

Rapport Final

Etude de faisabilité de la détection moléculaire de champignons dans les poteaux électriques en bois d'HydroQuébec.

Auteurs :

Alba Zaremski

Yves Prin

***CIRAD BIOS, TA A-39/C, Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5, France***



Rapport Final : Etude de faisabilité de la détection moléculaire de champignons dans les poteaux électriques en bois d'HydroQuébec.

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	4
1.1 Le contexte du projet	4
1.2 Les objectifs du projet	4
1.3 État actuel des connaissances scientifiques	5
1.4 Problématique des poteaux électriques d'Hydro-Québec : Quelques chiffres.....	6
CHAPITRE 2 : METHODOLOGIE	7
2.1. Sites d'étude et échantillonnage.....	8
2.1.1. Echantillonnage dans les poteaux électriques en service.....	8
2.1.2. Echantillonnage des témoins.....	8
2.2 Caractérisation moléculaire des champignons.....	12
2.2.1 Préparation de la poudre de bois	12
2.2.2 Extraction de l'ADN	12
2.2.2.1. Extraction de l'ADN avec les kits commerciaux supérieurs	
DNeasy (Qiagen, Courtabœuf, France).	12
<i>Extraction réalisée en Novembre 2007</i>	
2.2.2.2. Extraction au mercapto-éthanol (Le Quéré et al., 2002)	
<i>Extraction réalisée en Mai 2008</i>	14
2.2.3. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	15
2.2.3.1. Application aux ITS	16
2.2.3.2. Analyse des produits de la PCR.....	16
2.2.4. Purification sur gel des fragments d'ADN et séquençage.....	17
2.2.5. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données	
- <i>BLAST</i> -.....	18
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION	19
3.1. Observations des poteaux électriques.....	19
3.2. Quantification de l'ADN extrait.....	19
3.3. Amplification des ITS (PCR) ; séquençage et analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – <i>BLAST</i>	21
CHAPITRE 4. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	26
RÉFÉRENCES	27

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

Liste des figures

Figure 1 : Stérilisation de la mèche de la perceuse.....	8
Figure 2 : Prélèvement de l'échantillon à la ligne de sol.....	8
Figure 3 : Prélèvement de l'échantillon à 1,3 m.....	8
Figure 4 : Conservation de l'échantillon	8
Figure 5 : Thermocycleur	15
Figure 6 : Paramètres du cycle de la PCR.....	16
Figure 7 : Électrophorèse.....	16
Figure 8 : La migration de l'ADN.....	17
.....	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des poteaux en service qui ont été échantillonnés.....	9
Tableau 2 : Liste des échantillons témoins	10
Tableau 3 : Dimension et classe de poteaux de bois de 3 essences différentes	11
Tableau 4 : Résultats sur la quantification et la pureté de l'ADN	20
Tableau 5 : Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques.....	23

Résumé

Actuellement, aucun test de détection rapide et performant n'existe pour révéler les champignons dans le bois. Étant donné l'ampleur des problèmes causés par ces micro-organismes dans les industries du bois, il est nécessaire pour celles-ci de disposer d'un test à la fois rapide, simple d'utilisation, spécifique, automatisable, et doté d'un seuil de détection performant et bas.

Une technique mise au point au laboratoire de biologie moléculaire du CIRAD réunit toutes les qualités requises : 1) elle permet par le biais de la PCR, d'amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN génomique fongique; 2) elle combine la sensibilité et la fiabilité de la PCR et l'utilisation des banques de séquence nucléotidiques internationales. Cette méthode de détection moléculaire de champignons est utilisée au laboratoire de biologie moléculaire du CIRAD de façon routinière afin d'identifier des champignons de pourriture fibreuse et cubique dans les bois de construction et d'habitation.

Le rapport présente les travaux qui ont été effectués au laboratoire de biologie moléculaire du CIRAD sur les poteaux électriques en bois d'HydroQuébec du Canada. Nous avons appliqué et adapté la méthode de détection moléculaire de champignons déjà utilisée au CIRAD sur les échantillons de bois recueillis sur des poteaux de différents groupes d'âge du réseau de distribution d'Hydro-Québec.

ETUDE DE FAISABILITE DE LA DETECTION MOLECULAIRE DE CHAMPIGNONS DANS LES POTEAUX ELECTRIQUES EN BOIS D'HYDROQUEBEC.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. Le contexte du projet

Dans le bois, en particulier dans les poteaux électriques en bois, la présence de certaines espèces de champignons n'est décelable qu'à partir d'un stade avancé de développement. De plus, l'utilisation de poteaux infestés peut provoquer, une diminution des propriétés physiques et mécaniques préjudiciables à leur pérennité. Le développement d'un outil de diagnostic précoce des champignons lignivores dans les poteaux électriques devrait détecter leur présence, avant qu'ils n'aient provoqués d'altérations.

La présente étude doit aboutir à des outils d'aide aux opérations de surveillance, en diagnostic des poteaux en bois et en entretien à l'attention des inspecteurs et gestionnaires des poteaux électriques d'HydroQuébec. Le but ultime étant la détection in situ, à l'aide d'une mesure de l'ADN, de la présence de champignons de dégradation dans le poteau lors de l'inspection.

Cette aide va devenir d'autant plus importante que les réglementations actuelles conduisent à l'évolution des produits de préservation et de finition. Compte tenu de l'imprécision de la durée de service attendue, en particulier dans le cas de nouveaux produits de préservation, le diagnostic précoce et les programmes d'entretien sont aujourd'hui des clés qui assureront la pérennité des poteaux en bois vis à vis de l'exposition aux agents climatiques (température, eau et UV) et aux agents biologiques (champignons lignivores, insectes, etc.).

Cette détection précoce avant l'apparition de problèmes majeurs, permettra une re-conception du programme d'entretien des poteaux électriques d'Hydro-Québec. Actuellement, cet entretien n'est pas encore réalisé mais devrait débuter en 2008 avec environ 20 000 poteaux qui seront inspectés. Les visites d'inspection devraient se faire tous les 20 ans, 30 ans et 40 ans sur les poteaux de bois traités initialement au PCP (pentachlorophénol). L'inspection après 20 ans de vie utile est basée sur des mesures de la quantité résiduelle de pentachlorophénol réalisées lors du projet d'Innovation Technologie sur l'implantation d'un programme d'entretien des poteaux de bois.

