

CHAPITRE I : CARACTERES GENERAUX DES CHAMPIGNONS

Introduction

Champignon est un terme ambigu qui désigne divers organismes biologiques sans chlorophylle et sans plastides, pas ou peu mobiles, constitués de cellules pourvues de noyaux et qui font partie des eucaryotes. La science étudiant les champignons est la mycologie. Proche de la botanique. Les interactions de ces organismes avec les plantes sont d'une grande diversité. Certains sont bénéfiques, conduisant à l'établissement de symbioses mycorrhiziennes très répandues dans le règne végétal. Mais beaucoup plus sont nuisibles en raison des maladies qu'elles engendrent (Esquerré-Tugayé, 2001).

C'est le groupe des microorganismes pathogène le plus important, responsable de la majorité des maladies des plantes. On estime le nombre total des champignons à 1.500.000 d'espèces, dont environ 100000 à 150000 sont étudiés.

Les champignons **sont des végétaux car ils possèdent une paroi cellulaire et leur cytoplasme renferme des vacuoles turgescents**. Cependant, une partie seulement des champignons, les **Eumycètes** ou **Eumycotina** sont *pourvus en permanence d'une paroi cellulaire distincte*. Les autres pendant une partie, généralement brève de leur cycle de développement, se présentent sous l'aspect d'une *cellule nue, flagellé Zoïde ou d'une cellule nue amiboïde, Phycomycètes ou Phycomycotina*. Certains organismes, rangés ici dans les champignons les *Myxomycètes ou Myxomycotina, sont constitués durant une partie de leur cycle d'un plasmode plurinucléé nu ou d'un ensemble de cellules amiboïdes interconnectées pseudoplasmode*). Ce plasmode ou pseudoplasmode étant, en particulier, capable de phagocytose, on a tendu aussi considérer les myxomycètes comme des sortes d'intermédiaires entre les champignons et les animaux.

Les champignons sont, en plus des "**Eucaryotes**" car ils possèdent de véritables noyaux "avec paroi nucléaire, nucléole et chromosome» qui se divisent par mitose et contiennent aussi des mitochondries.

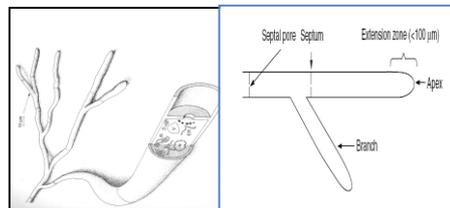
Les champignons sont des **Thallophytes** car leur appareil végétatif, ou thalle, ne comporte pas d'appareil conducteur différencié ; ce n'est donc pas un **cormus**, contrairement à celui des Cormophytes.

Enfin sont des thallophytes non chlorophylliens ; dépourvus de chloroplaste ; ce qui les distingue des **Algues**.

I. L'appareil végétatif :

L'appareil végétatif des champignons est généralement constitué par un **mycélium** : l'ensemble des filaments cylindriques "ou **hyphes**" ramifiés à croissance apical, linéaire, et dont le diamètre, très variable selon les espèces, peut aller de 1-2 μm jusqu'à 100 μm . La ramification du mycélium semble rarement ordonnée que celle des cormophytes et de certain Algues. Mais si cette ramification paraît relativement désordonnée elle reste cependant contrôlée par la dominance apicale.

Le mycélium est dit **septé** lorsque des cloisons transversales s'y forment. En réalité, celles-ci sont toujours incomplètes, ou moins dans les parties actives de mycélium où elles restent percées d'un pore central dont la structure de détail est plus ou moins complexe. Quand le mycélium est septé, il est donc en apparence subdivisé en éléments uni ou plurinucléés. En fait, ceux-ci ne sont pas réellement des cellules parfaitement individualisées puisqu'ils communiquent entre eux au niveau des pores.



Des passages d'organites cellulaires ou de noyaux peuvent s'y effectuer fréquemment. Les champignons à thalle septé, ou "**septomycètes**" ou quelquefois "champignons supérieurs"; cette dernière qualification, qui ne doit pas être prise dans un sens évolutif, tient au fait que ces champignons, ascomycètes et Basidiomycètes, forment des fructifications d'assez grande taille en général et le plus souvent visibles à l'œil nu. Au contraire, les champignons à thalle dépourvu de cloisons, ou "**Siphomycètes**", sont souvent qualifiés de "champignons Inférieurs"; leurs fructifications d'ordinaire, ne peuvent être observées qu'au microscope. Les **Siphomycètes** qui présentent donc une structure siphonnée ont un appareil végétatif formé d'une série de tuyaux ou siphons, plurinucléés, chez lesquels le mycélium devient rapidement pariétal, la partie centrale du filament étant occupée par une large vacuole.

Souvent particulièrement chez les siphomycètes, seule la partie la plus jeune du thalle reste vivante. Les parties les plus âgées, parfois séparées des autres par des cloisons dont le pore est obstrué, dégèrent en partie ou en totalité. Chez certaines espèces placées dans des conditions difficiles, le cytoplasme disparaît complètement, sauf chez quelques cellules qui sont isolées par des cloisons vraies, puis qui épaississent leur paroi et deviennent des **chlamydospores**.

Selon les espèces, le mycélium peut être complètement inclus dans le substrat ou bien comporter une partie aérienne plus ou moins développée.

Qu'il soit formé d'hyphes ou de cloisons, le thalle s'étend par des ramifications indéfinies formant généralement une **trame arachnéenne**. Le mycélium est susceptible de présenter diverses formes d'agréments plus ou moins compactes, appelées **stromes**. Il peut arriver que des filaments mycéliens s'agrèment en cordonnets formés d'un fuseau d'hyphes disposées parallèlement synnemas. Ces cordonnets sont quelquefois différenciés en **rhizomorphes** dont les hyphes externes ont des parois sombres. Les cordons rhizomorphiques peuvent s'allonger considérablement et atteindre quelquefois plusieurs mètres de long armillaire, mэрule.

