces du genre *Symphysisirinia* E.A. Ellis (fig. 16).

On trouve assez souvent sur l'hyménium très mature de *Sarcoscypha austriaca* (Beck ex Sacc.) Boud., les conidies du type *Molliardiomyces*, issues des ascospores germées. DOUGOUD & MORAVEC (1995), ont observé sur l'hyménium de trois récoltes de *Peziza acroornata* Dougoud & J. Moravec, l'anamorphe de type *Oedocephalum*, formé sur des ascospores ger-

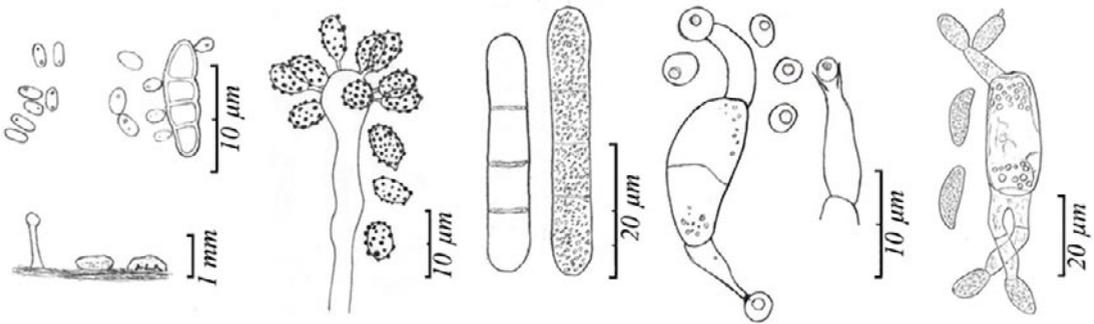


Fig. 17 • De gauche à droite : *Dendrostilbella prasinula* avec, ses conidies en dessus et une ascospore entourée des conidies en formation et libres. Conidiophore issu d'une ascospore germée et conidies verruqueuses du type *Oedocephalum*. Conidies du type *Symphysisira*. Conidies ou microconidies du type *Sclerotium*, issues d'une ascospore germée. Conidie du type *Molliardiomyces* issues des germes d'une ascospore de *Sarcoscypha austriaca*.



Fig. 23 • Apothécies, exemples de formes et de couleurs. a : *Gyromitra infula* ; b : *Bryoglossum gracile* ; c : *Neottiella rutilans*. d : *Geopora sumneriana*. e : *Ciboria batschiana*. f : *Morchella deliciosa*. g : *Diplonaevia circinata*. h : *Microglossum viride*. i : *Chlorociboria aeruginascens*. j : *Olla scrupulosa*. k : *Delastria rosea*. l : *Lachnum virgineum*. m : *Ascobolus immersus*. n : *Helvella* gr. *lacunosa*. o : *Orbilbia luteorubella*. p : *Hymenoscyphus ombrophilaeformis*. q : *Cyathicula coronata*. r : *Hymenoscyphus repandus*.

