

Analyse de l'ADN dans la taxinomie des champignons

GEERT SCHMIDT-STOHN* & BERNHARD OERTEL**

reçu le 26 juin 2009

(Traduction de Thomas Isarno)

RÉSUMÉ

Un aperçu à propos de l'utilisation d'analyse d'ADN dans la taxinomie des champignons, particulièrement le genre *Cortinarius* sera donné. Le séchage des spécimens frais et la conservation appropriée des exsiccata seront décrits. Les séquences ITS, l'alignement et la construction ainsi que la signification d'arbres phylogéniques seront discutés.

Mots clés : Taxinomie, ADN, ITS, Alignement, arbre phylogénétique, *Cortinarius*, Séchage, Exsiccatum.

Introduction

L'analyse biomoléculaire de séquences ADN est depuis quelques années une méthode établie de la taxinomie, comme le montre la grande proportion de telles publications dans les revues spécialisées correspondantes. Certes, les méthodes n'ont pas été principalement développées pour l'analyse des champignons, mais elles se laissent néanmoins utiliser à cet effet. C'est ainsi que la mycologie a profité des méthodes d'analyse ADN. Beaucoup de problèmes taxinomiques, longtemps sujets à controverse, ont été élucidés à l'aide de l'analyse ADN. Jusqu'à maintenant de telles méthodes furent particulièrement couronnées de succès dans le genre *Cortinarius* sous-genre *Phlegmacium*, où par exemple les groupes de Garnica à Tübingen et Frøslev à Copenhague ont publié des travaux de pionniers ces dernières années. Une clarification de beaucoup de questions dans le sous-genre *Telamonia* ne semble guère possible sans le concours de l'analyse ADN. Dans ce domaine, le groupe de Niskanen à Helsinki a présenté les premiers résultats. L'ensemble du genre *Cortinarius* (inclus *Rozites*, *Thaxterogaster*, etc.) à été entre autres étudié par Peintner et Garnica avec leurs groupes respectifs.

Dans le cadre de leur rassemblement de Prénovel en 2008, les J.E.C. ont constitué un groupe de travail (direction : Günter Saar, Lahr), dont les membres se mobilisent pour l'essor des analyses ADN dans le genre *Cortinarius*. C'est dans cette idée que l'article suivant a pour objectif d'éveiller l'intérêt des lecteurs de ce journal pour ces méthodes modernes de la taxinomie, ainsi que de transmettre la compréhension de leurs résultats, de leurs possibilités et de leurs vues.

1. Qu'est ce qu'une espèce ?

Lors de l'approche des champignons sur le terrain, aucune analyse précise de beaucoup de caractéristiques ne précède généralement une détermination.

* Geert Schmidt-Stohn, Burgstr. 25, D-29553 Bienenbüttel, geert.schmidt-stohn@t-online.de

** Bernhard Oertel, INRES, Universität Bonn, Auf dem Hügel 6, D-53121 Bonn, b.oertel@uni-bonn.de

Avec les espèces que nous connaissons, nous saisissons d'abord intuitivement certaines combinaisons de caractéristiques et en plus certains caractères particuliers qui lui sont typiques. Si nous ne pouvons pas nommer une récolte, un examen des caractéristiques microscopiques et chimiques est mis en œuvre pour arriver à une détermination. Toutes ces caractéristiques se réfèrent à l'aspect - ce sont au sens le plus large des caractéristiques morphologiques. Sur le terrain, seule cette définition morphologique d'un type de champignon est possible (concept d'espèce morphologique). Une distinction objective entre une espèce, une sous-espèce, une variété, etc. est ainsi à peine possible, puisque la détermination en toute objectivité de l'importance des caractères ne peut être que difficilement mise en œuvre. Il est par conséquent inutile d'entrer dans une querelle pour savoir si pour la séparation de deux espèces, un, deux, ou même trois caractères doivent être invoqués - cela dépend plus de la qualité intrinsèque et du poids de ces caractères.