1.2. Les objectifs du projet

Le premier objectif du projet est de mettre au point une méthode rapide de détection et d'identification de champignons parasites du bois (Basidiomycètes, Fungi Imperfecti, Ascomycètes). Les méthodes développées feront appel à des techniques de biologie moléculaire (PCR, séquençage,...). Après caractérisation génomique des souches existantes, on mettra au point des sondes moléculaires qui permettront la détection précoce et l'identification rapide des champignons. La détection précoce des champignons avant qu'ils n'aient atteint un stade avancé de développement dans le bois permettra une intervention

rapide et sera d'une aide majeure dans le programme d'entretien des poteaux électriques. Par voie de conséquence, cette détection précoce optimisera l'utilisation des fongicides destinées au traitement.

1.3. Etat actuel des connaissances scientifiques

Cette étude fait appel à des compétences scientifiques liées aux interactions « microorganismes bois environnement ». Le CIRAD développe des compétences concernant la durabilité naturelle ou conférée du bois vis-à-vis des agents biologiques et des compétences dans le diagnostic précoce de champignons dans le bois.

Le caractère innovant du développement d'un outil de détection précoce de champignons dans les poteaux électriques provient de l'exploitation des méthodes de biologie moléculaire et d'équipements utilisés pour la caractérisation et l'identification des champignons lignivores.

La performance de cet outil moléculaire repose sur :

- sa sensibilité permettant la détection précoce de champignons dégradant le bois
- sa spécificité permettant l'identification précise du champignon sur la base de l'analyse génétique
- sa rapidité de mise en œuvre.
-

Un compromis devra être établi entre un prélèvement sur site juste suffisant, sous forme de contrôle non destructif.

Les techniques de biologie moléculaire sont des outils de taxonomie particulièrement performants. Ainsi la "Polymerase Chain Reaction" permet grâce à l'action d'une enzyme thermorésistante, la Taq polymérase, d'étudier des portions déterminées ou non du génome. Les polymorphismes observés résultent d'une variabilité de séquences introniques et de mutations ponctuelles apparaissant chez certains individus ou groupes d'individus. Les résultats obtenus ne dépendent pas de facteurs environnementaux et par conséquent constituent des critères de classification incontestables. Le choix de la portion d'ADN à étudier est très important car sa séquence doit être assez stable au cours de l'évolution, mais doit présenter des mutations qui permettent de révéler des différences sans pour autant modifier les activités physiologiques. La région choisie dans le cadre de cette étude, nommée ITS (internal transcribed spacer), comprend le gène de l'ADN 5,8 S et les espaceurs ITS1 et ITS2. De plus, elle doit comporter à chaque extrémité des séquences spécifiques parfaitement conservées permettant aux amorces de s'hybrider avec l'ADN en délimitant parfaitement la séquence d'ADN à amplifier. Ainsi des mutations simples peuvent intervenir dans les zones ITS 1, ITS 2 et y être conservées sous réserve qu'elles n'engendrent pas de modifications du fonctionnement de l'opéron ribosomique dans son ensemble. L'opéron choisi est connu pour sa relative stabilité au cours de l'évolution. Le développement de recherches dans ce domaine nécessite : une extraction et une purification de l'ADN du champignon à partir de bois contaminé, une amplification par PCR de la séquence choisie dont on évaluera le nombre de paires de bases, le séquençage puis l'identification de l'espèce par comparaison de séquences dans GENBANK.

1.4. Problématique des poteaux électriques d'Hydro-Québec : *Quelques chiffres*

Hydro-Québec compte sur son réseau un inventaire d'environ 2,5 millions de poteaux de bois lesquels peuvent varier entre 11 et 18 m de longueur et dont la base peut atteindre entre 48 à 60 cm de diamètre.

Ces poteaux servent à supporter les fils de divers services publics (électricité, téléphone, câble) et sont utilisés pour la distribution des lignes électriques basse tension aux résidences et aux commerces. Ceux-ci peuvent aussi occasionnellement supporter des transformateurs. Les essences utilisées sont le pin rouge (aubier d'environ 4 cm) et le pin gris (aubier de 2 cm environ). Ces poteaux sont à peu près équivalents à des pins sylvestres.

Les poteaux ont été traités au PCP (PentaChloroPhénol) avant 2002 puis au CCA (arséniate de cuivre chromaté) après 2002. Le CCA n'est pas encore interdit au Canada pour les applications industrielles comme les poteaux de bois des compagnies d'utilité. Le CCA rend le bois plus dur et demeure encore un bon agent de préservation des bois et cela pendant au moins 50 ans. Hydro-Québec utilise un additif polymère pour réduire la dureté du bois et permettre une meilleure grimabilité.

Aujourd'hui le programme d'entretien ou l'inspection des poteaux traités au PCP devrait se réaliser après 20 ans, 30 ans et 40 ans après la mise en place des poteaux. Le projet devrait commencer en 2008 avec l'inspection d'environ 20 000 poteaux.

La capacité mécanique résiduelle du poteau après 20 ans de service détermine si celui-ci doit être changé ou non. Si le poteau est gardé en service, un retraitement avec des tiges Cobra est fait pour rehausser localement, à la ligne de sol, la toxicité du bois.

CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE

2.1. Sites d'étude et échantillonnages

Les collectes d'échantillons ont été effectuées entre le 16 et 19 octobre 2007 à partir de poteaux électriques sur pied en bois de pin rouge (*Pinus resinosa*) et de pin gris (*Pinus Banksiana*). Ces poteaux sont âgés de cinq à cinquante-huit ans et proviennent du réseau de distribution d'Hydro-Québec. Ils sont tous localisés sur la rive sud de Montréal. Tous ont été traités au pentachlorophénol (PCP) sauf ceux provenant de Phillipsburg qui ont été traités au Cuivre Chrome Arsenic (CCA) (Cf. Tableau 1)

2.1.1. Échantillonnage dans les poteaux électriques en service:

Les carottages ont été réalisés à l'aide d'une perceuse *Sthil* d'une mèche en acier de type *Haglöf* de la Société *Forestry Supply Inc.*

Dans chaque poteau électrique sur pied, 2 carottes de 5 mm de diamètre et d'environ 10 cm de longueur ont été prélevées : une au niveau du collet (ligne de sol) et l'autre à 1,3 mètre du sol. Avant chaque prélèvement, la mèche de la perceuse est stérilisée (enflammée avec de l'alcool éthylique). L'échantillon prélevé est ensuite stocké dans un tube stérile et conservé en chambre froide. Le déroulement de l'échantillonnage est illustré sur les figures de 1 à 4.

2.1.2. Échantillonnage des témoins

Les « témoins négatifs » nous ont été fournis par la compagnie Bois KMS (GMI) Ltée. Les prélèvements ont été réalisés sur des poteaux non traités et traités après fixation du CCA et polymérisation de l'additif polymère.

Les « témoins positifs » sont des carpophores (champignons) prélevés sur des poteaux faisant partie du site de poteaux expérimentaux de l'Institut de Recherche d'Hydro-Québec.