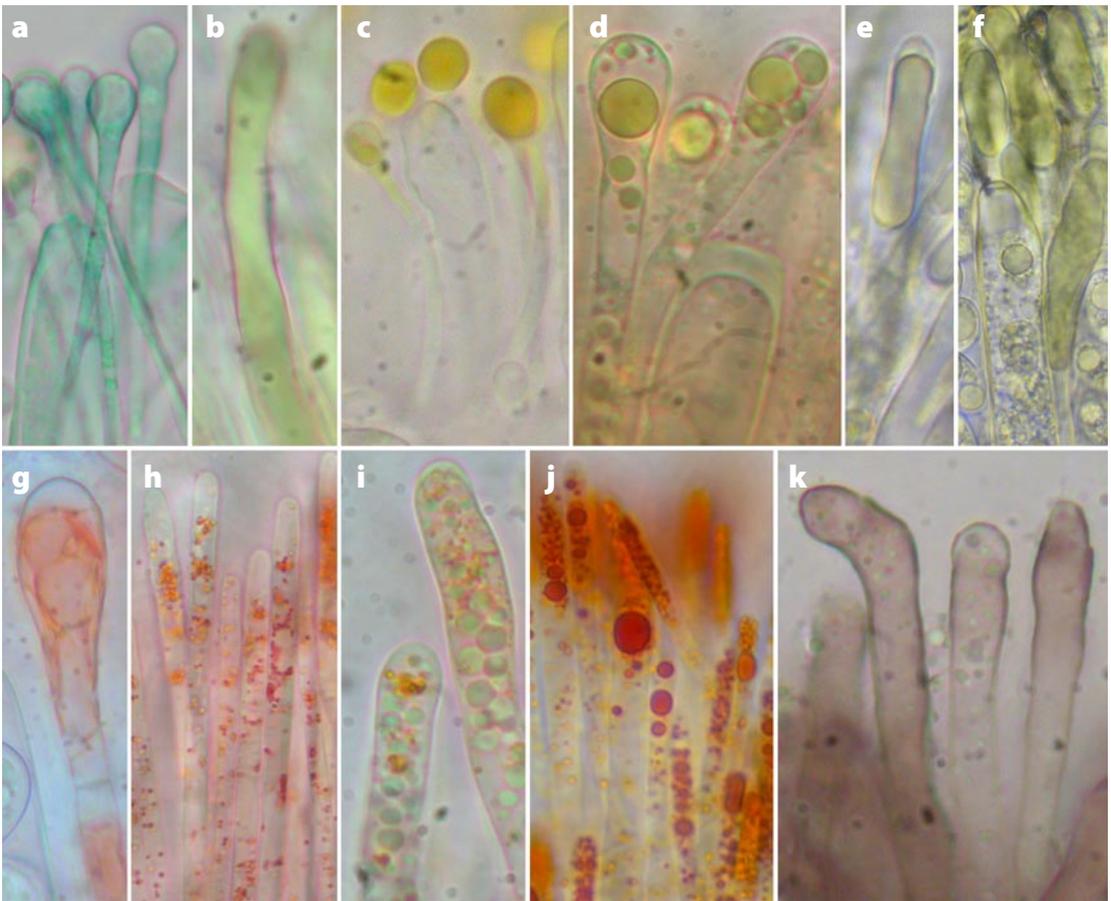


Fig. 34 • Pigmentation des paraphyses. a : *Mniaecia jungermanniae* ; b : *Moellerodiscus* sp. ; c : *Thelebolus microsporus* ; d : *Peziza sublaricina* ; e : *Calycellinaalniella* ; f : *Velutarinarufo-olivacea* ; g : *Scutellinia nigrohirtula* (caroténoïdes sous forme cristalline) ; h : *Sarcoscypha coccinea* (caroténoïdes sous forme granulaire) ; i : *Octospora wrightii* (caroténoïdes et gouttes lipidiques) ; j : *Pseudopithyella minuscula* (caroténoïdes sous forme granulaire et lipidique) ; k : *Helvella helvellula* (pigmentation homogène à l'intérieur, en enduit à l'extérieur).

avec elles lors de leur croissance (fig. 32L). On peut aussi relever, chez des *Orbiliales* la présence d'une fine pellicule cireuse qui recouvre non seulement le sommet des paraphyses, mais également celui des askes et parfois l'excipulum.

Le protoplasme contenu dans les paraphyses est incolore ou variablement coloré. Il peut être vacuolaire et parfois d'aspect spumeux, ou lipidique et alors réfringent, emplissant totalement la paraphyse ou fragmenté en gouttelettes de tailles variées ou en granulations.

Certaines paraphyses sont totalement remplies de protoplasme pigmenté, alors que chez d'autres, les pigments sont surtout situés vers le haut (fig. 32 et 34). On rencontre chez certaines espèces appartenant à plusieurs genres, mais notamment dans les genres *Hymenoscyphus* et *Calycina* Gray des paraphyses dont le protoplasme, lorsque libéré, s'oxyde. Cette oxydation se remarque par un changement de couleur, généralement rougeâtre et assez rapide, des

endroits blessés (fig. 36a). On constate presque toujours à un certain moment, qui correspond à la maturité de l'espèce ou en début de la post-maturité, que leur contenu a tendance à se fragmenter en amas ou à se concentrer en gouttelettes (fig. 36b). Le protoplasme est alors en cours de résorption. Il peut avoir déjà disparu à la base, ce qui se traduit généralement par une diminution plus ou moins marquée ou brusque du diamètre de la paraphyse.

