

DK 562329



BA_TH_1811

UNIVERSITE DE BRETAGNE
OCCIDENTALE

UFR Sciences et Techniques

Master Sciences Technologies Santé

Mention Biologie-Santé

Spécialité : MICROBIOLOGIE
FONDAMENTALE ET APPLIQUEE
(année 2010 / 2011)

Biodégradation de bois pollués par les communautés fongiques endogènes de sols tropicaux (Guyane)

Mémoire présenté le 28 juin 2011

Par Fanny CHAFFANEL



Stage effectué au
Laboratoire Universitaire de
Biodiversité et d'Écologie Microbienne

pour le CIRAD

Responsables de stage :

Dr Gaétan Le Floch

Dr Alba Zaremski

Ce mémoire a été réalisé dans le cadre du Master 2 Biologie et Santé, spécialité Microbiologie Fondamentale et Appliquée au cours de l'année universitaire 2010/2011. Il porte sur un stage dont le sujet était la biodégradation de bois pollués par les communautés fongiques endogènes de sols tropicaux (Guyane), stage réalisé par Fanny Chaffanel encadrée par ses maîtres de stage, les Dr Gaétan Le Floch et Alba Zaremski.

Le stage a été réalisé au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne sis à l'ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, du 03 janvier au 29 juillet 2011. Il a été financé par le CIRAD.

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet



Woods have been processed with fungicides for a long time, and the effects of these fungicides on forest grounds after being washed have turned into a true ecological issue. It is in this perspective that we are proposing to study fungal communities of these contaminated woods in a purpose of bioremediation. Most of precedent studies have focused on ability of some Basidiomycetes and white rot fungi to degrade these biocide produces.

Samples of processed woods and witness woods have been incubated in containers of forest grounds in Guyana. The first two samplings of these woods and grounds have been realized five months apart. A crop and molecular study allowed us to isolate and identify forty strains of Ascomycetes able to develop on wood and resist xenobiotics. Until now, no Ascomycete was known to resist xenobiotics.

Furthermore, a study of fungal communities of the woods and ground were done by D-HPLC and SSCP, then analyzed by ACP. According to these analyses, biocide produces are washed in the ground and have an impact on these fungal communities, which are different depending on date of sampling and the way wood is processed.

These interesting results have to be deepened by other samplings and a more important crop study.

Key Words: Fungal Community, D-HPLC, CE-SSCP, PCP, CCA

Les bois ont longtemps été traités avec des fongicides et l'impact de ces fongicides sur les sols après lessivage constitue un vrai problème écologique. Dans cette perspective nous nous proposons d'étudier des communautés fongiques de ces bois contaminés dans un but de biorémediation. La plupart des études précédentes se sont focalisées sur la capacité de certains Basidiomycètes et de certains champignons de la pourriture blanche à dégrader ces produits biocides.

Des échantillons de bois traités et témoins ont été incubés dans des containers de sols forestiers en Guyane. Deux premiers échantillonnages de ces bois et du sol des containers ont été réalisés à 5 mois d'écart. Une étude culturale et moléculaire a permis l'isolement et l'identification de 40 souches d'Ascomycètes qui sont capables de se développer sur le bois et de résister à des xénobiotiques.

D'autre part, une étude des communautés fongiques du bois et du sol a été effectuée par D-HPLC et CE-SSCP puis analysée par ACP. D'après ces analyses les produits biocides sont lessivés dans le sol et ont un impact sur les communautés fongiques. Celles-ci sont en effet différentes selon le temps d'échantillonnage et selon le traitement du bois.

Ces résultats intéressants sont cependant à approfondir par d'autres échantillonnages et une étude culturale plus approfondie.

Mots clefs : Communauté fongique, D-HPLC, CE-SSCP, PCP, CCA

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Table des matières | I |
| Tables des illustrations..... | III |
| Liste des abréviations utilisées | IV |
| Remerciements | V |
| Introduction | 1 |
| I. La préservation du bois et ses enjeux..... | 1 |
| 1. Constituants du bois | 1 |
| 2. Dégradation du bois et classes de durabilité..... | 2 |
| 3. Traitements fongicides et biocides..... | 3 |
| II. Des microorganismes en biorémédiation | 5 |
| 1. Croissance des Basidiomycètes (saprophytes) lignolytiques dans le sol | 5 |
| 2. Interaction des Basidiomycètes et des microorganismes du sol | 6 |
| 3. Production d'enzymes extracellulaires..... | 6 |
| 4. Expériences de biorémédiation | 7 |
| III. Objectifs..... | 8 |
| Matériel et méthode..... | 9 |
| I. Matériel biologique..... | 9 |
| 1. Le bois | 9 |
| 2. Le sol | 10 |
| II. Méthodes | 10 |
| 1. Traitement des échantillons | 10 |
| 2. Amplification par PCR | 11 |
| 3. D-HPLC | 13 |

| | | |
|------|--|----|
| 4. | SSCP | 14 |
| 5. | Séquençage..... | 14 |
| 6. | Traitement des données et analyse des séquences..... | 15 |
| 7. | Traitement statistique des données..... | 15 |
| | Résultats..... | 16 |
| I. | Analyse culturelle..... | 16 |
| II. | Analyse du bois | 18 |
| III. | Analyse du sol..... | 20 |
| | Discussion..... | 21 |
| | Conclusion et perspectives | 25 |
| | Bibliographie | 27 |

Tables des illustrations

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Affiliation taxonomique de séquences amplifiées d'ADNr 18S provenant (a) d'ADN du sol et (b) d'ARN en transcriptase inverse du sol..... | 5 |
| Figure 2: Pourcentage de biocides observés après culture fongique sur des disques traités au tébuconazole et propiconazole. | 6 |
| Figure 3: Aperçu d'expériences de biorémédiation <i>in situ</i> | 7 |
| Figure 4: Instrument D-HPLC Wave Transgenomic utilisé pour l'étude des communautés fongiques | 13 |
| Figure 5: Analyse en composante principale (axe 1 et 2) des échantillons de Pin Rouge : représentation des individus et cercle de corrélation des variables..... | 18 |
| Figure 6: Analyse en composante principale (axe 1 et 2) des échantillons de Yayamadou : représentation des individus et cercle de corrélation des variables..... | 19 |
| Figure 7: Analyse en composante principale (axe 1 et 2) des échantillons de Yayamadou : représentation des individus et cercle de corrélation des variables..... | 20 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Classification de la durabilité naturelle du bois, selon le Comité National pour le Développement du Bois..... | 3 |
| Tableau 2: Nombre d'échantillons de bois selon le type de bois et de traitement | 10 |
| Tableau 3: Conditions de D-HPLC utilisées pour l'étude des communautés fongiques..... | 13 |
| Tableau 4: Souches isolées des bois traités et mis en contact avec un sol tropical forestier (Guyane) | 16 |

Liste des abréviations utilisées

- CCA : Arsenate de Cuivre Chromaté
- PCP : Pentachlorophénol
- D-HPLC : Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes
- CE-SSCP : Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism
- BMA : Bois Médium Agar
- PDA : Potato dextrose Agar
- MEPA : Mal Extract Peptone Agar
- ITS : Internal Transcribed Spacer
- TEAA : Acétate de Triéthylamonium
- ACP : Analyse en Composante Principale
- UTO : Unité Taxonomique Opérationnelle
- HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Remerciements

Je remercie chaleureusement l'ensemble du laboratoire du LUBEM de Plouzané pour son accueil, sa bonne humeur et son soutien pendant toute la durée de ce stage.

Je souhaite remercier plus précisément le docteur Jean-Luc Jany, Mme Stella Debaetz, Mme Danielle Arzur, Melle Olivia Le Bourhis, Mme Marie-Anne Le Bras, Mr Franck Deniel, Mme Sylvie Tréguer et Mr Christophe le Meur pour leur aide technique, leur patience et leurs explications tout au long du stage.

Merci au docteur Georges Barbier pour m'avoir acceptée en tant que stagiaire au sein de son équipe et pour ses précieux conseils en statistiques.

Enfin, Je remercie le docteur Gaétan Le Floch pour m'avoir acceptée en tant que stagiaire sur ce projet passionnant et pour son aide durant le stage et la rédaction de ce rapport.

MERCI

Introduction

I. La préservation du bois et ses enjeux

Depuis toujours l'Homme construit en bois. Les premiers Hommes construisaient ainsi car il s'agissait d'un matériau accessible facilement et en grande quantité. Au cours des siècles, d'autres matériaux ont fait leur apparition mais l'utilisation du bois est restée. Aujourd'hui le bois est considéré comme un matériau noble, résistant, esthétique et peu onéreux. De plus, son origine naturelle lui confère une image positive et écologique.

De nombreuses essences sont actuellement utilisées et parmi elles nombreuses sont les essences tropicales. Celles-ci sont considérées comme plus résistantes aux facteurs environnementaux et aux agents biologiques de dégradation. Malgré tout, le bois est un matériau sensible qu'il faut dans la plupart des cas, et en particulier pour une utilisation extérieure, traiter chimiquement afin d'augmenter sa résistance. Ainsi, dans une démarche de développement durable, ce type d'utilisation du bois nécessite de prendre en considération le devenir des bois traités en fin de vie.

