

Université Libre de Bruxelles – Université Catholique de Louvain La Neuve
Sciences biologiques (ULB) – Agronomie (UCL)

Laboratoire de mycologie

Révision de la systématique de *Perenniporia fraxinea*
(Basidiomycota, Polyporales)

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de licencié en biologie
(orientation biologie végétale) par

Valentine Potten

~

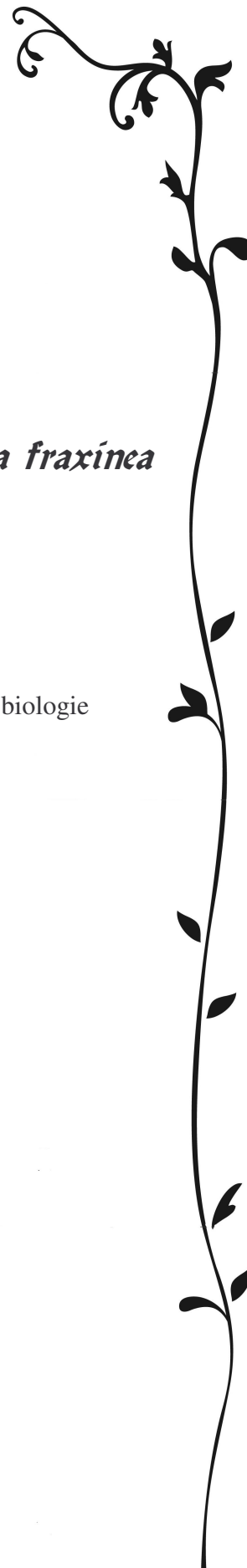
Promoteur : Professeur **Jean Lejoly** (ULB)

Co-promoteur : Docteur **Cony Decock** (UCL)

Lecteurs : Professeur **Anne-Marie Corbisier** (UCL)

& Professeur **Pierre Meerts** (ULB)

~ Juin 2007 ~



Remerciements

Cony,

j'aurais tellement de raisons de vous témoigner ma gratitude. Bien sûr, tout d'abord, il y a tout ce que vous m'avez appris en ce qui concerne la mycologie. Ensuite, durant toute cette année, vous avez veillé sur moi avec une infinie gentillesse, pas seulement lorsque nous étions perdus au milieu de nulle part à l'autre bout du monde, mais aussi jour après jour, au labo. Vous avez toujours repéré les moments de panique ou de déprime et aviez chaque fois un mot d'encouragement (...ou un morceau de chocolat) pour y remédier. Tout au long de mes études, je suis restée brouillée avec l'univers de la recherche. Je pense que vous avez finalement réussi à nous réconcilier.

Anne-Marie,

je vous suis très reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire avec tant d'amitié et d'enthousiasme. Je voudrais également vous remercier pour les nombreuses heures que vous avez consacrées à me donner les cours auxquels je n'avais pas pu assister.

Seb,

merci, mon amour, d'avoir toujours cru en moi et d'avoir tout fait pour que je fasse de même.

Philippe, Stéphanie, Marie, Olivier, Samuel, Pierre,

je vous remercie pour les conseils que vous m'avez prodigués. Sans vous, ça aurait certainement beaucoup moins bien fonctionné (et le travail aurait semblé beaucoup moins rigolo !).

Mario, Anne-Catherine,

ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

Maman, Papic, Ant,

merci d'avoir inlassablement supporté l'humeur massacrant de certains soirs.

Nat,

ta présence au cours de ces 4 longues et difficiles années a été un rayon de soleil. Merci mille fois pour cet optimisme qui te caractérise. Sans toi je n'y serais jamais arrivée. Et n'oublie pas : « Canopée, ohéh ohéh ! ».

Matthew,

thank you for singing when everything's wrong.

Résumé

Le mémoire que voici est le compte-rendu de mon travail de fin d'étude en biologie. Il consiste en une révision de la systématique et de la taxonomie d'un polypore que l'on nomme habituellement *Perenniporia fraxinea*. Cette recherche peut être interprétée comme une application pratique du problème théorique de la classification et de la nomination des organismes vivants et de la difficulté de définir une espèce de façon optimale. L'intérêt a été porté sur ce champignon en particulier en raisons d'études extérieures ayant montré que certains de ses métabolites permettaient de lutter contre le sarcome 180. Ainsi, outre l'intérêt que présente en soi une classification fine, il semble essentiel de pouvoir caractériser ce champignon avec précision. Notons que *P. fraxinea* n'est pas le nom correct de ce champignon.

Dans la systématique actuelle, le champignon qui répond à la description de *P. fraxinea* constitue en une et une seule espèce que l'on rencontre en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. Comme il existe de nombreuses barrières entre ces continents et que celles-ci se sont établies il y a bien longtemps, mes expériences, basées sur des données préliminaires, ont été dirigées dans le but d'évaluer la diversité génétique et le statut de cette espèce (espèce unique ou complexe d'espèces) dans son aire de répartition présumée. Pour ce faire, deux concepts d'espèces ont été envisagés et confrontés : le concept biologique et le concept phylogénétique. Le concept biologique, qui se définit via la capacité de croisements compatibles entre deux individus, a été mesuré à travers les tests de compatibilité (éventuelle formation de boucles au niveau des septa des hyphes génératifs). Les souches d'Asie sont originaires de Chine, du Japon et de Corée. L'Amérique est symbolisée par une souche du Canada et une souche des USA. Les souches d'Europe proviennent de Belgique, de France et des Pays-Bas. Les croisements intra-continentaux sont positifs. Les croisements entre les souches originaires d'Europe et d'Amérique et entre les souches originaires d'Europe et d'Asie sont tous négatifs. En revanche, les croisements entre les souches originaires d'Amérique et d'Asie ont montré, dans certains cas, une capacité à se croiser (compatibilité partielle).

Le concept phylogénétique induit l'idée qu'une espèce est un clade monophylétique terminal. Des marqueurs moléculaires de type séquence d'ADN ont été utilisés pour déduire les relations phylogénétiques entre nos souches. Les marqueurs utilisés sont nucléaires ribosomiaux (ITS, 28S) et non ribosomiaux (les EF et les RPB2). Les analyses ont été réalisées sur les souches utilisées lors des croisements, sur d'autres souches de *P. fraxinea* ainsi que sur d'autres espèces proches (congénériques). Les analyses basées sur les marqueurs considérés individuellement ou combinés sont concordantes et présentent *P. fraxinea* comme un groupe monophylétique avec trois sous-clades internes correspondant aux origines géographiques des souches et, partiellement, aux groupes de compatibilité. L'analyse suivant le marqueur 28S n'est pas discriminante mais celle des trois autres marqueurs l'est bien. Le concept utilisé pour désigner *P. fraxinea* est donc génétiquement complexe et comprend trois lignées « phylogéographiques », dont l'isolement reproductif est partiel ou complet. Il semble qu'il convienne donc de scinder l'espèce *P. fraxinea* en trois espèces différentes, chaque continent ayant ainsi son espèce propre.

Table des Matières

Page de garde.....	1
Remerciements.....	1
Résumé.....	1
Table des matières.....	1
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1. De qui parle-ton ?.....	1
1.2. Une classification nébuleuse.....	3
1.3. Quel est le problème ?.....	6
Chapitre 2 : Objectifs du travail.....	11
Chapitre 3 : Matériels & Méthodes.....	12
3.1. Liste des espèces intervenant dans ce travail.....	12
3.2. Terrain.....	12
3.3. Le concept biologique.....	13
3.4. Le concept phylogénétique.....	15
Chapitre 4 : Résultats.....	18
4.1. Le concept biologique.....	18
4.2. Le concept phylogénétique.....	23
Chapitre 5 : Discussion.....	28
5.1. Le concept biologique.....	28
5.2. Le concept phylogénétique.....	29
5.3. Confrontation des deux concepts.....	30
5.4. Le processus de spéciation.....	31
5.5. Quelques contre-exemples.....	33
5.6. Biogéographie.....	33
Chapitre 6 : Conclusion.....	36
6.1. La taxonomie.....	36
6.2. Les concepts d'espèce.....	36
6.3. Deux nouvelles espèces.....	37
Perspectives.....	38
Références bibliographiques.....	39
Annexes.....	43
1°) Annexes relatives au chapitre « Matériels & Méthodes ».....	43
1.1°) Terrain.....	43
Annexe 1.....	43

Annexe 2.....	43
1.2°) Le concept biologique.....	47
Annexe 3.....	47
1.3°) Le concept phylogénétique.....	48
Annexe 4.....	48
Annexe 5.....	48
Annexe 6.....	49
Annexe 7.....	50
Annexe 8.....	51
Annexe 9.....	51
2°) Annexes relatives au chapitre « Résultats ».....	52
2.1°) Le concept biologique.....	52
Annexe 10.....	52
2.2°) Le concept phylogénétique.....	58
Annexe 11.....	58

Chapitre 1 : Introduction

Quand j'étais petite et qu'on se promenait en forêt, je rêvais de pouvoir reconnaître tous les champignons. On m'a mise en garde, m'expliquant qu'il était souvent très difficile de déterminer les différentes espèces avec précision. Comme on avait raison... Bien sûr, à l'époque, mes parents faisaient référence à la nécessité de l'expérience, qui, elle seule, permet de se forger les réflexes qui mènent à une bonne observation et, surtout, qui permet d'acquérir une vaste connaissance.

Mon exemple trahit l'utilisation du concept morphologique de l'espèce dans la classification des champignons. Pendant très longtemps, cette approche fut exclusive par le simple fait qu'elle était la seule disponible. Vint ensuite l'approche de l'espèce biologique via la réalisation de tests d'interfertilité. Plus récemment encore, il y a une dizaine d'années seulement, apparut le concept phylogénétique basé sur les séquences moléculaires. Voilà donc que les mycologues d'aujourd'hui sont en possession de trois outils majeurs leur permettant d'observer le monde qui les entoure. (Notons qu'il existe encore d'autres concepts de l'espèce mais nous ne nous y attarderons pas). N'est-ce pas merveilleux ? On peut dès lors choisir de quelle manière identifier le sujet de ses recherches ! Oui mais... les choses sont en fait bien plus complexes qu'elles n'y paraissent puisque les regroupements générés par l'utilisation de telle ou telle méthode ne se superposent pas toujours. A quel concept se vouer ? Faut-il en choisir un et un seul, ou serait-il plus sage de faire un compromis ? Et qu'en est-il de la compréhension des processus qui ont mené le champignon que l'on étudie à une telle répartition sur notre planète ?

Je propose au lecteur d'accueillir ma recherche comme étant un modèle, une application pratique de ces notions.

1.1. De qui parle-t-on ?

Perenniporia fraxinea (Bull.:Fr.) Ryvar den (figure 1, ci-dessous) est un basidiomycète de l'ordre des Polyporales [Kirk & al., 2001]. Ce champignon de type polypore est lignivore, parasite ou saprophyte, à croissance pérenne. Il forme de larges basidiocarpes au pied de son hôte. Le plus souvent, comme le nom l'indique, celui-ci est un *Fraxinus spp.* mais il peut également s'agir d'un *Juglans spp.* ou d'un *Robinia pseudoacacia*, voire d'un *Fagus sylvatica spp.*, d'un *Prunus spp.*, d'un *Quercus spp.*, d'un *Salix spp.* ou d'un *Ulmus spp.* Son chapeau sessile présente une belle couleur ocre qui, au fil du temps, se pare de brun foncé puis se couvre de taches rouges pour finalement devenir anthracite. Une épaisse marge de couleur pâle gonfle tout son pourtour. La surface de ses pores a la couleur du liège.



figure 1. *Perenniporia fraxinea* (Chine, Jardin botanique de Shenyang, Prov. Liaoning)
V. Potten & C. Decock

Si l'on observe ce champignon au microscope, on voit apparaître son organisation. Celle-ci est faite de deux types d'hyphes : des hyphes génératifs et des hyphes squelettiques. On dit que le système d'hyphes est dimitique (le système d'hyphes peut être de trois types chez les polypores : mono-, di- ou trimitique) [Ryvarden, 1991]. La croissance du champignon est le fait des hyphes génératifs. Ceux-ci possèdent une paroi fine et hyaline et présentent, chez cette espèce, des boucles simples au niveau de leurs septa (voir « concept biologique » ci-dessous). (Ce n'est pas le cas chez tous les polypores, certains présentent des hyphes à septa simples.) Les hyphes squelettiques, en revanche, forment « l'ossature » du champignon. Ils sont très généralement constitués d'une seule longue cellule morte aux parois épaissies et sclérifiées. Chez *P. fraxinea*, cette paroi se colore en brun-rouge dans le réactif de Melzer (réaction dite dextrinoïde) (Le réactif de Melzer est une solution qui contient de l'iode, de l' I_3PO_4 , de l' HCl et de l'eau distillée [Melzer, 1924]). Ses basidiospores, qui sont lacrymoïdes (elles ont la forme d'une goutte d'eau), possèdent également une paroi épaisse.

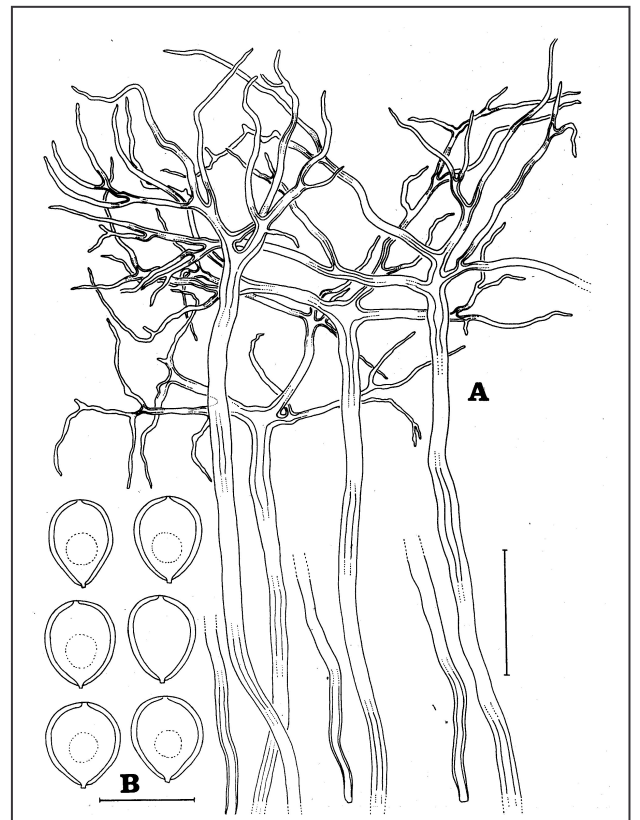


figure 2. Hyphes et spores de *P. vicina* (espèce type du genre)

[A. Arboriform skeletal hyphae from the trama of the tubes. Scale bar = 50 μ m. B. Basidiospores, from the type. Scale bar = 10 μ m]
[Decock & Ryvarden, 1999]

Celle-ci est néanmoins affinée au sommet à l'endroit où se développera le pore germinatif. Ses spores montrent, elles aussi, une réaction dextrinoïde. Ces notions sont illustrées par la figure ci-dessous (Figure 2 [Decock & Ryvarden, 1999]).