Des espèces peuvent être définies de façon plus précise en tant que communauté de reproduction : les individus d'une espèce sont mutuellement interfertiles et produisent des descendants fertiles (concept d'espèce biologique). Malheureusement, l'affirmation inverse n'est pas permise, puisque des individus non interfertiles ne font pas obligatoirement partie de différentes espèces. L'analyse de croisement est mise en œuvre généralement au laboratoire avec des mycéliums issus de spores. Puisque la culture de beaucoup de champignons (p. ex. tous les Cortinaires comme les champignons mycorrhiziques stricts) n'a jusqu'à présent pas été possible ou alors dans de rares cas et avec de très grandes dépenses au niveau des milieux de culture au laboratoire, nous n'aurons pas besoin ici d'évoquer plus en détail l'analyse de croisement.

Des études relatives à la biologie moléculaire peuvent-elles avoir une utilisation pour la mise au clair des problèmes brièvement examinés ici pour la définition d'espèces ? Ces techniques livrent-elles des critères objectifs visant à la distinction des espèces ? Avant qu'on ne puisse répondre à ces questions, il est nécessaire de faire la connaissance et de comprendre la méthode d'analyse ADN.

2. Conservation des espèces en vue de l'analyse et isolement de l'ADN

La procédure la plus commune de conservation des champignons est le séchage. Les champignons rassemblés doivent être séchés immédiatement après le retour d'une excursion avec un dessiccateur (Dörrex, Stöckli). On peut prendre des champignons divisés en deux, pour pouvoir faire avec l'autre moitié une description et l'étude microscopique. Les conditions suivantes sont cruciales pour un séchage adéquat:

1. Des carpophores en parfait état, non moisissés, avec le chapeau, le pied et la base du pied (l'exsiccatum est une source d'ADN et un échantillon d'herbier en même temps !).
2. Ne pas conserver au réfrigérateur, mais démarrer le séchage dans les 24 heures.
3. Sécher 12-24 heures à environ 60°C (p. ex. Dörrex) ou 40°C avec système à air circulé (p. ex. Stöckli). D'après notre expérience un séchage trop lent aboutit à des échecs.
4. Finir le séchage en faisant séjourner les échantillons dans un lieu chauffé et sec plus d'une semaine.
5. Conservation des exsiccata dans un sachet en polyéthylène, sac en papier ou tube en carton refermable (respectivement avec étiquetage adéquat en référence à l'herbier).
6. stockage dans les secteurs chauffés et secs. A cet effet les caves ou les greniers sont à proscrire.
7. Comme prévention contre une prolifération d'organismes nuisibles, garder une semaine à -18°C : Les échantillons en sachets seront ainsi placés dans des boîtes en plastiques étanches, puis mis à la température désirée et laissés une semaine au congélateur. Une fois la boîte en plastique sortie du congélateur, il conviendra d'attendre quelques jours avant de l'ouvrir afin d'éviter un contact entre les échantillons et l'eau de condensation.

Ces conditions doivent impérativement être observées, car on ne peut se permettre de soumettre un échantillon à une coûteuse analyse, si aucun résultat ne peut en être tiré. L'ADN ne peut être extrait et analysé même des années plus tard, que si les échantillons ont été correctement séchés et conservés.

Pour extraire de l'ADN des cellules (extraction), le matériel sec est fragmenté et extrait avec un certain volume d'un liquide d'extraction. Cette solution est ajustée sur un pH physiologique défini et contient des détergents, qui dissolvent les membranes cellulaires et détruisent la structure des protéines et libèrent ainsi l'ADN des cellules. L'extrait de cellule doit encore être purifié jusqu'à ce qu'une solution pure d'ADN soit obtenue. La solution correspondante ou l'ADN séché peuvent être conservés congelés pour être utilisés pour une analyse ultérieure.

Au lieu d'extraire l'ADN des exsiccata la méthode suivante pourra peut-être à l'avenir être mise en œuvre: Après une sortie sur le terrain, un échantillon sous la forme de petit morceau de lamelle/chair est prélevé à l'aide d'un matériel stérile et immédiatement introduit dans un tube plastique qui contient un certain volume de la solution d'extraction (voir ci-dessus). Le tube plastique est ensuite scellé et congelé.