La liste des échantillons avec leur numéro d'identification et leur localisation est présentée dans le tableau 1 pour les poteaux en service. Ceux-ci sont identifiés par un numéro de référence (Réf.), la localisation du carottage (au collet ou à 1,30m du sol), le numéro du poteau attribué par Hydro-Québec, le nombre d'années en service après le traitement initial, la région géographique, la hauteur du poteau en mètres, la classe du poteau, et le nom botanique des poteaux électriques (RP : Pin rouge; JP : Pin gris; SYP : Pin jaune du sud; WC : Cèdre rouge de l'ouest).

Le déroulement de l'échantillonnage est illustré sur les figures de 1 à 4.



Figure 1 : stérilisation de la mèche de la perceuse



Figure 2 : prélèvement de l'échantillon à la ligne de sol



Figure 3 : prélèvement de l'échantillon à 1.3m



Figure 4 : Conservation de l'échantillon

Tableau 1 : Liste des poteaux en service qui ont été échantillonnés

N° Réf.	Collet	1,3m	Numéro Hydro-Québec	Traitement (années)	Région	Hauteur (m)	Classe	Essence*	Année Traitement
1a	x		UE4GES	32	Contreccœur	12.19	5	RP	1975
1b		x	UE4GES	32	Contreccœur	12.19	5	RP	1975
2a	x		REE4WR	35	Contreccœur	12.19	4	RP	1972
2b		x	REE4WR	35	Contreccœur	12.19	4	RP	1972
3a	x		RBMU28	32	Contreccœur	12.19	5	RP	1975
3b		x	RBMU28	32	Contreccœur	12.19	5	RP	1975
4a	x		EQU7NOB	19	St-Hilaire	12.19	4	JP	1988
4b		x	EQU7NOB	19	St-Hilaire	12.19	4	JP	1988
5a	x		EUHZEM	19	St-Hilaire	12.19	4	WC	1988
5b		x	EUHZEM	19	St-Hilaire	12.19	4	WC	1988
6a	x		5H1ZKT	21	St-Hilaire	13.72	2	JP	1986
6b		x	5H1ZKT	21	St-Hilaire	13.72	2	JP	1986
7a	x		EE6NU9	9	St-Luc	13.72	4	JP	1998
7b		x	EE6NU9	9	St-Luc	13.72	4	JP	1998
8a	x		ENSUFF	9	St-Luc	12.19	4	SYP	1998
8b		x	ENSUFF	9	St-Luc	12.19	4	SYP	1998
9a	x		ECTHED	9	St-Luc	13.72	4	JP	1998
9b		x	ECTHED	9	St-Luc	13.72	4	JP	1998
10a	x		5GY1Y3	?	?	?	?	?	?
10b		x	5GY1Y3	?	?	?	?	?	?
11a	x		EW12FP	46	St-Luc	12.19	4	JP	1961
11b		x	EW12FP	46	St-Luc	12.19	4	JP	1961
12a	x		5T3WAQ	55	St-Jean	13.72	4	WC	1952
12b		x	5T3WAQ	55	St-Jean	13.72	4	WC	1952
13a	x		5YNHYD	42	St-Jean	12.19	4	WC	1965
13b		x	5YNHYD	42	St-Jean	12.19	4	WC	1965
14a	x		AIEXES	58	Phillipsburg	?	?	SYP (?)	1949
14b		x	AIEXES	58	Phillipsburg	?	?	SYP (?)	1949
15a	x		APMGOM	58	Phillipsburg			SYP (?)	1949
15b		x	APMGOM	58	Phillipsburg			SYP (?)	1949
16a	x		T8S36E	58	Phillipsburg			SYP (?)	1949
16b		x	T8S36E	58	Phillipsburg			SYP (?)	1949
17a	x		OLPBHQ27	6	616 Picardie	13.72	2	RP	2001
17b		x	OLPBHQ27	6	616 Picardie	13.72	2	RP	2001
18a	x		Marie-Renée	6	Varenes	13.72	4	RP	2001
18b		x	Marie-Renée	6	Varenes	13.72	4	RP	2001
18c			Champignon	6	Varenes	13.72	4	RP	2001
19a			Marie-Renée						
19a			Poteau -125		Site IREQ			RP	----
19b			Champignon		Site IREQ				
19b			Poteau 125						
19c			Champignon		Site IREQ				
19c			Poteau 120						
19d			Champignon		Site IREQ				
19d			Poteau 121						

Le tableau 2 présente la liste des échantillons témoins traités et non-traités

Tableau 2 : Liste des échantillons témoins

Témoins	Âge de traitement	Hauteur (mètres)	Classe	Essence	Année de traitement
1AT-PR	Aucun	12,19	4	RP	
1BT-PR	1 jour	12,19	4	RP	2007
1AT-PG	Aucun	12,19	4	JP	
1BT-PG	1 jour	12,19	4	JP	2007
2AT-PR	Aucun	12,19	4	RP	
2BT-PR	1 jour	12,19	4	RP	2007
2AT-PG	Aucun	12,19	4	JP	
2BT-PG	1 jour	12,19	4	JP	2007
3AT-PR	Aucun	12,19	4	RP	
3BT-PR	1 jour	12,19	4	RP	2007
3AT-PG	Aucun	12,19	4	JP	
3BT-PG	1 jour	12,19	4	JP	2007

Le tableau 3 présente, à titre d'exemple, quelques dimensions des poteaux en fonction de leur classe qui sont utilisés sur le réseau de distribution d'Hydro-Québec. Au total il existe plusieurs classes de poteau mais à titre d'exemple, seules les classes 2, 4 et 5 feront parties du tableau. En général, sur le réseau de distribution, la plupart des poteaux sont de classe 4.