Ce champignon produit une pourriture blanche du bois (white rot fungi). Il possède un système enzymatique capable de dégrader la lignine et les polysaccharides et augmente ainsi le rapport cellulose / lignine du bois de son hôte. Le bois devient spongieux, doux et de couleur très pâle. Il se décompose en fines lamelles qui seront rapidement dégradées au sol. [Overholts, 1953]

P. fraxinea n'est pas comestible (du fait de sa consistance rigide) mais il n'est pas dangereux. La médecine traditionnelle chinoise prête à ce champignon des vertus curatives. De récentes études ont montré que des extraits de carpophore (extraction à l'eau chaude) possédaient un pouvoir inhibiteur sur le Sarcome 180 [Ying & al., 1987]. Cet effet a été observé chez la souris et le poulet [Dalloul & al., 2006] et serait dû à la présence de protéases à activité fibrinolytique [Lee & al., 2006]. Ainsi, outre l'intérêt que présente en soi une classification fine, il semble essentiel de pouvoir caractériser ce champignon avec précision. Hélas ! La systématique et la taxonomie de *P. fraxinea* sont tout au monde sauf limpides et évidentes. Les livres de médecine chinoise utilisent ce nom pour une série de champignons qui semblent très différents les uns des autres, et ce à travers tout le pays.

1.2. Une classification nébuleuse

Jusqu'ici, il a été question du champignon étudié en termes de *Perenniporia fraxinea*, c'est le nom que la plupart des auteurs utilisent. En réalité, aucun de ces deux épithètes (genre et espèce) ne lui sont appropriés à juste titre [Decock, 2001].

1.2.1. L'épithète de genre

Le genre *Perenniporia*, établi par Murrill en 1942, a pour espèce type *Perenniporia medulla-panis* (Jacq.:Fr.) Donk. Les champignons qui appartiennent à ce genre se caractérisent entre autres par des hyphes squelettiques et des basidiospores à paroi épaisse dextrinoïde et pourvues à leur sommet d'un pore germinatif [Decock & Stalpers, 2006]. *Perenniporia fraxinea* présente également ces caractéristiques et Ryvarden les considère comme très pertinentes (même s'il ne considère pas le pore germinatif) [Ryvarden, 1976].

En revanche, si l'on s'intéresse aux basidiospores d'un peu plus près, et plus particulièrement au pore germinatif, on peut s'apercevoir que celui-ci est totalement différent chez *P. medulla-panis* et *P. fraxinea*, tant par sa morphologie que par son ontogenèse. Les *Perenniporia* (au sens strict) possèdent une paroi d'égale épaisseur sur tout leur pourtour (figure 3).

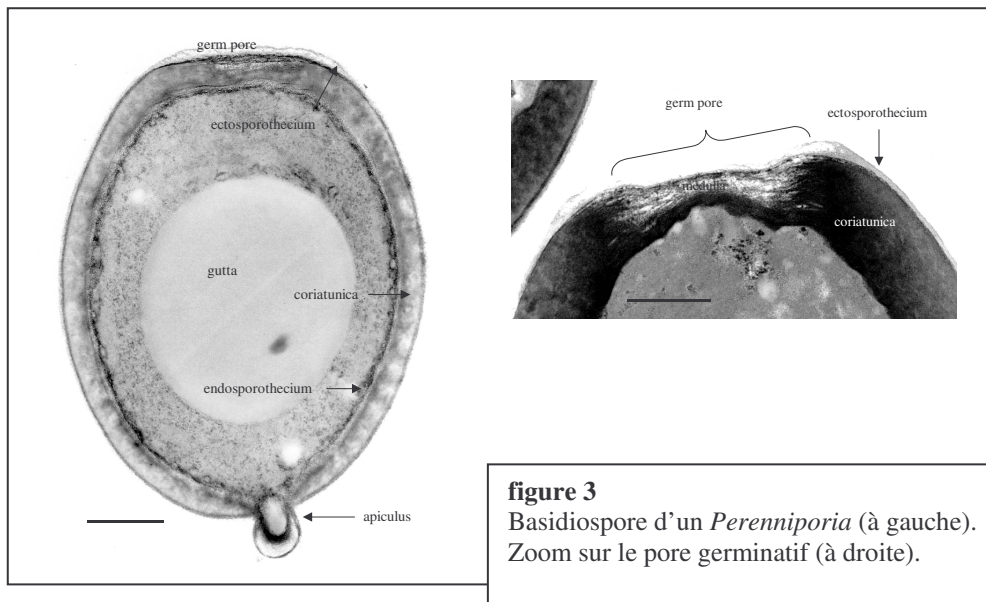


figure 3
Basidiospore d'un *Perenniporia* (à gauche).
Zoom sur le pore germinatif (à droite).

Ce n'est que lors d'un phénomène de post-maturation que cette paroi se désintègre partiellement au niveau de la zone apicale de la spore. Celle-ci s'affaisse légèrement et donne à la spore a un aspect tronqué. L'ontogénèse du pore germinatif chez *P. fraxinea* est très différente.

Celui-ci apparaît déjà au moment où la spore se développe, il résulte d'un amincissement localisé de la paroi au niveau de la zone apicale (figure 4). Le pore germinatif en résultant sera de petite taille. En 1999, Decock et Ryvarden soulignaient donc que cette espèce serait donc bien plus à sa place dans le sous-genre *Vanderbylia*. Celui-ci a été décrit par Reid en 1973 mais n'a pas été accueilli avec autant d'enthousiasme par tous les auteurs. Il a très rapidement été admis comme étant un synonyme du genre *Perenniporia*. Ce genre contient d'autres espèces : *vicina* (Lloyd) Reid (l'espèce-type), *mesoleuca* (Berk.) Ryv., *delavayi* (Pat.) Decock & Ryvarden, *robiniophila* (Murrill) Ryvarden, *ungulata* Reid, *borneensis* Corner et *subincarnata* Corner [Decock & Ryvarden, 2001 ; Decock, 2001].

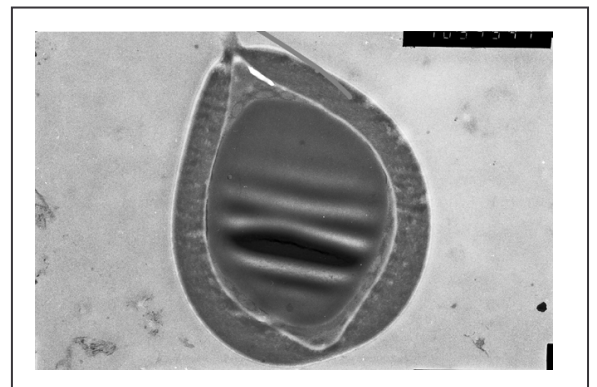


figure 4
Basidiospore d'un *Vanderbylia*.
P. fraxinea présente de telles spores.

A partir d'analyses phylogénétiques basées sur des marqueurs moléculaires, Decock et Ryvarden [recherches en cours] soutiennent l'idée que la réaction dextrinoïde est un caractère convergent. Ce n'est pas parce que deux espèces présentent une telle réaction qu'elles sont nécessairement plus proches entre elles qu'elles ne le sont d'une espèce qui ne la présente pas. Après tout, cette réaction colorée n'est liée qu'à la présence d'une molécule, la glycine bêtaïne (c'est un osmolyte synthétisé par divers groupes

d'organismes en conditions de stress imposé par l'environnement. Il est synthétisé par oxydation de la choline) [Blackwell & *al.*, 2001]. En revanche, l'ontogenèse du pore germinatif est un caractère subtil qui induit la présence de nombreux gènes. Ces caractéristiques morphologiques, couplées aux analyses phylogénétiques, nous portent à considérer ce champignon comme congénérique avec *P. vicina* (espèce type du genre *Vanderbylia*) et non avec *P. medulla-panis*, d'où la nécessité d'un transfert.

Sachons néanmoins que ce champignon a tout d'abord été décrit comme appartenant au genre *Boletus* (voir paragraphe ci-dessous). Au fil du temps et des découvertes qui ont permis d'affiner la classification, l'espèce a été recombinaée à de nombreux épithètes de genres différents. Par exemple, il a reçu le nom de *Fomes fraxineus* à cause de son caractère pérenne. Mais, les *Fomes* formant une croûte, il est devenu *Fomitopsis fraxineus*. Ce nom ne lui convenait guère plus puisque les *Fomitopsis* sont responsables de la pourriture cubique alors que *fraxineus* produit de la pourriture blanche. Il existe de nombreux autres exemples.

1.2.2. L'épithète d'espèce

Perenniporia fraxinea est basé sur le basionyme *Boletus fraxineus* Bull. (1789) [Donk, 1972] (figure 5). *Boletus fraxineus*, également décrit par Sowerby (1797) comme *B. ulmarius*, est bien reconnaissable grâce à la couleur très marquée du contexte par rapport à celle des tubes. (A l'époque, la

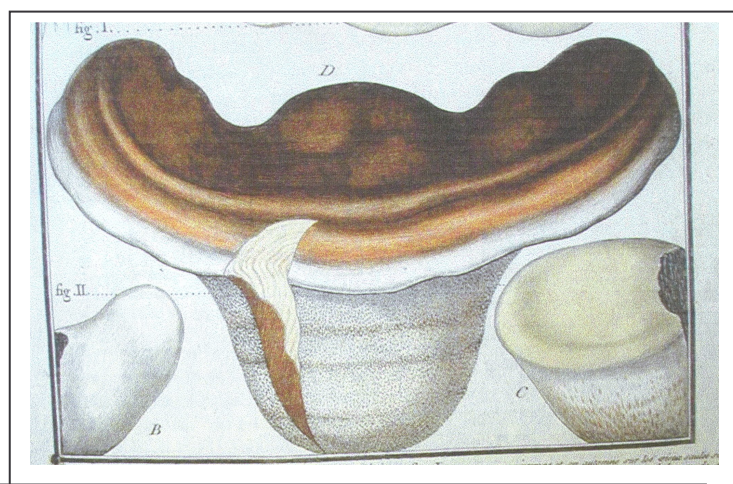


figure 5. *Boletus ulmarius*, synonyme de *Boletus fraxineus* [Bulliard, 1780 – 1793]

classification se voulait moins complexe qu'elle ne l'est aujourd'hui. Ainsi, tout champignon présentant des pores était appelé *Boletus*. *B. fraxineus* et *B. ulmarius* sont devenus des synonymes.) Or, il apparaît très clairement que le champignon désigné comme étant *P. fraxinea* par les auteurs modernes ne correspond pas à la description originale de *B. fraxineus* (ni d'ailleurs à celle de *B. ulmarius*). Chez *B. ulmarius*, un fort contraste apparaît entre la couleur blanche du contexte et la teinte brun rouille des tubes, caractéristique totalement absente chez

P. fraxinea sensu auctores. Il semblerait que cette malencontreuse confusion vienne d'une interprétation de Berkeley [1836 in Donk, 1972]. L'épithète *fraxineus* ne peut donc s'appliquer au champignon connu sous le nom de *P. fraxinea*, comme l'a souligné Donk [1972]. Il convient de chercher, dans la littérature, parmi les quelques noms disponibles, un autre épithète. Donk discute en détails du fait que le basionyme alternatif le plus souvent cité est *Polyporus cytisinus* Berk. (1836). C'était le nom le plus ancien qui

existait alors (le code de nomenclature considérait les textes de Fries (1826) comme point de départ de la taxonomie). Or, depuis, la date de référence a reculé jusqu'aux descriptions de Linné (1753) et d'autres noms sont devenus disponibles (bien que d'identité encore incertaine à l'heure actuelle). *Boletus suberosus* L. [Linnaei, 1753] a parfois été considéré comme synonyme de *P. fraxinea sensu auctores*. Cependant, il est évident que ce nom, basé sur un spécimen collecté sur *Betula sp.* est en fait un synonyme de *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. La confusion vient d'une interprétation erronée de Sowerby [1803]. Ainsi, en avançant dans le temps, les noms disponibles suivants sont *Polyporus gibbosus* Pers. (1825), *Placodes incanus* Quél. (1886) et *Polyporus sublingueformis* S. Schulz. In Linhart (1882) [Donk, 1972]. L'interprétation « moderne » de ces noms anciens est encore sujette à discussion et doit être encore analysée en détail.

La conclusion de tout ceci est que *P. fraxinea* ne devrait pas être appelé ainsi. L'épithète de genre devrait être *Vanderbylia*. En ce qui concerne l'épithète de l'espèce, il convient d'analyser et de comparer différentes interprétations de noms anciens pour lesquels, généralement, peu de matériel est disponible. Cependant, pour ne pas dérouter le lecteur et conformément à l'usage dans la littérature scientifique [Gilbertson & Ryvarden, 1986], le champignon dont il est question sera toujours désigné par le nom *Perenniporia fraxinea* dans le texte qui suit.

1.3. Quel est le problème ?

Le concept d'espèce de *P. fraxinea* n'est pas clairement établi [Decock & Ryvarden, 1999]. Actuellement, cette espèce est définie uniquement via le concept morphologique. Il en résulte qu'on la rencontre à travers tout l'hémisphère Nord en régions tempérées (Amérique du Nord Est, Europe et Asie de l'Est). Comme il existe de très fortes barrières géographiques entre ces différentes régions du monde, on peut questionner l'existence actuelle d'un flux de gènes entre les différentes populations. Dès lors, si on s'appuyait sur les autres concepts d'espèce, s'agirait-il toujours réellement d'une espèce ? N'y aurait-il pas plusieurs espèces qui correspondent, pour le moment, au champignon que l'on appelle *P. fraxinea* ? Nous nous heurtons ici, comme beaucoup d'autres avant nous, à un épineux problème : l'espèce est un concept abstrait et aucune définition optimale n'existe.

1.3.1. Le concept morphologique de l'espèce

La classification des champignons se base sur une ancienne (mais toujours très utilisée) considération de l'espèce, le concept morphologique [Peterson & Hughes, 2007], qui propose que « si deux spécimens se ressemblent suffisamment, ils font partie de la même espèce » [Smith, 1968 ; Singer, 1952 & 1986]. « Suffisamment ». Comment établir une classification stable à partir d'une définition aussi vague ? D'autre part, ce concept prend appui sur d'inévitables problèmes dont, entre autres, le fait que l'observation et la

description des caractéristiques morphologiques sont des « arts » qui dépendent de la qualité du matériel disponible et des convictions de chacun. Une notion aussi importante que la délimitation des espèces les unes par rapport aux autres nécessite l'utilisation d'une méthode qui ne se prêterait pas à de telles tergiversations.

Quoi qu'il en soit, même au niveau de ce concept très simple, les choses ne sont pas très claires en ce qui concerne l'identification de *P. fraxinea*. En Chine et en Amérique du Nord, certains auteurs (Nunez & Stokland (2000), Dai & al. (2002), Ying & al. (1987)) la nomment *P. robiniophila* parce qu'ils se basent sur son hôte, à savoir *Robinia pseudoacacia*. Or, *P. robiniophila* est une autre espèce du genre *Vanderbylia* [Gilbertson & Ryvardeen, 1986]. Cette espèce est probablement endémique à l'Amérique du Nord, où elle se rencontre dans des zones plus méridionales par rapport à *P. fraxinea*.