En effet, de nombreux traitements utilisés actuellement présentent un danger pour l'environnement, en raison de leur caractère toxique et de leur rémanence. Pour mieux comprendre ces phénomènes de dégradation du bois et de risque de pollution associés aux traitements, nous présenterons en introduction les différentes classes de bois et leur durabilité, leur dégradation par les microorganismes ainsi que les traitements appliqués.

1. Constituants du bois

L'arbre appartient à l'embranchement des phanérogames c'est-à-dire aux plantes à fleurs se reproduisant par graines. Il comporte deux sous embranchements : les angiospermes ligneuses (feuillus) et les gymnospermes (résineux). Le bois, principal constituant de l'arbre, possède une paroi cellulaire constituée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines) et de polymères phénoliques (lignines). Juste sous l'écorce de l'arbre se trouve l'aubier. Il s'agit de la partie correspondant aux zones d'accroissement le plus récemment formées. L'aubier contient des cellules vivantes riches en protéines (1).

2. Dégradation du bois et classes de durabilité

Du fait de sa constitution, le bois est un matériau sensible aux agents biologiques de dégradation. Ces organismes, dont la nature varie selon l'emploi du bois et la zone géographique d'utilisation, dégradent la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (2).

Il existe plusieurs formes de pourriture en fonction de l'agent de dégradation. Les plus connus et les plus visibles sont les insectes xylophages, mais ceux qui causent les plus gros dégâts sont les champignons lignivores. Ceux-ci se développent dès que les taux d'humidité atteignent 22% (1).

a. Agents de bleuissement et moisissures

Certains champignons se développent à la surface du bois sans altérer ses propriétés mécaniques. Ils vont alors se nourrir des substances de réserves contenues dans l'aubier. Ceci se traduit par une coloration du bois. En effet, le bois devient noir dans le cas des moisissures appartenant aux classes des Ascomycètes, Deutéromycètes ou Zygomycètes. Il devient bleu-gris sous l'action des agents de bleuissement de la classe des Ascomycètes. Ces champignons se développent sur les résineux et les feuillus des zones tempérées et tropicales.

b. Pourriture blanche

La pourriture blanche, ou pourriture fibreuse, est causées par les Basidiomycètes qui se développent sur les arbres ayant une forte teneur en lignine. La lignine étant le composant permettant la tenue du bois, une fois infecté, celui-ci devient mou, de couleur blanche avant de se décomposer en fibrilles. Parmi ces Basidiomycètes, le plus connu et le plus décrit est *Trametes versicolor*.

c. Pourriture cubique

Comme les agents de la pourriture blanche, ils font partie des Basidiomycète mais ils s'attaquent à l'autre composé majoritaire du bois : les polysaccharides. Ils provoquent une fracture du bois en forme de quadrillage, conférant au bois un aspect friable brun foncé. Leur représentant le plus connu est la mérule (*Serpula lacrymans*) qui induit de forts dégâts dans les habitations aux taux d'humidités assez faibles. Pour les bois d'extérieur et les bois aux taux d'humidité plus importants (40 à 60%) on retrouve les coniophores.

d. Pourriture molle

Pour les bois à très fort taux d'humidité, c'est-à-dire en contact avec le sol ou en milieu aquatique, ce sont les champignons de la classe des Ascomycètes qui agissent. Ils s'attaquent également à la lignine, ramollissant le bois et lui donnant une coloration noire.

e. Classe de durabilité

Les bois ont été classés en fonction de leur composition, de leur résistance aux agents biologiques de biodégradation et de leur imprégnabilité (capacité à s'imprégner en pesticides). Selon le type d'utilisation du bois, celui-ci sera choisi dans telle ou telle classe. Il existe des classements plus précis des résineux, des feuillus européens et des feuillus tropicaux.

Tableau 1: Classification de la durabilité naturelle du bois, selon le Comité National pour le Développement du Bois

| Classe d'imprégnabilité | Description | Explication |
|-------------------------|-------------------------|--|
| 1 | Imprégnable | Facile à traiter, le bois scié peut être pénétré complètement avec un traitement sous pression, sans difficulté |
| 2 | Moyennement imprégnable | Assez facile à traiter ; habituellement une pénétration complète n'est pas possible, mais après 2 ou 3 h de traitement sous pression, une pénétration latérale de plus de 6 mm peut être atteinte dans les résineux et une large proportion des vaisseaux peut être pénétrée dans les feuillus |
| 3 | Peu imprégnable | Difficile à traiter, 3 à 4 h de traitement sous pression ne peuvent donner plus de 3 à 6 mm de pénétration latérale |
| 4 | Non imprégnable | Virtuellement impossible à traiter ; peu de produit de préservation absorbé même après 4 h de traitement sous pression. Pénétrations latérale et longitudinale minimales |

3. Traitements fongicides et biocides

Comme expliqué ci-avant, le bois est un matériau qui peut être très sensible à son environnement. Il convient donc de renforcer sa durabilité naturelle par des procédés chimiques ou naturels. Jusque dans les années 80, ce sont les agents biocides de première génération qui sont utilisés. Dans cette classe de produits se retrouvent les sels métalliques à base d'arsenic, de cuivre, de bore ou de fluor ainsi que les produits biocides organiques de synthèse (pyréthroïdes, azoles,

famille des imidazolium...) et les polychlorophénols (PCP) formulés dans des solvants pétroliers. Il existe différents procédés d'imprégnation du bois, parmi lesquels l'autoclavage pour une bonne pénétration du produit. Les plus anciens sont des procédés d'immersion, de peinture ou d'aspersion. Ainsi, les produits biocides de première génération sont facilement délavés dans l'environnement, polluant les sols et les eaux de ruissellement (3).

Un exemple de bois traités au PCP et présentant ces caractéristiques est celui des poteaux électriques au Québec. Ces poteaux, âgés de plus de 25 ans, présentent aujourd'hui une forte concentration de produit à leur base. En effet, le PCP est un dérivé goudronné ayant tendance à facilement être lessivé le long du bois et risque de polluer le sol dans lequel il s'infiltré par ruissellement. Aussi les autorités ont-elles décidé d'interdire ce produit et de le remplacer par un biocide de deuxième génération : le CCA (Arsenate de Cuivre Chromaté), moins toxique et plus efficace. Les poteaux traités au PCP et au CCA sont aujourd'hui en fin de vie et sont remplacés peu à peu par des poteaux traités avec ces nouvelles formulations.

En effet, on utilise aujourd'hui des produits biocides de troisième génération comme le couple Propiconazole/Tébuconazole ou d'autres différentes combinaisons de fongicides en fonction des usages. La question du recyclage des bois traités avec les produits de 1^{ère} et 2^{ème} génération se pose donc avec une particulière acuité du fait de l'évolution de la réglementation qui contraint désormais les propriétaires de réseaux à gérer ces produits arrivés en fin d'utilisation (2). Ces poteaux sont susceptibles de polluer les sols lorsqu'ils sont stockés dans l'attente de leur recyclage ou de leur destruction. En France ils sont incinérés dans les cimenteries afin d'alimenter les fours. Ils peuvent également, dans le cas du CCA, être distillés en carbone par un procédé spécifique nommé CHARTHERM™. En effet, contrairement à la combustion ce nouveau procédé ne rejette dans ses fumées ni éléments minéraux ni métaux lourds. De plus ce procédé permet une revalorisation des bois traités (4).

Afin de faciliter le traitement de ces bois, l'utilisation des champignons comme agents de biodégradation et de biorémédiation est une alternative encore peu évaluée.

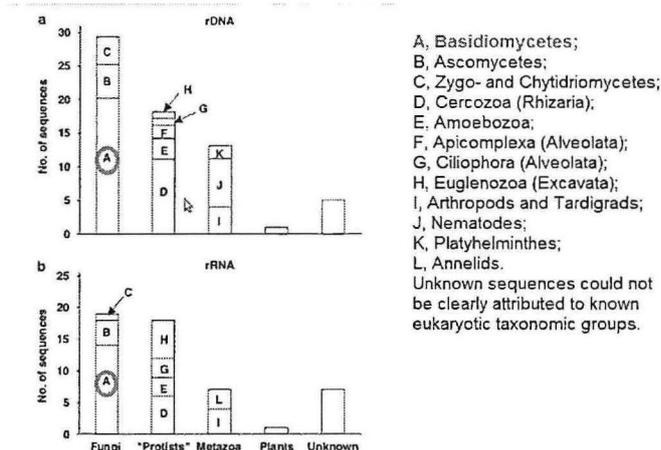


Figure 1: Affiliation taxonomique de séquences amplifiées d'ADNr 18S provenant (a) d'ADN du sol et (b) d'ARN en transcriptase inverse du sol.

II. Des microorganismes en biorémédiation

Parmi les microorganismes eucaryotes présents dans les sols forestiers, les champignons, et plus particulièrement les Basidiomycètes, sont majoritaires (Figure 1) (5). Ils sont autant majoritaires du fait de leur présence (Figure 1_a) que de leur forte activité détectée par la présence de leurs ARNs (Figure 1_b). Ils occupent un

rôle essentiel dans la vie et la fertilité des sols car ce sont des décomposeurs primaires de la matière organique. Certaines pressions anthropiques perturbent durablement le fonctionnement du sol (par exemple le relargage de produits biocides). Néanmoins, certains basidiomycètes sont capables de se développer dans ces conditions polluées et participent ainsi à la dépollution du sol par biorémédiation (5).