Leur observation se fait d'abord dans l'eau, avant d'utiliser les colorants et les réactifs microchimiques. Il peut arriver, malgré ce milieu jugé neutre, que surviennent des modifications plus ou moins rapides de l'aspect et de la couleur du protoplasme. Il est donc recommandé d'observer la préparation sitôt montée, de manière à pouvoir observer et relever ces éventuelles modifications.

Le recours à la coloration est utilisé pour faciliter le repérage des paraphyses lorsqu'elles sont peu nombreuses ou peu visibles, pour mettre en évidence

Paroi sporale

Lorsqu'il est possible d'observer les différentes membranes de la paroi sporale, il est important de pouvoir les reconnaître et de les désigner. On trouvera dans la littérature des termes différents en fonction du choix des auteurs (fig. 46). Nous pensons avoir choisi ici les termes les plus usuels et les indiquons de l'intérieur vers l'extérieur :

- **la membrane plasmique**, qui est aussi nommée membrane cellulaire, membrane cytoplasmique ou encore plasmalemma, enferme le protoplasme cellulaire. Commune à toutes cellules vivantes, elle est composée de deux couches de phospholipides insérées par des protéines. Cette membrane, qui mesure moins de 10 nm (1 nm = 1 million de fois plus petit qu'un millimètre) est invisible au microscope optique. Son importance est toutefois très grande, puisque c'est elle qui sélectionne ce qui peut entrer ou sortir de la cellule ;

- **l'endospore**, parfois réfringente, d'une certaine épaisseur ;

- **l'épisporre**, dotée de rigidité, souvent colorable par le bleu coton, le bleu de trypan, le bleu de cré-syl ;

- **l'exospore** où se forme les ornements (verruques, crêtes, stries, etc.). Chez certaines espèces, cette paroi est séparable, c'est notamment le cas des ascospores du genre *Cheilymenia* et de quelques espèces du genre *Scutellinia*, montées dans le bleu coton lactique et portées à ébullition. LE GAL (1947) nomme cette paroi, coque interpérissporique. BRUMMELEN (1967) nomme la couche lisse ou ornementée, violette à brune, des espèces des genres *Ascobolus* et de *Saccobolus*, de formation épiplasmique. Celle-ci est formée de particules produites par le protoplasme de l'asque, particules qui précipitent et finissent par recouvrir l'épisporre.

- **l'ectospore**, une fine membrane entourant parfois l'ornementation de certaines ascospores.