1.3.2. Le concept biologique de l'espèce

Mayr (1942 & 1974) définit l'espèce comme un groupe de populations qui se croisent dans des conditions naturelles et qui sont isolées des autres groupes au niveau de la reproduction. (« Species are groups of interbreeding natural populations that are reproductively isolated from other such groups »). En aucun cas, un individu a de l'espèce A ne pourra se reproduire avec un individu b de l'espèce B. Cette notion induit que le mécanisme par lequel les individus sont isolés sur le plan reproducteur est une propriété intrinsèque de l'individu (et de l'espèce, par extension). Un isolement géographique ne peut donc être considéré comme un réel mécanisme d'isolement [Peterson & Hughes, 2007].

Ce concept trace l'une des deux grandes lignes de mon travail.

1.3.2.1. *Comment juger de l'inter-fertilité de 2 souches de champignon ?*

Lorsqu'on parle de champignon, c'est toujours l'image du carpophore qui nous vient à l'esprit. Celui-ci représente l'organe de dispersion des spores sexuées. Il est constitué d'hyphes dicaryotiques compactés. De tels hyphes résultent de la rencontre de deux hyphes haploïdes. Leurs deux noyaux cohabitent au sein de chaque cellule. Au niveau des cellules germinales, les basides dans notre cas, les noyaux fusionnent, subissent la méiose, et chacun migre dans une spore. [Peterson & Hughes, 1999]

Les hyphes dicaryotiques se forment par une succession de mitoses. Chacune d'elle s'articule autour d'un des deux noyaux. L'autre noyau gagne la nouvelle cellule par l'élaboration, au niveau des septa, d'une excroissance appelée boucle (*clamp connection*). Les boucles peuvent être visualisées au microscope (figure 6), il suffit d'un petit peu d'entraînement pour les reconnaître. Sachons néanmoins que tous les basidiomycètes ne forment pas de boucles ; dans ce cas, il faut faire appel à d'autres techniques pour identifier les dicaryons (comptage des noyaux, formation d'un barrage mycélien, morphologie particulière,...).

Il est évident qu'un dicaryon stable ne peut être formé à partir de la rencontre de *n'importe quels* hyphes haploïdes. La cohabitation des noyaux est permise par la présence d'allèles différents au niveau de deux loci appelés facteur A et facteur B. L'individu dicaryotique doit être hétérozygote au niveau de

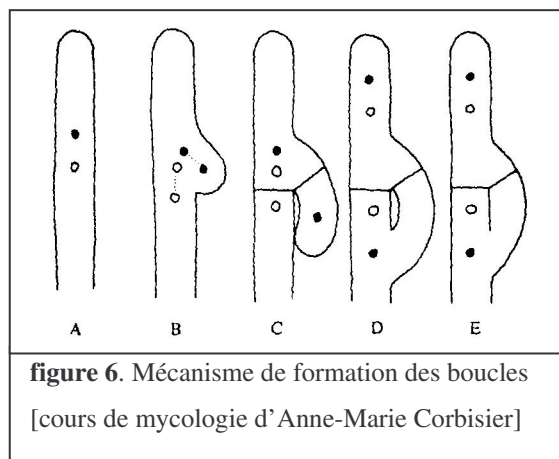


figure 6. Mécanisme de formation des boucles
[cours de mycologie d'Anne-Marie Corbisier]

chacun de ces deux facteurs. Ainsi, les associations de type $(A_1 B_1 \times A_2 B_2)$ et $(A_1 B_2 \times A_2 B_1)$ formeront un dicaryon viable à l'inverse de celles du type $(A_1 B_1 \times A_1 B_1)$ et $(A_1 B_1 \times A_1 B_2)$. Lorsque le dicaryon subira la méiose, il produira quatre types de spores : $(A_1 B_1)$, $(A_1 B_2)$, $(A_2 B_1)$ et $(A_2 B_2)$. Il y a donc quatre groupes. Chacun de ces groupes n'est compatible qu'avec un seul autre, celui qui présente des allèles différents pour chacun des deux facteurs. Ce phénomène, décrit par Kniep en 1920, est appelé sexualité tétrapolaire et se

rencontre chez beaucoup de champignons supérieurs, chez certains angiospermes et chez une fougère [Hennebert & al., 1994 & Raper & al., 1958].

Le facteur A est responsable de la formation de la boucle, le facteur B assure la migration des noyaux.

Mon travail, en termes du concept biologique de l'espèce, a donc consisté à croiser entre elles des souches haploïdes (monocaryons) issues de différentes régions géographiques et à observer l'éventuelle formation de boucles. Les souches originaires d'Asie proviennent du Japon, de la Chine et de la Corée. Les souches européennes ont été récoltées en France, en Belgique et aux Pays-Bas. Les souches d'Amérique proviennent des USA et du Canada.

Remarquons que le critère pratique utilisé pour fixer les limites des espèces biologiques ne correspond pas strictement à la définition de ce concept. En effet, celui-ci énonce que deux individus appartiennent à la même espèce s'ils font partie de populations qui peuvent se reproduire entre eux dans des conditions naturelles, tout en étant isolées sur le plan reproducteur des autres espèces. Le principe de la reproduction induit donc l'idée de l'existence d'une descendance fertile, capable de se reproduire à son tour. Dans notre cas, nous avons considéré comme une seule espèce les individus capables de former des boucles. Celles-ci renseignent sur les possibilités de plasmogamie et de cohabitation des noyaux mais ne permettent de prévoir ni la caryogamie ni le bon déroulement de la méiose et la production subséquente de spores (Lepoint [2006] a en effet observé, chez les *Giberella*, la formation de périthécium qui restait stérile). Concrètement, il faudrait pouvoir observer la formation d'un carpophore fertile et s'assurer de la viabilité de ses spores. En ce qui concerne *P. fraxinea*, cette entreprise est difficile et aléatoire en laboratoire, la production de basidiome étant impossible à contrôler en culture. Et que devrait-on conclure si la

descendance des croisements était viable mais à croissance anormale ou non fertile (perte de *fitness*) ? Et si elle devenait de moins en moins fertile au fil des générations ? Ces problèmes sont liés, d'une part, à la méthode (compatibilité n'est pas synonyme de fertilité) et, d'autre part, au concept même de l'espèce biologique. Nous utiliserons donc, tout au long de ce travail, les termes de compatibilité (inter-compatible / inter-incompatible) et non pas les termes de fertilité (inter-fertile / inter-stérile).

1.3.3. Le concept phylogénétique de l'espèce

Le concept phylogénétique induit l'idée qu'une espèce est le plus petit groupe d'organismes qui peut être séparé des autres via le diagnostic d'un caractère qui leur est propre. L'espèce est donc un clade monophylétique terminal. Tous les individus de ce clade possèdent ainsi le même ancêtre commun et ils sont les seuls à le posséder. Les clades peuvent être définis sur la base de différents types de caractères (morphologiques, écologiques, moléculaires,...). Dans notre cas, nous nous intéressons aux clades définis en fonction de la ressemblance de la séquence de nucléotides de marqueurs choisis. En fonction de cette séquence d'ADN, on cherche à dessiner les relations entre les individus de telle manière qu'il faille faire intervenir le moins de mutations possibles, c'est le principe de parcimonie. [Ridley, 2004]

C'est sur ce concept que repose la seconde partie de mon mémoire. Les analyses phylogénétiques sont basées sur quatre marqueurs génomiques (les ITS et les 28S sont des marqueurs de type ribosomiaux, par opposition aux EF et aux RPB2). Les ITS sont des séquences fort variables, on les utilise pour comparer des espèces proches ou des populations différentes au sein d'une même espèce. Il ne s'agit pas d'un gène puisque c'est une séquence non-codante comprise entre les régions 18S et 28S (codant, elles pour l'ARNr). Les EF (facteurs d'élongation) sont des séquences codant pour les enzymes qui permettent l'ajout des acides aminés à une protéine en cours de synthèse. Les séquences 28S codent pour la grande sous-unité des ribosomes et les séquences RPB2 codent pour une partie de la grande sous-unité de l'ARN polymérase. Ces trois types de séquences sont, de manière générale, plus conservés puisque ces gènes sont essentiels à la vie des cellules. Elles permettent plutôt d'assigner une espèce à un genre ou à identifier des espèces au sein d'un genre considéré.

Ces analyses ont été réalisées sur les souches utilisées lors des croisements, sur toute une série d'autres souches de *P. fraxinea* ainsi que sur d'autres espèces du même genre (*P. robionophila*, *V. sinensis*, *P. vicina* et *P. unguolata*) et sur *P. latissima* (Bresadola) Ryvarden (outgroup).

L'intérêt de construire la phylogénie de plusieurs marqueurs indépendants est de comparer ces différentes phylogénies les unes aux autres. Il est très imprudent de parler de l'évolution d'une espèce sur la base d'un seul gène. En effet, les différents marqueurs moléculaires n'évoluent pas nécessairement sur des chemins parallèles puisqu'ils peuvent être soumis à des pressions de sélection différentes. De plus, les

limites d'une espèce par rapport à une autre ne sont définies que de manière subjective. En revanche, si plusieurs gènes présentent des arbres phylogénétiques dont la topologie est similaire, il y a de plus fortes chances que cette dernière représente l'évolution de l'espèce en elle-même. On parle alors de concordance généalogique (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition). [Mayden, 1997 in Taylors & al., 2000] Les limites de l'espèce sont ici définies par la transition entre la concordance et les conflits entre les différentes topologies.

1.3.4. Biogéographie

La ressemblance entre les forêts d'Amérique du Nord-Est et d'Asie de l'Est a été discutée pour la première fois par Halénus, il y a trois cents ans [Mueller & al., 2001]. Elle a été mise en évidence par Graya en 1846 à l'aide d'exemples. Cette ressemblance a été appuyée ensuite par de très nombreuses autres observations relatives aux mousses, aux fougères (Kato & Iwatsuki), aux lichens (Culberson), aux plantes supérieures (Li, Graham, Raven, Tiffney, Wen,...), aux animaux (Suzuki, Patterson, Enghoff, Nordlander,...) et, aux champignons supérieurs (Hongo & Yokoyama, Wu & Mueller) dont, par exemple, parmi les polypores, les genres *Fomitopsis* Karst., *Perenniporia* Murr., *Phellinus* QuéL., *Phyloporia* QuéL., *Trametes* Fr. et *Wolfiporia* Ryv. & Gilb. [Hsu, Jorgensen, Vana,.. in Nunez, 2000].

Notons que malgré cette ressemblance, l'Est de l'Asie a une plus grande biodiversité que les autres zones tempérées de la planète. Cette diversité a sans doute moins fortement subi les effets des glaciations grâce au plateau Qinghai/Xizang qui a dû se former au centre de l'Asie durant l'Eocène. Une forêt continue s'étend donc de l'Est de la Sibérie jusqu'au Sud-Est de l'Asie (en zone tropicale) et, ce depuis des millions d'années. C'est cela qui a assuré la coexistence de toutes ces espèces tempérées et tropicales. [Nunez & Stokland, 2000].

Il existe donc de très nombreuses espèces qui présentent une distribution apparemment semblable à celle de *P. fraxinea*.

Chapitre 2 : Objectifs du Travail

La classification actuelle définit *Perenniporia fraxinea* comme étant une espèce dont la distribution s'étend de l'Amérique du Nord Est à l'Asie de l'Est, en passant par l'Europe. Cette observation repose sur l'identification de *P. fraxinea* via le concept morphologique de l'espèce. Des résultats très partiels sur un nombre restreint de souches [Decock, données non publiées] avaient mis en évidence l'existence de trois clades dans une phylogénie basée sur les ITS. Mon travail a consisté à compléter ces données. L'analyse est étendue à plusieurs marqueurs moléculaires sur un nombre plus important de souches et permet ainsi de confirmer l'existence de ces différents clades. D'autres part, les clades proposés par l'analyse phylogénétique sont comparés aux groupes de compatibilité mis en évidence par les croisements. Ainsi, deux des principaux concepts de l'espèce, à savoir le concept biologique et le concept phylogénétique sont confrontés l'un à l'autre (et au concept morphologique, bien entendu).

Le but est de découvrir s'il convient de parler de *P. fraxinea* en termes de différentes populations d'une même espèce (dans ce cas, il y aurait un grand groupe de populations en Amérique, un autre en Europe et un troisième en Asie) ou en termes de trois espèces différentes (chacune ayant un continent sur lequel se répartissent ses populations). Le concept phylogénétique de l'espèce me permet également de définir si les individus définis comme *P. fraxinea* sur la base de la morphologie forment un groupe monophylétique. En d'autres termes, il s'agit de découvrir si le complexe *P. fraxinea sensu lato (s.l.)* contient plusieurs espèces cryptiques (du moins à première vue parce qu'aucune analyse morphologique poussée ne sera réalisée dans le cadre de ce mémoire).

Les résultats des deux concepts de l'espèce seront traités et interprétés séparément. Leur comparaison permet de pallier les défauts que chacun présente. Nous essayerons également de comprendre les processus qui ont mené à la distribution de *P. fraxinea* telle qu'on peut l'observer aujourd'hui.

L'intérêt de cette recherche est, d'une part, d'éclaircir un petit morceau resté obscur de la systématique des polypores. L'idée sous-jacente à ce but abstrait est de pouvoir également ajouter une petite pierre à notre montagne de connaissances relatives à la biodiversité de notre planète. L'intérêt d'une telle recherche se concrétise puisqu'il est évident que l'on ne peut protéger efficacement que ce que l'on connaît et comprend.

Je souhaiterais également que cette recherche me permette ensuite de décrire les nouvelles espèces éventuellement mises en évidence par le biais de mes expériences.

Cette démarche me semble d'autant plus justifiée que *P. fraxinea* est un champignon médicinal utilisé encore actuellement dans le contexte de la médecine traditionnelle chinoise. De récentes études ont démontré son pouvoir sur les tumeurs malignes du Sarcome 180.

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes

3.1. Liste des espèces intervenant dans ce travail

Perenniporia fraxinea (Bulliard : Fries) Ryvar den (synonyme : *Vanderbylia fraxinea*)

Perenniporia robiniophila (Murrill) Ryvar den (synonyme : *Vanderbylia robiniophila*)

Vanderbylia sinensis Decock (nom. prov.)

Perenniporia vicina (Lloyd) Reid (synonyme : *Vanderbylia vicina*), espèce type du genre

Perenniporia ungulata Reid (synonyme : *Vanderbylia ungulata*)

Perenniporia latissima (Bresadola) Ryvar den (synonyme : *Hornodermoporus latissimus*)

Vanderbylia sp.

Le détail des souches utilisées se trouve en annexes 1 & 2.

3.2. Terrain (août – septembre 2006)

3.2.1. Localisation géographique des souches personnellement collectées

La liste se trouve en annexe 1.

3.2.2. Collecte des spécimens [Gilbertson & Ryvar den, 1986]

Dans le cadre de ce travail, j'ai participé à une mission de récolte en Chine durant quatre semaines. Le périple a couvert la majeure partie de la côte Est, du Nord (Liaoning) jusqu'aux îles tropicales du Sud (Hainan).