1. Croissance des Basidiomycètes (saprophytes) lignolytiques dans le sol

Ces champignons ne poussent pas ou peu en dessous de 10°C mais peuvent se développer dans de larges gammes de températures et de conditions. Ainsi, seules les caractéristiques intrinsèques du sol peuvent avoir un véritable impact sur leur croissance.

En effet, le sol présente une hétérogénéité spatiale conduisant à une disparité des ressources en nutriments ; mais les champignons sont capables de se développer loin de leur source de nutriments qu'ils peuvent acheminer via leur mycélium. Ces deux caractéristiques provoquent une distribution agrégée des microorganismes (6).

Malgré tout, une fois établis dans de bonnes conditions, ils peuvent survivre longtemps. Selon les espèces, il existe des différences de quantité de biomasse formée et de potentiel à coloniser un sol non stérile. Certaines sont également plus soumises à la compétition spatiale que d'autres (6).

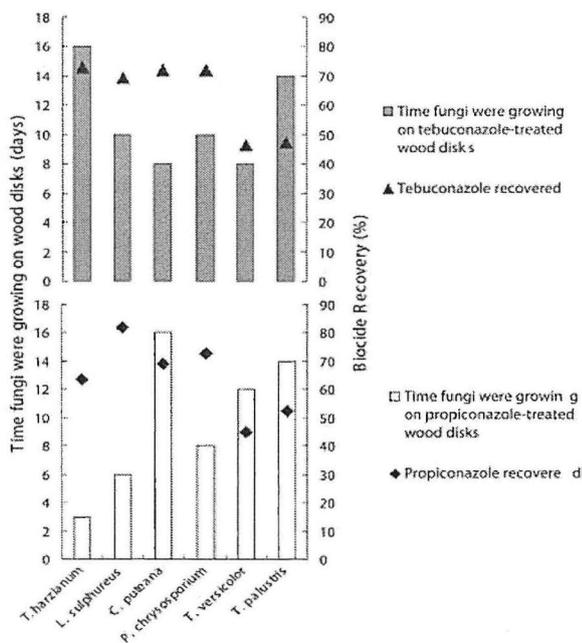


Figure 2: Pourcentage de biocides observés après culture fongique sur des disques traités au tébuconazole et propiconazole.

Enfin, certains Basidiomycètes sont tolérants aux produits toxiques tels que les Pentachlorophénols (PCP), aux polluants organiques et aux hydrocarbures polycycliques aromatiques (Figure 2) (7; 8).

2. Interaction des Basidiomycètes et des microorganismes du sol

Les interactions entre bactéries et champignons dépendent de leur productions d'antibiotiques, du (myco)parasitisme et des compétitions pour l'espace et les nutriments. Les bactéries dégradent en effet les substrats simples, permettant une complémentarité avec les Basidiomycètes qui dégradent les matières organiques récalcitrantes comme la lignine (principal constituant du bois)

par l'action d'enzymes ligninolytiques. Cependant cela peut au contraire conduire à la création de différentes niches écologiques (6; 9).

Les protistes, quant à eux, régulent les populations de microorganismes par prédation.

Enfin, de très nombreux microorganismes eucaryotes ne sont pas cultivables en condition de laboratoire et de nombreuses espèces restent à décrire (10; 11).

3. Production d'enzymes extracellulaires

C'est la large gamme d'enzymes produites qui permet aux basidiomycètes de survivre dans les multiples conditions décrites ci-dessus. La température et l'activité de l'eau influent sur la production, l'activité et la stabilité des enzymes, établissant ainsi une saisonnalité de la décomposition alors que la teneur en manganèse influe sur la production d'enzyme.

Ainsi les enzymes principalement excrétées sont (6; 12):

- Les enzymes ligninolytiques, qui permettent la transformation de la lignine du sol (augmentation de la transcription des gènes associés lors de l'invasion du sol par des basidiomycètes). Parmi celles-ci les glutathionnes S-transférase semblent avoir un rôle important de détoxification mais elles sont peu étudiées chez les champignons.
- Les Mn-peroxydases et les laccases, qui permettent la dégradation des acides humiques du sol.

4. Expériences de biorémédiation

| Contaminant type | PCP ¹ | PCP and creosote | PCP and creosote | PCP and creosote | Explosives (TNT, HMX, RDX) ² | PCP |
|--------------------------------|---|---|----------------------------------|---|---|--|
| Fungus | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>P. sordida</i> | <i>P. chrysosporium</i> , <i>P. sordida</i> , <i>Trametes hirsuta</i> | <i>Phanerochaete sordida</i> | <i>Phanerochaete sordida</i> | <i>Pleurotus ostreatus</i> | <i>Trametes versicolor</i> |
| Treatment | on site | on site | on site | on site, soil diluted, tillage, water adjustment | on site, tillage | off site in covered bioreactors, soil diluted, aeration, water adjustment |
| Plot area (m ²) | 1.0 | 2.3 | 2.3 | 630 | 26.8 | 2.1 |
| Soil depth (m) | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.6 |
| Inoculum carrier (amount) | wood chips < 3 % | fortified grain/ sawdust 5-13 % | fortified grain/ sawdust 10 % | fortified grain/ sawdust 10 % | rye 17 % | sawdust/cornmeal/ starch 33 % |
| Additional substrate | peat moss 2 % | wood chips 2.5 % | wood chips 2.5 % | - | cellulose 33 %, gypsum, molasses | wood chips 33 % |
| Inoculation | mixing | mixing | mixing | mixing | mixing | mixing |
| Time (days) | 45 | 60 | 60 | 140 | 62 | 525-1225 |
| Performance fungi (removal) | 88-91 % PCP | 15-89 % PCP | 24-95 % PAHs ³ | 64 % PCP | TNT 98 %, HMX 70 %, RDX 96 % | >99 % PCP |
| Performance substrate addition | 10-35 % PCP | 14 % PCP | 15-68 % PAHs | 26 % PCP | TNT 96 %, HMX 49 %, RDX 92 % | not tested |
| Mean temperature | 15 °C | 17 °C | 17 °C | ? | ? | 17 °C |
| Reference | (Lamar & Dietrich 1990) | (Lamar et al. 1993) | (Davis et al. 1993) | (Lamar et al. 1994) | (Axtell et al. 2000) | (Walter et al. 2005) |

1 FCP - pentachlorophenol.
2 TNT - 2,4,6-trinitrotoluene; HMX - cyclotetramethylenetrinitramine; RDX - trinitromethylenetriamine.
3 PAHs - polycyclic aromatic hydrocarbons.

Figure 3: Aperçu d'expériences de biorémédiation *in situ*.

Dans la quasi-totalité des études sur la biorémédiation et ses aspects écologique (figure 3) (6), le sol n'est considéré que comme un support stérilisé avant d'êtreensemencé avec l'agent de biorémédiation sélectionné de manière empirique (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* par exemple). Le sol est ainsi préparé à êtreensemencé par voie externe causant la perte de près de 83% de la biomasse fongique.

Il est ainsi à noter que peu de travaux ont eu lieu *in situ*, car cela nécessite des études préliminaires parfois trop onéreuses et limitatives. La plupart de ces auteurs n'ont donc pas étudié les communautés fongiques présentes mais plutôt la capacité d'une espèce précise à résister aux contraintes physico-chimiques testées. Il a ainsi été mis à jour qu'une simple addition de substrats donne parfois d'aussi bons résultats qu'un traitement par Basidiomycètes (7; 13; 14).

III. Objectifs

Les Basidiomycètes saprophytes font l'objet d'une attention accrue depuis les années 1980, selon deux axes principaux : la gestion de la biomasse et la biorémédiation de produits biocides. Par exemple, dans le cadre de la dépollution des sols, *Trametes versicolor* présente une efficacité avérée sur le PCP (plus de 99% de PCP dégradé). Mais cette étude montre également une efficacité accrue si le champignon était naturellement présent dans le sol (6; 7; 15).

Aussi une étude descriptive des communautés microbiennes est-elle aujourd'hui nécessaire avant de passer à la caractérisation de la diversité fonctionnelle et des mécanismes impliqués dans la biorémédiation.

Dans notre étude nous nous proposons d'évaluer la biodiversité des champignons responsables de la dégradation du bois traité par des produits biocides et mis en contact avec un sol forestier tropical selon trois axes principaux :

- Identifier et isoler des champignons agents de biorémédiation,
- Evaluer l'impact des biocides sur les communautés fongiques d'un sol natif,
- Etablir un indice de biodégradation d'un sol forestier de Guyane.

Pour réaliser cela nous allons nous baser sur les techniques de caractérisation moléculaire des communautés microbiennes telles que la D-HPLC et la CE-SSCP dans ces bois contaminés. En parallèle nous conduisons une étude culturale des communautés fongiques présentes.

Ainsi dans un premier temps nous décrirons les conditions d'obtention des échantillons de bois et de sol traités ainsi que les différentes techniques mises en œuvre. Ensuite nous détaillerons les résultats obtenus avant de les discuter dans une troisième partie. Enfin, nous exposerons nos conclusions et nos perspectives.