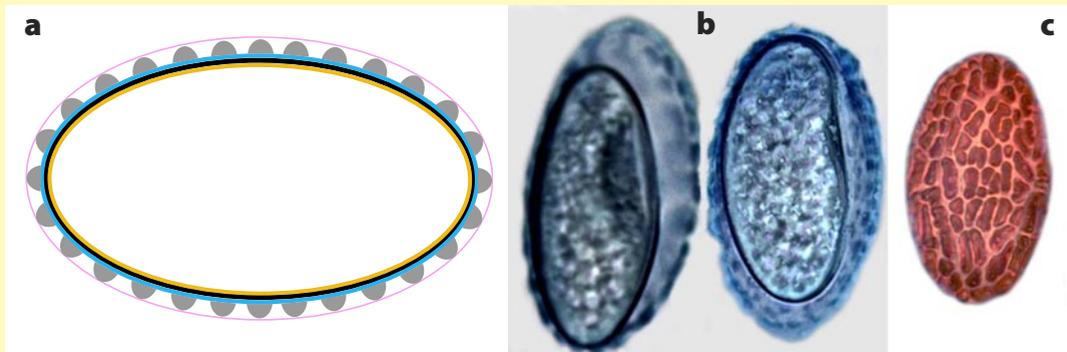


Fig. 46 • Paroi sporale. a : schéma d'une spore montrant les différentes membranes : — endospore, — episporre, — exospore, — ectospore ; b : ascospores de *Scutellinia mirabilis*, dans le bleu coton lactique et après chauffage, montrant les exospores verruqueuses dilatées et séparées de l'épisporre ; c : ascospore d'*Ascobolus behnitzensis*, dans l'eau, montrant l'épisporre recouverte de précipitations violettes formant l'exospore ou formations épiplasmiques.

éclairage froid, les prélèvements étant bien évidemment faits à partir d'exemplaires encore fixés à leur substrat.

Ascospores

Les ascospores sont les cellules reproductrices. Hormis ce rôle, elles contribuent au maintien des caractères génétiques des espèces. Le terme ascospores est usité par les auteurs modernes. Il indique de façon explicite les organes à l'intérieur desquelles elles se sont formées et d'où elles sont issues, les asques. Spore est un terme générique qu'il convient d'utiliser pour désigner les cellules propagatrices, celles généralement sexuées, issues de divers ordres de champignons et autres organismes.

Avant de passer en revue chacun des caractères sporiques, il est nécessaire de traiter du mode de positionnement qu'elles adoptent à l'intérieur des asques. Ce caractère n'est pas à négliger, car assez typique et constant chez certains genres. Il l'est toutefois beaucoup plus au sein des espèces. La position des ascospores à l'intérieur des asques est fonction de la place qu'elles ont à leur disposition, soit de la largeur des asques.

Position des ascospores

Les ascospores sont dites unisériées ou monostiques lorsque, à l'intérieur de l'asque, leur alignement est simple. C'est par exemple le cas des espèces du genre *Peziza* au sens large. Elles sont

L'introduction de la biologie moléculaire comme méthode d'analyse et de détermination des taxons s'est désormais généralisée dans tous les domaines du Vivant. Elle permet d'évaluer de nouveaux caractères inscrits dans les structures génétiques des organismes étudiés. L'objectif principal est de disposer d'une systématique phylogénétique permettant de retracer l'histoire évolutive des taxons et d'évaluer leurs parentés. Nous ne détaillerons pas ici les différentes méthodes employées pour produire une phylogénie, ni leurs avantages ou inconvénients, et invitons le lecteur à consulter des ouvrages donnant un éclairage plus détaillé sur ces aspects, tel que celui de LECOINTRE & LE GUYADER (2016).

Extraction de l'ADN et séquençage

D'un point de vue pratique, la première étape à réaliser consiste à extraire l'ADN d'un échantillon du champignon étudié. La méthode employée est généralement précisée dans le chapitre « Matériel et méthodes » des publications scientifiques et vous sera communiquée, si besoin, par le laboratoire réalisant cette opération. L'ADN extrait va ensuite être soumis à la technique dite PCR (Polymerase Chain Reaction) ou amplification en chaîne par polymérase. L'objectif est d'obtenir une quantité suffisamment importante des portions de l'ADN génomique que l'on souhaite utiliser pour l'analyse future, grâce à des amorces (primers en anglais) spécifiques de ces portions. Pour les Eucaryotes (dont les champignons font partie), il est d'usage d'amplifier des domaines de l'ADN ribosomique tels que le fragment ITS1–5.8S–ITS2 (souvent noté ITS) ou le 28S (souvent noté LSU) qui sont répétés à de nombreuses reprises dans les génomes et donc plus faciles à amplifier. Il est parfois utile ou nécessaire de cibler d'autres régions ou « loci » (*locus* au singulier) ou « marqueurs », comme les gènes codants RPB1, RPB2, EF1- α , etc., pour différencier des espèces proches au sein d'un groupe taxinomique. Leur amplification nécessite des amorces distinctes.

Pour l'étude des discomycètes, les ITS et LSU sont fréquemment utilisés et offrent de bons résultats au niveau spécifique, utilisés seuls ou parfois combinés.