- Les spécimens intacts sont tout d'abord photographiés dans leur habitat naturel. Les photographies (dont notamment celle présentée en figure 1 dans le chapitre « Introduction ») ont été prises par C. Decock à l'aide d'un appareil numérique Nikon D70S (objectif macro 60mm).
- Ensuite, détacher précautionneusement l'individu de son hôte à l'aide de la lame d'un solide couteau inséré entre le carpophore et le tronc. Emballer le champignon dans du papier journal pour éviter qu'il ne s'abîme durant le trajet.
- Le soir même, bien installé dans une pièce sans courants d'air, découper des petits cubes de carpophore (environ 2mm de côté) de chaque individu à l'aide d'une lame de rasoir stérilisée à l'éthanol. Transférer ces petits morceaux dans des boîtes de pétri contenant du malt agar 2% (MA2, voir plus loin) afin d'obtenir des cultures pures (pour les croisements et l'extraction d'ADN, voir plus loin). Il est conseillé de récolter des spores sur le carpophore quand il est encore frais et de les semer sur boîte. Cela permet de ne pas devoir faire sporuler le mycélium (celui-ci est fort capricieux en boîte de pétri et il est très possible de ne jamais parvenir à obtenir de spores).

- Déposer les carpophores devant un courant d'air chaud (généré par un petit chauffage par exemple) afin qu'ils se dessèchent. Selon la taille et la consistance du carpophore, l'entreprise peut être plus ou moins longue (12 à 48h en moyenne). Lorsqu'ils sont parfaitement secs, ils peuvent être stockés dans les collections d'herbiers sans trop de risques de contamination.

3.2.3. Description de l'écosystème

Perenniporia fraxinea se rencontre en climat tempéré. Il est très généralement sur *Fraxinus spp.*, mais il peut également se développer sur un *Juglans spp.* ou un *Robinia pseudoacacia*, voire un *Fagus spp.*, un *Prunus spp.*, un *Quercus spp.*, un *Salix spp.* ou un *Ulmus spp.* Il n'est donc pas tellement dépendant du type de sol puisque ces différents arbres correspondent à des groupes écologiques qui s'étendent du mull polytrophe calcique au moder-mor. [Dulière & al., 1995] On le rencontre plus souvent dans des milieux ouverts que dans des forêts (jardins, bord des routes,... sur des arbres relativement isolés).

Les spécimens récoltés en Chine dans le cadre de la mission à laquelle j'ai participé se retrouvent dans des *Camellietea japonicae* Hara 1959 de types subtropicales [Nunez & Ryvardeen, 2000]. Ces forêts ont une température moyenne de 21°C. Elles couvrent les îles Ryuku et Bonin (au Japon), les provinces du Yunnan et du Fujian (en Chine). La forêt est dominée par des *Castanopsis* (D. Don) Spach et les *Quercus* L. On peut également trouver *P. fraxinea* dans des forêts de type *Quercus-Fagetea crenatae* Miyawake et al. 1964. Ce type de forêt est très répandu en Asie du Nord-Est en dehors des régions tropicales. Les températures moyennes y sont de 1 à 8 °C au Nord et de 14°C lorsqu'on se rapproche de la forêt mésophytique. Il y pleut 600 à 1000 mm d'eau par an. Cette association comprend la forêt caducifoliée de la zone tempérée dominée par les *Fagus crenata* Blume, les *Quercus crispula* Blume, les *Tsuga sieboldii* Carr., les *Abies firma* Siebold & Zucc. et les *A. homolepsis* Siebold & Zucc. au Nord d'Honshu et dans la Péninsule d'Hokkaido (au Japon), par les *Quercus mongolica* Fischer ex Ledebour et les *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. en Corée, en Manchurie (Chine) et à l'Est de la Russie. Les forêts à *Betula* L. marquent la transition avec la zone boréale.

Les autres souches utilisées lors de mes expériences sont citées en annexe 2 parce que je ne les ai pas récoltées par moi-même.

3.3. Le concept biologique

Ces expériences ont consisté à croiser des souches monocaryotiques de *P. fraxinea* issues de différentes régions géographiques.

3.3.1. Obtention de souches monocaryotiques [Josserand, 1997]

- Le mycélium obtenu à partir du carpophore est dicaryotique. Il faut donc faire en sorte qu'il produise des spores haploïdes monocaryotiques sur lesquelles on peut travailler par la suite. Si l'on n'a pas réussi à obtenir une sporée à partir du carpophore frais, il faut faire en sorte que le mycélium sporule. Pour cela, laisser le mycélium à 25°C avec une alternance de lumière (jour / nuit) en posant la boîte de Pétri sur son couvercle afin que les spores y tombent.
- Ensuite, faire couler quelques gouttes d'eau stérilisée dans le couvercle afin d'y récupérer les spores. On peut faire des dilutions de cette solution avant de la répartir sur un milieu MA2. Sitôt que les spores ont germé, les isoler afin que les hyphes ne puissent fusionner les uns avec les autres (sans quoi ils redeviendraient dicaryotiques et il faudrait tout recommencer). Avant d'utiliser ces souches pour les croisements, il vaut mieux vérifier au microscope qu'il s'agit bien de monocaryons (voir plus loin).

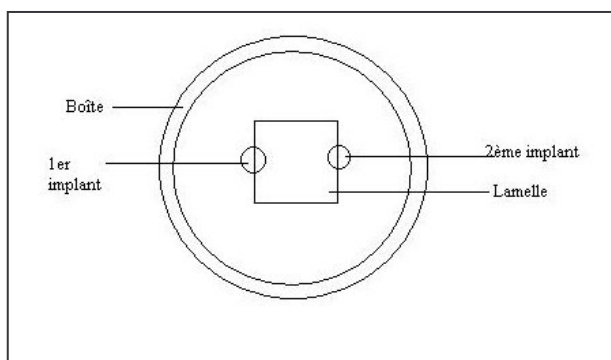
3.3.2. Le milieu MA2 (malt agar 2%) [catalogue MUCL, 1998]

Le malt agar 2% est un milieu qui convient à la croissance de beaucoup de champignons. La marche à suivre pour le réaliser se trouve en annexe 3.

3.3.3. Les croisements [Hennebert & al., 1994]

Toutes les opérations suivantes doivent être réalisées sous hotte à flux laminaire. Tous les objets cités (pince, emporte-pièce,...) doivent bien entendu être stérilisés à l'éthanol avant d'entrer en contact avec le mycélium. Il faut également stériliser tous les objets lorsqu'on passe d'un mycélium à un autre (que ce soit pour les différents monocaryons issus d'une même souche ou pour les monocaryons issus de deux souches différentes).

- Au centre d'une boîte de pétri (diamètre de 5.5cm), déposer à l'aide d'une pince une lamelle couvre-objet préalablement stérilisée à l'éthanol (il faut faire évaporer l'éthanol à la flamme pour qu'il n'y en ait pas dans le milieu). Ensuite, déposer délicatement les implants de mycélium (réalisés par exemple à l'emporte-pièce) d'un côté et de l'autre de la lamelle (comme indiqué sur la figure 7). Il



faut que l'implant de mycélium soit, d'une part, en contact avec l'agar (afin qu'il puisse se développer facilement) et, d'autre part, qu'il repose sur la lamelle.

figure 7. Disposition des implants de mycélium pour réaliser les croisements

- Les boîtes sont mises à l'obscurité à 25°C durant environ 10 jours (il faut que le mycélium de chacun des 2 implants se soit rencontré sur la lamelle).
- Les résultats s'observent, bien entendu, au microscope (grossissement 40x, ph 2, Olympus BH2 ou BX50). Les lamelles sont déposées sur une lame porte-objet, le mycélium baignant dans une goutte d'acide lactique. Les résultats seront retranscrits dans un tableau (lorsque le croisement est positif, cela veut dire que l'on a observé des boucles).

3.3.3.1. Comment réaliser ces croisements ?

Tout d'abord, croiser entre eux, deux à deux, tous les monocaryons issus d'une souche mère. Il faut faire cela pour chacune des souches (les souches étant issues chacune d'une origine géographique différente) afin de déterminer le groupe auquel appartient chaque monocaryon (A₁ B₁,...). Lorsque c'est fait, pour chaque souche, sélectionner deux monocaryons de chacun des quatre groupes et les croiser avec ceux d'une autre origine géographique selon toutes les possibilités. Pour organiser le travail, il est conseillé de commencer par réaliser tous les croisements intra-continentaux.

La souche originaire des USA (n° MUCL 47692) n'ayant jamais sporulé en conditions de laboratoire, aucun monocaryon n'a pu être obtenu. Les dicaryons des USA ont donc été croisés avec des monocaryons des autres pays (Canada (n° MUCL 40031), Belgique (n° MUCL 47981) et Chine (n° MUCL 47003)). Il faut d'abord laisser pousser le monocaryon pendant quelques jours dans une boîte de Pétri, seul. Lorsque le mycélium s'est étendu sur environ la moitié de la boîte, on rajoute un implant du dicaryon. Une semaine plus tard, on prélève un petit peu de mycélium au point opposé, c'est-à-dire le plus loin possible de l'endroit où on a déposé le dicaryon. Si les souches étaient compatibles, les noyaux du dicaryon devraient avoir migré dans les hyphes du monocaryon et celui-ci devrait donc présenter des boucles au niveau de ses septa.

3.4. Le concept phylogénétique

3.4.1. Préparation du matériel biologique

L'extraction d'ADN peut se faire à partir de souches d'herbiers, de mycélium frais sur milieu liquide ou de mycélium lyophilisé ayant poussé sur milieu liquide. La marche à suivre pour chacune de ces possibilités se trouve en annexe 4.

3.4.2. Extraction d'ADN

Les extractions ont toutes été réalisées à l'aide du kit « Invisorb Spin Plant Mini Kit » (proposé par Invitex GmbH). La marche à suivre se trouve en annexe 5.

3.4.3. PCR

Une fois extrait, l'ADN peut être amplifié en un certain locus qui dépend des amorces choisies (tableau a.3, en annexe 6). La solution contenant l'ADN est chauffée jusqu'à environ 90°C afin que les deux brins se désappariant. Elle redescend jusqu'à environ 55°C afin de permettre à l'amorce de s'apparier avec le locus qui lui est assorti. L'ADN polymérase complète la séquence d'ADN en prenant exemple sur le grand brin, à partir de la petite amorce. Quelques minutes plus tard, la température remonte jusqu'aux environs de 70°C et la petite séquence d'ADN qui vient d'être assemblée se détache du grand brin. La température redescend à nouveau et tout peut recommencer. Ce cycle (tableau a.4, en annexe 6) est répété un grand nombre de fois afin de disposer d'une certaine quantité de cette séquence particulière. La marche à suivre est détaillée en annexe 6.

3.4.4. Electrophorèse

L'électrophorèse permet (dans une certaine mesure) de s'assurer que la réaction PCR a eu lieu et qu'il n'y a pas d'ADN contaminant. L'ADN, qui est chargé négativement, migre à travers un gel d'agarose grâce à l'influence d'un champ électrique. La marche à suivre est détaillée en annexe 7.

3.4.5 Révélation sous UV

Le BET et le GelRed s'associent aux molécules d'ADN. On peut exciter ces molécules à certaines longueurs d'onde (fluorescence). Si la réaction PCR a eu lieu, il y a une grande quantité d'ADN et la molécule peut s'y fixer. Comme il y a beaucoup d'ADN, il y aura beaucoup de molécules et une tache lumineuse apparaîtra sous les UV. Imprimer cette image pour se souvenir du résultat.

3.4.6. Purification du produit PCR

Le kit d'extraction d'Invisorb (MSB Spin PCRapace 500 proposé par Invitex GmbH) a été utilisé. La marche à suivre est détaillée en annexe 8.

3.4.7. Préparation des échantillons pour le séquençage

Préparer X x Y Eppendorf de 1.5ml (X étant le nombre de souches, Y étant le nombre d'amorces nécessaires pour tel marqueur). Chaque Eppendorf contient 3µl d'ADN purifié, 1µl de primer (tableau a.5 en annexe 9) et 8µl d'eau biomol. Je ne me suis pas occupée personnellement du séquençage. La personne qui s'en chargeait rajoutait 8µl de Master Mix (ddNTP, ADN polymérase, tampon) pour porter le volume final à 20µl. Le séquençage a été fait à l'aide de la machine Beckam Coulter CEQ2000XL DNA Analysis System.

3.4.8. Traitement des données

Les résultats du séquençage sont visualisés grâce au programme Sequencher 3.0 (sur Mac). Ce programme superpose les séquences obtenues avec les différentes amorces pour chaque souche. Lorsque les zones communes présentent des différences au niveau de certains nucléotides, il faut observer le chromatogramme. Selon la forme des pics, on décide d'accorder son crédit à l'une ou l'autre possibilité et on corrige la séquence en fonction de cette décision.

Pour chaque marqueur (ITS, EF, 28S et RPB2), les séquences obtenues pour chaque souche sont alignées l'une à l'autre à l'aide du programme Clustal X (sur Mac, version 1.5beta) [Thompson & al. 1994]. Les séquences obtenues sont transférées vers le programme Paup (version 4.0 beta 10) où l'alignement est vérifié et corrigé manuellement.

Paup est un programme qui permet d'obtenir la phylogénie la plus parcimonieuse à partir des séquences d'ADN alignées. Le programme calcule donc l'arbre phylogénétique qu'il convient de construire de manière à faire appel à un nombre minimal de mutations (insertions, délétions, tranversions et transitions). Les insertions et les dédoublements de séquences de grande importance ont été considérées comme un seul événement évolutif. Les insertions ont été traitées comme étant un cinquième type de base. Les régions dont l'alignement était ambigu ont été exclues de l'analyse. Le programme exécute également, à cent reprises et de manière aléatoire, une recherche heuristique en comparant la matrice globale par petits morceaux (bootstrap). Il peut ainsi évaluer la force des clades qu'il définit.

Chapitre 4 : Résultats

4.1. Le concept biologique de l'espèce

Les monocaryons de souches issues de différents lieux géographiques ont été croisés afin de déterminer s'il existe une et une seule espèce de *P. fraxinea* ou si un processus de spéciation a donné lieu à plusieurs espèces cryptiques.

Pour qu'il y ait reproduction sexuée, il faut que les hyphes de deux monocaryons dont les allèles des facteurs A et B diffèrent se rencontrent, subissent une plasmogamie, une caryogamie et une méiose. (Ensuite, des spores viables et fertiles à leur tour doivent être formées. On peut alors dire que les deux monocaryons appartiennent à la même espèce biologique). Les résultats présentés ci-dessous se basent sur l'observation de boucles. Leur présence indique que la plasmogamie a eu lieu et que les noyaux cohabitent l'un avec l'autre.

Le symbole « + » indique l'observation effective de boucles et le symbole « - » représente le fait qu'aucune boucle n'a pu être observée. Ces expériences ont également permis de confirmer que *P. fraxinea* présentait une sexualité tétrapolaire. Ce fait était supposé par de nombreux auteurs mais il semble n'avoir jamais été clairement défini.

4.1.1. Détermination des facteurs d'incompatibilité

Les différentes monospores issues d'une même souche sont croisées l'une avec l'autre afin de déterminer le groupe auquel chacune d'elle appartient. Ces expériences sont détaillées dans les tableaux qui se trouvent en annexe 10 (tableaux a.6 à a.11) et sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau 1).

Croisements des monospores de la souche mère...