Matériel et méthode

I. Matériel biologique

1. Le bois

Dans le département de l'UMR EcoFoG (Unité Mixte de Recherche Ecologie des Forêts de Guyane) du CIRAD de Guyane, des conteneurs étanches ont été remplis de terre collectée sur le site forestier de Paracou (5°18'N, 52°53'W). Dans ce sol forestier ont été plantés des échantillons de bois sous forme d'éprouvettes d'environ 5 à 10cm de long pour 2 à 10mm de diamètre. Ces morceaux de bois appartiennent à deux essences différentes : le Pin Rouge et le Yayamadou.

Le Pin Rouge est fréquemment utilisé pour la confection de mobilier technique tel que les poteaux électriques et les traverses de chemin de fer. Dans ces cadres, il est traité avec des fongicides tels que le PCP (Pentachlorophénol) et le CCA (Arsenate de cuivre chromaté). Le traitement au PCP se subdivise en deux catégories d'échantillons : ceux récoltés à la base du poteau (nommés PCP) et ceux prélevés à 1 mètre de hauteur (nommés PCP 1M). En effet, la texture goudronnée du PCP provoque son lessivage le long du poteau, ainsi le PCP se retrouve de façon plus concentrée au niveau du sol. Les éprouvettes traitées (CCA, PCP et PCP 1M) et non traitées (NT) sont enfoncées dans le sol de sorte que 2 cm seulement restent à l'extérieur.

Les échantillons de Yayamadou et de Pin Rouge non traités ont servi de témoins. Dans chaque bac ont été placés des échantillons traités de Pin Rouge ainsi que des échantillons témoins des deux bois. Un seul traitement est étudié par bac de terre avec une répétition sur 3 containers par traitement (tableau 2). Un dixième container ne contenant pas de bois sert de témoin sol.

Chaque container fermé est conservé dans un hangar à température ambiante (35°C en moyenne) et est arrosé régulièrement. Un échantillonnage aléatoire est effectué tous les cinq mois, le premier ayant été effectué en septembre 2010 et le second en février 2011. Cinq échantillonnages sont prévus pour ce projet, mais nos résultats ne porteront que sur les deux premières dates de prélèvement.

Tableau 2: Nombre d'échantillons de bois selon le type de bois et de traitement

| Numéro du container | Pin Rouge CCA | Pin Rouge PCP | Pin Rouge PCP 1m | Pin Rouge | Yayamadou |
|---------------------|---------------|---------------|------------------|-----------|-----------|
| 1 | 80 | 0 | 0 | 28 | 18 |
| 2 | 75 | 0 | 0 | 33 | 18 |
| 3 | 70 | 0 | 0 | 38 | 18 |
| 4 | 0 | 81 | 0 | 27 | 18 |
| 5 | 0 | 77 | 0 | 31 | 18 |
| 6 | 0 | 69 | 0 | 39 | 18 |
| 7 | 0 | 0 | 80 | 0 | 46 |
| 8 | 0 | 0 | 75 | 0 | 51 |
| 9 | 0 | 0 | 70 | 0 | 56 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

2. Le sol

A chaque échantillonnage de bois est réalisé un échantillonnage du sol de chaque container. Environ 5g de sol sont prélevés à la surface de chacun des containers.

II. Méthodes

1. Traitement des échantillons

a. Mise en culture

Les échantillons de septembre ayant été congelés, seuls ceux de février 2011 (conservés à 4°C) ont pu être mis en culture. Un échantillon de bois traité et un de chaque témoin des containers 1, 4 et 7 ont été débités au scalpel en fine lamelles qui ont ensuite été ensemencées sur trois milieux gélosés (en boîtes de Pétri) : BMA, PDA et MEPA (chacun additionnés à trois antibiotiques) et à quatre températures différentes (20°C, 25°C, 30°C et 35°C).

Les souches obtenues ont été isolées sur milieu gélosé PDA additionné de trois antibiotiques à 20°C et 35°C.

La même chose a été réalisée avec des échantillons désinfectés. En effet, alors que les échantillons sont initialement bruts et couverts de terre, ici ils ont été trempés 10min dans un bain d'alcool à 70° puis 5min dans un bain de javel à 7% avant d'être rincés par trois fois à l'eau distillée afin

d'être désinfectés en surface. Cette manipulation a pour but de collecter la flore fongique propre au bois et de la comparer à celle du sol obtenue avec les échantillons non désinfectés.

Les souches isolées ont été identifiées selon leur morphologie, et si leur morphologie n'était pas assez distinctive elles ont été identifiées par séquençage après extraction de leur ADN et amplification de celui-ci par PCR. Les souches isolées ont été confiées après identification à la Souchothèque de Bretagne.

b. Extraction d'ADN

L'ADN du bois a été extrait avec le kit « Fast DNA Spin Kit For Soil » (MP-Biomedicals®) selon les recommandations du fournisseur à partir d'échantillons de bois préalablement râpés à la râpe à bois.

L'ADN du sol a été extrait avec le même kit à partir des sols sans préparation préalable.

L'ADN des souches pures a été extrait avec le kit d'extraction « Fast DNA Spin Kit » (MP-Biomedicals®) à partir de cultures de 3 jours en boîtes de Pétri sur milieu PDA additionné de trois antibiotiques.

L'ADN extrait a été quantifié par analyse spectrophotométrique (Nanodrop de Thermo Scientific).

2. Amplification par PCR

a. Amplification par PCR

La région d'ADN fongique que l'on cherche à amplifier est la région ITS (Internal Transcribed Spacer). La comparaison des séquences de la région ITS est largement utilisée en taxonomie et phylogénie moléculaire, car elle est (en raison du nombre élevé de copies de gènes d'ARNr) facile à amplifier même avec de petites quantités d'ADN, et possède un haut degré de variation, même entre des espèces étroitement apparentées et en particulier chez les champignons. Pour ce faire, les amorces sélectionnées sont ITS 1 et ITS 4 pour une première PCR puis ITS 1 et ITS 2 pour la PCR nichée.

Le mécanisme de PCR nichée permet d'augmenter la sensibilité de la PCR. Il s'agit d'amplifier l'ensemble de la région ITS (ITS 1 et 2) puis d'amplifier une partie réduite (ITS I) de cette région.

Le mix utilisé correspond à 50µl et se compose d'1µl d'amorce sens (ITS 1 à 10µM), 1µl d'amorce anti-sens (ITS 4 ou ITS 2 à 10µM), 4µl de dNTP (2.5nM), 10µl de tampon (buffer 5X), 4µl de MgCl₂ (25nM), 0,2µl de taq polymérase, et 27.8µl d'eau de qualité biomoléculaire. 2µl d'ADN total sont utilisés comme matrice pour l'amplification. Lors de la PCR nichée servant pour l'analyse SSCP, le même protocole est utilisé à la différence que l'amorce ITS 2 est marquée.

Le protocole d'amplification PCR est composé de 25 cycles. Il est effectué grâce à un thermocycleur (MJ research® PTC 200). Chaque cycle comprend une première phase de 3min à 95°C puis une phase triptyque de 1min à 95°C, d'1min à la température t selon les amorces choisies (t=60°C pour ITS I et t=55°C pour ITS II) et d'1min à 72°C. Enfin la dernière phase dure 10min à 72°C. Puis les produits sont maintenus à 4°C jusqu'à révélation.

b. Migration et révélation des produits amplifiés

Les amplicons ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1.5% après migration de 1h à voltage constant de 90V. Au moment du dépôt, 3µl de tampon de charge 6X (G190A Promega®) ont été ajoutés à chacun des échantillons. En parallèle des échantillons, le marqueur de poids moléculaire 100 paires de bases (Promega®) a été déposé afin de contrôler la taille des fragments obtenus. Ce marqueur va de 100 à 1500 paires de bases.

La révélation du gel s'effectue en bain de bromure d'éthidium à 0,1µg/mL pendant au moins 20min. Il s'agit d'un agent intercalant, puissant mutagène qui se positionne entre les bases des acides nucléiques. Cette molécule est fluorescente sous UV (254nm). L'utilisation d'une caméra UV et du logiciel Gel Doc 2000 (Biorad®) permettent de visualiser les bandes obtenues sur gel par transillumination.

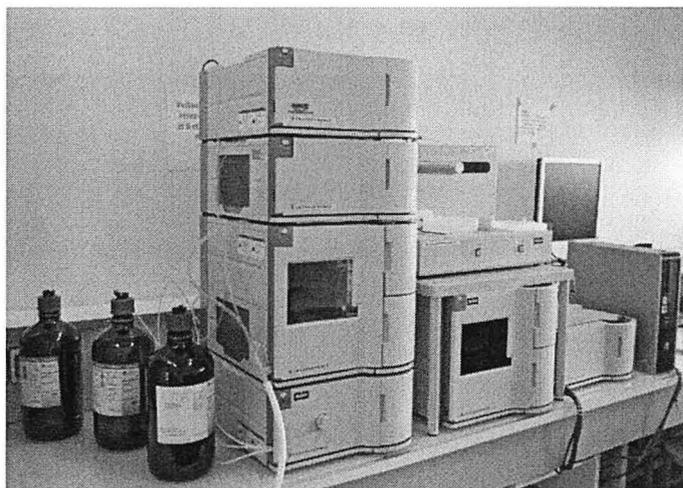


Figure 4: Instrument D-HPLC Wave Transgenomic utilisé pour l'étude des communautés fongiques

3. D-HPLC

Tous les échantillons d'ADN (bois, souches pures et sol) ont été analysés par D-HPLC (Chromatographie Liquide à Hautes Performances en conditions Dénaturantes).

