

# Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons

Marjolaine Verscheure, Georges Lognay, Michel Marlier

Unité de Chimie générale et organique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : verscheure.m@fsagx.ac.be

Reçu le 7 mars 2002, accepté le 24 juillet 2002.

Depuis quelques années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des organismes selon des caractéristiques biochimiques. Cette classification dénommée chimiotaxonomie comprend les méthodes moléculaires et les méthodes chimiques qui fournissent des données complémentaires aux méthodes classiques. De plus, en combinaison avec les données morphologiques, la chimiotaxonomie permet une identification et/ou une classification plus performante.

**Mots-clés.** Chimiotaxonomie, champignons, méthode moléculaire, méthode chimique, métabolite primaire, métabolite secondaire.

**Chemotaxonomy of fungi: a review.** For few years, advancements of molecular methods and analytical techniques enabled scientists to realise a classification of microorganisms based on biochemical characteristics. This classification, called chemotaxonomy, includes molecular methods and chemical methods which provide additional data and lead to a better identification and/or classification.

**Keywords.** Chemotaxonomy, fungi, molecular method, chemical method, primary metabolites, secondary metabolites.

## 1. INTRODUCTION

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

À titre d'exemple, l'identification des espèces appartenant au genre *Alternaria*, basée uniquement sur des caractéristiques morphologiques, est très difficile car ces moisissures sont très sensibles aux conditions de culture (Anderson, Thrane, 1996). Anderson et Thrane (1996) ont utilisé à la fois la morphologie, le profil en métabolites et les caractéristiques de culture (diamètre et couleur des colonies sur 9 milieux après 6 jours d'incubation) pour classer 36 isolats appartenant aux espèces d'*Alternaria infectoria* et *Alternaria alternata*. L'analyse par groupements des résultats obtenus a permis de délimiter deux groupes : le groupe *A. infectoria* dont les isolats produisaient uniquement des composés non identifiés et le groupe *A. alternata*

où les isolats produisaient de l'alternariol et de l'éther monométhylé d'alternariol, eux-mêmes subdivisés en trois sous-groupes. De plus, la couleur des colonies sur quatre milieux de culture différents a également permis de différencier les groupes *A. infectoria* et *A. alternata*.

## 2. LA CHIMIOTAXONOMIE

Depuis quelques années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des microorganismes selon des caractéristiques biochimiques basées sur l'étude de trois grandes classes principales de molécules :

- les métabolites primaires, composés nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme ;
- les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes ou les terpènes, qui n'ont pas de fonctions vitales ;
- les sémantides qui portent l'information génétique : acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN) et protéines.

Actuellement, la combinaison de diverses caractéristiques telles que les caractéristiques morphologiques (par exemple, forme et taille cellulaire), physio-

logiques, métaboliques, écologiques et moléculaires permet la classification et l'identification correcte non seulement des bactéries et des levures mais aussi des moisissures. La chimiotaxonomie, partie intégrante de la démarche, comprend les méthodes moléculaires et les méthodes chimiques.

## 2.1. Méthodes moléculaires

Cette partie donne un aperçu des méthodes moléculaires utilisées en taxonomie fongique. Puisque le but de cette revue concerne avant tout les méthodes chimiques, cette partie n'est donc ni exhaustive ni très précise. Cependant, il est impossible de discuter de la taxonomie fongique sans citer les techniques moléculaires car celles-ci ont connu un progrès important et ont suscité un intérêt énorme grâce à l'émergence de la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

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

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

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

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

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

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

À côté de l'étude d'un gène, les techniques de "fingerprints" (empreintes moléculaires) ciblent l'ensemble du génome. Ces techniques contiennent, entre autres, le polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard (RAPD), les microsatellites et les minisatellites. Le RAPD (Arisan-Atac, Kubicek, 1995 ; Frisvad *et al.*, 1998) utilise la technique PCR pour amplifier des segments d'ADN génomique avec des amorces d'oligonucléotides non spécifiques. Cette technique présente le désavantage d'être peu reproductible et nécessite la standardisation de la méthode d'amplification ainsi que de la visualisation des fragments obtenus. Cependant, elle peut être utile lors de l'analyse rapide d'un nombre élevé d'isolats dont on suspecte qu'ils font partie du même taxon et dont aucune information sur la séquence d'un marqueur n'est connue. Les microsatellites (séquences répétitives de 2 à 5 paires de bases réparties de manière aléatoire dans le génome) et les minisatellites (séquences répétitives d'environ 20 paires de bases) peuvent être amplifiés (Frisvad *et al.*, 1998). Ces techniques utilisant les micro- et minisatellites sont reproductibles et nécessitent peu d'ADN mais sont longues et coûteuses.