...de Chine (n° MUCL 47003)	(1, 5) x (2, 8) et (3, 6) x (4, 10)
...du Japon (n° MUCL 47982)	(1, 7) x (11, 12) et (3, 4) x (5)
...de Corée (n° MUCL 45904)	(1, 13) x (2, 5) et (3, 7) x (4, 6)
...de Belgique (n° MUCL 47981)	(1, 2) x (6) et (3) x (5, 8)
...de France (n° MUCL 45888)	(1, 10) x (3, 5) et (2, 4) x (11, 14)
...des Pays-Bas (n° MUCL 41564)	(1, 2) x (4, 5) et (7, 8)
...du Canada (n° MUCL 40031)	(1, 3) x (5, 8) et (2, 7) x (4, 6)

tableau 1. Groupes des facteurs d'incompatibilité. Les numéros représentent les différents monocaryons issus d'une même souche mère. Au sein d'une parenthèse se situent les monocaryons d'un même groupe. Les croisements représentés sont ceux qui sont positifs.

Ci-dessous, à titre d'exemple (tableau 2), le tableau des croisements des monospores de la souche originaire de Chine (n° MUCL 47003).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
2			-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
3				+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
4					-	+	-	-	+	-	-	-	-
5						-	-	+	-	-	-	+	-
6							-	-	-	+	+	-	-
7								+	-	-	-	+	-
8									-	-	-	-	+
9										+	+	-	-
10											-	-	-
11												-	-
12													+
13													

tableau 2. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* de Chine (n° MUCL 47003)

Nous observons que les monocaryons (1, 5, 7 et 13) se croisent avec les monocaryons (2, 8 et 12). Les monocaryons (3, 6, et 9) croisent avec les monocaryons (4, 10 et 11). Nous avons donc nos quatre groupes d'incompatibilité. Les monocaryons (1, 5), (2, 8) (3, 6) et (4, 10) ont été choisis pour réaliser les tests suivants.

4.1.2. Croisements intra-continentaux

Les différentes monospores (sélectionnées comme ci-dessus) issues d'une même souche mère sont croisées avec celles d'une autre souche de *P. fraxinea* issue d'un autre pays du même continent. Ces expériences sont reprises dans les tableaux présentés en annexe 10 (tableaux a.12 à a.15). Ci-dessous sont présentés les tableaux (tableau 3 à 5) qui correspondent à une possibilité de croisement par continent.

4.1.2.1. Croisements des souches asiatiques

Ci-dessous, à titre d'exemple (tableau 3), les résultats du croisement des monocaryons de la souche mère de Chine (n° MUCL 47003) avec ceux de la souche mère de Corée (n° MUCL 45904).

Corée \ Chine	1	2	3	4	5	6	8	10
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+

tableau 3. Résultat des croisements des monocaryons de la souche mère de Chine avec ceux de la souche mère de Corée

La souche de Chine (n° MUCL 47003) est parfaitement compatible avec la souche de Corée (n° MUCL 45904). Elles font donc toutes les deux partie de la même espèce au sens biologique, il s'agit de deux populations différentes. Le fait que tous les croisements se révèlent positifs s'explique par le fait que les deux populations possèdent des allèles différents au niveau des facteurs d'incompatibilité. On pourrait par exemple dire que la souche de Chine possède les allèles 1 et 2 : (A₁ B₁), (A₁ B₂), (A₂ B₁) et (A₂ B₂) tandis que la souche de Corée possède les allèles 3 et 4 : (A₃ B₃), (A₃ B₄), (A₄ B₃) et (A₄ B₄).

4.1.2.2. Croisements des souches européennes

Ci-dessous (tableau 4), les résultats du croisement des monocaryons de la souche mère de Belgique (n° MUCL 47981) avec ceux de la souche mère de France (n° MUCL 45888)

Belgique \ France	1	2	3	4	5	10	11	14
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

tableau 4. Résultat des croisements des monospores de la souche mère de Belgique avec ceux de la souche mère de France

La souche de Belgique (n° MUCL 47981) est parfaitement compatible avec la souche de France (n° MUCL 45888). Elles font donc toutes les deux partie de la même espèce au sens biologique, il s'agit de deux populations différentes. Le fait que tous les croisements se révèlent positifs s'explique par le fait que les deux populations possèdent des allèles différents au niveau des facteurs d'incompatibilité.

4.1.2.3. Croisements des souches américaines

Ci-dessous (tableau 5), les résultats du croisement des monocaryons de la souche mère du Canada (n° MUCL 40031) avec les dicaryons de la souche mère des USA (n° MUCL 47692). Seul un nombre réduit de souches a été utilisé à cause de l'incapacité à obtenir des monocaryons de la souche mère des USA (voir chapitre matériel & méthode).

Canada	1	2	3	4	5	6	7	8
USA	+	+	-	+	-	+	+	+

tableau 5. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Canada avec les dicaryons de la souche mère des USA

On peut s'étonner de la présence de croisements négatifs au vu des analyses moléculaires et des résultats des autres croisements (tableau 5). Cette apparente incompatibilité ne peut être liée à la présence d'un allèle commun parce que les monocaryons 3 et 5 n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité (tableau 1). Les croisements auraient pu être analysés quelques jours plus tôt. Il y avait déjà énormément d'hyphes squelettiques (hyphes à paroi épaisse qui remplacent les hyphes génératifs au fil du temps ; ils ne

présentent pas de boucles), ce qui est peut-être la cause des deux croisements négatifs. Il semblerait que l'on peut néanmoins considérer que ces deux espèces font partie de la même espèce biologique.

4.1.3. Croisements inter-continentaux

Les différentes monospores issues d'une même souche mère sont croisées avec celles d'une autre souche de *P. fraxinea* issue d'un autre continent. Les résultats de ces expériences sont détaillés dans les tableaux présentés en annexe 10 (tableaux a.16 à a.22). Ci-dessous sont représentés quelques possibilités de croisements (tableaux 6 à 8).

- Croisement des monocaryons de la souche mère de Chine (n° MUCL 47003) avec ceux de la souche mère de France (n° MUCL 45888)

France \ Chine	1	2	3	4	5	6	8	10
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-

tableau 6. Résultat des croisements des monospores de la souche mère de Chine avec celles de la souche mère de France

La souche de Chine (n° MUCL 47003) est totalement incompatible avec celle de France (n° MUCL 45888) (tableau 6). Nous sommes donc en présence de deux espèces différentes au sens biologique du terme.

- Croisement des monocaryons de la souche mère du Canada (n° MUCL 40031) avec ceux de la souche mère de Belgique (n° MUCL 47981)

Belgique \ Canada	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

tableau 7. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Canada avec celles de la souche mère de Belgique

La souche du Canada (n° MUCL 40031) est totalement incompatible avec la souche de Belgique (n° MUCL 47981) (tableau 7). Nous sommes donc en présence de deux espèces différentes au sens biologique du terme.

- Croisement des monospores de la souche mère du Canada (n° MUCL 40031) avec celles de la souche mère de Chine (n° MUCL 47003)

Chine \ Canada	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	+	+	+	-	+
10	-	-	-	+	+	+	-	+

tableau 8. Résultat des croisements des monospores du Canada avec celles de Chine

La souche du Canada (n° MUCL 40031) est partiellement compatible avec la souche de Chine (n° MUCL 47003) (tableau 8). Quarante-huit résultats parmi soixante-quatre sont positifs. Les deux souches sont compatibles à 75%. Cela ne peut pas être dû à la possession d'un allèle commun parce que les résultats ne se disposent pas de manière à soutenir cette théorie. Ces résultats seraient alors plutôt liés au fait qu'il existe encore une certaine compatibilité entre les souches asiatiques et américaines.

Les résultats de toutes ces expériences sont synthétisés dans le tableau 9 ci-dessous. Au sein d'un même continent, les croisements sont toujours positifs. Les souches d'Europe sont isolées sur le plan reproducteur de celles d'Amérique et d'Asie. Les souches d'Amérique et d'Asie montrent une incompatibilité partielle.

	Chine	Japon	Corée	France	Belgique	Pays-Bas	Canada	USA
Chine		100%	100%	0%			75%	63%
Japon			100%		0%		79%	
Corée					0%		75%	
France					100%	100%	0%	
Belgique						100%	0%	0%
Pays-Bas								
Canada								100%
USA								

tableau 9. Synthèse des résultats concernant le concept biologique de l'espèce. Le pourcentage représente la compatibilité. Les pourcentages en italique n'ont pas été strictement observés comme tels à cause de la présence d'une trop grande quantité d'hyphe squelettiques (tableau 5 ci-dessus et tableau a.15 en annexe 10). En rose : redondance des informations ; en vert : croisements non réalisés

Ces résultats peuvent également se résumer en un petit schéma (figures 8 et 9).

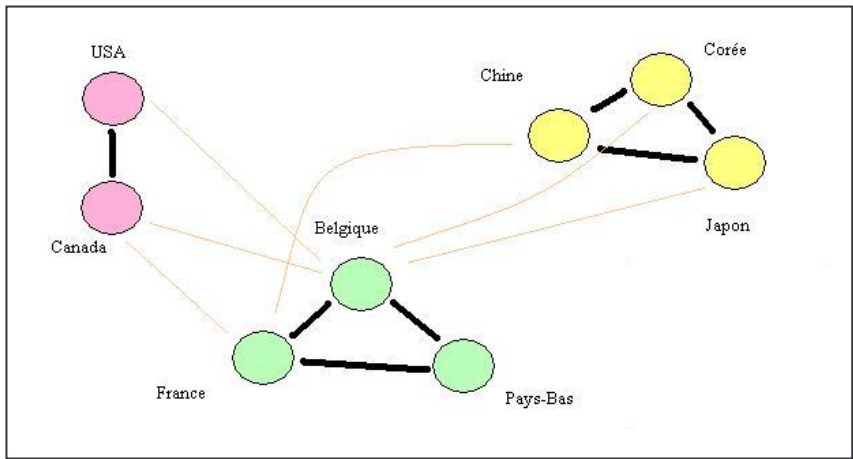
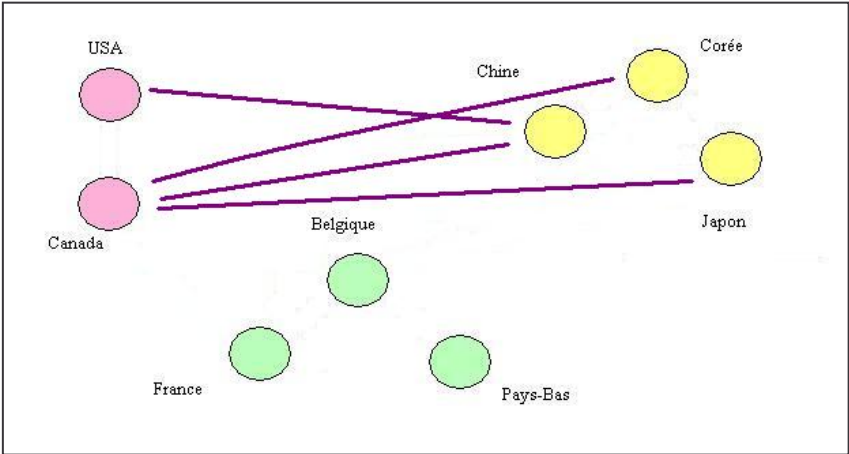


figure 8. 1^{er} schéma représentant les croisements effectués. Les épaisses lignes noires représentent les croisements totalement compatibles (100% de compatibilité). Les fines lignes oranges représentent les croisements effectués et qui se sont révélés totalement incompatibles.

figure 9. 2^{ème} schéma représentant les croisements effectués. Les lignes violettes moyennement épaisses représentent les croisements partiellement positifs (environ 75% de compatibilité).



4.2. Le concept phylogénétique de l’espèce

Dans le cadre de ces expériences, l’intérêt a été porté sur les marqueurs nucléaires ITS (non-codants), EF, 28S et RPB2 (codants). Les ITS et les 28S sont des marqueurs ribosomiaux, contrairement aux EF et aux RPB2. Tous les arbres phylogénétiques des analyses basées sur les marqueurs individuels et leur description respective se trouvent en annexe 11 (figures a.1 à a.5). Les informations relatives aux analyses sont reprises dans le tableau 10 ci-dessous. Ci-dessous également, les phylogénies basées sur les analyses des marqueurs combinés (ITS, EF et 28S en figure 10 et ITS, EF, 28S et RPB2 en figure 11).

(Remarque : L’analyse a tout d’abord été menée sur un nombre beaucoup plus important de souches de *P. fraxinea*. Les souches possédant des séquences identiques n’ont cependant pas été incluses dans les analyses finales. Cela permet également de réduire le temps de calcul. De manière générale, les souches qui ont été conservées sont celles qui sont communes aux trois autres marqueurs et, bien entendu, les souches utilisées pour les croisements (concept biologique).)

	Nombre d'arbres	Longueur	CI	RI	Nombre de caractères	Nombre de souches
ITS	425	299	0.883	0.893	721	33
EF	32	377	0.806	0.775	734	30
28S	14	119	0.815	0.868	655	32
RPB2	3	164	0.872	0.771	677	14
3 marqueurs (ITS+EF+28S)	84	532	0.846	0.821	2110	21
4 marqueurs	1	587	0.893	0.771	2787	10

tableau 10. Informations relatives aux différentes analyses phylogénétiques

Les différentes analyses réalisées, tant sur la base des marqueurs individuels que sur la base des marqueurs combinés, sont concordantes et résolvent à l'intérieur du concept morphologique de *P. fraxinea* (sensu lato) trois clades terminaux variablement supportés en fonction des marqueurs. Ces trois clades correspondent parfaitement à la distribution géographique des spécimens analysés, à savoir un éclatement de *P. fraxinea* s.l. en un clade européen, Est asiatique et Nord-Est américain. Le clade européen est toujours supporté : 99% pour les ITS, 73% pour les EF, 67% pour les 28S, 100% pour les trois et les quatre marqueurs (tableau 11).

Les relations entre ces trois clades varient en fonction des marqueurs utilisés. Dans la plupart des analyses et des topologies résultantes, ces trois clades forment un super-clade monophylétique (le clade *P. fraxinea* s.l.). Le clade *P. fraxinea* s.l. n'est cependant soutenu que dans l'analyse basée sur l'addition des quatre marqueurs (tableau 11). Dans les autres analyses (individuelles ou groupées), le clade *P. fraxinea* s.l. n'est pas supporté. Les analyses basées sur les séquences ITS résolvent avec un support important les clades européen et américain en un clade plus large (les clades européen et nord américain sont des clades soeurs), tandis que le clade asiatique est isolé et basal (les clades européen et américain dérivent du clade est asiatique). Par contre les analyses basées sur les EF et les 28S ne résolvent pas ces clades.