La D-HPLC est une application de la méthode chromatographique classique (HPLC) à la séparation de l'ADN. L'ADN est introduit dans la colonne thermorégulée.

Les variations de la température appliquée à la colonne permettent de travailler en conditions dénaturantes ou non dénaturantes. La phase stationnaire électriquement neutre et hydrophobe est composée de particules alkylées non poreuses (styrène/divinylbenzène). Le TEAA est amphiphile, il s'adsorbe donc à la surface de la phase stationnaire, présentant ainsi une charge positive à sa surface. Ces particules vont attirer et fixer l'ADN chargé négativement. Son élution est réalisée en faisant passer un gradient linéaire et croissant d'acétonitrile. Un détecteur UV couplé à la machine lit les signaux en sortie de colonne.

Tableau 3: Conditions de D-HPLC utilisées pour l'étude des communautés fongiques

| | Time (min) | Buffer A | Buffer B |
|--------------------------|------------|----------|----------|
| Loading | 0 | 55 | 45 |
| Start gradient | 0,1 | 48 | 52 |
| Stop gradient | 18,1 | 39 | 61 |
| Start clean | 18,2 | 55 | 45 |
| Stop clean | 18,7 | 55 | 45 |
| Start equilibrate | 18,8 | 55 | 45 |
| Stop equilibrate | 20,3 | 55 | 45 |

Pour l'analyse de nos produits PCR, 5 μ L sont injectés dans la colonne à une température dénaturante de 50°C et un débit de 0,5mL/min pour la circulation des solvants. Le tampon A est composé de 0.1 M TEAA et le tampon B de 0.1 M TEAA et de 25% d'acétonitrile (phase mobile).

4. SSCP

Chaque produit d'amplification (1 μ L) a été mélangé à 18,5 μ L de formamide et 0,5 μ L du marqueur de taille GeneScan-400 ROX (Applied Biosystems) avant de subir un traitement thermique de 95°C pendant 5min puis un refroidissement dans de la glace pendant 10min. Les molécules d'ADN ainsi dénaturées sous forme de simples brins ont été séparées par électrophorèse capillaire à l'aide d'un séquenceur automatique ABI PRISM 310 Applied (Applied Biosystems). Les conditions de migration étaient de 12kV à 32°C. La détection des brins d'ADN en sortie de capillaire se faisait grâce au marquage de l'amorce ITS 2 par le fluorophore FAM. Les différents profils obtenus ont été calibrés par le logiciel GeneMapper® 4.0 grâce à la position du marqueur de taille contenu dans chaque échantillon. Les profils SSCP ont été traduits en valeurs numériques grâce au logiciel SAFUM. L'analyse de l'ensemble des profils permet de déterminer des pics dominants ou UTO (Unité Taxonomique Opérationnel) qui constituent par la suite les données SSCP analysées.

5. Séquençage

Les souches pures qui n'ont pas pu être identifiées par analyse des boîtes de Pétri et microscopie optique ont été séquencées.

Les produits PCR (volume : 25 μ L) obtenus avec les amorces ITS 1 et ITS 4 (PCR non nichée) sont déposés dans une plaque 96 puits et séquencés à la plateforme Biogenouest de Roscoff.

Sur place, une purification des fragments d'ADN amplifiés est réalisée afin d'éliminer les sels, amorces et dNTPs qui n'ont pas été incorporés lors de la PCR grâce à une enzyme, l'exoSAP (tous les fragments inférieurs à 100pb sont alors éliminés). Le produit PCR est purifié dans un volume final de 10 μ L : 4 μ L de produits PCR à purifier et 6 μ L de mix (5 μ L d'eau et 1 μ L d'exoSAP-IT). Le mélange est ensuite réparti en 2 x 5 μ L pour la réaction de séquence. Pour l'étape de purification, la plaque est filmée, centrifugée puis placée dans le thermocycleur. Le programme utilisé correspond à 15min à 37°C pour inactiver les fragments grâce à l'enzyme puis une étape de 15min à 80°C pour inactiver l'enzyme. 10 μ L de produit PCR purifié sont alors obtenus. Ce volume est réparti en deux plaques pour faire la réaction de séquence.

La réaction de séquence est effectuée dans la même plaque que la purification. Aux 5µL de produits PCR purifiés sont ajoutés 5µL de mix (0,5µL de Kit BDT, 1,75µL de Tampon 5X, 1µL de l'amorce à 5µmol/L et 1,75µL d'eau milliQ). La plaque est ensuite filmée, centrifugée et placée dans le thermocycleur. Le programme d'amplification comprend un cycle de dénaturation initiale à 96°C pendant 1min, puis 25 cycles de dénaturation à 96°C pendant 10s, un cycle d'hybridation à 55°C pendant 5s et enfin, un cycle d'élongation à 60°C pendant 4min. Nous réalisons la réaction de séquençage avec ces deux amorces : ITS 1 et ITS 4.

6. Traitement des données et analyse des séquences

Les séquences obtenues sont nettoyées et alignées avec le logiciel DNA Baser (HeracleSoftware). Après nettoyage des séquences (sens et anti-sens) avec ce logiciel et obtention d'une séquence consensus (contig), le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) est consulté afin de comparer les séquences obtenues à ses bases de données nucléotides.

Un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est une méthode de recherche utilisée en bioinformatique qui permet de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides. En fonction des critères de qualité de l'alignement (E-value, maximum d'identité, couverture, etc.), le choix de la séquence la plus pertinente est réalisé sur les dix premiers résultats issus du BLAST, permettant d'identifier les séquences et donc le genre et l'espèce de la souche pure.

7. Traitement statistique des données

Les données correspondant aux valeurs numériques des UTO de tous les profils SSCP et D-HPLC analysés ont été comparés grâce à une analyse en composantes principales normée (Pearson) avec le logiciel de statistiques *R*.

Pour ce faire chaque échantillon (individu) est recensé dans un tableau. Pour chaque OTU (temps de rétention), un individu possède une variable (hauteur du pic de rétention), elle aussi consignée dans un tableau. C'est ce tableau de données qui est analysé par le logiciel *R*.

Résultats

I. Analyse culturale

Grâce à l'approche culturale, 40 souches de champignons ont pu être isolées et purifiées à partir des bois traités (au PCP et au CCA). Les souches les plus communes ont été identifiées sur critères morphologiques, les autres ont été identifiées par séquençage de la région ITS. Dans le tableau 1 sont présentées les souches identifiées selon le traitement appliqué au bois et le type de bois d'origine, avec en noir les souches identifiées sur critères morphologiques et en vert celles identifiées par séquençage. Les résultats des différentes conditions (température, milieu, bois désinfecté ou non) ont été regroupés car les mêmes espèces de champignons ont été retrouvées. Les souches isolées font toute partie de la classe des Ascomycètes et de celle des Mucorales et sont pour la plupart des champignons saprophytes. Il s'agit d'une flore tellurique classique plus proche d'une flore fongique d'un sol cultivé que d'un sol forestier. Certaines de ces souches ont des vitesses de croissance très rapide (48h) ce qui les rend très envahissantes, comme les genres *Trichoderma* ou *Fusarium*.

Tableau 4: Souches isolées des bois traités et mis en contact avec un sol tropical forestier (Guyane). En noir les souches identifiées sur critères morphologiques et en vert celles identifiées par séquençage. Les résultats des différentes conditions (température, milieu, bois désinfecté ou non) ont été regroupés car les mêmes espèces ont été retrouvées.

| | Container 1 | | | Container 4 | | | Container 7 | |
|------------------------------|-------------|---------------|-----------|-------------|---------------|-----------|------------------|-----------|
| | Pin rouge | Pin rouge CCA | Yayamadou | Pin rouge | Pin rouge PCP | Yayamadou | Pin rouge PCP 1m | Yayamadou |
| <i>Trichoderma</i> | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Fusarium</i> | | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | | | | | 1 | | | 1 |
| <i>Aspergillus niger</i> | | 1 | | | 1 | 1 | | |
| <i>Aspergillus terreus</i> | | 1 | | | | | 1 | 1 |
| <i>Aspergillus fleurus</i> | | | 1 | | | | | |
| <i>Penicillium sp.</i> | | | 1 | | | | | |
| <i>Penicillium sp.</i> | | | | | | | 1 | |
| <i>Mucorale</i> | 1 | | 1 | | 1 | 1 | | |

| | Container 1 | | | Container 4 | | | Container 7 | |
|--------------------------------------|-------------|---------------|-----------|-------------|---------------|-----------|------------------|-----------|
| | Pin rouge | Pin rouge CCA | Yayamadou | Pin rouge | Pin rouge PCP | Yayamadou | Pin rouge PCP 1m | Yayamadou |
| Forme sexuée de <i>Penicillium</i> ? | | | | | | | 1 | |
| <i>Chaetonium</i> | | 1 | 1 | | | | | |
| Ascomycètes | | 1 | | | | | | |
| <i>Thielavia terricola</i> | | | | | | 1 | | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | | | 1 | | | | | 1 |
| <i>Fusarium solani</i> | | | | | 1 | | | |
| <i>Xylogone sphaerospora</i> | | | | | 1 | | | |
| <i>Humicola</i> | | 1 | | | | | | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | | | | | | | | 1 |
| <i>Trichoderma spirale</i> | | | | | | | | 1 |
| <i>Hypocrea virens</i> | | | | | | | 1 | |
| <i>Eupenicillium javanicum</i> | | | | | | | | 1 |
| <i>Aspergillus</i> | | | | | | | 1 | |
| Mucorales | | | 1 | | | | | |