Tableau 3 : Dimension et classe de poteaux de bois de 3 essences différentes

			Pin jaune du sud	Pin rouge	Cèdre rouge de l'ouest
Longueur (m)	G _L (m)	C _T (cm)	C _{GL} (cm)	C _{GL} (cm)	C _{GL} (cm)
Classe 2		63,5			
10,7	1,8		92,7	97,8	101,6
12,2	1,8		97,8	104,1	108,0
13,7	2,0		102,4	108,7	112,5
15,2	2,1		105,7	111,0	116,8
16,8	2,2		109,0	116,3	121,4
18,3	2,3		112,5	119,6	124,7
Classe 4		58,4			
10,7	1,8		80,0	85,1	87,6
12,2	1,8		85,1	90,2	92,7
13,7	2,0		88,4	93,5	97,3
15,2	2,1		91,7	98,0	100,6
16,8	2,2		92,3	101,3	105,2
Classe 5		48,3			
10,7	1,8		73,7	78,7	81,3
12,2	1,8		78,7	83,8	86,4
13,7	2,0		82,0	87,1	90,9
15,2	2,1		85,6	90,4	94,2

G_L; partie enfouie dans le sol; C_T; circonférence haut du poteau; C_{GL}; circonférence ligne de sol

2.2. Caractérisation moléculaire des champignons

Les régions ITS de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR avec les amorces ITS1, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3' et ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Gardes et Bruns, 1993). Les produits PCR obtenus sont séparés sur gel d'agarose et purifiés à l'aide du kit Qiaquick Gel extraction (Qiagen, Courtabœuf, France) avant de procéder au séquençage qui est sous-traité par la société Macrogen en Corée. Les séquences corrigées et assemblées ont été comparées par BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) avec les séquences nucléiques des banques de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn>). Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

2.2.1. Préparation de la poudre de bois

- Les carottes de bois ont été réduits en poudre en les frottant sur du papier de verre N°40 (gros grain)

Remarque :

Dans cette étape, nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour réduire en poudre les carottes de bois. En effet, les poteaux traités au PCP et au CCA se sont révélés très durs à broyer et à réduire en poudre.

- Les carpophores (champignons trouvés sur les poteaux) ont été broyés à sec en présence d'une pincée de sable de Fontainebleau à l'aide d'un mortier et d'un micro pilon.

2.2.2. Extraction de l'ADN

Dans cette étude, nous avons testés deux méthodes d'extraction. Nous rappelons que la première méthode d'extraction (cf.2.2.2.1.), et au vu des premiers résultats, n'a pas été très concluante (cf.rapport intermédiaire du mois de décembre 2007).

Les deux méthodes d'extraction qui ont été effectuées sont :

- 1) à partir d'un fragment de 50 mg environ d'échantillon (poudre) avec le kit de purification de l'ADN pour végétaux supérieurs DNeasy (Qiagen, Courtabœuf, France).
- 2) à partir d'un fragment de 100 mg environ d'échantillon (poudre) avec une méthode classique au mercapto-éthanol (Le Quéré *et al.*, 2002). Celle-ci est aujourd'hui parfaitement adaptée aux conditions de traitement des poteaux électriques d'HydroQuébec.

2.2.2.1. Extraction de l'ADN avec les kits commerciaux supérieurs DNeasy (Qiagen, Courtabœuf, France). *Extraction réalisée en Novembre 2007*

L'extraction de l'ADN fongique a été réalisée à partir d'un fragment de 50 mg environ d'échantillon avec le kit de purification de l'ADN pour végétaux supérieurs DNeasy (Qiagen, Courtabœuf, France)

À 50 mg de poudre de bois et à 50mg de poudre de champignons ont été ajoutés 400 µl de la solution tampon de lyse AP1 et 4µl de RNase A (100mg/ml). Chaque tube est agité à l'aide d'un mélangeur Vortex, puis incubé au bain marie pendant 10 minutes à 65°C en prenant soin d'agiter ceux-ci de temps en temps pendant l'incubation.

Cette étape entraîne la destruction des membranes, l'éclatement des noyaux et donc la libération de l'ADN mais aussi de tous les autres composés cellulaires.

Cent trente (130) μ l de solution tampon de déprotéinisation AP2 sont ajoutés. Chaque suspension est agitée sur mélangeur Vortex, puis incubée dans la glace pendant cinq minutes et finalement centrifugée pendant cinq minutes à 13,200rpm.

Les protéines, les polysaccharides, et les détergents précipitent.

Une étape de centrifugation est nécessaire ici pour éviter que la viscosité et la quantité de précipité viennent saturer la membrane de la colonne QIAshredder.

À l'aide d'une micropipette, transférer le lysat est transféré dans une colonne de filtration QIAshredder (450 μ l) puis est centrifugé 2 minutes à 13,200rpm. La colonne est ensuite jetée.

Les débris cellulaires et le précipité sont éliminés donc retenus dans la colonne alors que l'ADN et la solution de tampons passent à travers le filtre.

Le surnageant est transféré soigneusement dans un tube eppendorf de 1.5 ml en mesurant le plus précisément possible le volume* à l'aide de micropipettes allant de 100 à 1000 μ l. Au surnageant est ajouté un demi-volume de tampon AP3 et un volume d'éthanol absolu.

L'ADN précipite. Le tampon AP3, par sa salinité favorise la liaison de l'ADN à la colonne DNeasy mini spin.

Le mélange est transféré par fraction de 650 μ l (utiliser une micropipette) dans une colonne Dneasy mini spin puis est centrifugé pendant 1 min à 13,200rpm. L'ADN est fixé sur la colonne. Le filtrat est jeté. Cette opération renouvelée afin d'utiliser la totalité du matériel.

La colonne est transférée dans un nouveau tube (collection tube). 500 μ l de solution tampon de lavage AW est ajouté sur le filtre. Le tube est centrifugé pendant 1 minute à 13,200rpm. Cette étape est répétée en jetant le filtrat à chaque fois.

Ces lavages permettent de rincer puis de sécher la colonne. Le tampon AW comprend de l'éthanol qui élimine les impuretés notamment les sels, les protéines et les polysaccharides

La colonne est transférée sur un nouveau tube Eppendorf de 2 ml (collection tube). L'ADN est élué par 50 μ l de tampon d'éluion AE qui a été préalablement chauffé à 65°C.

Les tubes sont laissés à température ambiante pendant 5 minutes et sont centrifugés 1 min à 8000 rpm. Cette étape est répétée en ajoutant 50 μ l de tampon AE préchauffé à 65°C afin d'obtenir un volume final de 100 μ l de solution d'ADN. L'ADN est conservé au congélateur à -20°C.

Le principe de fixation de l'ADN par la colonne DNeasy est basé sur des interactions apolaires. Des molécules de silice associées à des chaînes alkyles générant des interactions apolaires sont greffées sur la colonne (phase stationnaire), l'ADN avec les zones

Faisabilité de la méthode détection moléculaire sur des poteaux électriques d'HydroQuébec

hydrophobes présentant une affinité pour cette fonction s'adsorbe. Cet ensemble de liaisons hydrophobes est ensuite rompu par l'ajout d'un solvant polaire (phase mobile) et de sels présents en faibles concentrations. L'ADN est désorbé.

2.2.2.2. Extraction au mercapto-éthanol (Le Quéré et al., 2002). Extraction réalisée en Mai 2008

Note : Lors de l'extraction, un long travail de mise au point, nous a permis de déterminer des conditions d'efficacité satisfaisante au niveau de la composition du milieu réactionnel.