	Asie	Europe	Amérique	Amérique-Europe	Asie-Europe	<i>P. fraxinea</i> s.l.
ITS	42	99	92	98		46
EF	97	73	98		20	59
28S	97	68	1			
RPB2	64			37		56
3 marqueurs	100	100	99	97		47
4 marqueurs	100	100		97		90

tableau 11. Support des clades de *P. fraxinea* s.l. (bootstrap) pour les différentes analyses phylogénétiques

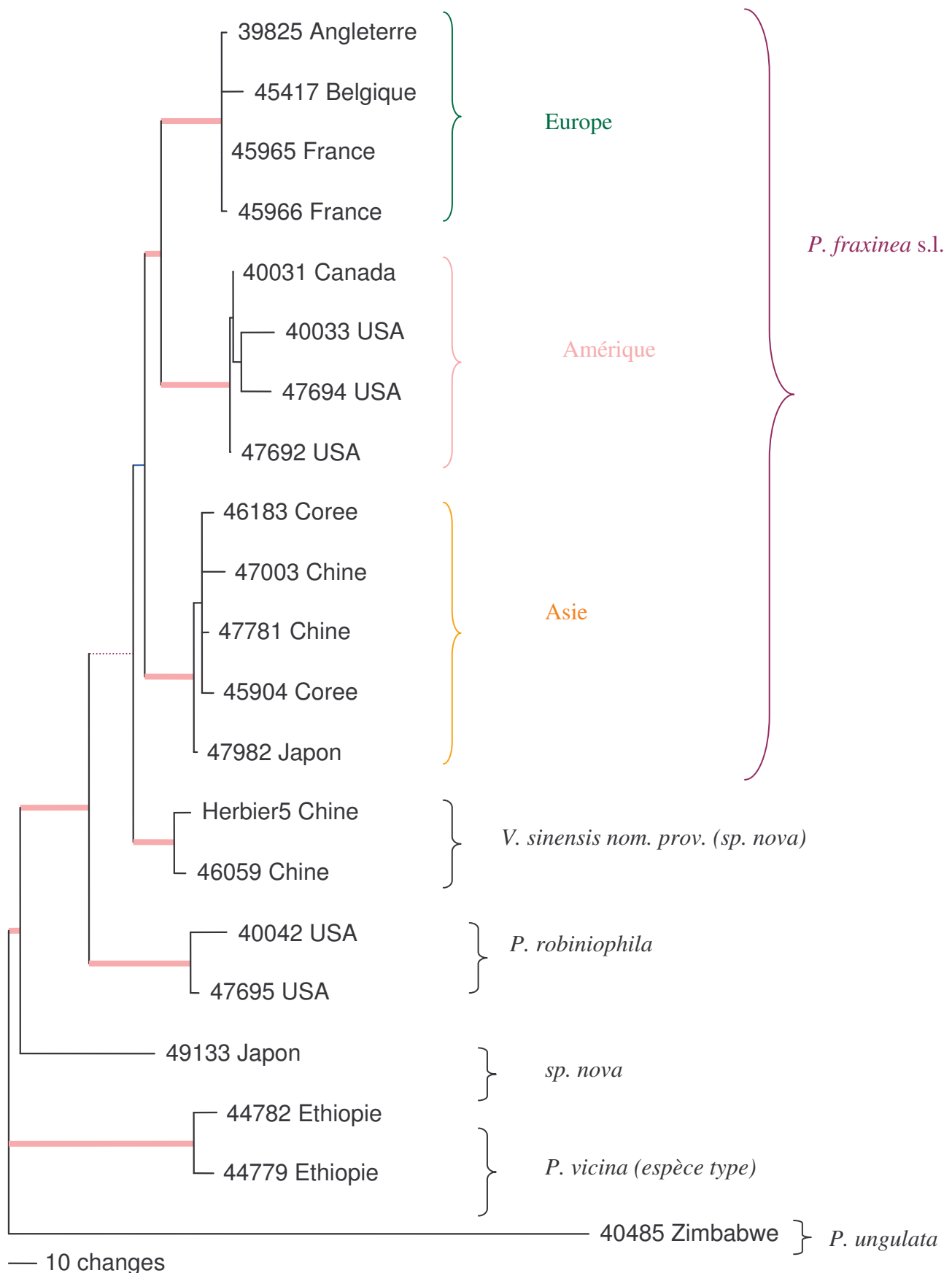


figure 10. Phylogénie basée sur l'addition de trois marqueurs (les ITS, EF et 28S)

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%

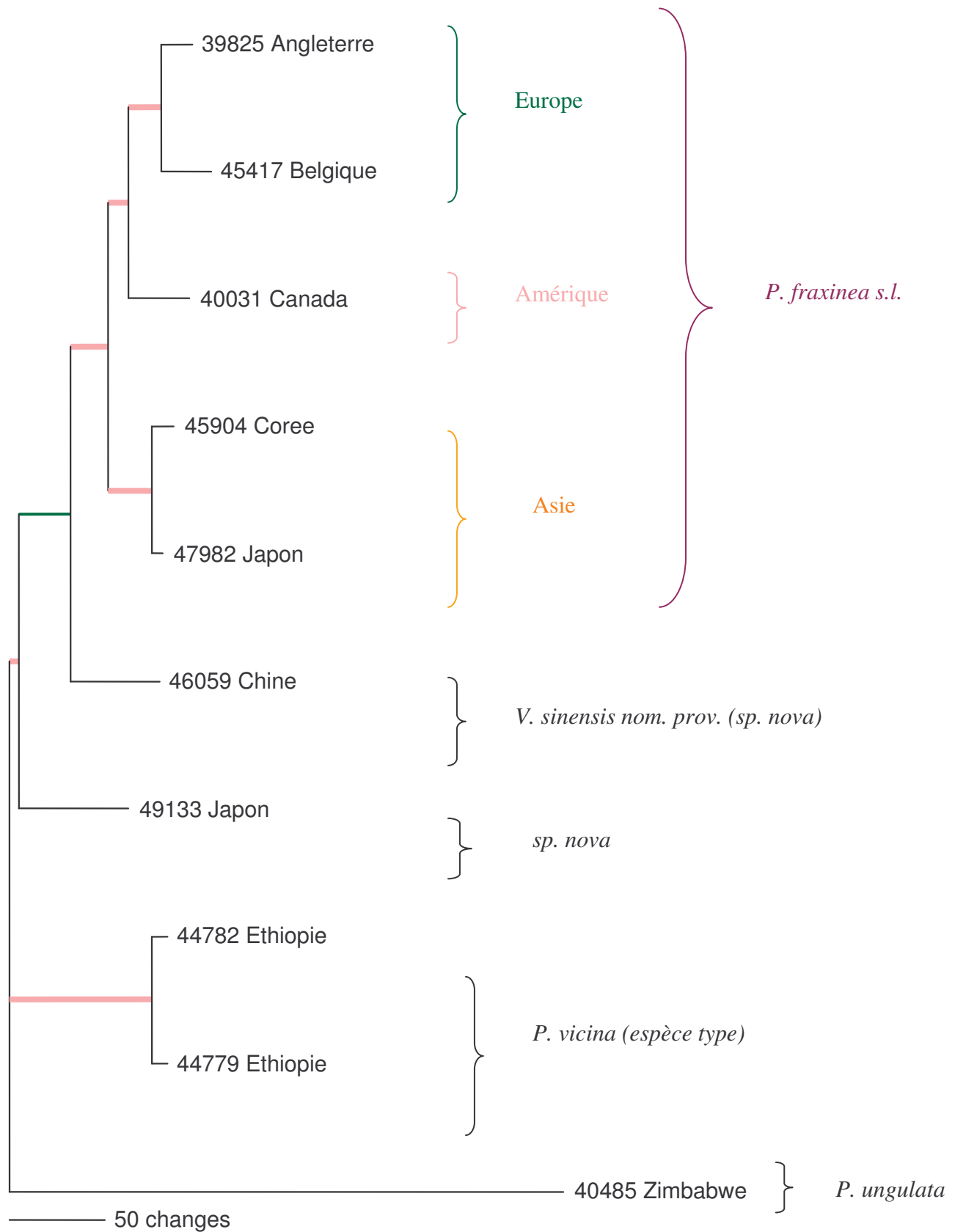


figure 11. Phylogénie basée sur l'addition de quatre marqueurs (les ITS, EF, 28S et RPB2)

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%

4.2.1. Les autres espèces

L'outgroup est *P. latissima* (originaire de Singapour) ou *P. ungulata* (originaire du Zimbabwe) selon l'analyse considérée. La deuxième espèce est plus proche de *P. fraxinea* que la première. Les relations qu'entretient *P. fraxinea s. l.* avec les autres espèces sont plus difficiles à déterminer. En effet, si notre étude nous donne une bonne résolution des clades terminaux, celle-ci est nettement moins bonne au niveau des relations entre les espèces. Ainsi, les souches de *P. vicina* originaires d'Ethiopie se groupent toujours ensemble, au même titre que les *P. robiniophila* (Amérique) ou les *V. sinensis* mais le positionnement de ces taxons les uns par rapport aux autres varient d'une analyse à l'autre.

Outre les *P. fraxinea s.l.*, notre étude a permis de mettre en évidence quatre autres nouvelles espèces du genre *Vanderbylia* : trois nouvelles espèces asiatiques (46059 (*V. sinensis* nom. prov.), 46931 et 46928 en Chine et 49131 à 49133 au Japon) ainsi qu'une nouvelle espèce africaine (47466 au Gabon).

Chapitre 5 : Discussion

5.1. Le concept biologique

Les croisements des différents monocaryons issus d'une même souche-mère ont confirmé que *P. fraxinea* s.l. présente une sexualité de type hétérothallique tétrapolaire [Stalpers 1978].

Les croisements effectués entre souches originaires d'un même continent se sont tous montrés positifs. On peut, par conséquent, parler d'une même espèce biologique au sein d'un même continent. Cela suppose un préalable évident : l'absence d'erreurs d'identification. En effet, certains auteurs [Dai (2002), Zhao (1992), Nunez (2000), herbiers anonymes,...) confondent parfois *P. fraxinea* et *P. robiniophila*. Leur morphologie n'est pourtant pas similaire, ce dernier formant des carpophores beaucoup plus étendus à la consistance plus légère. Les confusions viennent entre autres du fait qu'ils identifieraient d'office comme *P. robiniophila* un *P. fraxinea* qu'ils trouveraient sur le tronc d'un *Robinia pseudoacacia*.

Les croisements entre les souches américaines de *P. fraxinea* et de *P. robionophila* se montrent inter-incompatibles. Cela démontre, si nécessaire, l'existence de deux espèces différentes en Amérique du Nord. Ce fait est également soutenu par l'éloignement de *P. robiniophila* par rapport à *P. fraxinea* au niveau des analyses phylogénétiques.

Les croisements effectués entre les souches originaires de différents continents révèlent, en revanche, une situation plus complexe et l'existence de plusieurs groupes soit totalement, soit partiellement incompatibles. En effet, si les croisements entre, d'une part, les souches d'Europe et les souches d'Amérique et, d'autre part, les souches d'Europe et les souches d'Asie se sont tous révélés négatifs (incompatibilité totale), les croisements confrontant les souches d'Amérique aux souches d'Asie ont révélé une compatibilité partielle (de 63 à 79% de croisements positifs).

Il existe donc, à l'intérieur du concept morphologique de *P. fraxinea*, deux groupes inter-incompatibles auxquels le concept (théorique) biologique de l'espèce pourrait s'appliquer, à savoir, d'une part, une espèce à distribution européenne génétiquement isolée d'une seconde espèce à distribution disjointe asiatique et nord américaine, d'autre part. L'espèce européenne représente le *P. fraxinea sensu stricto* (s.s.). Toutefois, « l'espèce théorique » asiatico-américaine ne montre qu'une compatibilité interne partielle qui semble aléatoire (63 à 79% de croisements positifs). La présence d'allèles différents dans deux populations d'une même espèce aurait entraîné une compatibilité complète. D'autre part, la disposition des résultats ne peut s'expliquer par la possession d'un allèle commun aux deux groupes. Les croisements négatifs ne peuvent donc pas être attribués à la présence d'un allèle similaire.

L'incompatibilité partielle observée indique un certain niveau d'isolement incomplet entre ces souches. Le concept d'espèce biologique au sens strict ne s'applique donc pas ici, les barrières d'incompatibilité n'étant que partielles. Les populations pourraient donc, du moins en théorie, se croiser (même si cette rencontre semble relativement peu probable en nature). Remarquons toutefois que la possibilité de plasmogamie in vitro ne présume en rien de la capacité de former des basidiospores fertiles (cf Chapitre Introduction).

Ce phénomène de compatibilité partielle entre des populations issues de zones géographiques différentes a déjà été mis en évidence chez d'autres espèces fongiques : chez les *Gibberella* Sacc. (Ascomycota) [Lepoint, 2006], chez *Armillaria s.l.* (Vahl. :Fr.) P. Kumm [Coetzee & al., 2000], chez les *Polyporus* Fr. [Silveira & Wright, 2002 ; Krüger, 2002], chez les *Pleurotus* (Jacq. Fr.) P. Kumm. [Zervakis & al., 2004], chez les *Omphalotus* (Schw.) Sacc. [Peterson & Hughes, 1999],... Zervakis & al. soulignent qu'une telle situation nous amène aux limites de la définition du concept biologique de l'espèce. Ce concept a tendance à mettre en évidence des caractères plésiomorphes, qui ne sont donc pas indicateurs des relations récemment établies. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de confronter les données biologiques à d'autres concepts, la phylogénie par exemple.

5.2. Le concept phylogénétique

Les marqueurs utilisés pour construire les différentes phylogénies ont été choisis en vue d'être complémentaires l'un de l'autre. Les marqueurs non codants (comme les ITS par exemple) ne sont pas soumis à la sélection directe (mais notons qu'ils n'en sont pas toujours totalement indépendants non plus à cause de la proximité de séquences codantes sur le chromosome). Ils peuvent subir des mutations sans que les cellules en subissent quelque conséquence que ce soit. On peut donc en conclure qu'ils sont plus riches en informations concernant la proximité des organismes les uns par rapport aux autres. Néanmoins, on peut argumenter à l'encontre de cette théorie puisque ces éventuelles variations peuvent quelques fois être si nombreuses qu'elles ne contiennent plus la moindre information, les caractères communs pouvant être le résultat de très nombreuses mutations successives (phénomène d'homoplasie).

L'utilisation des séquences codantes ne résout pas pour autant le problème. Celles-ci codent pour des fonctions souvent essentielles à la vie des cellules. Cette fonction les soumet à une pression de sélection plus rigoureuse qui a pour conséquence de conserver la séquence telle quelle au sein d'organismes parfois très éloignés. Notons que le plus souvent, la pression est relâchée au niveau du troisième nucléotide de chaque codon à cause de la redondance de leur correspondance vis à vis des acides aminés. Quelques fois, certaines zones d'un gène sont soumises à une sélection plus forte que d'autres, comme par exemple celles qui correspondent aux sites catalytiques d'une enzyme.

D'autre part, les séquences codantes ne sont pas toutes soumises à la même sélection. L'évolution de chaque gène pris séparément ne représente pas strictement l'évolution des organismes eux-mêmes.

Ces notions soulignent l'intérêt de comparer la phylogénie de plusieurs gènes, d'une part, et de les combiner en une analyse unique, d'autre part [Taylor & al., 2000].