3. Comment est construit l'ADN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est la substance portant l'hérédité d'une cellule et représente chimiquement une double hélice dont les brins continus se composent de molécules de sucre s'alternant (Z) et de groupement phosphate (P). Chaque molécule de sucre porte une base (B) comme chaîne latérale; une molécule constituée respectivement d'une base, d'un sucre et d'un groupement phosphate est appelée nucléotide. Il y a quatre bases différentes dans l'ADN: Guanine et Cytosine ainsi qu'Adenine et Thymine, donc aussi quatre nucléotides différents. Les bases ne se ferment que dans les combinaisons G ----C et A----T grâce à des interactions chimiques faibles (ponts hydrogène) et assurent la cohésion des deux brins dans la double hélice (cf. fig. 1).

Pour la plupart des organismes vivants, l'ADN se présente sous la forme de plusieurs doubles brins séparés, des chromosomes, qui deviennent microscopiquement visibles pendant la division cellulaire. Au cours du projet « Le génome humain » l'enchaînement total des bases - la séquence des bases - d'un ADN humain a été déterminé. Cela constitue ainsi le génome nucléaire humain, c'est-à-dire l'ADN contenu dans chaque noyau de cellule, environ 3 milliards de paires de nucléotides, ce qui donnerait une molécule d'environ 1,2 m de long (réparti sur 46 chromosomes). Le génome des champignons est construit de manière très similaire au génome humain, mais le nombre et la longueur des chromosomes peuvent toutefois être très différents.

4. Quelles sections de l'ADN sont examinées ?

Les espèces d'Agaricales complètement séquencées jusqu'ici d'après le NCBI (National Center for Biotechnology Information, état du 31.03.2009) sont les génomes de *Coprinopsis cinerea* (= *Coprinus cinereus*) avec respectivement environ 37,5 Millions de paires de Bases (MB) et de *Laccaria bicolor* avec 65 Millions de paires de Bases. Pour des questions d'études taxinomiques, le séquençage de l'ADN total est trop long et coûteux. Par conséquent des sections de l'ADN particulièrement appropriées doivent être trouvées. Pour l'homme, seulement environ 1% de l'ADN constitue des entités de transmission (gènes) dans le sens qu'ils orientent directement la construction et les fonctions de l'organisme.

Chez l'homme et les animaux, ces séquences de base sont généralement bien conservées, et elles ont été seulement relativement peu changées au cours des périodes géologiques. Les 99% restants sont vides de gènes, leur fonction étant largement inconnue. Ces régions sont généralement hautement variables dans leurs séquences de base. Une situation semblable, quand bien même moins extrême, devrait également être présente chez les champignons.

En y regardant de plus près ces résultats ne sont pas étonnants. Des mutations sont des modifications de la séquence de base qui, par des erreurs lors de la multiplication de l'ADN pendant la division cellulaire, peuvent être déclenchés par l'effet des rayons radioactifs, par des produits chimiques mutagènes, etc. Si de telles mutations ont lieu directement dans un gène, cela a généralement une conséquence négative: si une fonction importante est concernée, la cellule meurt souvent. Une telle mutation n'est pas transmise et disparaît immédiatement à nouveau ainsi aux descendants. Il n'en est pas ainsi dans les sections vides de gènes de l'ADN. Puisque des mutations n'entraînent pas ici de dérangement d'une fonction, les cellules concernées ne meurent pas et peuvent maintenir les modifications de la séquence de base et les transmettre aux descendants.

Les sections sur l'ADN que l'on examine dépendent du niveau taxonomique auquel on travaille. Si on veut comparer de plus hauts taxons comme des genres, des familles, des ordres etc., on choisit plutôt les régions variables de l'ADN (voir ci-dessus) mais plutôt conservées. Au niveau de la distinction des espèces dans des genres, on choisit en revanche les sections hautement variables. Si on examinait les sections plutôt conservées (ou conservatrices) de l'ADN, on trouverait à peine des différences, puisque les périodes de séparation entre deux espèces à partir d'un précurseur sont trop courtes, pour faire naître des variations dans les secteurs plutôt conservés (ou conservateurs) de l'ADN.