Parfois, les filaments mycéliens aériens agrégés acquièrent un géotropisme négatif et constituent des faisceaux d'hyphes dressées ou **corémies**.

II. cytologie de thalle Organisation cellulaire des champignons)

1. La paroi :

La paroi des champignons est généralement stratifié est formée d'au moins deux couches ; une couche externe mince et réfringente "**vagina**", constitue le long du filament et une couche interne épaisse, hyaline "**lucula**", qui seule participe à la différenciation éventuelle de cloison transversales, uniquement par sa partie interne.

La constitution chimique de la paroi varie notablement dans le groupe des champignons et en tend de ce fait à lui accorder une importante valeur taxonomique. La paroi renferme 80 à 90 % de polysaccharides associés à des protéines enzymatiques ou non, des lipides, des dérivées d'acides nucléiques, des polyuronides.

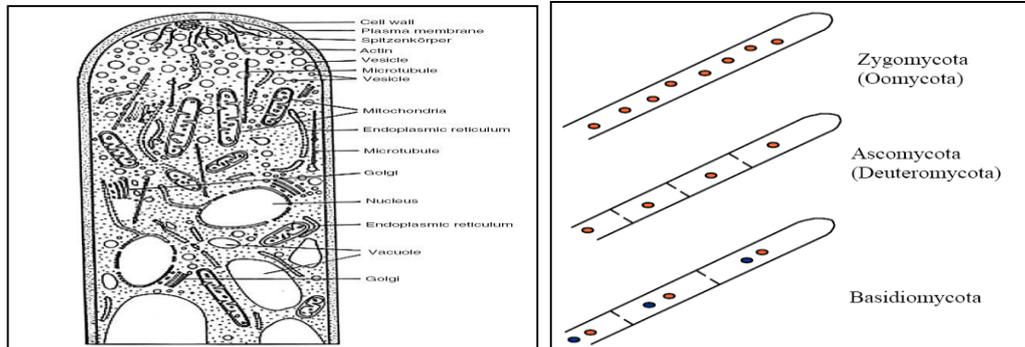
Parmi les constituant glucidiques, la chitine, constituée par de chaînes de résidus de β -14 acétylglucosamine, est sans doute le plus important.

2. Le cytoplasme :

Les cellules de champignons possèdent généralement les caractéristiques générales des eucaryotes. Dans le cytoplasme on observe des mitochondries, souvent assez petites, dont les crêtes sont en général moins nombreuses et moins développées que chez les cormophytes ou les animaux.

Le réticulum endoplasmique est abondant chez les champignons, surtout dans les parties jeunes de thalle. Il forme un système réticulé, lâche et irrégulier, constitué par des membranes trilaminaires de structure classique. Ce réseau est en continuité avec la paroi nucléaire, mais non avec le plasmalemma. La forme "rough" avec des ribosomes accolés aux membranes paraît assez rare, le réticulum endoplasmique étant généralement lisse.

L'appareil de Golgi n'a été bien observé que chez certains Phycomycètes, semble difficile à caractériser chez les Eumycètes où l'on rencontre cependant fréquemment des empilements de saccules réticulaires dont la signification reste ambiguë.



3. Le plasmalemme :

Le plasmalemme a une structure trilaminaire qui diffère un peu de celle de RE car les deux lamelles bordantes ne présentent pas la même coloration.

Des vacuoles colorables au rouge neutre ou bleu de crésyl sont aisément mises en évidence chez les champignons. Leur taille est généralement plus faible que celle des vacuoles des cellules de plantes supérieures. Ces vacuoles sont délimitées par une membrane trilaminaire classique "tonoplaste".

Le cytoplasme des champignons contient aussi des multiples types de vésicules subglobuleuses de très faible diamètre perceptible seulement au microscope électronique certaines renferment des enzymes "peroxisomes", d'autres contiennent probablement des précurseurs de la paroi.

Le cytoplasme des champignons contient aussi des ribosomes. Ils sont rarement associés aux membranes du RE. Ils peuvent devenir très abondants, dans les spores en particulier. , où ils masquent les autres organites cellulaire.

4. Le noyau :

Les différentes classes des champignons montrent une variabilité au niveau de mode de distribution de nucléoles dans les hyphes : quelques champignons sont équipés par des nucléoles haploïdes ; bien qu'il existe quelque exception diploïde.

Les zygomycètes sont caractérisés par l'absence d'une véritable **septa** par conséquent les noyaux sont éparpillé dans le mycélium.

En outre, la distance entre les noyaux est bien régulière et ces dernières peuvent migrés.

Dans les Ascomycota il y a normalement seulement un noyau haploïde dans chaque compartiment. Dans les Basidiomycota le mycélium végétatif contient 2 noyaux dans chaque compartiment. Il est donc dicaryotique, l'un et l'autre homocaryotique, avec deux noyaux identiques ou hétérocaryotique avec deux noyaux différents dans chaque compartiment.

Chaque compartiment mycélien peut renfermer un ou plusieurs noyaux ; quand les noyaux sont identiques, le thalle est **homocaryotique**. Une mutation affecte un ou plusieurs noyaux, ou l'apport d'un ou plusieurs noyaux étrangers par anastomose de filaments mycéliens, peut transformer un élément homocaryotique en un élément **heterocaryotique**.