Pour 11 de ces souches, le résultat de séquençage donne un seul nom d'espèce et des critères de performances du BLAST (e-value, % de coverage) très hauts pour les 10 meilleurs résultats. Par contre pour 13 autres souches le nom d'espèce ne peut être obtenu par le seul séquençage de la région ITS. En effet, les différents BLAST effectués sur le site NCBI donnent pour ces souches pures deux noms d'espèces différentes avec des critères de performances identiques. Il s'agit parfois de la forme sexuée et de son téléomorphe, et parfois de souches peu représentées dans la base de données. Les *Trichoderma* et les *Fusarium* sont les genres les plus représentés. Ils sont également répartis sans distinction pour tous les types de bois et de traitements. Peu de champignons se sont développés sur le pin rouge non traité, contrairement au Yayamadou (non traité également) qui regroupe un grand nombre de souches différentes et ce quel que soit le container où il a été échantillonné.

II. Analyse du bois

Une fois l'ADN fongique total extrait du bois et amplifié par PCR nichée, les produits d'amplifications ont été séparés et analysés par D-HPLC. Ceci dans le but d'étudier l'évolution des profils de communautés fongiques par traitement, par type de bois et par date d'échantillonnage. Afin de permettre la comparaison et l'analyse des profils, il a été décidé d'analyser ces profils par Analyse en Composantes Principales. Ces ACP ont été réalisés sans individus ou variables supplémentaires. Pour ce faire, la hauteur des pics (absorbance en UV) pour chaque OTU représente les variables quantitatives. Les traitements représentent les individus. Aucune différence significative dans la répartition des individus n'a été observée lors d'un traitement des données basé sur les dates d'échantillonnage.

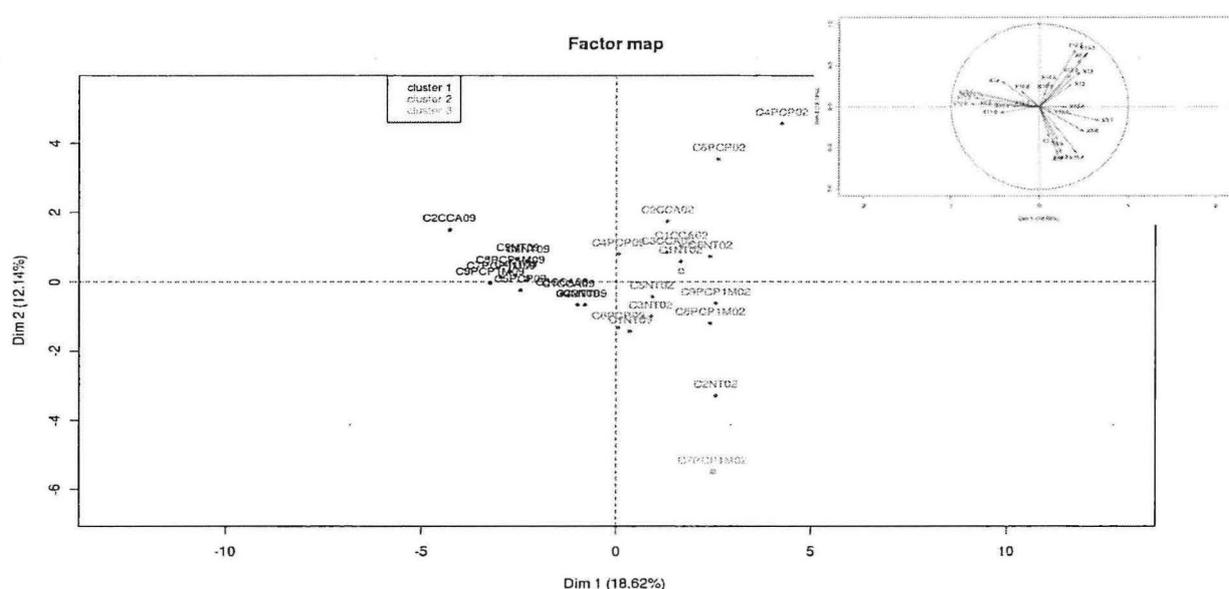


Figure 5: Analyse en composante principale (axe 1 et 2) des échantillons de Pin Rouge : représentation des individus et cercle de corrélation des variables. Les individus sont identifiés ainsi : C1CCA09, C1 correspondant au numéro du container (ici, container 1), CCA correspond au traitement (CCA, PCP ou PCP 1M c'est-à-dire PCP échantillonné à 1m du sol sur le poteau, ou NT pour non traité) et 09 à la date d'échantillonnage (09 pour septembre et 02 pour février). Les individus en noirs sont ceux de septembre et ceux en rouge et vert sont de février.

Les données présentées en figures 5 et 6 sont regroupées par essence de bois afin de mettre en évidence une meilleure corrélation entre les individus. Des groupes d'individus sont alors parfaitement dissociés. Dans les deux cas, les données de septembre sont regroupées en partie gauche du diagramme tandis que les données de Février se trouvent en partie droite du diagramme sur l'axe 1 (horizontal).

De plus pour les données de février, elles, sont éclatées sur l'axe 2 (vertical) mais regroupées par traitement. D'après le cercle de corrélation des variables, les variables sont bien corrélées sur les axes en trois groupes distincts. Dans la figure 5, les échantillons de septembre sont en noirs tandis que ceux de février sont en rouge et vert. L'individu C7PCP1M02 est en vert car le logiciel le considère comme exclu du groupe rouge. Dans notre analyse nous le considéreront comme faisant partie intégrante du groupe rouge c'est-à-dire des individus de février.

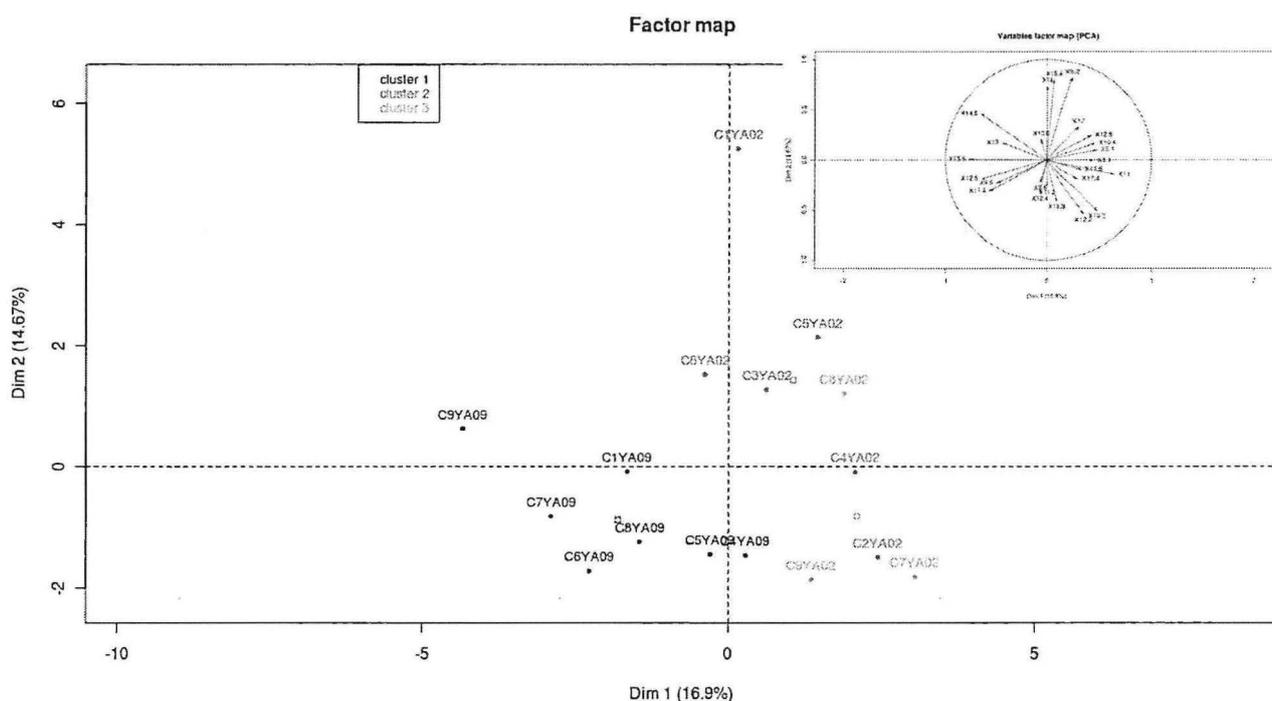


Figure 6: Analyse en composante principale (axe 1 et 2) des échantillons de Yayamadou : représentation des individus et cercle de corrélation des variables. Les individus sont identifiés ainsi : C1CCA09, C1 représente le container, CCA le traitement du Pin rouge contenu dans ce container et 09 représente le mois d'échantillonnage. Les individus en noir sont ceux de septembre tandis que ceux de février sont en rouge et vert.