## 2.2. Immunotaxonomie et électrophorèse des protéines

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

À côté des méthodes immunologiques, l'électrophorèse des protéines et des isozymes (enzymes différents mais qui catalysent la même réaction) est une technique largement utilisée en

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

### 2.3. Méthodes chimiques

Les méthodes chromatographiques et spectroscopiques permettent l'analyse qualitative et quantitative d'un ou plusieurs métabolites ou composés de la membrane cellulaire. On étudie principalement les polysaccharides, les lipides insaponifiables, les acides gras, les métabolites secondaires volatils et non volatils.

**Les polysaccharides.** Les polysaccharides constituent 80 à 90 % de la membrane cellulaire des champignons et leurs différences de composition chimique et structurale indiquent que chaque genre possède ses propres caractéristiques polysaccharidiques.

La détermination des structures des polysaccharides est très complexe car elle nécessite la connaissance des monomères et de leur séquence, de la taille des cycles, de la position des liaisons et de la configuration anomérique.

Ahrazem *et al.* (1999) ont étudié les polysaccharides de *Penicillium vermoesenii*. Ils ont pu mettre en évidence la présence d'un polysaccharide spécifique à l'espèce *P. vermoesenii* et ont conclu que cette espèce était plus proche du genre *Fusarium* que du genre *Penicillium*. Jiménez-Barbero *et al.* (1995) ont étudié les polysaccharides des genres *Trichophyton* et *Microsporum* (des dermatophytes dont la membrane cellulaire est composée de chitine). Ils ont constaté que les polysaccharides de *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton soudanense* sont presque identiques à ceux de *Microsporum gypseum*.

**Les lipides insaponifiables.** Plusieurs types de lipides insaponifiables sont étudiés en chimiotaxonomie : les ubiquinones, les stéroïdes et les caroténoïdes.

**Les ubiquinones.** Les ubiquinones font partie des lipides terpéniques et sont des constituants des membranes mitochondriales des eucaryotes. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans le métabolisme, notamment lors du transfert d'électrons dans la chaîne du système respiratoire.

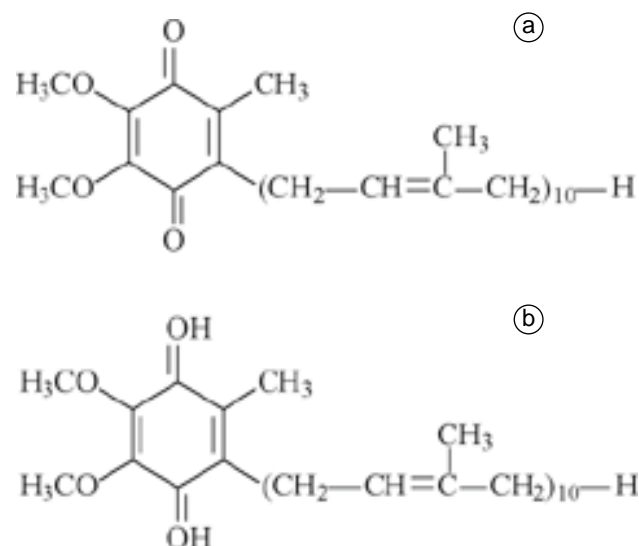
Les ubiquinones sont utilisées en chimiotaxonomie car leur structure varie en fonction du taxon. La longueur de la chaîne isoprénoïde et le degré d'insaturation varie selon le système biologique à partir duquel les ubiquinones ont été isolées.

Okada *et al.* (1996) ont déterminé qualitativement et quantitativement les ubiquinones présentes dans 14 espèces de *Cladosporium* et ils ont divisé le genre en deux : le premier groupe contenant l'ubiquinone Q10 (**Figure 1a**) englobe six espèces dont quatre sont des pathogènes humains ; le deuxième groupe contenant l'ubiquinone Q10(H<sub>2</sub>) (**Figure 1b**) comprend huit espèces qui sont des pathogènes des plantes et/ou des saprophytes. Les résultats de ces auteurs sont en accord avec les études phylogénétiques et physiologiques classiques réalisées antérieurement.