5. Les cloisons :

Les cloisons du mycélium se forment toujours de façon centripète. Leur initiation commence au niveau de la partie interne de la couche profonde de la paroi. La cloison transversale est généralement percée d'un pore unique de faible taille "0,05 à 0,5 µm de diamètre"; il est exceptionnel qu'il y en ait plusieurs. Ce pore est simple chez les ascomycètes et les phragmobasidiomycètes "roilles et Ustilaginales". Chez les ascomycètes, un ou plusieurs corps globuleux protéiques peuvent se trouver d'un part et d'autre du pore et parfois, semble-t-il venir d'obstruer. Leur rôle n'est pas connu. Le pore est complexe chez les Eubasidiomycètes où il constitue un dolipore. Dans ce cas le septum se renfle autour du pore.

III. Croissance du thalle :

1. modalité de la croissance :

La croissance des filaments isolés ou associés des rhizomorphes ou de corémies s'effectue essentiellement au niveau de leur apex sur une longueur d'environ 50 à 100 µm. Mais il ne faut pas négliger le rôle de la partie sous-jacente du mycélium qui assure une partie de l'absorption et de synthèse. Les translocations vers le foyer de croissance de l'apex sont donc très importantes.

La croissance apicale des filaments est très polarisée puisque le filament s'allonge de façon linéaire. La paroi joue probablement un rôle fondamental dans ce mode de croissance en s'organisant en un tube dans lequel le cytoplasme se trouve en quelque sorte maintenu.

La courbe de croissance pondérale d'une colonie mycélienne, en fonction du temps, comporte une phase d'adaptation soit en palier, soit faiblement ascendante "lagphase", puis une phase de croissance dont la courbe est exponentielle mais qui est moins active que la phase de croissance d'une colonie bactérienne, et enfin une phase de déclin faiblement décroissante qui correspond à une perte de poids par faible autolyse.

2. condition de croissance :

Les conditions du milieu influent sur la croissance de mycélium. Celle-ci peut en général s'effectuer entre 0°C et 35°C, la température optimale étant souvent un peu supérieure à 20°C; on connaît souvent de nombreuses espèces, soit thermophiles, soit psychrophiles, dont l'optimum est plus élevé ou plus faible.

La lumière n'est pas indispensable à la croissance végétative mycélienne. Cette dernière peut obéir à un rythme circadien parfois lié à la lumière mais qui peut aussi dépendre de la température. Chez les champignons, la croissance s'effectue préférentiellement dans des milieux un peu acides "Ph proche de 6". Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des champignons. Par ordre d'importance pondérale décroissante, la liste de ceux-ci en général la suivante : C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe, Zn. Mais ces éléments ne doivent pas être fournis dans n'importe quelles conditions.

CHAPITRE II : LA REPRODUCTION DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES**Introduction :**

La reproduction des champignons est dite conforme lorsque les descendants a un patrimoine génétique exactement identique au parent, ou non conforme lorsqu'il y a recombinaison génétique.

La reproduction conforme, généralement appelée reproduction végétative ou asexuée, ne met en jeu en principe que des mitoses normales, c'est-à-dire des divisions conservatives dans un thalle monocaryote, quel que soit le mode de multiplication du thalle.

La reproduction non conforme est réalisée d'une façon générale par une recombinaison génétique à la suite d'une méiose faisant suite elle-même plus au moins rapidement à une caryogamie, c'est alors la reproduction sexuée. Mais elle peut se produire à la suite de deux autres phénomènes : l'hétérocaryose ou la parasexualité.

1. La reproduction végétative :

Elle est très importante chez les champignons où elle assure le plus souvent une multiplication propre à assurer la propagation de l'espèce. Elle s'effectue par une fragmentation de thalle ou par sporulation.

La fragmentation de thalle peut se réaliser de plusieurs façons. Ainsi, lors du vieillissement des thalles, les ramifications finissent par être séparées, les unes des autres à la suite de dégénérescence de la partie basilaire de l'hyphe dont elles dérivent. Ce processus de simple bouturage, est utilisé pour repiquer les cultures artificielles de champignons. Dans d'autres cas, le thalle se fragmente en cellules autonomes ou arthrospores.

Il est rare que l'ensemble de thalle se transforme en spore lors de la multiplication végétative (thalle holocarpique de certains *Chytridiales*). Le plus souvent c'est seulement le contenu d'un territoire du thalle (ou d'une cellule) isolé de reste de celui-ci par une cloison, qui engendre des spores en constituant un sporocyste ; le thalle est alors eucarpique.

On peut distinguer plusieurs types de sporocystes d'après les modalités de libération des spores. Deux seulement, les plus fréquents, seront mentionnés ici.

Chez le premier type, les spores (ou l'unique spore) nées de la transformation du contenu cytoplasmique de celui-ci mûrissent dans la sporocyste et sont libérées à maturité soit par rupture de la paroi du sporocyste, soit par gélification, ou encore par la formation d'un pore plus ou moins large s'ouvrent parfois par un opercule. Les spores sont donc d'origine interne (spores endogènes).

Le second type de sporocyste, ou conidiocyste, après rupture, à son sommet, de la partie externe de sa paroi, émet à l'extérieur un diverticule de la partie interne de la paroi de la cellule mère. Ce diverticule s'isole, reconstitue une paroi analogue à celle du conidiocyte et devient une spore appelée conidie dont la maturation s'est effectuée, au moins en partie, à l'extérieur du sporocyste et qui est donc une spore exogène. Le conidiocyste (ou cellule conidiogène), appelé « phialide » peut émettre successivement plusieurs conidies, souvent, la partie externe de la paroi rompue de la cellule conidiogène persiste à la base de la conidie sous forme d'une collerette plus ou moins développée selon les cas, et qui, lorsqu'elle est importante, prend l'aspect d'un goulot.