Mise à part la phylogénie du marqueur 28S (qui ne donne pas de résolution au niveau qui nous intéresse), toutes les phylogénies individuelles des marqueurs ainsi que les analyses des facteurs combinés révèlent que *P. fraxinea* est un clade monophylétique avec une forte structuration interne basée sur l'origine géographiques des souches et résolvant trois clades « phylogéographiques ». Ces sub-divisions sont toujours très bien supportées (tableau 12). Les analyses menées ne nous permettent pas de déduire les relations des taxons inclus dans l'analyse les uns par rapport aux autres à cause de la faiblesse des supports des branches internes mais elles ont néanmoins souligné que *P. robiniophila*, *P. vicina*, *V. sinensis* (nom. prov.) formaient des clades clairement distincts de celui de *P. fraxinea*. De plus, *P. fraxinea* et *P. robiniophila* se sont montrés incompatibles lorsqu'ils étaient confrontés l'un à l'autre. Les analyses ont également mis en évidence l'existence de nouvelles espèces, deux en Chine, une au Japon et une autre encore au Gabon.

5.3. Confrontation de ces 2 concepts

Chacun des deux concepts (biologique et phylogénétique) isole les souches de *P. fraxinea* d'Europe en une espèce distincte. *Perenniporia fraxinea sensu stricto* est donc une espèce génétiquement et biologiquement distincte. En ce qui concerne les souches d'Amérique et d'Asie, les résultats sont moins tranchés. Les analyses phylogénétiques les séparent en deux clades distincts tandis que les croisements témoignent d'une certaine inter-compatibilité (cf. ci-dessus). Celle-ci n'est, toutefois, que partielle. De plus, les analyses biologiques et phylogénétiques présentent une certaine incohérence l'une vis à vis de l'autre. L'observation d'une inter-compatibilité partielle entre les souches d'Amérique du Nord et d'Asie aurait pu présager d'une proximité génétique, qui se serait alors reflétée dans les analyses phylogénétiques. Les souches d'Amérique du Nord et celles d'Asie auraient dès lors formé un clade monophylétique constitué de deux sous-clades sœurs, les spécimens de ces deux clades montrant encore une certaine compatibilité. Or, cette configuration n'apparaît dans aucune de nos analyses. Les analyses des facteurs combinés (trois marqueurs et quatre marqueurs), ainsi que celles des ITS et des RPB2 font apparaître une autre parenté : ce sont les souches du *P. fraxinea* s.s. (les souches d'Europe) et du *P. fraxinea* d'Amérique qui s'organisent en clades sœurs bien qu'elles soient totalement incompatibles entre elles. Ces clades sont très fortement supportés par l'analyse des marqueurs combinés avec un bootstrap de 97% pour le clade américano-européen et 99 et 100 %, respectivement, pour les sous-clades américain et européen. A l'inverse, les souches de *P. fraxinea* d'Asie sont isolées et forment un clade basal par rapport aux deux autres (100% de bootstrap). L'analyse des EF présente une autre configuration : les souches d'Europe et

d'Asie forment deux clades sœurs mais ce groupement n'est pas supporté (20%). L'analyse des 28S n'apporte pas d'informations à ce sujet.

Cette apparente contradiction a déjà été mise en évidence pour d'autres complexes d'espèces fongiques, notamment par Zervakis & al. (2004) chez les *Pleurotus* (Pleurotes). Des analyses phylogénétiques basées sur les ITS ont révélé d'une part, un parallélisme entre l'organisation des souches étudiées et leur origine géographique et, d'autre part, une non concordance des relations de compatibilité vis à vis de cette organisation. Ainsi, *Pleurotus cystidiosus* O. K. Miller (USA) et *Pl. smithii* Guzman (Mexique) forment des clades sœurs, ce qui est assez cohérent, ces deux espèces étant « géographiquement » proches. Elles sont cependant totalement incompatibles. A l'inverse, les clades de *Pl. cystidiosus* (USA) et de *Pl. abalonus* Han & al. (Taiwan) sont plus distantes dans la phylogénie, ce qui n'est, à nouveau, pas vraiment surprenant, étant donné leur distribution géographique. Pourtant, les souches de ces clades (*Pl. abalonus* et *Pl. cystidiosus*) montrent entre elles une compatibilité partielle dont l'ampleur varie selon les populations étudiées. Ces résultats montrent des similitudes avec *P. fraxinea* sensu lato.

Il existe également des exemples similaires dans d'autres groupes d'organismes comme les lichens [Culberson, 1972], les bryophytes [Steere, 1696], les ptéridophytes [Kato & Iwatsuki, 1983] et de très nombreuses familles de plantes [Hsu, 1983 ; Wen, 1999]. Lang & al. [2007] se sont penchés sur la répartition des espèces du genre *Castanea*. Ces Fagaceae sont très largement distribuées à travers tout l'hémisphère Nord dans les forêts de feuillus caduques. Des analyses phylogénétiques menées sur plusieurs régions du génome chloroplastique ont montré, comme dans le cas de *P. fraxinea*, que les souches de *Castanea* originaires d'Asie (Chine) formaient un clade basal très bien supporté avec les souches originaires d'Europe et d'Amérique.

5.4. Le processus de spéciation

Peterson & Hughes [1999] soulignent à l'aide de nombreux exemples de la littérature que l'inter-compatibilité partielle entre des zones géographiques distinctes ne peut être que relictuelle et que cette situation serait la preuve de l'existence passée d'une espèce ancestrale plus largement distribuée. On parle dans ce cas de spéciation allopatrique en cours (incipient speciation) parce que les populations n'échangent plus de gènes depuis très longtemps. (Le concept de spéciation allopatrique désigne le processus de formation d'espèces nouvelles via une séparation géographique [Foret, 2004].)

De la même manière, Zervakis & al. [2004] (cf. ci-dessus) interprètent leurs résultats comme étant un vestige de la nature unique d'une espèce ancestrale. Ces auteurs suggèrent que ce processus de spéciation

ne serait pas achevé, comme le suggèrent les possibilités de croisement et la ressemblance morphologique (morphological stasis). Les divergences génétiques et les barrières de stérilité vont probablement s'accroître au cours du temps (sauf dans le cas d'un éventuel phénomène d'hybridation). Pour le moment, comme il existe encore une certaine compatibilité, on peut supposer que la séparation est relativement récente sur l'échelle des temps géologiques.

Le même raisonnement pourrait donc être appliqué à notre cas pour *P. fraxinea*. Vraisemblablement, à l'heure actuelle, les *P. fraxinea* d'Asie et d'Amérique ne sont plus amenés à se croiser de manière naturelle. Si cela avait été le cas, nous aurions pu observer, au niveau de la phylogénie, un clade européen et un clade américano-asiatique avec une structuration interne moins développée ou éventuellement des phénomènes de populations (ou d'individus) hybrides [Kausrud & al., 2006]. En effet, l'hybridation conduirait à un échange continu de gènes, amenant ainsi à une certaine homogénéisation, une atténuation de la variation génétique dans un pool commun. Les populations de *P. fraxinea* d'Asie sont donc, dans les faits, isolées de celles d'Amérique. Cet isolement est lié à des facteurs extérieurs, comme des barrières géographiques naturelles (océan, très longue distance,... [Lickey & al., 2002]), et non à une barrière biologique intrinsèque stricte (incompatibilité partielle). Néanmoins, la barrière géographique étant extrinsèque (non intégrante à la biologie de l'espèce), cela ne devrait pas constituer un critère valable pour la délimitation (théorique) des espèces (cf chapitre « Introduction »).

Ainsi, les populations de *P. fraxinea* seraient, elles aussi, en voie de spéciation allopatrique (spéciation au sens biologique du terme). Leur isolement (géographique) n'a sans doute pas (encore) permis le développement de mécanismes intrinsèques d'incompatibilité qui empêcheraient une éventuelle hybridation (absence de pression de sélection au niveau des gènes de la sexualité, absence de compétition favorisant cette sélection,...). Comme le souligne Lepoint [2006], le concept phylogénétique présente la réalité d'une situation avant que les effets ne puissent être perçus au niveau des concepts biologiques et morphologiques. De plus, comme les populations d'Asie et d'Amérique se trouvent dans des forêts similaires (forêts humides sous climat tempéré avec une canopée dominée par les Fagaceae Dumortier, les Pinaceae Lindley,...), leur évolution est soumise à une sélection stabilisante [Mueller & al., 2001].

Il est possible qu'en revanche, l'Europe ait plus longtemps possédé une jonction avec l'Asie. La spéciation aurait alors pu être de type sympatrique (formation d'espèces nouvelles dans une même aire géographique [Foret, 2004]) ou parapatric (formation d'espèces nouvelles à partir de populations situées dans des aires géographiques adjacentes [Ridley, 2004]) et les populations auraient érigé petit à petit des mécanismes les isolant les unes des autres (cf. le paragraphe Biogéographie, ci-dessous).

Ainsi, considérer qu'il existe trois espèces correspondant au champignon habituellement appelé *P. fraxinea* n'est pas rigoureusement correct d'un point de vue biologique (quoique l'on n'ait pas expérimenté

ce concept dans les moindres détails puisque les expériences se basent sur la plasmogamie et non sur la caryogamie). Néanmoins, il ne semble pas y avoir de raison pour que les populations d'Asie et d'Amérique se rencontrent dans la nature, à moins, bien sûr, que le commerce (de bois par exemple) ou la naturalisation d'espèces importées (comme le *Robinia pseudoacacia*, apporté d'Amérique en Asie et en Europe) ne permette à des spores originaires d'un continent de se mêler efficacement et durablement aux populations d'un autre continent.

5.5. Quelques contre-exemples

Il est évident que toutes les espèces ne suivent pas toutes le même chemin évolutif et que, par conséquent, les regroupements formés par les analyses moléculaires et les tests de compatibilité ne sont tous semblables pour tous les organismes. Par exemple, des analyses moléculaires (ITS et gène de la β -tubuline) de populations de *Grifola frondosa* [Shen & al., 2002] ou d'*Armillaria mellea* (ITS et IGS) [Coetzee & al., 2000] mettent en évidence que les souches d'origine asiatique se regroupent en un clade sœur par rapport aux souches d'origine américaine. Pour ce qui est du dernier exemple, le clade asiatique se groupe avec le clade américain, tandis que le clade européen est positionné à la base. Les croisements entre les souches d'Asie et celles d'Europe sont positifs et ceux entre l'Asie et l'Amérique du Nord-Est sont partiellement positifs.

Un autre chemin évolutif est illustré par l'exemple de *Schizophyllum commune* qui montre une interfertilité mondiale et très peu de structure phylogéographique [Shen & al., 2002]. Dans un autre registre, chez *Xerula furfuracea* [Mueller & al., 2001], dont la morphologie est fort variable, l'étude de la phylogénie basée sur les ITS n'a pas mis en évidence de clades correspondant aux origines géographiques des souches.

Quoi qu'il en soit, les exemples qui reflètent une certaine connexion entre l'Asie et l'Amérique sont très nombreux.

5.6. Biogéographie

Comme nous ne disposons pas de fossiles de champignons (sauf cas exceptionnel), c'est à l'aide de fossiles des plantes que l'on essaye de comprendre le passé. Les théories développées pour les plantes peuvent ensuite servir de modèle pour comprendre la répartition des champignons.

Deux grands types de scénarios sont envisageables. La première hypothèse est celle d'une espèce ancestrale présente sur tout l'hémisphère Nord ; des barrières auraient ensuite isolé ces populations les unes des autres. L'autre hypothèse situe l'espèce ancestrale en un lieu à partir duquel, par bonds, des petites populations auraient colonisé d'autres terres.

Ce premier scénario a été suggéré par Zervakis & al. [2004] et Lickey & al. [2002] dont les résultats de l'étude concernant, respectivement les pleurotes et les *Artomyces pyxidatus* (Pers. : Fr.) Jülich concordent avec ceux de *P. fraxinea*. L'espèce ancestrale aurait eu une distribution très large sur tout l'hémisphère Nord (distribution laurasienne) à une époque où une forêt caducifoliée pan-tempérée couvrait sans doute en continu toute la zone entre l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Asie (cette période pourrait par exemple être antérieure à l'éocène (40 millions d'années) [Graham, 1999]). Sa dispersion aurait donc eu lieu avant l'apparition d'éventuelles barrières géographiques (par exemple, lors de la disparition du pont nord atlantique (à l'Eocène) ou, plus récemment, lors de disparition du pont du détroit de Béring). Les populations des différents continents, même après leur séparation, auraient pu continuer à échanger des gènes les unes avec les autres aux périodes d'occurrence de ce lien lors des glaciations. Par exemple, à la fin du Crétacé, un pont a relié l'Amérique du Nord à l'Eurasie, le détroit de Béring. Des études menées sur du pollen fossile de plantes proches des Juglandaceae, des Ulmaceae et des Betulaceae actuelles le prouvent [Wolfe, 1975]. De même, au Pléistocène, les glaciations ont formé un pont entre l'Amérique du Nord et l'Asie. [Zervakis & al., 2004]. Pour expliquer dès lors que toutes les espèces ne soient pas présentes en tous points du globe, Axelrod [1986, in Wu & al., 2000] a proposé l'idée que de nombreuses espèces se soient éteintes en différents lieux durant les glaciations du Pléistocène. De même, nous savons que le climat a été très fortement perturbé durant l'Oligocène [Wolfe, 1975].

Il n'existe pas, dans la littérature, d'exemples relatifs au règne fongique qui soutienne la deuxième hypothèse. Ce scénario, illustré pour les plantes, propose que l'espèce ancestrale se soit développée en un endroit et qu'elle ait migré petit à petit d'un point à un autre au moment de ces glaciations. Dans ce cas, et c'est ce qu'ont montré Lang & al. [2007] à propos de *Castanea*, la diversité en termes de populations et d'espèces proches est plus grande en ce lieu d'apparition de l'espèce. A partir de l'Asie de l'Est, ces arbres auraient commencé à coloniser les autres continents durant l'Eocène. Ces échanges ont également pu s'effectuer durant les glaciations de l'Oligocène. Ils ont également souligné que le clade des *Castanea* asiatiques se positionnait à la base des clades européen et américain. Aujourd'hui, ces espèces sont indistinguables au niveau de la morphologie mais sont interstériles au niveau intercontinental. Pour découvrir ce qu'il en est exactement dans le cas de *P. fraxinea*, des études moléculaires au niveau d'autres gènes ou du génome entier (AFLP, GIS), et sur de plus nombreuses souches, devraient être réalisées.

Quoi qu'il en soit, comme l'a proposé Wen [2001, in Mueller & al., 2001], il existe plusieurs routes de migration possibles. La distribution disjointe des champignons (et des plantes auxquelles ils sont associés) ne représente pas un unique événement, chaque histoire a pu être affectée différemment par le climat et la

géologie. Les informations dont nous disposons à propos de *P. fraxinea* ne nous permettent pas de trancher en faveur de l'un ou l'autre scénario.

5.6.1. Le paradoxe de Ryvardeen [Ryvardeen, 1991]

Ryvardeen présente la distribution des genres de polypores comme un paradoxe. Il explique que la plupart des genres ont une distribution mondiale. Il y a deux possibilités : soit chacun des groupes qui présente cette situation était déjà fortement diversifié au Gondwana (il y a 150 MA, l'évolution a ensuite été plus lente), soit les mécanismes de dispersion sont plus efficaces qu'il n'y paraît de prime abord. Le problème est le suivant : les plantes vasculaires, hôtes des polypores, ont commencé leur étendue au Coniferopsida (il y a 230 MA). Les champignons ont donc eu quatre-vingt à cent millions d'années pour s'étendre sur tout le continent solitaire et se diversifier (l'évolution est donc très rapide). Ensuite, durant les cent millions d'années suivantes, ils ne se seraient presque plus diversifiés. Si on rejette cette hypothèse, il faut accepter que les mécanismes de dispersion sont extrêmement efficaces mais il semble alors illogique de ne pas observer plus d'homogénéité entre les différentes régions à l'heure actuelle.