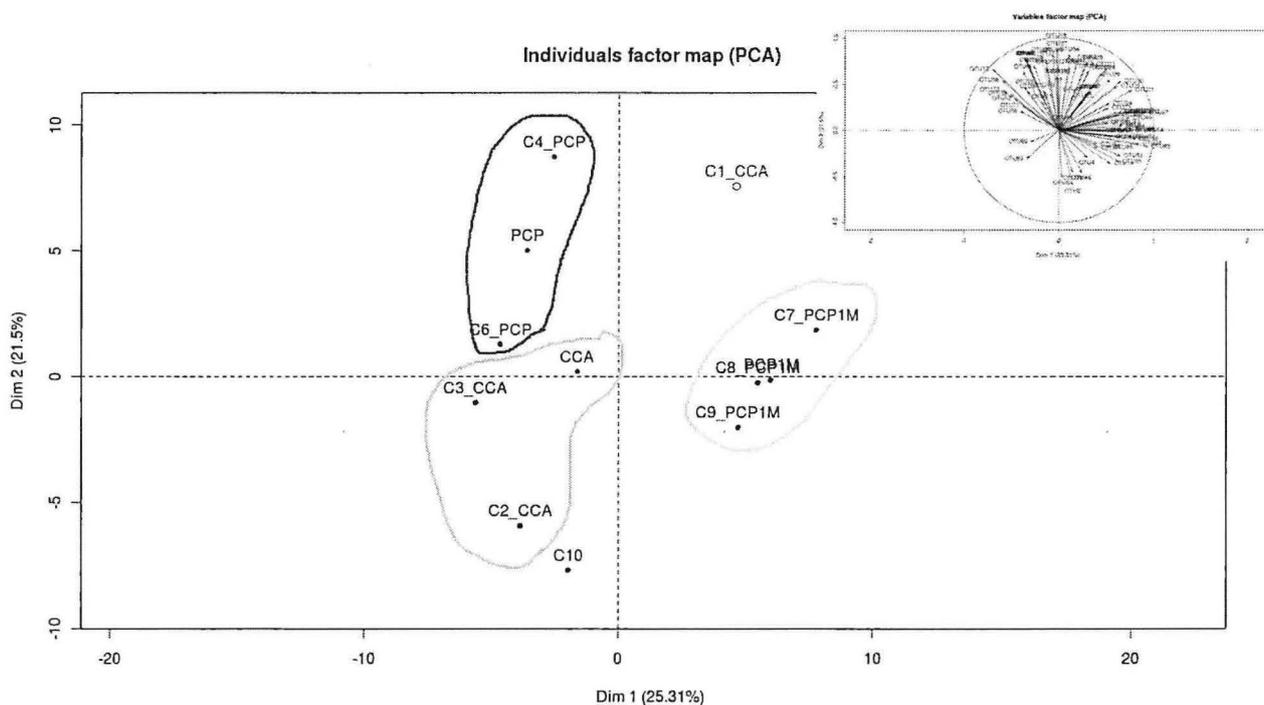
Dans la figure 6 sont regroupés en rouge le Yayamadou des containers 1, 2, 3, 4, 5 et 6 qui contiennent également du Pin Rouge traité au CCA ou au PCP. Et en vert le Yayamadou des containers 7, 8 et 9 qui contiennent également du Pin Rouge traité au PCP 1m (figure 6).

III. Analyse du sol

Après extraction, amplification et analyse par SSCP de l'ADN du sol, les données sont soumises à une analyse multifactorielle comme précédemment.

Pour ce faire les hauteurs des pics par temps de rétention (OTU) représentent les variables quantitatives, les traitements représentant les individus (figure 7).

Cette ACP a été réalisée avec un individu supplémentaire : C1_CCA, c'est-à-dire le container 1 contenant du bois traité au CCA. Le container 10 (C10) sert de témoin et permet de visualiser si les traitements ont eu un impact ou non. Les données sont réparties en trois groupes bien distincts représentant chacun un traitement, auquel s'ajoute un dernier individu, le témoin, qui



n'appartient à aucun groupe. La moyenne de chaque groupe a été obtenue en calculant la moyenne des données pour chaque traitement. Là encore le cercle de corrélation des variables confirme la bonne corrélation des individus sur les axes.

Discussion

Les mises en culture ont permis d'isoler 40 souches de champignons appartenant au groupe des Ascomycètes et Mucorales à partir du bois traité (PCP et CCA) et au contact avec un sol forestier de Guyane. L'originalité de ces résultats repose sur la capacité de ces souches à se développer en présence de xénobiotiques.

Différents auteurs ont montrés que l'isolement de champignons à partir de sol forestier permet de mettre en évidence une proportion plus importante de Basidiomycètes (16-18). Nos résultats diffèrent de ces études, pour les raisons suivantes :

- Premièrement, il est possible que certaines souches n'aient pu être isolées du fait de la croissance rapide et envahissante d'autres espèces. Par exemple, les genres *Trichoderma* et les *Fusarium* regroupent des espèces dont la croissance est rapide; il est possible qu'elles aient imposé une trop grande compétition, empêchant le développement de certaines souches de croissance plus lente.
- Deuxièmement, nos conditions expérimentales (bois traités) d'incubation en Guyane peuvent avoir favorisé le développement des Ascomycètes au détriment des Basidiomycètes. Une caractérisation des communautés fongiques du sol utilisé permettrait de déterminer le niveau relatif initial des deux groupes.
- Troisièmement, les caractéristiques des sols tropicaux et des sols tempérés diffèrent. En effet, les forêts tropicales ont une couche organique plus fine que les forêts tempérées, ce qui induit une importante quantité de biomasse ainsi qu'un rapide turn-over de celle-ci.

L'identification sur critères morphologique classiquement utilisée a été complétée par le séquençage de la région ITS des souches dont l'identification semblait douteuse. Les résultats de la confrontation des séquences aux bases de données NCBI par la méthode du BLAST sont pour certaines souches difficiles d'interprétation malgré l'obtention de séquences de très bonne qualité et séquencées en double sens. Pour expliquer ce résultat, deux hypothèses peuvent être émises : d'une part les bases de données peuvent présenter des lacunes (soit que les souches ne soient pas valides, soit qu'il s'agisse de nouvelles espèces non encore décrites ou d'espèces isolées non encore inscrites). D'autre part le problème peut également venir du choix des régions de l'ADN

ciblées : celles-ci permettent d'identifier à l'espèce les champignons mais présentent des zones variables qui ne permettent pas une analyse phylogénétique. En effet, les ITS sont généralement utilisées pour l'analyse taxonomique des champignons ; mais pour réaliser une analyse phylogénétique pertinente il est recommandé d'utiliser plusieurs régions de l'ADN (Cox1, 18S, B-tubuline, EF alpha) (19).

Nos résultats présentent une originalité certaine car les souches isolées et identifiées ne sont pas reconnues dans la littérature pour leur dégradation de produits biocides (6; 16; 20).

Rappelons qu'il est généralement admis aujourd'hui que seuls 1 à 10% des microorganismes sont cultivables (18). C'est pourquoi, l'étude des communautés fongiques du bois a également été réalisée par D-HPLC et analysée en ACP. La première ACP est celle du Pin Rouge. Il est clairement visible que les individus sont séparés en deux groupes distincts. A droite les données du mois de février et à gauche celle du mois de septembre. L'axe horizontal représente donc le temps. Celui-ci a un impact sur les communautés fongiques. D'autre part les données de septembre sont regroupées et il est difficile de distinguer les individus entre eux. Cela signifie qu'il n'y a pas de véritables différences entre ces individus, donc que les traitements biocides n'avaient pas encore d'impact sur les communautés du bois au mois de septembre.

Par contre, la répartition des individus de février est éclatée. Les communautés fongiques sont donc distinctes, il y a un effet des traitements visible. Les individus traités au PCP se trouvent en haut du diagramme, ceux traités au CCA et ceux non traités (NT) sont au centre tandis que ceux traités au PCP 1m sont en bas de ce même diagramme. L'axe vertical peut représenter l'intensité, l'agressivité du traitement. Plus une communauté fongique a été changée plus elle s'éloigne du centre du diagramme, là où l'on trouve les individus de septembre. De plus le PCP 1m est le moins concentré des traitements du fait de sa tendance à être lessivé le long du tronc, tandis que le PCP est le plus agressif des trois traitements du Pin Rouge.

De plus, en étant lessivés par les arrosages réguliers des containers, les produits biocides sont venus affecter les populations des échantillons témoins, c'est-à-dire les populations fongiques du Yayamadou. Ceci est visible sur la deuxième ACP présentée dans la partie résultats du mémoire.