La cellule conidiogènes peuvent être dispersées sur le mycélium ou bien groupées. Elles sont alors généralement portées à l'extrémité de filament, ou conidiophore, contenus dans une fructification. Les fructifications conidiennes de type divers seront envisagées à propos de l'étude des ascomycètes et des imperfecti, groupe où elles sont le mieux représentés.

Certains champignons ont des spores de multiplication végétative nues, mobiles et nageuses ou moyen d'un ou de deux flagelles (zoïdes ou planospores). Chez d'autres groupes, les spores dépourvues de flagelles ne sont pas mobiles (aplanospores) et possèdent une paroi propre.

En fait, la différence entre les deux types des spores n'est peut-être pas aussi importante qu'il y paraît tout d'abord. En effet, les zoïdes peuvent s'enkyster en se transformant en une spore pourvue d'une paroi et, inversement des aplanospores peuvent germer en produisant des zoïdes.

Les spores flagellées sont de plusieurs types chez les champignons. Certaines d'entre elle ne possèdent qu'un unique flagelle en forme de fouet inséré à la partie postérieure de la cellule. Chez d'autres, ce flagelle unique a une insertion antérieure et possède des mastigonèmes. Enfin, des champignons ont des zoïdes pourvus de deux flagelles insérés latéralement dans une sorte de gouttière de la cellule, l'un étant en forme de fouet et dirigé vers l'avant, l'autre garni de mastigonèmes étant dirigé vers l'arrière.

Les flagelles des zoïdes des champignons ont la même structure que ceux des algues ou des animaux et possèdent onze doublets des fibrilles dont neuf sont périphériques et deux sont axiaux.

Les conidies d'aspect très divers, peuvent être uni ou pluricellulaires, posséder des parois sombres, colorés ou hyalines. Elles sont généralement produites en grandes quantités. Si leurs paroi est sèche, elles forment alors des masses pulvérulentes dispersés par le vent. Si leur paroi comporte une couche externe mucilagineuse, elles constituent des cordons muqueux ou cirrhes dispersé par les insectes et d'autres petits animaux.

2. La reproduction sexuée :

Le cycle de la reproduction sexuée des champignons comporte une plasmogamie accompagnée d'une caryogamie et suivie d'une méiose. Les cellules dont les cytoplasmes et les noyaux pourront se fusionner sont des gamètes, ou des cellules sexuelles, normalement engendrées par des organes spécialisés à cet effet : les organes sexuels.

Chez les champignons, les organes sexuelles, très petits, ne sont pas toujours bien différenciés, et peuvent même être absents, des cellules apparemment banales des thalles pouvant parfois en tenir lieu.

Les deux types d'organes sexuels sont rarement portés par des thalles différents (espèces dioïques à thalle unisexués). Le plus souvent ils sont rassemblés sur le même thalle (espèce monoïque à thalle hermaphrodites).

Il n'y a pas nécessairement compatibilité entre les deux sexes porté par un même thalle ou entre n'importe quel thalle mâle et n'importe quel thalle femelle (homo ou hétérothallisme).

a. Les organes sexuels et la gamie

Les organes sexuels des champignons se forment en générale sur des thalles haploïdes. Mais dans certains cas (perenosporales, sapolégnales) ils peuvent apparaître sur des thalles diploïdes, la méiose prélude la formation des gamètes.

Les gamètes mâles et femelles peuvent s'échapper du gamétocyste générateur (cas des phycomycètes) et connaître une phase libre. Ce sont des zoïdes nageurs qui peuvent être analogue dans les deux sexes (isogamie de certains chytridiales, et de certains cas des myxomycètes) ou bien légèrement différents (**anisogamie** des blastocladales). Le rapprochement sexuel ou gamie se fait alors par copulation de deux zoïdes : il y a **zoïdogamie**. Parfois les gamètes libres sont amiboïdes ou bien l'un des gamètes est de ce type, l'autre étant un zoïde.

Le gamète mâle peut être le seul gamète libre, le ou les gamètes femelles restant inclus dans les gamétocystes femelle sous forme d'une cellule immobile non flagellée qui sera fécondée sur place. Les gamètes mâles peuvent être des zoïdes (monoblépharidales) ou des cellules non flagellées. Ce dernier cas est réalisé chez certains Ascomycètes chez lesquels la fécondation est assurée par des microconidies (spermaties). Des spermaties sont également connues chez les urédinales (Basidiomycètes).

Il est fréquent que la régression de la sexualité soit encore plus importante et que ni le gamète mâle ni le gamète femelle ne soient libérés de leurs cystes générateurs ; ce sont alors les gamétocystes eux-mêmes qui se fusionnent (cystogamie). Les gamètes mâles perdent alors toute individualité. Mais les gamètes femelle peuvent encore être différenciés sous formes des cellules

globuleuses à l'intérieure du gamétocyste femelle ou oogone. Chez les Péronosporales il n'y a qu'un seul gamète femelle dans chaque oogone. Il y a oogamie. Parfois des tubes copulateurs s'organisent pour le transit des noyaux mâles vers le gamète femelle (siphonogamie des Saprologniales).

Chez les Mucorales, ni les gamètes femelles ni les gamètes mâles ne sont individualisés. Deux gamétocystes plurinucléés de mêmes tailles un peu différentes copulent et fusionnent leurs noyaux. Chez certains Ascomycètes où il y a fusion d'une anthéridie et d'un ascogone, les noyaux mâles transitent alors par le trichogyne (trichogamie).

Enfin, les organes sexuels peuvent avoir complètement disparus chez les champignons supérieurs et l'échange de noyaux peut se faire entre deux filaments mycéliens d'apparence banale (somatogamie). Parfois tout échange de noyaux a disparu et il n'ya plus de reproduction sexuée. C'est le cas d'une partie des champignons imparfaits au sens strict de terme.

b. Le zygote :

Le zygote se forme à la suite de la gamie, quelles que soient les modalités de celle-ci. Il est généralement constitué par le gamète femelle à la suite de la gamie. Mais dans le cas des Mucorales et de quelques rares Ascomycètes le zygote est formé par la fusion des deux ampoules copulatrices et non pas par l'une d'entre elles modifiée par le transfert du contenu de l'autre ; le zygote est alors appelé zygosporé.