Si on voulait utiliser les secteurs hautement variables pour l'analyse des taxons supérieurs, on n'arriverait pas aux résultats souhaités, puisque les séquences ne seraient pas alignées (voir plus bas) et conduiraient ainsi à des erreurs. Les variations observées à travers des mutations ne seraient également plus proportionnelles à la période de l'évolution.

Pour des champignons, les sections de l'ADN le plus fréquemment examinées lors de la distinction entre des espèces dans un genre, sont les séquences ITS (Internal Transcribed Spacer). Ces séquences font partie « de l'ADN ribosomal » (rDNA) dont la fonction est la fabrication de « l'acide ribonucléique ribosomal » (rRNA). Des RNA sont développés de façon semblable comme l'ADN qui sert de matrice pour sa synthèse. Les molécules de rRNA font partie des ribosomes qui veillent à la synthèse de protéine dans la cellule. L'ARN ribosomal, rRNA, est nécessaire dans de grandes quantités, c'est pourquoi il y a jusqu'à 1000 copies de rDNA dans la cellule – ce qui constitue le grand avantage pour les analyses ADN des régions ITS et des autres sections ADN du rDNA. En effet la plupart des gènes ne sont contenus dans une cellule que par 2 copies (cellules diploïdes), ce qui les rend beaucoup plus difficiles à examiner par conséquent.

La figure 2 montre une section de rDNA. Une seule copie de la séquence se répétant souvent est représentée ici. Avec 18S, 5,8S et 28S les sections qui sont compétentes pour la fabrication de trois rRNA de taille différente sont désignées. Ces sections contiennent quelques secteurs variables, mais principalement des secteurs conservateurs. Ici, si des mutations apparaissent, la structure du rRNA peut changer. On peut en venir ainsi à des défauts de fonctionnement des ribosomes qui sont négatifs pour la cellule. De telles mutations s'éliminent ainsi d'elles-mêmes.

Il n'en va pas de même avec les séquences ITS. Ces séquences ne sont rien d'autre que des sections d'espacement entre les 3 gènes 18S, 5,8S et 28S et n'ont pas de fonction durable connue pour la cellule, de sorte que des mutations peuvent se maintenir. Ainsi naît une grande variation génétique dans les séquences ITS qu'on utilise à des fins d'études taxinomiques au niveau des espèces.

Dans beaucoup de cas actuellement, certains secteurs à l'intérieur des « Large SubUnit » LSU (= 28S; cf. fig. 2) deviennent aussi à côté des séquences ITS, une aide complémentaire, pour placer les résultats sur une plus large base. Il y a en effet entre espèces des différences claires dans l'impact des séquences de différentes régions de l'ADN. Des régions, avec la séquence desquelles des groupes d'espèces peuvent être bien différenciées, ne sont pas entre autres appropriées pour d'autres groupes d'espèces.

5. Comment obtient-on les quantités suffisantes de l'ADN pour l'analyse ?

On a besoin de plus grandes quantités d'ADN pour l'analyse de séquence - beaucoup plus qu'un simple extrait ADN (p. 2.) n'en contient. Ici entre en jeu la technique de l'amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne de Polymérase, PCR), un jalon de la génétique moléculaire. Kary Banks Mullis a reçu pour cela en 1993 le prix Nobel. Avec cette technique, les plus petites quantités d'ADN peuvent être multipliées pratiquement au choix dans le tube à essai. Sans la PCR, l'utilisation « des empreintes génétiques » dans la lutte contre le crime ne serait pas possible si l'on devait utiliser les simples traces d'ADN contenues dans les échantillons. En l'espace de 1-2 heures, des sections souhaitées peuvent être amplifiées dans un processus automatisé, p. ex. par millions comme les séquences ITS d'un échantillon ADN et ainsi rendues disponibles pour les prochaines étapes de l'étude.