Dans un tube de 10ml (tube Falcon), à 100 mg de poudre de bois ont été ajoutés 1 ml de tampon d'extraction préparé extemporanément et contenant les produits suivants :

- 100 mM de Tris-HCL (pH 8),
- 100 mM d'EDTA,
- 2% de SDS,
- 1% de β -mercaptoéthanol,
- 100 μ g/ml de Proteinase K.

L'échantillon est ensuite broyé avec un micropilon puis passé au vortex. Il est incubé ensuite au bain marie pendant 30 minutes à 55°C puis 1 heure à 37°C.

A la sortie du bain marie, 250 μ l de NaCl à 5M sont ajoutés puis 110 μ l de cetyltriméthylammonium (CTAB) à 10%. Le mélange est vortexé puis incubé dans un bain marie à 65°C pendant 10 minutes.

Cette étape entraîne la destruction des membranes, l'éclatement des noyaux et donc la libération de l'ADN mais aussi de tous les autres composés cellulaires.

La suspension est ensuite transvasée dans un tube Eppendorf à 1.5ml. Ce tube est placé 30 minutes dans la glace puis centrifugé 10 minutes à 6 000 g. Le surnageant est alors transvasé dans un tube froid (préalablement placé dans de la glace) et 550 μ l d'isopropanol sont ajoutés afin de faire précipiter l'ADN. On centrifuge à 16 000 g pendant 20 minutes.

Le surnageant est éliminé.

Le culot contenant l'ADN est lavé, en ajoutant 300 μ l d'éthanol à 70%. On centrifuge 5 minutes à 13 000 g, on enlève le surnageant. On prendra soin de laisser évaporer toute vapeur d'alcool à l'air libre, sous la hotte.

Le culot ainsi obtenu est dissout dans 50 μ l de TE buffer (1mM EDTA, 10 mM tris-HCl pH 8) et est stocké pendant une nuit à 4°C.

2.2.3. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Principe

C'est une réaction enzymatique en chaîne qui permet l'amplification d'une région spécifique de l'ADN. Elle a été décrite initialement par Mullis (1985). La PCR utilise deux oligonucléotides (séquences courtes d'ADN) qui servent d'amorce, une enzyme la Taq DNA polymérase thermostable et des dNTPs (ATP, TTP, GTP, CTP).

La PCR est un ensemble de cycles thermiques répété n fois :

- *La dénaturation.* La dénaturation s'effectue par chauffage, au dessus de la température de fusion (T_m) de l'ADN. Elle provoque la rupture des liaisons non covalentes établies entre les bases (3 liaisons hydrogène entre G-C, 2 entre A-T). On obtient un ADN simple brin orienté 3'-5'.
- *L'hybridation.* La température est abaissée progressivement sous la T_m . Dans ces conditions, les amorces se fixent sur le brin d'ADN matrice dont elles sont complémentaires. Les deux amorces sont placées de part et d'autre de la région à amplifier.
- *L'extension.* Les oligonucléotides servent d'amorce à la Taq Polymérase qui synthétise un brin complémentaire du brin matriciel en intégrant spécifiquement les dNTPs complémentaires correspondants.

Remarques : les précautions nécessaires à l'élimination à toutes sources de contaminations sont réunies : séparation du lieu de PCR et du lieu d'analyse, jeu de pipette uniquement pour la PCR, utilisation de cônes avec filtre, irradiation aux UV du matériel, le témoin d'amplification sans ADN est toujours réalisé, le passage des portoirs à PCR dans la javel.

L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 50 μ L contenant 5 μ L de matrice ADN (50 ng), 10 μ L de tampon 5X Green Go Taq, 4 μ L de dnTP, 2 μ L de chaque amorce (ITS1 et ITS4 à 10mM), 0,3 μ L de Taq polymérase et de l'eau (26.7 μ L) pour compléter jusqu'à 50 μ L.

Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et les tampons. Les PCR sont effectuées avec un thermocycleur (Perkin Elmer Applied Biosystems : Gen Amp PCR system 9700 ou 2400, Cf.figure 5). Cet appareil change automatiquement de température selon un programme temporel précis.



Figure 5 : Thermocycleur

2.2.3.1. Application aux ITS

Les régions ITS de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorce spécifique des champignons ITS1 et ITS4 (White *et al.*, 1990 ; Gardes et Bruns, 1993) :



Les paramètres du cycle de la PCR sont présentés dans la figure 6, on réalise 30 cycles.

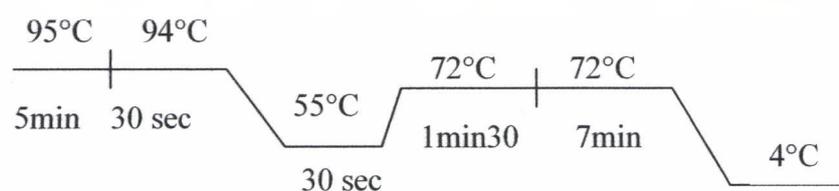


Figure 6 : Les paramètres du cycle de la PCR

2.2.3.2. Analyse des produits de la PCR

Après amplification, on dépose 5 µl d'amplifiats dans les puits d'un gel d'agarose à 1 % contenant 2 gouttes de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml.

La migration s'effectue sous une tension de 120 Volts pendant 30 min dans un tampon d'électrophorèse TAE 1X (Cf. Figure 6). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Smart Ladder, (Eurogentec). Il permet de déterminer la taille et d'estimer la concentration des amplifiats.

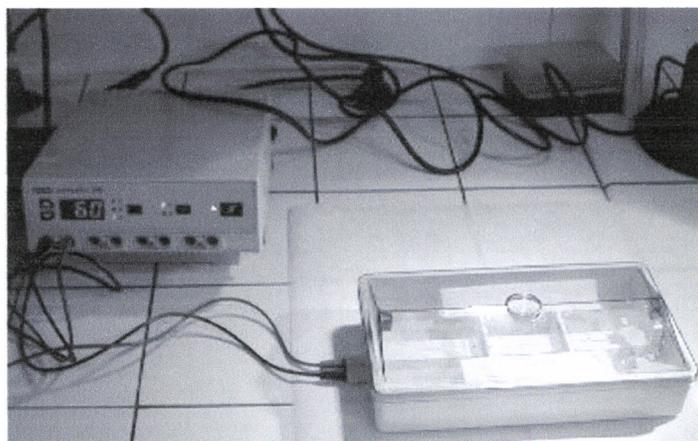


Figure 7 : L'électrophorèse

Les bandes d'acides nucléiques sont alors visualisées sous UV à l'aide du bromure d'éthidium. Le BET comporte un groupement qui s'intercale entre les plans de bases

successives des chaînes polynucléotidiques. La fluorescence à 590 nm étant plus intense pour le groupement intercalé par rapport au groupement libre.