La formation de zygote résulte donc au moins d'une plasmogamie (fusion de cytoplasmes mâle et femelle) mais n'implique pas nécessairement une caryogamie immédiate. Par la suite la constitution nucléaire des jeunes zygotes n'est pas identique chez tous les champignons. Si la caryogamie se réalise d'emblée, le zygote contient un ou plusieurs noyaux diploïdes selon qu'il a eu copulation de gamètes ou de gamétocystes. Si la caryogamie est différée, le jeune zygote ne renferme alors qu'un ou plusieurs couples de noyaux appariés, haploïdes.

c. de zygote à la méiose

Les caractéristique de la partie du cycle de développement des champignons qui sépare la formation du zygote de la méiose dépendent pour une part de la biologie du zygote et aussi de la durée de l'intervalle qui sépare la plasmogamie de la caryogamie et celle-ci de la méiose.

Du point de vue biologique, les zygotes des champignons sont de deux types. Les uns sont des spores durables qui connaissent ordinairement un temps de repos avant la germination ; ce sont alors des spores assez volumineuses, à cytoplasme dense riche en globule lipidiques, remarquables par l'épaisseur et la différenciation de leur paroi souvent pluristratifiée et ornements de façon complexe (zygote de Mucorales, Péronosporales).

Les zygotes d'autres champignons ne constituent pas des spores durables, mais germent immédiatement ou presque (zygote des Blastocladales et des Myxomycètes) ou reprennent leur croissance.

La caryogamie peut se produire avant ou après la germination du zygote. Les cycles de développement correspondant sont alors différents.

Lorsque la caryogamie est antérieure à la germination de zygote, elle se réalise soit en même temps que la plasmogamie (ce qui est rare) soit peu après celle-ci. Dans un cas comme dans l'autre, le zygote qui renferme un ou plusieurs noyaux diploïdes germe en produisant soit un filament, soit une vésicule génératrice d'un sporocyste d'aspect analogue aux sporocystes de multiplication végétative et que l'on appelle souvent « sporocyste de germination ». Celui-ci émet des zoïdes ou des spores qui germent en un nouveau thalle végétatif.

Parfois la méiose suit de très près la caryogamie et se produit avant que soit achevée la germination du zygote. Le thalle issu de celle-ci est alors haploïde.

Si la méiose est postérieure à la germination du zygote, ce thalle est diploïde. C'est ce qui a lieu chez les Blastocladales, les Péronosporales et les saprolégniales. Cependant, dans le premier de ces trois ordres, le thalle diploïde ne subit pas de sexualisation et les cystes qu'il produit et où s'effectue la méiose sont tous identiques : ils engendrent des zoïdes non sexués dont chacun donne naissance à un thalle haploïde. Par contre, chez Péronosporales et saprolégniales, les thalles diploïdes produisent les uns des gamétocystes mâles et les autres des gamétocystes femelle. Dans chacun des types de gamétocystes les gamètes sont engendrés par méiose.

Chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes, le zygote germe avant que la caryogamie ait lieu : il peut tout d'abord produire des filaments contenant des noyaux haploïdes d'origine mixtes, les uns mâles, les autres femelle (thalle micto-haploïdes). Puis les noyaux de ces filaments s'apparient en noyaux conjugués, non fusionnés, qui se divisent de façon synchrone.

Ensuite ces filaments se cloisonnent en cellules binucléées et deviennent des filaments à dicaryons, plus développés d'ailleurs chez les Basidiomycètes que chez les Ascomycètes et caractérisés la présence d'anses latérales. C'est dans ce thalle que se produit plus tard la caryogamie. Les cellules dans lesquelles celle-ci s'effectue sont des cystes particuliers (basides ou asques) qui subissent immédiatement la méiose et libèrent des spores méiotiques (basidiospores ou ascospores).

d. Des spores méiotique aux organes sexuels et aux gamètes :

Lorsque la méiose intervient sur des thalles déjà sexualisés (Péronosporales et Saprolegniales) les spores méiotiques sont des gamètes destinés à coupler et le cycle de

développement est alors monogénétique diplophasique : il n'a qu'un seul type de thalle (sexualisé ou non) et celui-ci a des noyaux diploïdes.

Quand la méiose se produit sur des thalles non sexués (Ascomycètes, Basidiomycètes, Mucurales et Saprolegniales) les spores méiotiques ne sont pas des gamètes, elles ne couplent pas mais engendrent des thalles haploïdes dont la sexualisation n'apparaîtra que plus tard et qui produisent des gamétocystes (ou leurs équivalents).

Il résulte de développement précédent, que le cycle des Mucurales est monogénétique haplophasique. Par contre, celui des Blastocladales est digénétique haplodiplophasique. Celui des ascomycètes et des Basidiomycètes est également digénétique mais d'un type particulier puisqu'il est haplodicyphasique.

Chez certains Basidiomycètes, la cellule où va s'effectuer la méiose devient une spore durable ou spore de résistance, à paroi épaisse ou ornementée (Uredinales, Ustilaginales) dont l'aspect rappelle celui des zygotes des champignons à thalle non cloisonné, mais dont la signification est différente. Ces spores en effet ne résultent pas immédiatement de la gamie, dont elles sont séparées par l'ensemble de la phase à dicaryons.