6. Qu'est ce que le séquençage et quels résultats apporte-t'il ?

Le séquençage est l'analyse de l'ADN base par base et détermine ainsi la succession des bases - la séquence - d'un fragment d'ADN. Ici, le développement d'une méthode par Sanger et ses collaborateurs était crucial, méthode pour laquelle Sanger a reçu en 1980 (avec Gilbert) le prix Nobel. Décrire et expliquer ici cette procédure en détail sortirait du cadre de cet article. Les développements ultérieurs de cette technique ont eu pour conséquence une automatisation du séquençage, à l'aide d'un appareil d'analyse de la séquence de base d'un fragment d'ADN, aujourd'hui stocké directement sur un ordinateur. Les séquences sont déposées dans le WWW dans les bases de données spéciales, pour les rendre disponibles. Pour les mycologues, les bases de données importantes sont la « GenBank » du NCBI (National Center for Biotechnology Information) et « UNITE, A molecular for l'identification the database of fungi » dont les adresses Internet avec les noms de base de données cités peuvent être trouvées facilement avec un moteur de recherche. UNITE est une base de données qui est spécialisée dans les Asco- et Basidiomycetes avec des ectomycorrhizes. De nouvelles séquences ADN devraient être placées au plus tard par les auteurs Internet lorsque les données ont été utilisées pour une publication. La figure 3 montre deux séquences de *Cortinarius rapaceotomentosus* Delaporte & Eyssart. si on introduit le nom de ce champignon avec UNITE.

7. Qu'est ce qu'un Alignement ?

S'il y a plusieurs séquences pour une espèce de différentes récoltes, celles-ci apparaissent avec UNITE les unes sous les autres. On remarque qu'on voit en partie à première vue à peine un accord, bien qu'on s'attende quand même à ce que les séquences soient les mêmes ou se ressemblent fortement. Une comparaison directe de ces « séquences brutes » pour une concordance et/ou des différences n'est pas visuellement possible. Surtout le début et/ou la fin des séquences ainsi qu'également leurs longueurs peuvent se différencier clairement. Ces différences peuvent être conditionnées méthodiquement (différents laboratoires, méthodes modifiées) ou biologiquement. À côté des mutations, avec lesquelles différents nucléotides ont été échangés (substitutions), plusieurs groupes de nucléotides peuvent être insérés (insertions) ou perdus (délétions). Pour ces morceaux insérés ou perdus de l'ADN, la notion étendue a été marquée « Indel » (une forme abrégée « insertion/délétion »).

Par « le procédé d'alignement » (anglais: Alignment) on compare les différences de longueur dues à des sections des extrémités collantes (sticky ends) ou par une élimination suivie du remplissage des lacunes ainsi obtenues. On peut utiliser des programmes informatiques spéciaux pour la procédure, ou mettre aussi cela en œuvre « à la main » à l'écran d'ordinateur ou combiner généralement les deux méthodes. On appelle le résultat l'alignement, « the Alignment » en anglais.

Le programme MEGA4 (fig. 4, software gratuit = freeware) a été développé à cet effet. On peut

s'en servir très facilement après une courte formation d'environ 3-4 heures (au téléchargement on peut visiter la page d'accueil du fournisseur de ce programme en tapant « MEGA4 » dans un moteur de recherche). D'abord, toutes les séquences à comparer sont disposées horizontalement par la gauche les unes sous les autres (fig. 4A, dans un but de simplification ici seulement 2 séquences). On voit que les deux séquences sont à peine concordantes à cause d'un alignement manquant. On peut maintenant lire tout à droite les longueurs différentes des séquences (non représenté dans fig. 4). On peut se représenter le mode de fonctionnement de l'alignement par un décalage progressif de toutes les séquences les unes par rapport aux autres dans la position horizontale, de telle manière que le total de toutes les différences de base entre les séquences soit minimal.