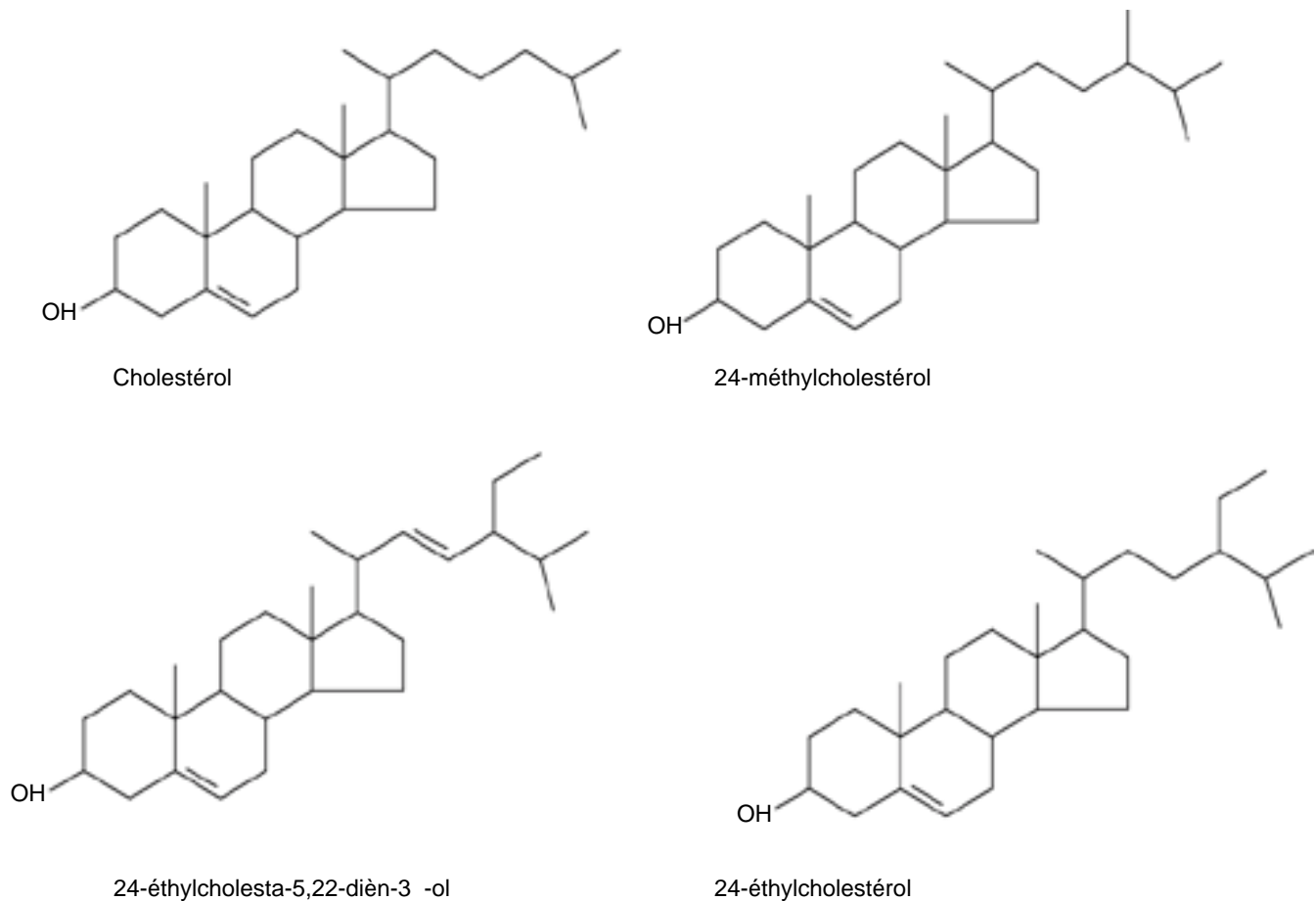
**Les stéroïdes.** Les stéroïdes sont des composés importants de la bicouche lipidique de la membrane. Les champignons possèdent des stéroïdes méthylés en C<sub>24</sub> tels que l'ergostérol, un stéroïde commun à tous les champignons, des stéroïdes éthylés et parfois des stéroïdes désalkylés en C<sub>24</sub> (**Figure 2**). La détection de l'ergostérol indique la présence de contaminants fongiques (Frisvad *et al.*, 1998).