Remarque :

On utilise un tampon TAE 1X : Tris Acétate EDTA pour le tampon de la cuve mais aussi pour le gel. Le Tris impose un pH à 8. L'ADN est une molécule chargée négativement.

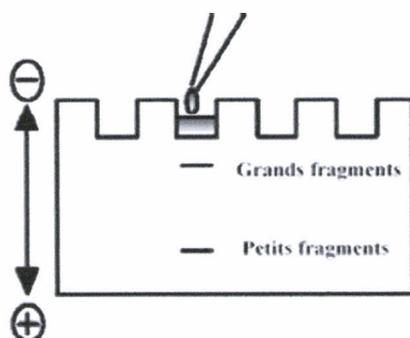


Figure 8 : La migration de l'ADN

2.2.4. Purification sur gel des fragments d'ADN et séquençage

Purification des fragments d'ADN sur gel

Après migration sur gel d'agarose, les bandes à séquencer sont découpées sous UV au scalpel et chaque bande découpée est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Puis les fragments d'ADN sont extraits puis purifiés à l'aide du kit Qiaquick Gel extraction (Qiagen, France).

Trois volumes de solution QG pour 1 volume (masse) de fragment de gel sont ajoutés (le poids en mg correspond à 1 volume de gel). Les tubes sont mis à incuber au bain marie à 50°C pendant 10 min. Ils sont vortexés 2 à 3 fois pendant l'incubation pour mieux dissoudre le gel.

Le tampon QG contient un indicateur coloré de pH. Il faut vérifier que la couleur du mélange soit jaune car l'absorption de l'ADN sur la membrane est efficace seulement à $\text{pH} < 7,5$.

Un volume d'isopropanol pur est ajouté pour augmenter le rendement de la purification puis vortexé. Le mélange est transféré dans une colonne QIAquick spin puis centrifugé 1 min à 14000 rpm. L'ADN s'adsorbe sur la colonne. Le filtrat est jeté.

Cinq cents μl de tampon QG sont ajoutés et centrifugés 1 min à 14000 rpm pour éliminer toutes traces d'agarose. Le filtrat est jeté.

Sept cent cinquante μl de solution PE sont ajoutés et centrifugés 1 min à 14000 rpm, le filtrat est jeté. On recommence cette étape, mais avec 250 μl de solution PE. Le tampon PE, contenant de l'éthanol, est utilisé pour laver la colonne : les primers, les impuretés (sels, Taq polymérase, agarose, nucléotides non incorporés, le BET) sont éliminés.

La colonne est séchée en centrifugeant 1 min à 14000 rpm ce qui permet d'éliminer la solution PE qui pourrait interférer dans les étapes suivantes.

La colonne est transférée sur un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. L'ADN est élué avec 30 µl de solution d'éluion EB après une incubation de 1 min à température ambiante et une centrifugation de 2 min à 14000 rpm. L'ADN est au fond du tube et est conservé à -20°C.

La concentration d'ADN de l'extrait est quantifiée (5 µl d'extrait déposés avec 5 µl de bleu de charge) par comparaison des bandes avec le marqueur (5 µl de Smart Ladder) par migration sur gel d'agarose 1 % (120 Volts pendant 20 min). Cette quantification permettra ultérieurement d'ajuster la concentration d'ADN pour la réaction de séquence.

Les produits des PCR purifiés sont ensuite envoyés à la société MACROGEN en Corée qui sous-traite les réactions de séquençage.

Le séquençage se fait par une méthode automatique d'analyse de séquence de l'ADN basée sur une détection de la fluorescence. La réaction de séquence, dite méthode de Sanger, consiste en la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire d'une matrice d'ADN simple brin, terminée par un nucléotide « terminator » portant une fluorescence. Les brins d'ADN sont séparés en fonction de leur taille. Les brins les plus petits sont les premiers à migrer. Les bandes sont repérées lors de leur passage au niveau du système de détection par un faisceau laser, et un jeu de filtres est alors utilisé pour les différencier d'après leur spectre d'émission; on obtient un électrophorégramme de spectre d'émission. Un logiciel d'analyse permet de faire la correspondance entre les courbes de fluorescence et le nucléotide incorporé ; l'ordre de lecture étant par définition, l'ordre de la séquence.

2.2.5. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Le **BLAST**, *Basic Local Alignment and Search Tool*, (Altschul *et al.*, 1997) est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997).

Dans notre étude, après avoir obtenu et corrigé les séquences à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS nous effectuerons des BLASTn (Nucléotide) sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pour comparer nos séquences avec celles présentes en banques.

Chapitre 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Observations des poteaux électriques

Les poteaux électriques visités présentent en général un bon état physique et mécanique. Néanmoins quelques poteaux présentent des zones très humides au collet et presque noircies. Après examen macroscopique (visuel et microscope), les carottes ne présentent pas de signes visibles d'une présence fongique qui ne permettent pas de voir de mycélium dans l'aubier.

3.2. Quantification de l'ADN extrait

Les conditions fixées par Le Quéré et al. (2002) nous ont permis d'extraire tous nos échantillons.

La concentration et la pureté de l'extrait d'ADN total ont été évaluées en mesurant l'absorbance à 260nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le rapport d'absorbance 260/280 indiquant le degré de pureté de la purification est compris entre 1,7 et 1,9, ce qui nous a permis de travailler ultérieurement de façon reproductible.

La quantification est réalisée sur 2µl d'échantillon en utilisant le spectrophotomètre Nano Drop ND-1000.

Le tableau 2 présente la quantification de l'ADN pour chaque échantillon à partir des deux méthodes d'extraction : 1) avec les kits DNeasy (Qiagen) et 2) avec la méthode au mercapto-éthanol (Le Quéré et *al.*, 2002) . La concentration est exprimée en ng/l.

Tableau 4 : Résultats de la quantification et de la pureté de l'ADN.