Le résultat se trouve décrit dans la figure 4B. On voit qu'il y a chez *C. catharinae* Consiglio (1) un secteur collant à gauche (côté droit non représenté). Lors de la dernière étape de l'alignement, les secteurs collants sont découpés à gauche (fig. 4C) et à droite, de sorte que toutes les séquences commencent maintenant à nouveau à gauche et présentent la même longueur. Dans l'exemple de la figure 4, toutes les bases des deux collections correspondent maintenant dans le secteur représenté; la section comparée totale est ici de 606 bases (non représenté dans cette longueur), avec une différence à une seule position (partie non représentée). De plus grandes différences ressortent dans la plupart des cas, si on compare les séquences de différentes espèces. La figure 4D montre une comparaison entre un *C. albertii* Dima, Frøslev & T.S. Jeppesen et *C. catharinae* Consiglio. Ici, dans les petites sections représentées des deux séquences, déjà 8 paires de bases différentes sont mises en évidence. Dans les séquences totales de ces deux types, on trouve 43 paires de bases différentes.

Dans l'état actuel, on ne peut pas encore considérer les procédés d'alignement comme théoriquement pleinement fondés. Les arbres calculés d'après l'alignement sont donc (p. 8.) à interpréter avec la prudence qui s'impose. Une bonne introduction sur les méthodes d'alignement se trouve dans l'article de Knoop et Mueller (2009).

8. Comment naît « un arbre phylogénétique » ?

« Un arbre phylogénétique » est une construction mathématique qui reflète les relations de parenté (Phylogénie) entre des organismes vivants (Haeseler et Liebers 2003). Un tel arbre peut être conçu de différentes données: Données morphologiques et/ou écologiques, séquences d'acide aminé des protéines ou des séquences ADN. Dans le dernier cas, des séquences alignées sont la matière première pour la construction de l'arbre correspondant. Les bases théoriques « la systématique phylogénétique » fondée par W. Hennig s'appelle aujourd'hui la « Cladistique ».

Pour reconstruire à l'aide de programmes d'ordinateur des états de caractères constatés - ici des séquences ADN - de beaucoup de taxons dus aux processus évolutifs du passé géologique, le bio informaticien à sa disposition les quatre procédures statistiques suivantes qui sont contenues dans les programmes MEGA4 et PAUP*: maximum de parcimonie, analyse de distance, analyse de similitude maximale et analyse bayésienne.

On trouve des explications plus pointues sur ces quatre procédures dans la littérature germanophone chez KNOOP ET MUELLER (2009) qui consacrent aux 4 procédures un vaste chapitre. HAESELER ET LIEBERS (2003) donnent aussi un bon aperçu, dans une certaine mesure plus compréhensible pour le profane en mathématique.

9. Qu'est ce qu'énonce un arbre phylogénétique ?

Un tel arbre généalogique mis au point d'après les analyses ADN se compose des branches (lignes horizontales) et des points de branchement (nœuds). Les lignes verticales qui partent de haut en bas des nœuds, n'ont pas d'importance particulière et servent seulement à la meilleure re-

présentation graphique de l'arbre. « Aux nœuds extérieurs », – la fin des branches – on trouve des taxons ou des groupes de taxons vivants, dont la morphologie et la séquence ADN sont connues. Les hypothétiques ancêtres de ces taxons vivants se trouvent aux « nœuds internes ».

Ceux-ci se sont scindés pour donner leurs descendants. Tous les descendants qui se trouvent à un nœud sont nommés « cluster ». Pour le cas particulier des taxons se trouvant à un nœud extérieur, on utilise le terme « clade ». Les clades et les clusters sont monophylétiques, c.-à-d. que tous les taxons qui y sont contenus dérivent d'un ancêtre commun et les deux contiennent chacun tous les descendants de l'ancêtre commun.

On nomme un tel arbre « Cladogramme » ou « Phylogramme ».

Un Cladogramme possède des branches de longueur égale, de sorte qu'aucune conclusion sur les degrés des relations ne peut être tirée. Ici on ne peut en tirer que la séquence des événements évolutifs lors de la naissance des taxons. Ce type d'arbres n'est pas très fréquemment utilisé dans la taxinomie des champignons.