Grandmougin-Ferjani *et al.* (1999) ont étudié par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) la distribution en stéroïdes de 16 espèces de champignons mycorrhiziens appartenant à l'ordre des Glomales. Ils ont constaté que le nombre de stéroïdes variait de 5 à 15 en fonction de l'espèce, que le stéroïde majoritaire était le 24-éthylcholestérol, tandis que l'ergostérol n'était pas détecté. Ces analyses ont montré un profil en stéroïdes très similaire pour les espèces étudiées et ont révélé que les Glomales étaient un ordre primitif des Zygomycètes.

Cependant, des études complémentaires sont nécessaires car les stéroïdes ne sont pas présents chez toutes les espèces.



**Figure 1.** Structure chimique des ubiquinones Q10 (a) et Q10 (H<sub>2</sub>) (b) — Chemical structure of ubiquinones Q10 (a) and Q10 (H<sub>2</sub>) (b) (adapted from Frisvad *et al.*, 1998).



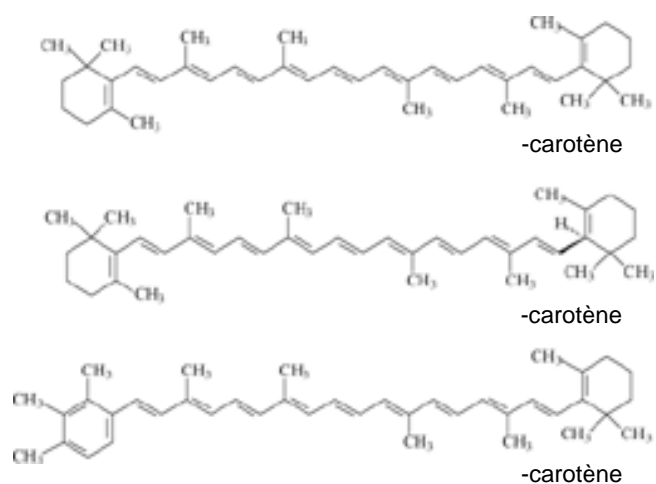
**Figure 2.** Structure chimique du cholestérol, du 24-méthylcholestérol, du 24-éthylcholesta-5,22-dièn-3 -ol et du 24-éthylcholestérol — *Chemical structure of cholesterol, 24-methylcholesterol, du 24-ethylcholesta-5,22-dien-3 -ol and of 24-ethylcholesterol* (adapted from Grandmoujin-Ferjani *et al.*, 1999).

**Les caroténoïdes.** La dernière classe de lipides envisagée en chimiotaxonomie est celle des caroténoïdes car 60 % des champignons étudiés en contiennent. Par exemple, les espèces des Zygomycètes (ordre des *Mucorales*) possèdent du  $\beta$ -carotène (**Figure 3**) comme pigment majoritaire tandis que les espèces de *Chytridiales* et *Blastocladales* biosynthétisent l' $\gamma$ -carotène et que certaines espèces de *Chytridiomycetes* contiennent le  $\delta$ -carotène (Frisvad *et al.*, 1998).

**Les acides gras.** Lopes da Silva *et al.* (1998) ont prouvé qu'il était possible de différencier des espèces de *Penicillium* sur base de leur profil en acides gras cellulaires. En effet, plusieurs espèces présentaient la même composition mais des concentrations relatives différentes ; l'acide palmitique (16:0), l'acide oléique (18:1) et l'acide linoléique (18:2) ont été détectés pour toutes les espèces tandis que la quantité en acides gras insaturés variait entre 68,5 % et 78,5 %.

Cependant, différents facteurs peuvent influencer la composition et lorsque l'on compare celle-ci, il faut

tenir compte de la vitesse de croissance, de l'âge de la culture, de l'oxygène disponible, de la température, du pH et de la composition du milieu de culture.