Chapitre 6 : Conclusion

6.1. La taxonomie

Le nom qu'il conviendrait de donner au champignon que l'on nomme *Perenniporia fraxinea* reste à déterminer. L'épithète de genre qui lui convient est *Vanderbylia*. La situation est plus complexe en ce qui concerne celui de l'espèce et nécessite de plus amples recherches bibliographiques. Néanmoins, comme tous les auteurs utilisent le nom *P. fraxinea*, il serait sans doute plus judicieux de le conserver afin de ne pas ajouter davantage de confusion à la taxonomie.

6.2. Les concepts d'espèce

P. fraxinea sensu auctores est une espèce à large distribution géographique dans la zone tempérée de l'Hémisphère Nord, allant de l'Est de l'Amérique du Nord à l'extrême Est de la Chine jusqu'au Japon, en passant par l'Europe. Le concept de cette espèce avait été établi sur la base unique du concept morphologique. Suivant le concept phylogénétique, il faudrait scinder *P. fraxinea* en trois espèces. Il y aurait donc une espèce par continent (en Amérique du Nord, en Europe et en Asie de l'Est). Le nom serait alors donné à l'espèce européenne puisque c'est en Europe que le type a été décrit.

Si on appliquait le concept biologique à la lettre, il n'y aurait que deux entités : une pour l'Europe et une pour l'ensemble Amérique-Asie. L'analyse des résultats nous conduit à conclure à l'existence de trois espèces distinctes, deux d'entre elles possédant toutefois un potentiel d'hybridation : l'espèce nord américaine et l'espèce est-asiatique. Toutefois, ce potentiel est probablement uniquement théorique. Comme l'analyse de diversité génétique le démontre, il n'y a vraisemblablement plus d'échanges génétiques entre ces différentes espèces, du fait des barrières géographiques.

L'origine et l'époque de cette séparation restent incertaines dans notre cas. D'autres auteurs, pour d'autres espèces, évoquent des temps de divergence de millions d'années [Vilgalys & Sun, 1994 (*Pleurotus*), Coetzee & al., 2000 (*Armillaria*)].

D'autre part, il est probable que dans notre cas, comme il en allait chez d'autres champignons, la compatibilité sexuelle chez les populations actuelles soit un caractère plésiomorphe (relique de l'espèce commune ancestrale). Ce n'est donc pas un bon indicateur des relations phylogénétiques, il ne permet pas nécessairement de déterminer les limites des espèces chez les champignons [Zervakis & al., 2004]. De plus, comme Hibbet et Donoghue le soulignent [in Zervakis & al., 2004], la valorisation d'un concept qui crée de plus nombreuses espèces permet de protéger une plus large diversité génétique dans la nature. Peut-être vaut-il mieux avoir tendance à bien séparer les organismes qui constituent la biodiversité de manière à nous inciter à faire davantage d'efforts en vue de les protéger.

6.3. Deux nouvelles espèces

Il n'est plus question de parler des *P. fraxinea* issus de différents continents sous forme de populations, il s'agit là d'espèces différentes. Ce nom reste celui de l'espèce européenne. L'espèce américaine et l'espèce asiatique porteront un nouveau nom que je leur choisirai après avoir réalisé les observations morphologiques en vue d'une publication.

Perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence, via les concepts biologique et phylogénétique de l'espèce, que l'espèce morphologique *Perenniporia fraxinea* représente un complexe d'espèces. Nous retiendrons donc ce nom pour l'espèce européenne. Il est néanmoins souhaitable d'effectuer des tests de croisements supplémentaires sur un plus grand nombre d'espèces américaines en les confrontant aux souches asiatiques.

Avant de nommer les deux nouvelles espèces, il serait intéressant d'étudier plus profondément leur morphologie afin de savoir si on peut véritablement parler d'espèces cryptiques (en effet, la phylogénie révèle souvent des « taxa » non encore discernables sur le plan morphologique) ou s'il existe de subtiles nuances.

Il serait également appréciable d'élargir le nombre de souches séquencées au niveau du gène RBP2. En effet, pour obtenir une phylogénie riches en informations, il est important de disposer de plusieurs gènes et d'un bon nombre de souches issues de différentes régions géographiques. Comme il est très délicat d'amplifier ce gène, on peut imaginer de mener les mêmes expériences sur les gènes de l'actine, de la cytochrome oxydase ou de la β -tubuline. Il serait utile d'étudier plus en détail la variation génétique intra-continentale par d'autres méthodes, sondant le génome dans son intégralité (AFLP).

Je souhaiterais mener ces dernières expériences en vue de publier mes découvertes.

Pareilles expériences devront ensuite être appliquées à tout le clade des *Vanderbylia* dont seules quelques souches ont été utilisées en vue de marquer leurs différences avec le champignon étudié ici.

Il reste également à décrire les trois espèces nouvelles mises en évidence par la phylogénie (deux espèces pour l'instant recensées uniquement en Chine, une au Japon et une troisième du Gabon et de l'Ouganda).

Références bibliographiques

- BERKELEY M. 1836. « No. I. of British Fungi ; consisting of dried specimens of the species described in vol. V., part II. of the English Flora ». p. 142.
- BLACKWELL M., DAVID C. & BARKER S. 2001. « The presence of glycine betalaine and the dextrinoid reaction in Basidiomata ». *Harvard Papers in Botany*, Vol. 6, n° 1, p. 35 – 41.
- BULLIARD J. B. F. & FRIES. 1780 – 1793. « Herb. Fr. [Plates] ». *Hist. Champ.*, p. 1 – 368.
- COETZEE M., WINGFIELD B., HARRINGTON T., DALEVI D., COUTINHO T. & WINGFIELD M. 2000. « Geographical diversity of *Armillaria mellea* s.s. based on phylogenetic analysis ». *Mycologia*, Vol. 92, n° 1, 105 – 113.
- CULBERSON W. 1972. « Disjunctive Distribution in the Lichen-Forming Fungi ». *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 59, n° 2, p. 165 – 173.
- DAI Y-C., NIEMELA T. & KINNUMEN J. 2002. « The polypores genera *Abundisporus* and *Perenniporia* (Basidiomycota) in China, with notes on *Haploporus* ». *Ann. Bot. Fennici*, Vol. 39: p. 169 – 182.
- DALLOUL R., LILLEHOJ H., LEE J. and CHUNG K. 2006. « Immunopotentiating effect of a *Fomitella fraxinea*-derived Lectin on Chicken Immunity and Resistance to Coccidiosis ». *Poultry Science* Vol. 85, p. 446-451.
- DECOCK C. 2001. « Element for a revision of the genus *Perenniporia* ». PhD Thesis, Université catholique de Louvain.
- DECOCK C., 2006, Rapport d'activité « Bilateral actions: S & T cooperation with China ». [non publié]
- DECOCK C. « On the species complexes within *Perenniporia*: *Vanderbylia* and *Hornodermoporus* reconsidered based on morphological and molecular approaches ». [pas encore publié]
- DECOCK C. & STALPERS. 2006. « Studies in *Perenniporia*: *Polyporus unitus*, *Boletus medullapanis*, and the nomenclature of *Perenniporia*, *Poria*, and *Physisporus*, with a note on the European *Perenniporia* taxa with a resupinate basidiome ». *Taxon*, Vol. 55, p. 759 – 778.
- DECOCK C. & RYVARDEN L. 1999. « Studies in *Perenniporia*: *Perenniporia detrita* and its taxonomic synonyms ». *Mycologia*, Vol. 91, n° 2, p386 – 395.
- DONK M. 1972. « Notes on European Polypores ». *Proc. K. Ned. Akad. Wet. C.*, Vol. 45, n° 3, p. 165 – 78.

- DULIERE J.-F., TANGHE M. & MALAISSE F. 1995. « Répertoire des groupes écologiques du fichier écologique des essences ». Direction générale des Ressources naturelles et de l'environnement, 315 p.
- FORET R. 2004 « Dico de Bio ». Editions De Boek Université, Bruxelles, Belgique, 566 p.
- GILBERTSON R. & RYVARDEN L. 1986. « North American Polypores ». Vol 1 & 2. Oslo, Norvège: Fungiflora, p. 2 – 65, 68 – 69, 508 – 511, 519 – 520.
- GRAHAM A. 1999. « Late cretaceous and Cenozoic history of North American vegetation ». New York, Oxford University press, 350 p.
- HENNEBERT G., PASCAL S. & CONSYNS M. 1994. « Interactions d'incompatibilité entre homocaryons du basidiomycète bifactoriel *Lenzites betulinus* ». *Cryptogamie, Mycol.*, Vol. 15, n° 2, p. 83 – 116.
- JOSSERAND M. 1997. « La description des champignons supérieurs (basidiomycètes charnus) ». Dunod, Poche, Encyclopédie mycologique 392 p.
- HAVARD KAUSERUD H., BJORVAND SVEGARDEN I., DECOCK C. & HALLENBERG N. 2006. « Hybridization among cryptic species of the cellar fungus *Coniophora puteana* (Basidiomycota) ». *Molecular Ecology*, Vol. 16, p. 389 – 399.
- HSU J. 1983. « Late Cretaceous and Cenozoic Vegetation in China, Emphazing Their Connections With North America ». *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 70, n° 3, p. 490 – 508.
- KATO M. & IWATSUKI K. 1983. « Phytogeographic Relationships of Pteridophytes Between Temperate North America and Japan ». *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 70, n° 4, p. 724 – 733.
- KIRK P. M., CANNON P. F., DAVID J. C. AND STALPERS J. A. 2001. « Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi », 9th edition, CABI Publishing, Wallingford, UK, 655 p.
- KRÜGER D. 2002. « Monographic studies in the genus *Polyporus* (Basidiomycota) ». PhD thesis, University of Tennessee, USA, p.1-166.
- LANG P., DANE F., KUBISIAK T. & HUANG H. 2007. « Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America ». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 43, p. 49 – 59.
- LEE J., HYUNG-SUK B., and SANG-SHIN P. 2006. « Purification and Characterization of two novel Fibrinolytic Proteases from Mushroom, *Fomitella fraxinea* ». *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 16 p. 264-271.
- LEPOINT P. 2006. « Speciation in *Gibeberella xyloaroides* and *G. indica* ». PhD thesis, Université catholique de Louvain la Neuve.

- LICKY E.B., HUGHES K.W., PETERSEN R.H. 2002. « Biogeographical patterns in *Artomyces pyxidatus* ». *Mycologia* Vol. 94, p. 461-471.
- LINNAEI C. 1753. « Species plantarum, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas ». Vol. 2, p. 1176.
- MUELLER G., WU Q.-X., HUANG Y.-Q., GUO S.-Y., ALDANA-GOMEZ R. & VILGALYS R. 2001. « Assessing biogeographic relationships between North American and Chinese macrofungi ». *Journal of Biogeography*, Vol. 28, 271 – 281.
- NUNEZ M. & RYVARDEN L. 2000. « East Asian Polypores ». Vol 1 & 2, Oslo, Norvège, Fungiflora, p 6 – 37, 391 – 395.
- NUNEZ M. & STOKLAND J. 2000. « Biogeographical affinities of East Asian polypores ». *Karstenia*, Vol. 40, p. 123 – 128.
- OVERHOLTS L. 1953. « Polyporaceae of the United States, Alaska and Canada ». Ann Arbor: University of Michigan Press, p. 1 – 27.
- PETERSON R. & HUGHES K. 1999. « Species and Speciation in Mushrooms ». *BioScience*, Vol. 49, n° 6, p. 440 – 452.
- PETERSON R. & HUGHES K. 2007. « Some agaric distribution patterns involving Pacific landmasses and Pacific Rim ». *Mycoscience*, Vol. 48, p. 1 – 14.
- RAPER J., KRONGELB G. & BAXTER G. 1958. « The Number and Distribution of Incompatibility Factors in *Schizophyllum* ». *The American Naturalist*, Vol. 92, n° 865, p. 221 – 232.
- RIDLEY M. 2004. « Evolution ». Malden, USA, Blackwell Publishing, 751 p.
- RYVARDEN L. 1976. « The Polyporaceae of North Europe ». Vol 1 & 2, Oslo, Norvège, Fungiflora, p. 8 – 33, 304 – 309.
- RYVARDEN L. 1991. « Gerena of Polypores ». Oslo, Norvège, Fungiflora, p. 9 – 102, 193 – 194, 234.
- SHEN Q., GEISER D. & ROYSE D. 2002. « Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating eastern North American and Asian isolates ». *Mycologia*, Vol. 94, n° 3, p. 472 – 482.
- SILVEIRA B. & WRIGHT J. 2002. « *Polyporus s. str.* In southern South America : mating tests ». *Mycol. Res.*, Vol. 106, n° 11, p. 1323- 1330.
- SOWERBY J. 1803. « Coloured figures of English fungi or Mushrooms ». Vol. 3, London, United Kingdoms, planche 288.

- STALPERS J. A. 1978. « Identification of wood-inhabiting *Aphylllophorales* in pure culture ». Centraalbureau voor schimmelcultures barn institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Studies in Mycology, n°16, 248 p.
- STEERE W. 1969. « Asiatic Elements in the Bryophyte Flora of Western North America ». *The Bryologist*, Vol. 72, n° 4, p. 507 – 512.
- TAYLOR J., JACOBSON D., KROKEN S., KASUGA T., GEISER D., HIBBETT D. & FISHER M. 2000. « Phylogenetic Species Recognition and Species Concept in Fungi ». *Fungal Genetics and Biology*, Vol. 31, p. 21 – 32.
- VILGALYS R. and SUN B.L. 1994. « Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushrooms *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences ». *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, Vol. 91, p. 4599-4603.
- WEN J. 1999. « Evolution of Eastern Asian and Eastern North American Disjunct Distribution in Flowering Plants ». *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol 30, p. 421 – 455.
- WOLFE J. 1975. « Some Aspects of Plant Geography of the Northern Hemisphere During the Late Cretaceous and Tertiary ». *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 62, n° 2, p. 264 – 279.
- WU Q.-X., MUELLER G., LUTZONI F. HUANG Y.-Q. & GUO S.-Y. 2000. « Phylogenetic and Biogeographic Relationships of Eastern Asian and Eastern North American Disjunct *Suillus* Species (Fungi) as Inferred from Nuclear Ribosomal RNA ITS Sequences ». *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 17, n° 1, p. 37 – 47.
- YING J., MAO X., MA Q., ZONG Y. & WEN H. 1987. «Icons of medicinal fungi from China ». Science Press, Beijing, China, p. 132 – 133.
- ZERVAKIS G., MONCALVO J.-M. & VILGALYS R. 2004. « Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa ». *Microbiology*, Vol. 150, p. 715 – 726.
- ZHAO J.D. & ZHANG X. Q. 1992. « The polypores of China ». *Bibliotheca Mycologica*, Vol. 145, p. 1-524.