Le Phylogramme (cf. fig. 5), de par les longueurs des branches (lignes horizontales), exprime la distance génétique, p. ex. comme nombre des différences dans la séquence. Plus les branches sont longues, plus grandes sont les différences et d'autant plus éloignés sont les taxons correspondants (on n'évalue avec cela que les longueurs de ligne horizontales mais pas les lignes verticales !). Une échelle se trouve généralement dans un Phylogramme comme mesure quantitative pour les longueurs de branche par différence de paires de bases.

Chaque arbre possède normalement une origine, une racine (anglais : root). Pour cela on choisit une espèce ou un groupe d'espèces phylogénétiques en dehors de la totalité des taxons analysés (« Ingroup » = groupe intérieur). L'espèce (ou les espèces) à la racine d'un arbre est qualifiée de « outgroup » (groupe extérieur). Un taxon outgroup est défini de telle sorte qu'il se sépare des taxons du ingroup, avant qu'ils ne se différencient les uns des autres. Il ne devrait pas clairement appartenir à l'ingroup, mais ne devrait cependant pas être trop éloigné au niveau de la parenté.

Ceci est dû au fait qu'une certaine concordance au niveau de la séquence des bases est requise pour l'alignement. A la position des racines, les arbres se présentent principalement tournés à 90° vers la droite, et les indications concernant la question des lignes horizontales et verticales dans ce chapitre se sont également référées à une telle position d'arbre.

On appelle basale, la position des espèces qui se trouvent les plus éloignées à gauche des nœuds juste après l'outgroup. Ces taxons se sont dissociés au niveau phylogénique depuis des temps plus anciens.

Des espèces trouvées très à droite des nœuds résultent comme fortement dérivés. Leur différenciation d'espèces n'a eu lieu que récemment.

Les branches des arbres phylogéniques peuvent être tournées librement, c'est pourquoi lors de l'évaluation visuelle d'un arbre, seule la topologie (construction d'embranchement) peut être tirée du haut vers le bas, ce qui n'est pas le cas de l'ordre des taxons dans le calcul.

10. Comment détermine-t-on la sécurité statistique d'un arbre ?

Les valeurs Bootstrap donnent une information sur la sécurité statistique (degré de confiance) des différents Clades d'un arbre. Ces valeurs sont écrites aux nœuds en question. La procédure a été appliquée par Felsenstein (1985) pour la première fois pour des calculs phylogénétiques. Elle consiste à effectuer un tirage d'échantillons au hasard dans une série de données existante, qui est calculé dans un arbre. Une valeur de 1000 répétitions est ici habituelle.

Si un certain embranchement (Clade/Cluster) est présent dans toutes les répétitions, il a une valeur Bootstrap de 100% et donc un degré de confiance élevé. L'évaluation de plus faibles valeurs Bootstrap n'est pas malheureusement uniforme, car cela dépend aussi de la région de l'ADN examinée.

11. Les analyses ADN remplacent-elles le taxinomiste ?

Au début de cet article, la question a été soulevée de savoir si les analyses ADN pouvaient livrer des critères objectifs pour une définition d'espèce. Un concept d'espèce basé sur l'ADN devrait-il être développé conformément à cela ?

Des différences morphologiques ne sont pas toujours objectables, puisque l'environnement exerce une influence considérable sur l'expression prononcée des caractères, de sorte que des individus génétiquement identiques peuvent éventuellement paraître tout à fait différents. En revanche des différences dans la séquence de base de l'ADN entre deux taxons sont un critère objectif pour que ces taxons ne soient pas identiques. Le problème se trouve ici dans l'évaluation des différences. Si 2 taxons se différencient par 1, 2, 3 ou plus de bases au niveau des séquences ITS, mais ne se différencient ni macro- ni microscopiquement ainsi qu'écologiquement, on peut alors parler à peine de 2 espèces différentes ; à moins que l'on définisse seulement l'espèce en fonction des différences de bases.

Où doit être fixée une frontière par conséquent ? Il pourrait arriver facilement qu'on doive considérer des individus d'un type morphologique comme des espèces propres. Ces réflexions montrent qu'un concept d'espèces défini seulement en fonction des différences dans la séquence de base n'est pas praticable.