Sur cette ACP il est possible de voir que les échantillons de septembre sont à nouveaux groupés sur la gauche du diagramme tandis que ceux de février sont à droite, ce qui vient étayer

l'hypothèse d'un effet du temps sur la composition des communautés fongiques. Les échantillons de septembre du Yayamadou sont moins groupés que ceux de septembre du Pin Rouge ce qui peut s'expliquer par la nature même du bois. Ici il n'y a qu'un seul bois, une seule essence mais dans des bacs contenant des bois traités alors que dans la première ACP les individus étaient traités directement. Cette différence significative permet de bien statuer sur ces résultats. En effet, puisqu'il s'agit d'un seul bois non traité il ne devrait pas y avoir de différences significatives sur les profils des communautés fongiques au cours du temps. Or ce n'est pas le cas.

Celle-ci prouve que les traitements biocides des autres bois présents dans les bacs de sol ont bien été lessivés et ont eu un impact non seulement sur les communautés fongiques des bois qu'ils contaminent mais également sur l'ensemble des communautés fongiques présentes dans chaque container. Au fur et à mesure du temps, les produits contenus dans les éprouvettes de bois ont été lessivés dans le sol et ont contaminé celui-ci, provoquant une modification de la flore fongique globale. Cependant ces résultats devront être confirmés par l'analyse d'un troisième groupe d'échantillon dont la récolte est prévue pour juillet 2011. Les effets des biocides sur les communautés fongiques sont méconnus, la plupart des articles se tournant vers l'utilité des communautés fongiques et vers leur impact sur la biorémediation (6; 16; 20).

Qu'en est-il de cet impact sur le sol ? Puisque les fongicides ont un impact sur l'ensemble des communautés fongiques des autres essences de bois, il est possible qu'il y ait un impact sur celles du sol. La réponse se trouve dans l'analyse par ACP des profils SSCP obtenus à partir d'échantillons de sol de chaque container avec un container 10 témoin. Il est impossible de statuer sur l'effet du temps puisque seuls des échantillons de février ont été analysés.

Cette ACP a été réalisée avec un individu supplémentaire, le C1-CCA, c'est-à-dire le container 1 contenant des échantillons de bois traité au CCA. Trois groupes sont distinctement visibles sur le diagramme. Chacun est clairement dissocié des deux autres. Il est intéressant de noter que chaque groupe représente un type de traitement biocide. Ainsi, le PCP 1m se trouve sur la droite du diagramme le plus éloigné du témoin C10, ce qui montre que le PCP 1m est le traitement qui a le plus d'impact, c'est celui qui a le plus modifié les communautés fongiques. Le PCP est en haut à gauche, et assez éloigné du témoin, il a donc un impact moins fort sur les communautés. Enfin le CCA est le plus proche du témoin, signifiant ainsi qu'il est le traitement qui a le moins modifié les communautés fongiques.

Notre hypothèse se vérifie donc : puisqu'il est possible de voir de grandes modifications dans les communautés fongiques des sols des containers, il est clair que les traitements biocides ont un impact plus ou moins important sur celles-ci. Nos conclusions rejoignent celles de la littérature, bien que dans celle-ci il s'agisse plus d'études portant sur les communautés bactériennes et non sur les communautés fongiques avec un xénobiotique différent (21; 22) et où il s'agit de sol cultivé tempéré et non tropical (17).

Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons démontré la prédominance des Ascomycètes par rapport aux Basidiomycètes dans les bois contaminés et les sols de Guyane au contact de ces bois. Ce résultat diffère des données de la littérature (5) puisque celle-ci est le plus souvent axée sur la caractérisation des populations fongiques des sols forestiers tempérés. Cette répartition est plus courante dans les sols cultivés que forestiers (17). Ainsi, les souches isolées ne figurent pas parmi celles qui sont généralement étudiées et utilisées en biorémediation (16).

En outre les Ascomycètes isolés sont peu représentés dans les bases de données, les hypothèses avancées dans la discussion amènent à la perspective d'un travail d'indentification basé sur d'autres gènes afin de confirmer les résultats obtenus ou de les infirmer avec l'apparition probable de nouvelles espèces à décrire ou la mise en avant d'espèces mal décrites dans les bases de données (18).

Ainsi nos résultats de caractérisation des communautés fongiques mériteraient d'être complétés par une autre approche méthodologique comme par exemple l'ARISA. Cette méthode est en effet la méthode fréquemment utilisée pour l'analyse des communautés des sols (23). L'analyse des communautés fongiques pourrait également être complétée par le calcul de l'indice de biodiversité. Celui-ci permettrait d'évaluer l'impact des biocides sur les communautés fongiques.

D'après nos résultats, les produits biocides des bois traités sont bien lessivés dans le sol et ils ont un impact dans le temps et l'espace sur les communautés fongiques des sols et du bois ; cet impact étant variable selon le produit. Ces tendances sont à confirmer par l'étude (avec la même méthodologie) des échantillons récoltés après 15 mois d'incubation (juillet 2011). De même les concentrations en PCP et en CCA dans les échantillons ne nous sont pas encore parvenues. L'étude de ces résultats pourrait nous fournir des facteurs explicatifs quant à l'impact des produits biocides sur les communautés fongiques.

Les bois collectés aux deux premiers échantillonnages ont une différence de masse. Cette différence a été mesurée au CIRAD de Montpellier mais nous n'avons pas encore eu accès à ces données (données en cours d'acquisition). Ces résultats confirment donc l'action des champignons et pourraient également être complétés par une analyse en microscopie.

Les souches isolées pourraient en outre être une source de nouvelles glutathionnes S-transférase qui sont des marqueurs de contamination par des hydrocarbures polycycliques aromatiques et interviennent dans la dégradation de la lignine par le clivage des liaisons β -aryle éther. En effet, les champignons saprophytes présentent un plus grand nombre de séquences codantes que les autres champignons (12). Une étude fonctionnelle pourrait ainsi être menée avec les mêmes outils mais en travaillant à partir de l'ARN.

Bibliographie

1. **Sjöström E.** 1993. Wood chemistry: fundamentals and applications. Gulf Professional Publishing.
2. **Pignolet O.** 2008. Optimisation de la durabilité de bois d'oeuvre (classe d'emploi 4) à l'aide d'anhydrides alkényles succiniques d'origine végétale. Thèse Université de Toulouse.
3. **Lu Y, Shi Y, Giesy JP, Luo W, Wang T.** [sans date]. Organochlorine pesticides in soils around Guanting Reservoir, China. *Environmental Geochemistry and Health*. **29**:491-501.
4. **Thermya** - Enginnering for tomorrow. 2005. Available from: http://www.thermya.com/index_thermya.php?id=51
5. **Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner M-C, Debaud J-C, Lemaire M, Wesolowski-Louvel M, Marmeisse R.** 2007. Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *ISME J*. **1**:632-642.
6. **Baldrian P.** 2008. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*. **1**:4-12.
7. **Woo C, Daniels B, Stirling R, Morris P.** 2010. Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **64**:403-408.
8. **Lamar RT, Davis MW, Dietrich DM, Glaser JA.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol- and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *phanerochaete sordid a*: A field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**:1603-1611.
9. **Boer W de, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L.** 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**(4):795-811.
10. **Holmer L, Stenlid J.** 1996. Diffuse Competition for Heterogeneous Substrate in Soil among Six Species of Wood-Decomposing Basidiomycetes. *Oecologia*. **106**:531-538.
11. **Okada H, Harada H, Kadota I.** 2005. Fungal-feeding habits of six nematode isolates in the genus *Filenchus*. *Soil Biology and Biochemistry*. **37**(6):1113-1120.
12. **Morel M, Ngadin AA, Droux M, Jacquot J-P, Gelhaye E.** 2009. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell. Mol. Life Sci*. **66**:3711-3725.13.
13. **Mileski GJ, Bumpus JA, Jurek MA, Aust SD.** 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol*. **54**:2885-2889.
14. **Andersson BE, Lundstedt S, Tornberg K, Schnürer Y, Öberg LG, Mattiasson B.** 2003. Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-

- rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **22**:1238-1243.
15. **Byss M, Elhottová D, Tríska J, Baldrian P.** 2008. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere*. **73**:1518-1523.
 16. **S. P.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **57**:20-33.
 17. **Pankhurst CE, Ophel-Keller K, Doube BM, Gupta VVSR.** 1996. Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodivers Conserv*. **5**:197-209.
 18. **Hawksworth DL, Rossman AY.** 1997. Where Are All the Undescribed Fungi? *Phytopathology*. **87**:888-891.
 19. **Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H.** [sans date]. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evol Bioinform Online*. **4**:193-201.
 20. **Tuomela M, Lyytikäinen M, Oivanen P, Hatakka A.** 1998. Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Soil Biology and Biochemistry*. **31**:65-74.
 21. **Harris-Hellal J, Vallaëys T, Garnier-Zarli E, Bousserhine N.** 2009. Effects of mercury on soil microbial communities in tropical soils of French Guyana. *Applied Soil Ecology*. **41**:59-68.
 22. **Kandeler F, Kampichler C, Horak O.** 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils*. **23**:299-306.
 23. **Ranjard L, Poly F, Lata J-C, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S.** 2001. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Appl Environ Microbiol*. **67**:4479-4487.