**Figure 3.** Structure chimique du  $\beta$ -carotène,  $\gamma$ -carotène et  $\delta$ -carotène — *Chemical structure of  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene and  $\delta$ -carotene*.

L'identification des organismes sur base des profils en acides gras est risquée car il n'y a pas eu d'analyses sur des souches provenant de lieux différents. Par contre, en combinaison avec d'autres caractères phénotypiques, ils sont d'une utilité démontrée. El Menyawi *et al.* (2000) ont mis en évidence que l'analyse des profils en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (GC) de souches de moisissures de spécimens cliniques était une méthode rapide et précise d'identification. Cependant, ils ont dû établir une base de données contenant les profils d'un grand nombre de moisissures et ils ont ainsi pu mettre au point une technique rapide d'identification spécifique à l'espèce qui facilite le diagnostic de l'infection.

**Les métabolites secondaires volatils.** Les champignons synthétisent un grand nombre de métabolites secondaires et, parmi eux, des molécules volatiles responsables de leur odeur caractéristique (**Tableau 1**). Le développement des techniques analytiques telles que la GC et la GC-MS a facilité l'identification des composés volatils, même présents à l'état de traces.

Wilkins et Larsen (1995) ont étudié la variation du profil en composés organiques volatils (COV) d'espèces de moisissures provenant de bâtiments. Ils ont conclu que si le profil en terpènes est plus ou moins constant sous des conditions de croissance bien définies, il pourrait être utile à des fins taxonomiques. En effet, Sunesson *et al.* (1995) ont montré que la production de composés volatils dépendait de l'espèce de champignon étudiée mais aussi du milieu de culture utilisé.

**Tableau 1.** Liste des familles des métabolites volatils microbiens — *Family of microbial volatile metabolites* (adapted from Wilkins *et al.*, 2000).

hydrocarbures	alcane, alcènes, diènes, triènes
terpènes	hémi- (C5), mono- (C10), sesqui- (C15, C11, C12), diterpènes (C20)
alcools	saturés, insaturés et branchés
acides carboxyliques et esters	saturés, insaturés, branchés, diols, cétoles
cétones, méthyl-2-cétones	+ alcools correspondants
éthyl(3-)-cétones	+ alcools saturés/insaturés cycliques
dérivés soufrés	thiols, mono-, di-, trisulfures, S-méthyl thioesters, thioéthers
composés aromatiques	hydrocarbures, alcools, éthers, cétones, phénols
hétérocycliques	N (alkyl et alkoxy-pyrazines, indoles, pyrroles) O (alkylfuranes, gamma et delta-lactones)

C'est surtout dans le domaine alimentaire et en biotechnologie que ces composés ont été étudiés pour pouvoir détecter et identifier rapidement les champignons contaminant certaines denrées alimentaires.

Ainsi, Magan et Evans (2000) ont analysé des métabolites secondaires volatils avec un nez électronique pour détecter rapidement la détérioration des stocks de grains. Cette technique permet de faire la distinction entre des espèces mycotoxigéniques et non-mycotoxigéniques.

**Biosynthèse des métabolites volatils.** Le précurseur le plus important lors de la biosynthèse des métabolites volatils est l'acétate, présent dans les cellules sous forme d'acétyl coenzyme A. L'acétyl CoA provient du pyruvate généré par la glycolyse (**Figure 4**).

L'acétyl CoA est le précurseur principal des acides gras et du mévalonate, un intermédiaire important dans le métabolisme secondaire des terpènes. Les acides gras sont métabolisés en d'autres métabolites primaires.

Les différents types de métabolites volatils peuvent provenir de l'acétate (**Figure 5**), des acides gras (**Figures 6 et 7**) ou des acides aminés (**Figure 8**).