D'autre part, il y a des taxons dont les séquences de base examinées sont complètement identiques, mais qui se différencient clairement morphologiquement et en partie écologiquement; c'est p. ex. le cas avec *Cortinarius atrovirens* Kalchbr. et *C. ionochlorus* Maire ainsi qu'avec *Cortinarius xanthophyllus* (Cooke) Rob. Henry et *C. claroflavus* Rob. Henry. On ne peut certes pas exclure qu'il ne s'agit peut-être que d'une seule espèce. Cette conclusion n'est justifiée toutefois que si les différences observées sont purement écologiques, et non pas génétiques. Si les caractères divergents étaient provoqués génétiquement, on trouverait des séquences différentes après avoir recherché des différences de séquence dans le génome total. La concordance dans les séquences pour le moment examinées serait peut-être due au hasard.

La conclusion qui doit être tirée est que des analyses ADN peuvent en effet livrer des résultats objectifs, mais cependant pas un critère clair pour une espèce. S'il faut considérer un taxon comme une espèce, le taxinomiste pourra disposer ainsi des données sur l'ADN en plus des habituelles méthodes morphologiques, chimiques et écologiques.

Remerciements

Nous remercions très chaleureusement Michael Blum, Westerweyhe, pour le soutien lors de l'établissement des illustrations, le Dr. Thomas Isarno, Niffer, pour la traduction du texte en français et Günter Saar, Lahr, pour la relecture du manuscrit et ses indications précieuses. La base de données Internet Unite nous a autorisés la reproduction d'un Screenshots a partir de son site web.

Le deuxième auteur remercie le Dr. Sigisfredo Garnica, Tübingen, pour de nombreuses discussions fructueuses au cours des années passées et le Dr. Roland Kirschner, Francfort, pour des suggestions précieuses au sujet des programmes informatiques appliqués aux analyses ADN. Et sans l'échange de pensées intensif de Günter Saar, Lahr, et Thomas Münzmay, Dormagen (malheureusement décédé en 2008), notre compréhension de l'importance des analyses ADN pour la taxinomie des Cortinaires n'aurait pas été poussée aussi loin que maintenant.

Bibliographie

- HAESLER, A. V. & D. LIEBERS (2003), *Molekulare Evolution*, S. Fischer Verlag, Frankfurt a.M. (128 S.).
KNOOP, V. & K. MÜLLER (2009), *Gene und Stammbäume*, Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (386 S.).

Légende des figures (voir pages 12 – 18)

- Fig. 1** : Schéma de la double hélice, A = Adénine, T = Thymine, G = Guanine, C = Cytosine, Z = Sucre Desoxyribose, P = Groupement Phosphate, ----- = Ponts hydrogène
- Fig. 2** : construction de l'ADN ribosomal (Schéma simplifié), SSU = Small SubUnit, LSU = Large SubUnit, ITS = Internal Transcribed SpacEr
- Fig. 3** : reproduction du site web de UNITE en recherchant *Cortinarius rapaceotomentosus* Delaporte & Eyssart. Dans la banque de données, marquée en rouge: les parties non concordantes des séquences brutes (voir texte pour plus d'explications)
- Fig. 4** : **4A**: séquences brutes ITS de deux récoltes de *Cortinarius catharinae* Consiglio, **4B** et **4C**: séquences après alignement (voir texte), **4D**: découpage d'un alignement entre *C. albertii* Dima, Frøslev & T.S. Jeppesen et *C. catharinae* Consiglio (ici un autre découpage des séquences ITS par rapport aux figures 4A à 4C),
- * = paires de bases concordantes
- Fig. 5** : arbre phylogénétique calculé des séquences LSU (voir section 4 et fig. 2) *Bolbitius reticulatus* et *Laccaria amethystea* choisies comme outgroup; les valeurs Bootstrap de plus de 50% signifient un degré de confiance statistique. Différentes collections d'une espèce (*C. sulfurinus* u. *C. armillatus*) coïncident comme attendu. *Rozites* montre sa correspondance avec le genre *Cortinarius*. *) Distance qui correspond horizontalement à une différence de 5 bases (pris sur 1000 bases).