N° Réf.	Numéro HydroQuébec	1) Concentration ng/μl avec les kits DNeasy (Qiagen)	2) Concentration ng/μl mercapto-éthanol (Le Quéré et <i>al.</i> , 2002)
1a	UE4GES	2.96	14.68
1b	UE4GES	14.81	258.36
2a	REE4WR	33.89	10.3
2b	REE4WR	42.21	49.67
3a	RBMU28	46.25	12.41
3b	RBMU28	28.65	43.71
4a	EQU7NOB	12.95	64.68
4b	EQU7NOB	44.36	156.17
5a	EUHZEM	32.25	54.96
5b	EUHZEM	40.23	4.48
6a	5H1ZKT	41.25	15.54
6b	5H1ZKT	17.89	67.48
7a	EE6NU9	23.34	338.74
7b	EE6NU9	64.5	77.7
8a	ENSUFF	78.89	48.88
8b	ENSUFF	76.23	307.01
9a	ECTHED	35.89	62.57
9b	ECTHED	21.35	47.69
10a	5GY1Y3	12.85	44.26
10b	5GY1Y3	17.89	52.26
11a	EW12FP	74.56	55.66
11b	EW12FP	65.58	37.17
12a	5T3WAQ	32.15	61.9
12b	5T3WAQ	28.56	43.48
13a	5YNHYD	62.7	32.85
13b	5YNHYD	2.13	55.67
14a	AIEXES	25.61	57.69
14b	AIEXES	23.12	9.75
15a	APMGOM	5.89	21.92
15b	APMGOM	6.23	14.41
16a	T8S36E	31.34	4.49
16b	T8S36E	53.69	31.22
17a	OLPBHQ27	22.12	23.28
17b	OLPBHQ27	23.23	139.97
18a	Marie-Renée	56.23	178.35
18b	Marie-Renée	32.62	50.21
18c	Champignon Marie-Renée	97.59	Pas assez de matériel biologique
19a	Poteau -125	79.29	230.3
19b	Poteau 125	18.26	485.21
19c	Poteau 120	32.59	220.86
19d	Poteau 121	57.86	105.54
	1AT-PR	34.96	133.62
	1BT-PR	56.18	177.57
	1AT-PG	12.15	130.21
	1BT-PG	21.3	220.12

3.3. Amplification des ITS (PCR); séquençage et analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

- Nous avons obtenu des amplifications d'ITS fongiques à partir des extraits d'ADN testés au 1/100^{ième} pour les échantillons suivants : RBMU28; EUHZEM; 5H1ZKT; ENSUFF; ECTHED; 5GY1Y3; EW12FP; 5T3WAQ; 5YNHYD; AIEXES; APMGOM; 18b (Marie Renée); 19a (poteau 125), 19b (poteau 125), 19c (poteau 120), 19d (poteau 121).
- Le poids moléculaire pour chaque amplifiat est d'environ 500 à 700 paires de bases.
- En revanche, les produits d'amplifications de l'ADN des autres échantillons testés au 1/100, 1/1000 et 1/10000^{ième}, n'ont pas été obtenus. En se basant sur les résultats des témoins positifs récoltés sur le site de l'IREQ tels que : 19a (poteau 125), 19b (poteau 125), 19c (poteau 120), 19d (poteau 121) nous **confirmons l'inexistence probable de champignons dans les poteaux électriques d'HydroQuébec selon les conditions de notre réaction de PCR¹**.

¹En supposant que chaque échantillon possède ses propres spécificités car le champignon varie tant au niveau de la qualité de l'ADN obtenu que de la quantité d'ADN. Nous suggérons les hypothèses suivantes pour expliquer ces résultats :

- les pigments restants après extraction de l'ADN inhiberaient la Taq polymérase en bloquant la phase d'élongation. Il serait envisageable de réaliser ces réactions de PCR en éliminant les pigments restants en ajoutant, au besoin 1mg/ml de Bovine Serum Albumine.
 - Lors de la PCR, une amplification non spécifique de différents fragments devrait se réaliser. Nous suggérons dans ce cas là, de choisir d'autres amorces et de changer les conditions de températures et de concentrations dans lesquelles l'amplification doit empêcher ce type de résultat.
 - Une autre explication peut résider dans le fait que le matériel fongique d'étude est dicaryotique. Les fragments de taille inférieure à 100 paires de bases dus sans doute à un grand polymorphisme (multiples bandes) tendent à disparaître dans le gel. Ils ne sont donc pas pris en considération car ils se situent sous le seuil de résolution de l'électrophorèse telle qu'elle est pratiquée. Pour tester cette hypothèse et permettre d'éliminer le problème des bandes multiples, il conviendrait de réaliser un clonage avant l'amplification.
- Les 16 amplifiats obtenus ont permis l'obtention de séquences nucléotidiques pour la plupart interprétables** après les comparaisons avec les banques de données par BLAST

**Dans le tableau 5, le résultat « non déterminé » indique une séquence trop courte qui est non significative et reste ininterprétable lors de la recherche de similarité par BLAST.

- Les recherches de similarité par BLAST révèlent pour les échantillons dits témoins positifs*** des séquences des genres *Gloeophyllum* et *Ganoderma*, agents de pourriture fibreuse et des séquences du genre *Coniophora*, champignon de pourriture cubique. Nous

Faisabilité de la méthode de détection moléculaire sur des poteaux électriques d'HydroQuébec

notons que ces champignons, de la famille des basidiomycetes, sont des champignons qui dégradent les bois.

*** Nous rappelons que ce sont tous des carpophores récoltés sur les poteaux électriques du site d'HydroQuébec (« essai terrain pour étudier le comportement et la durée de vie des poteaux »). Ces carpophores portent les références suivantes : 19a* (poteau 125), 19b* (poteau 125), 19c* (poteau 120), 19d* (poteau 121).

En revanche, les autres BLAST pour les échantillons des poteaux électriques d'HydroQuébec ont révélé les genres : *Alternaria*, *Phaeomoniella*, *Mycosphaerellaceae*, *Bensingtonia*, *Cladosporium*, *Beauveria*, *Aspergillus*, *Debaryomyces*. Ce sont tous des champignons ubiquistes qui ne génèrent en aucun cas la dégradation du bois.

Tous ces résultats figurent dans le Tableau 5.

Dans ce tableau est présenté le descriptif de l'échantillon :

Le numéro de référence (N°Ref); l'endroit du prélèvement de l'échantillon (au collet; à 1,30m du sol); le numéro de référence attribué par HydroQuébec; le nombre d'années de traitement du poteau; la concentration de l'ADN génomique en ng/μl selon la méthode d'extraction au mercapto-éthanol (Le Quéré et *al.*, 2002); le résultat de l'obtention de produits après amplification de la portion d'ADN selon nos conditions standards de PCR; le nombre de paires de bases de la séquence amplifiée (npb), le nom de la souche révélée après comparaison des séquences par BLASTn, et les observations.

Tableau 5: Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques qui ont donné la même espèce et le même genre de champignon pour la séquence la plus proche.