Chapitre III : Classification des champignons phytopathogènes

1. Introduction

La systématique est la branche de la biologie qui traite de la classification et du nom scientifique des organismes. Le principe central de cette discipline est de regrouper les espèces qui partagent certaines similitudes anatomiques ou développementales, et qui proviennent d'une même lignée évolutive.

La classification est en continuel changement. Au gré des nouvelles recherches et découvertes, le regroupement des organismes est modifié. Selon les interprétations, les sociétés, la résistance naturelle au changement qui retarde l'adoption de certains regroupement par les scientifiques, ... on trouve à ce jour des classifications de tout type, depuis la classification traditionnelle à peine remaniée, jusqu'aux classifications strictement phylogénétiques en passant par différents mélanges, par exemple gardant les catégories, mais s'alignant sur les découvertes plus récentes en matière de phylogénie.

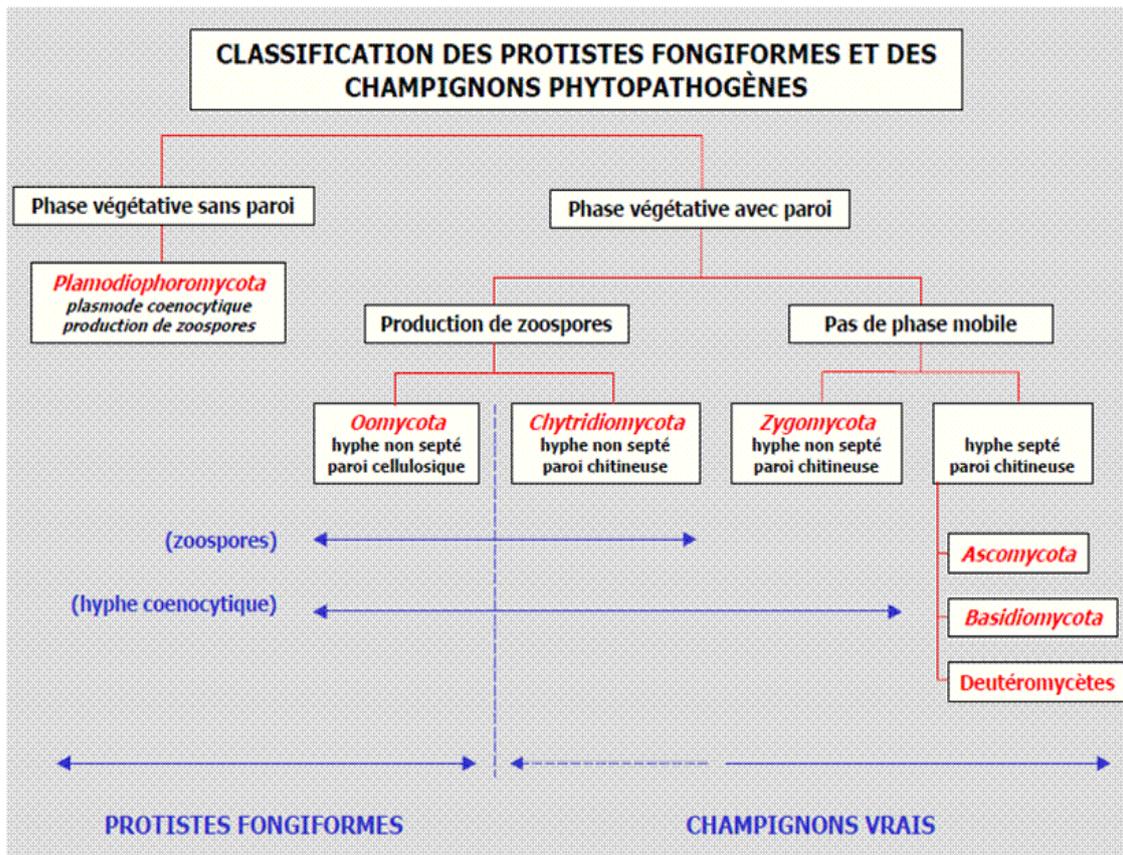
Les classifications de type phénétique (fondées sur la similitude des organismes pour un maximum des critères) et de type cladistique ou phylogénique peuvent aboutir à des regroupements différents. Le phénomène de convergence morphologique entre champignons morphologiquement très éloignés est fréquent. Lorsque l'habitat est aquatique, les faciès sont analogues à ceux des algues filamenteuses (présence de zoospore), tandis qu'en milieu terrestre, on observe la production des spores anémophiles. La définition d'un taxon sur base de production de zoospores (un critère de similarité) aboutirait à réunir *Plasmodiophoromycota*, *Oomycota* et *chytridiomycota* alors que ces phylums, issus d'ancêtres distinctes, ce différencient les unes des autres sur le plan de phylogénèse.

L'augmentation de nombre des critères pris en compte dans une classification aboutit au traitement d'un très grand nombre caractères nécessitant le maniement mathématique des données (Taxonomie numérique). Cette approche aboutit à la préparation d'une matrice de similarité et a la construction d'un dendrogramme de similarité. Cette matrice de similarité permet également de générer un arbre phylogénique construit selon un principe de parcimonie, disposant les espèces de manière à pouvoir les relier par un minimum de modification.

La systématique des champignons est basée principalement sur des critères morphologiques. En pratique, la procédure la plus utilisée est la croissance d'isolats sur un milieu de culture approprié, ce qui permet de reconnaître les traits caractéristiques de ces isolats qui sont génétiquement stables et en général peu influencés par les changements environnementaux. Cependant, dans certains cas, ces critères sont délicats à utiliser et requièrent une expérience particulièrement approfondie.