À noter que les domaines ITS1 et 2 sont beaucoup plus variables que les domaines 5.8S et LSU, et sont de ce fait plus adaptés à la comparaison d'espèces taxinomiquement proches. À l'inverse, étant plus conservée entre espèces proches, la région LSU offre généralement une alternative plus fiable que l'ITS pour délimiter des groupes taxinomiques phylogénétiquement distants. Elle est notamment utilisée en combinaison avec des gènes codants pour produire des phylogénies multigéniques destinées aux classifications génériques ou supra-génériques (voir par exemple, HANSEN *et al.*, 2013).

Cette phase de séquençage aboutit parfois à un échec total ou partiel. En effet, selon l'état du matériel ou son ancienneté, il n'est pas possible d'extraire suffisamment de matériel génétique pour réaliser la PCR. Parfois on obtient partiellement le domaine recherché. Dans certains cas, l'ADN extrait est celui d'un organisme contaminant (moisissures, levures s'étant développé suite à un mauvais séchage ou une mauvaise conservation des exsiccata).

Traitement des séquences

Si le séquençage a réussi, nous disposons d'une séquence représentée sous la forme d'une suite de pics colorés en rouge, bleu, vert et noir, nommée chromatogramme (fig. 62), révélant l'ordre des différents nucléotides sur la région analysée. Ces derniers, retranscrits sous forme de lettres, correspondent aux différentes bases entrant dans la composition de l'ADN : adénine (A, vert), cytosine (C, bleu), guanine (G, noir) et thymine (T, rouge). En analysant ce chromatogramme, il est possible de détecter certaines « anomalies » et de les corriger.

On peut citer, par exemple, la superposition de deux pics dans une région du chromatogramme « propre », c'est-à-dire constituée de pics uniques bien isolés (fig. 61). Ce type d'irrégularité, souvent nommé SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), a pour origine la nature diploïde, au moins chez les Basidio-

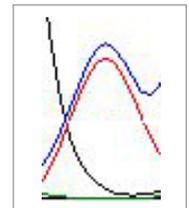


Fig. 61 • SNP



Fig. 62 • Exemple de chromatogramme de séquence

chitine. Syn., membrane cellulaire, membrane cytoplasmique ou plasmalemme (cf. Osmotrophie).

Métabolites : (n.m., du gr. *metabolê* = changement, transformation + suffixe ite) Composés chimiques issus de réactions chimiques produites à l'intérieur des cellules vivantes. Il y a deux types de métabolites : les primaires, impliquées dans le processus vital, le développement et la reproduction ; les secondaires, qui ne s'impliquent pas dans le processus vital, mais dont les fonctions sont écologiquement importantes.

Métachromasie : (n.f., du gr. *meta* = après, au-delà + *chroma* = couleur) En microscopie, phénomène par lequel des éléments cellulaires mis en présence d'un colorant prennent une teinte différente de celle du colorant.

Métachromatique : (adj., du gr. *meta* = après, au-delà + *chroma* = couleur et suf. *ique* = relatif à) En microscopie, caractérise la propriété d'éléments cellulaires de prendre une teinte différente de celle du colorant

Moniliforme : (adj., du lat. *monile* = collier) Qualifie des hyphes, ou autres éléments allongés, avec ou sans cloisons, présentant alternativement des étranglements et des dilatations, qui font qu'ils ressemblent à un collier ou à un chapelet.

Noyau : (n.m., du lat. *nux, nucis* = noix, amandes) Structure vitale à toute cellule vivante, présente dans la majorité des cellules eucaryotes contenant l'essentiel du matériel génétique (ADN).

Oblong(-ues) : (adj. du lat. *oblongus* = longuet, assez long) Qui a une forme allongée, plus longue que large. S'applique surtout aux ascospores, mais avec les extrémités arrondies

Organite ou parfois **organelle** par anglicisme : (n.m.) (n.f.) ; du lat. *organalis, organum* = orgue) Désigne un ou des organes spécialisés (noyau, ribosomes, réticulum endoplasmique, mitochondries, appareil de Golgi, plastes, vacuole, etc.) contenu dans le cytoplasme, qui est enveloppée par la membrane plasmique et, chez les champignons, par une paroi formée de chitine.