N° Réf.	Collet	1,3m	Numéro Hydro-Québec	Traitement (années)	Concentration ng/ μ l (Le Quéré et al, 2002)	Obtention produits de PCR	Nombre de paires de bases de la séquence amplifiée npb	Identité de la souche après BLASTn	Observations
1a	x		UE4GES	32	14.68				Culot d'ADN coloré et dilué au 1/1000 et au 1/10000
1b		x	UE4GES	32	258.36				
2a	x		REE4WR	35	10.3				
2b		x	REE4WR	35	49.67				
3a	x		RBMU28	32	12.41				
3b		x	RBMU28	32	43.71	+	864	Non déterminé	ADN dilué au 1/100
4a	x		EQU7NOB	19	64.68				Culot d'ADN coloré et dilué au 1/1000 et au 1/10000
4b		x	EQU7NOB	19	156.17				
5a	x		EUHZEM	19	54.96	+	645	Non déterminé	ADN dilué au 1/100
5b		x	EUHZEM	19	4.48				Culot d'ADN coloré et dilué au 1/1000 et au 1/10000
6a	x		5H1ZKT	21	15.54				
6b		x	5H1ZKT	21	67.48	+	475	Alternaria alternata	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
7a	x		EE6NU9	9	338.74				Culot d'ADN coloré dilué au 1/1000 et au 1/10000
7b		x	EE6NU9	9	77.7				
8a	x		ENSUFF	9	48.88	+	525	Phaeomoniella sp.	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
8b		x	ENSUFF	9	307.01				Culot d'ADN coloré dilué au 1/1000 et au 1/10000
9a	x		ECTHED	9	62.57				

Suite Tableau									
N° Réf.	Collet	1,3m	Numéro Hydro-Québec	Traitement (années)	Concentration ng/µl (Le Quéré et al, 2002)	Obtention produits de PCR	Nombre de paires de bases de la séquence amplifiée npb	Identité de la souche après BLASTn	Observations
9b		x	ECTHED	9	47.69	+	758	Non déterminé	ADN dilué au 1/100
10a	x		5GY1Y3	?	44.26	+	345	Non déterminé	ADN dilué au 1/100
10b		x	5GY1Y3	?	52.26	+	759	Mycosphaerellaceae sp.	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
11a	x		EW12FP	46	55.66	+	673	Bensingtonia sakaguchii	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
11b		x	EW12FP	46	37.17	+	702	Cladosporium cf.	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
12a	x		5T3WAQ	55	61.9				Culot d'ADN coloré dilué au 1/1000 et au 1/10000
12b		x	5T3WAQ	55	43.48	+	833	Non déterminé	ADN dilué au 1/100
13a	x		5YNHYD	42	32.85				Culot d'ADN coloré dilué au 1/1000 et au 1/10000
13b		x	5YNHYD	42	55.67	+	629	Beauveria virella	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
14a	x		AIEXES	58	57.69	+	539	Aspergillus sp.	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
14b		x	AIEXES	58	9.75				Culot d'ADN coloré dilué au 1/1000 et au 1/10000
15a	x		APMGOM	58	21.92	+	554	Aspergillus sp.	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
15b		x	APMGOM	58	14.41				
16a	x		T8S36E	58	4.49				
16b		x	T8S36E	58	Pas assez de matériel				Culot d'ADN coloré dilué au 1/1000 et au 1/10000

Suite Tableau									
N° Réf.	Collet	1,3m	Numéro Hydro-Québec	Traitement (années)	Concentration ng/µl (Le Quéré et al, 2002)	Obtention produits de PCR	Nombre de paires de bases de la séquence amplifiée npb	Identité de la souche après BLASTn	Observations
17a	x		OLPBHQ27	6	23.28				Culot d'ADN coloré et dilué au 1/1000 et au 1/10000
17b		x	OLPBHQ27	6	139.97				
18a	x		Marie-Renée	6	178.35				
18b		x	Marie-Renée	6	50.21	+	691	Debaryomyces vanrijiae	ADN dilué au 1/100 Champignon ubiquiste
19a			Poteau infesté -125		230.3	+	383	Gloeophyllum sepiarium	ADN dilué au 1/100 Champignon lignivore de pourriture fibreuse
19b			Champignon Poteau 125		485.21	+	434	Gloeophyllum sepiarium	ADN dilué au 1/100 Champignon lignivore de pourriture fibreuse
19c			Champignon Poteau 120		220.86	+	716	Ganoderma lucidum	ADN dilué au 1/100 Champignon lignivore de pourriture fibreuse
19d			Champignon Poteau 121		105.54	+	552	Coniophora puteana	ADN dilué au 1/100 Champignon lignivore de pourriture cubique
AT-PR					133.62				Culot d'ADN coloré et dilué au 1/1000 et au 1/10000
BT-PR					177.57				
AT-PG					130.21				
BT-PG					220.12				

CHAPITRE 4. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Après avoir appliqué et adapté la méthode de détection moléculaire de champignons utilisée au CIRAD sur les échantillons de bois recueillis sur des poteaux de différents groupes d'âge du réseau de distribution d'Hydro-Québec **nous ne décelons pas de champignons lignivores** dans l'aubier des poteaux électriques d'HydroQuébec traités au CCA et au PCP.

Les seuls échantillons qui se sont révélés positifs sont ceux issus des témoins provenant du site d'HydroQuébec qui sont du genre *Gloeophyllum*, *Ganoderma*, agents de pourriture fibreuse et du genre *Coniophora*, champignon de pourriture cubique. Ces champignons, tous de la famille des basidiomycetes, sont des champignons qui dégradent les bois.

Dans ce travail, il convient de rappeler que lors des extractions de l'ADN, l'aubier de ces échantillons présentait une dureté exceptionnelle due à leur traitement et donc présentait des difficultés lors de la réduction de l'échantillon bois en poudre.

Dans le futur, des mises au point seront nécessaires afin de réduire le bois en poudre sans altérer l'ADN du champignon. Ces mises au point tiendront compte de certaines particularités des poteaux électriques comme les produits de préservation, les tanins et les pigments qui inhiberaient certaines enzymes spécifiques des réactions de polymérase.

De plus, il faudrait multiplier le nombre d'échantillons afin de valider de manière certaine cette technique de diagnostic précoce de champignons qui dégradent les poteaux électriques d'HydroQuébec. Cela nous permettra ainsi de connaître la diversité de ces champignons capables de dégrader des poteaux traités au CCA et au PCP.

REFERENCES

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J., 1997. Gapped BLASTn and PSI-BLASTn: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 : 3389-402.

Gardes M. et Bruns T., 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 : 113-118.

Le Quéré, 2002. Modification of the method developed by Wöstemeyer in 1985.

Mullis K.B. et Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.

White T.J., Bruns T., Lee S. et Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dans : *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications*, (eds.) Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et White T.J. Academic Press Inc., San Diego, Californie, 315-322.