À titre d'exemple, l'identification des espèces appartenant au genre *Alternaria*, basée uniquement sur des caractéristiques morphologiques, est très difficile car ces moisissures sont très sensibles aux conditions de culture (Anderson, Thrane, 1996). Anderson et Thrane (1996) ont utilisé

à la fois la morphologie, le profil en métabolites et les caractéristiques de culture (diamètre et couleur des colonies sur 9 milieux après 6 jours d'incubation) pour classer 36 isolats appartenant aux espèces d'*Alternaria infectoria* et *Alternaria alternata*. L'analyse par groupements des résultats obtenus a permis de délimiter deux groupes: le groupe *A. infectoria* dont les isolats produisaient uniquement des composés non identifiés et le groupe *A. alternata* où les isolats produisaient de l'alternariol et de l'éther monométhylé d'alternariol, eux-mêmes subdivisés en trois sous-groupes. De plus, la couleur des colonies sur quatre milieux de culture différents a également permis de différencier les groupes *A. infectoria* et *A. alternata*.



2. Les méthodes d'identification et de classification des champignons

2. 1. Classification basée sur les critères morphologique :

Les caractéristiques morphologiques des champignons (plasmode, mycélium cloisonné ou non, cellules nues flagellées) ainsi que les modalités de la reproduction sexuée ont été longtemps privilégiées pour établir leur classification, aboutissant à une taxonomie essentiellement de type phénétique. Les formes de reproduction sexuée de certains champignons étant inconnues, on a groupé ces espèces au sein des Deutéromycètes.

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des

paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...)

L'identification des champignons jusqu'à niveau de l'espèce se fonde le plus souvent sur les caractéristiques des fructifications et des spores. Cependant, pour l'agronome ou le phytopathologue, l'identification de l'espèce d'un agent pathogène est souvent insuffisante, car c'est la forme spécialisée du champignon qui montre une spécialité parasitaire vis-à-vis d'une espèce hôte particulière.

2. 1. 1. Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies : Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pynides) est aussi un élément important de diagnose (Botton *et al.*, 1990).

2. 1. 2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

a. Le thalle :

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

- **Le thalle siphonné**, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné est caractéristique des *Zygomycètes* ;

- **Le thalle septé** ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 µm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* (Badillet *et al.*, 1987).

b. Les spores

Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

- **Les spores endogènes** (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les *Mucorales*, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.

- **Les spores exogènes** (conidies), retrouvées chez les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes*, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 1996).

Aspect des spores

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores

- 1) *les amérospores* : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*)
- 2) *les didymospores* : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
- 3) *les phragmospores* : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;
- 4) *les dictyospores* : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
- 5) *les scolécospores* : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

c. Modes de formation des conidies

Le mode thalique :

La formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales :

- le type thalique solitaire, ex: *Chrysosporium*
- le type thalique arthrique, ex: *Geotrichum*

Le mode blastique :

Les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes :

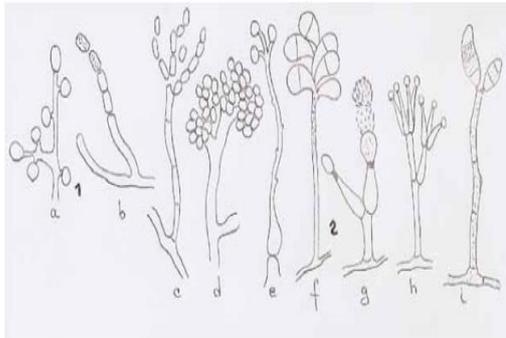


Figure 1. Modes de formation des conidies

1. Formation thalique : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthrique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : régressif (*Trichothecium*), g : annellidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).

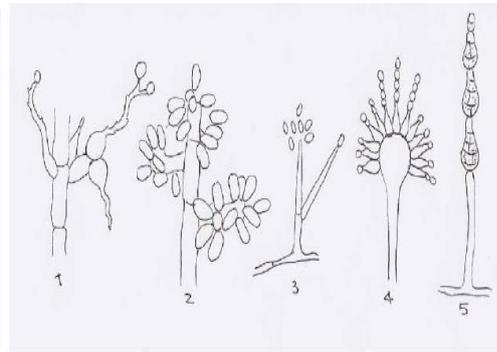


Figure 2. Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux

1. grappes (*Beauveria*), 2. masses (*Botrytis*), 3. têtes (*Acremonium*),
4. chaînes basipètes (*Aspergillus*), 5. chaînes acropètes (*Alternaria*).

- le type blastique acropète, ex: *Cladosporium*, *Alternaria* - le type blastique synchrone, ex: *Botrytis*
- le type blastique sympodial, ex: *Beauveria*- le type blastique régressif, ex: *Trichothecium*
- le type blastique percurrent (annellidique), ex : *Scopulariopsis* - le type blastique phialidique, ex: *Aspergillus*, *Penicillium* - le type blastique porique, ex: *Alternaria*, *Curvularia* (Figure 1) (Botton *et al.*, 1990).

d. Mode de groupement des conidies

Les conidies sont, en général, regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. L'organisation de ce regroupement est aussi un facteur d'identification. Les principaux types sont :

- grappes, ex. *Beauveria*, *Trichothecium* - masse, ex. *Botrytis* - têtes ou balles, ex. *Acremonium*, *Trichoderma*
- chaînes basipètes, ex. *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium* - chaînes acropètes, ex. *Cladosporium*, *Alternaria* (Figure 2) (Botton *et al.*, 1990).

Mode d'implantation des cellules conidiogènes

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces (de Hoog et Guarro, 1995).

Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (ex : *Aureobasidium*).

Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être :

- directement insérées sur les filaments végétatifs (ex : *Acremonium*, *Fusarium*) ;
- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :
- a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex : *Aspergillus*) ;
- b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex : *Penicillium*) ;

- c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex : *Verticillium*) ;
- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés ;
 - conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corèmie (ex : *Graphium*) ;
 - conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex : *Myrothecium*).

Présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée

Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules :

- **Les pycnides** sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée des conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (*Phoma*).
- **Les acervules** sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. A l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies. Sur les milieux de culture seules les pycnides sont visibles, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal (de Hoog et Guarro, 1995).

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types:

- a) les apothécies** : l'ascocarpe est ouvert, en forme de coupe, portant les asques en surface ;
- b) les cléistothèques** : l'ascocarpe est arrondi et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques ; il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (ex : *Emericella*) ;
- c) les périthèces** : l'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitiqué) ou à deux membranes (bitiqué) et contenant chacun 8 ascospores (*Chaetomium*) ;

Présence des chlamydospores

Les chlamydospores sont des éléments de résistance qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydospores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*).

2.3. Méthodes moléculaires

Cette partie donne un aperçu des méthodes moléculaires utilisées en taxonomie fongique. Cependant, il est impossible de discuter de la taxonomie fongique sans citer les techniques

moléculaires car celles-ci ont connu un progrès important et ont suscité un intérêt énorme grâce à l'émergence de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Lorsque les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour identifier un champignon, on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Cependant, pour des champignons filamenteux peu différenciés tels que *Penicillium*, *Aspergillus* ou *Alternaria*, ces méthodes sont laborieuses, longues et quelquefois incomplètes (Andersen, Thrane, 1996; Frisvad *et al.*, 1998 ; Guarro *et al.*, 1999).

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Les méthodes moléculaires sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total, dépendant du but poursuivi.

Les méthodes utilisées dans l'étude de l'ADN total sont la détermination du contenu en bases guanine et cytosine de l'ADN nucléaire ou l'étude du taux d'hybridation de l'hétéroduplex ADN-ADN dont un brin appartient à l'organisme indéterminé et l'autre à un organisme de référence. Cet hétéroduplex est comparé à l'homoduplex des souches hybridées avec elles-mêmes.

Les méthodes basées sur l'étude d'un gène ou de plusieurs gènes utilisent la technique PCR (Mullis *et al.*, 1986). Cette technique permet l'amplification de séquences spécifiques d'ADN *via* sa synthèse *in vitro* et l'obtention rapide et simple de microgrammes de l'ADN ciblé.

La PCR-RFLP (polymorphisme de taille des fragments de restriction) (digestion de l'ADN par des enzymes de restriction) et le séquençage précédé d'une PCR sont basés sur l'étude d'un gène ou d'un fragment d'ADN (Frisvad *et al.*, 1998; Kano *et al.*, 2000).

Plusieurs auteurs ont utilisé un fragment de l'ADN ribosomal (Frisvad *et al.*, 1998) tel que les unités 5.8S (très conservées), 18S et 25S (très conservées mais plus utiles que 5.8S), les espaceurs (interne ou externe qui sont des régions non codantes et variables) (Lübeck *et al.*, 2000; Makimura *et al.*, 2001) ou encore l'"intergenic spacer" (IGS) qui sépare deux copies de l'ADN ribosomal. L'inconvénient de la PCR-RFLP est qu'elle fournit une information phylogénétique moindre que lors d'un séquençage. Cependant, elle peut être très utile lors d'un criblage d'isolats suspectés appartenir à la même souche ou espèce. En effet, bien que le séquençage soit une technique très précise générant beaucoup d'informations, celle-ci demande un temps de mise en œuvre élevé ainsi qu'un coût important.

À côté de l'étude d'un gène, les techniques de "fingerprints" (empreintes moléculaires) ciblent l'ensemble du génome. Ces techniques contiennent, entre autres, le polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard (RAPD), les microsatellites et les minisatellites. Le RAPD (Arisan-Atac, Kubicek, 1995; Frisvad *et al.*, 1998) utilise la technique PCR pour amplifier des segments d'ADN génomique

avec des amorces d'oligonucléotides non spécifiques. Cette technique présente le désavantage d'être peu reproductible et nécessite la standardisation de la méthode d'amplification ainsi que de la visualisation des fragments obtenus. Cependant, elle peut être utile lors de l'analyse rapide d'un nombre élevé d'isolats dont on suspecte qu'ils font partie du même taxon et dont aucune information sur la séquence d'un marqueur n'est connue. Les microsatellites (séquences répétitives de 2 à 5 paires de bases réparties de manière aléatoire dans le génome) et les minisatellites (séquences répétitives d'environ 20 paires de bases) peuvent être amplifiés (Frisvad *et al.*, 1998). Ces techniques utilisant les micro- et minisatellites sont reproductibles et nécessitent peu d'ADN mais sont longues et coûteuses.

2.4. Immunotaxonomie et électrophorèse des protéines

Les champignons produisent un grand nombre d'antigènes qui se sont révélés être propres au genre et/ou à l'espèce. En effet, des études ont montré que non seulement la présence de polysaccharides (exoantigènes) permet de classer les espèces, mais aussi que la composition en carbohydrates définit le taxon auquel appartient l'espèce étudiée. De plus, la production de ces molécules ne dépend ni du milieu de culture, ni de la température, ni de l'âge de la culture (Frisvad *et al.*, 1998).

À côté des méthodes immunologiques, l'électrophorèse des protéines et des isozymes (enzymes différents mais qui catalysent la même réaction) est une technique largement utilisée en taxonomie. L'électrophorèse des isozymes permet de détecter et d'identifier un champignon particulier mais son utilisation est encore controversée bien que des études (Micales, 1986) aient utilisé la différence des profils en isozymes pour résoudre des problèmes situés au niveau de l'espèce. De plus, elle fournit plus d'informations d'un point de vue évolutif et est plus rapide que les méthodes basées sur la technique PCR.