Osmolytes : (n.m. du gr. *osmos* = poussé + suf. *lyte* = de *lutós* = délié, adjectif verbal de *lúein* = détacher, desserrer) En biochimie, métabolites qui, en s'accumulant dans une cellule, maintiennent la pression osmotique. C'est notamment le cas des osmolytes contenus dans l'asque (des glucides de petites tailles) qui, en attirant de l'eau, augmente la turgescence et favorise la déhiscence.

Osmotrophie : (adj., du gr. *osmos* = poussée + *trophus* = nourriture) Désigne la stratégie alimentaire consistant à se nourrir à partir de substances dissoutes. C'est le cas des champignons. La stratégie des champignons repose sur la présence de protéines, nommées transporteurs, enchâssées dans la membrane plasmique. Ceux-ci conduisent spécifiquement les molécules nutritives et l'eau à l'intérieur

des cellules du mycélium, c'est l'endocytose. La membrane plasmique permet également l'excrétion d'enzymes, produits par le cytoplasme, afin de favoriser la réduction des sucres et autres éléments en corps simples et assimilables, c'est l'exocytose.

Oxydation : (n.f., du gr. *oxus* = aigu, piquant + suf. *ation* = qui indique l'action) Réaction chimique provoquée par la combinaison d'un corps mis en présence de l'oxygène. En mycologie, se traduit notamment par le changement progressif de la couleur de certains sucres et tissus mis en présence de l'air, après rupture des hyphes.

Paraphylétique : (n.m. ou n.f., du gr. *para* = à côté, près de + *phulon* = tribu, + *ique*, issu de *icus* = relatif à, propre à) En systématique, un taxon est dit paraphylétique quand il regroupe un ancêtre commun et seulement une partie de ses descendants.

Parenchyme(-mateux) : (n.m., du gr. *para* = à côté + *egkheô* = répandre) Désigne une structure, par ex. celle composant une strate, formée de cellules peu différenciées, plus ou moins isodiamétriques, globuleuses, anguleuses, presque polyédriques ou allongées, ayant un rôle conjonctif.

pH : (n.m.) Abréviation signifiant "potentiel hydrogène". Le pH indique si la solution est une base ou un acide. Quand le pH est compris entre 0 et 7, la solution est acide. Un pH égal à 7 montre la neutralité de la solution. Quand le pH est compris entre 7 et 14, la solution est basique.

Phialide : (n.f., du gr. *phialê* = coupe à libation) Cellule fertile, cylindracée, productrice par bourgeonnement d'un grand nombre de conidies, aussi nommées phialospores, en chaîne ou en amas globuleux.

Pigment(s) : (n.m., du lat. *pigmentum* = couleur) En biologie, substances produites par un organe vivant qui donnent leurs couleurs à un liquide, à un organe ou à un ensemble. Ils peuvent être désignés en fonction de leur localisation.

Plectenchyme(-mateux) : (n.m., resp. adj., du lat. *plectura* = enlacement + suf. *chyme* = bouillie, mélange) Terme général définissant des tissus composés d'hyphes parallèles, enchevêtrées, tressées, plus ou moins serrées, formant des accumulations plus ou moins épaisses. C'est le composant des mycéliums, des sporophores, des sclérotés, des rhizomorphes, etc. Le plectenchyme n'est pas un tissu au sens propre, c'est pourquoi il est aussi désigné comme pseudo-tissu ou faux-tissu.

Pore apical : (n.m., du lat. *porus* = passage + *apex* = sommet, pointe) Orifice s'ouvrant au sommet de l'asque pour permettre le passage des ascospores lors de la déhiscence.

Pore septal : (n.m., du lat. *porus* = passage et *septum* = cloison) Petit orifice situé au niveau des septa des hyphes, permettant le passage du protoplasme.

Potasse : (n.f., du lat. *kalium* = potassium) Terme générique de produit chimique contenant du potas-