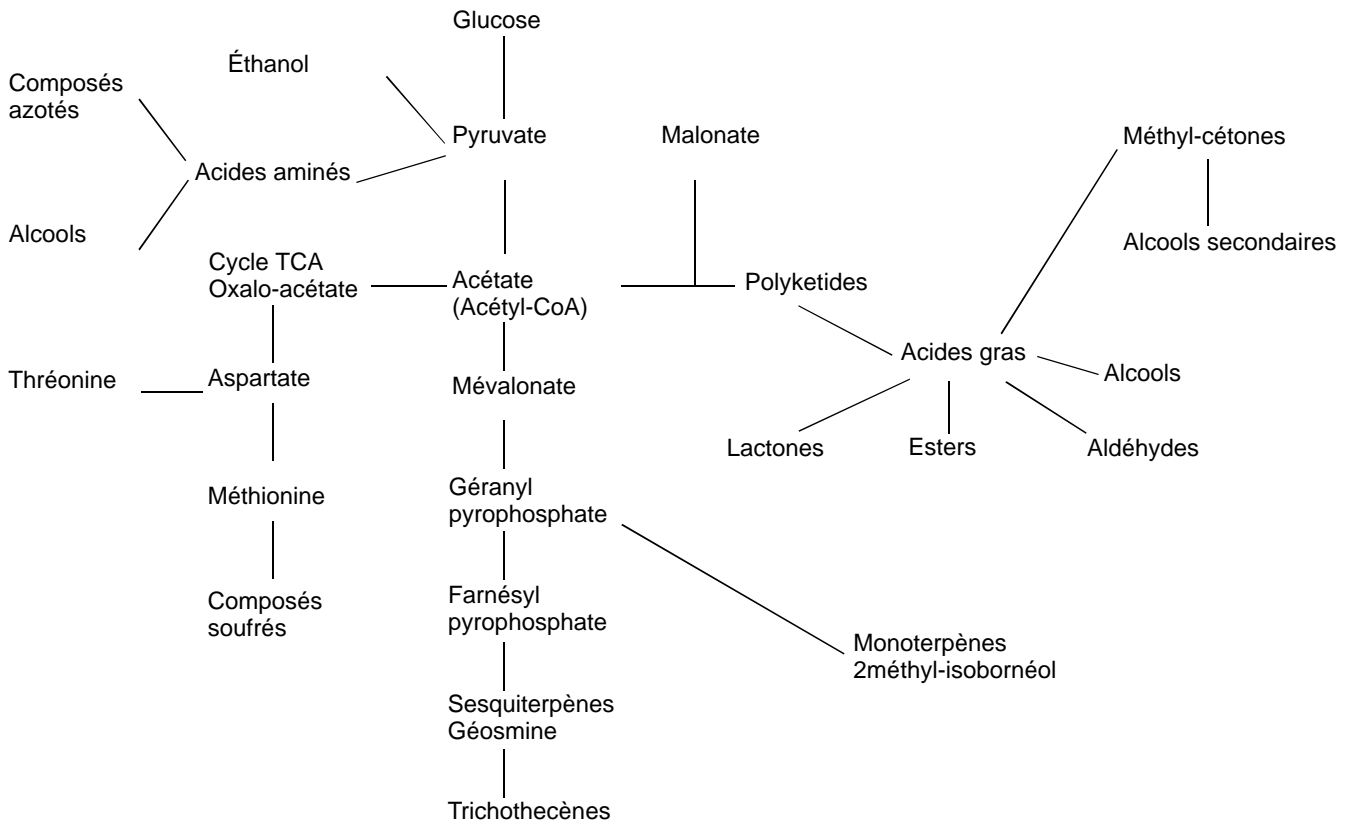
**Facteurs influençant la production des métabolites volatils.** Divers facteurs tels que les paramètres environnementaux (activité d'eau, pH, composition atmosphérique, agitation et température) et la composition des substrats peuvent avoir une influence prépondérante sur la production des métabolites volatils, tant qualitativement que quantitativement.

En général, on admet que des conditions favorisant la croissance peuvent aussi favoriser la production des métabolites volatils.

Cependant, la composition en métabolites secondaires volatils peut fortement varier en fonction de la source de carbone et d'azote.

Sunesson *et al.* (1995) ont étudié la production de métabolites volatils par 5 espèces fongiques sur deux milieux de culture différents (malt extract agar (MEA) et dichloran glycerol agar (DG18)), riches d'un point de vue nutritionnel, mais de composition différente, surtout leur contenu en eau (le milieu DG18 contient du glycérol au lieu d'eau). D'après leurs résultats, ces auteurs ont conclu que la production des volatils dépendait non seulement de l'espèce de champignon mais aussi du milieu. En effet, une grande majorité des volatils était produite par une seule espèce fongique et sur un seul milieu.

**Utilisation des métabolites volatils pour l'identification des champignons.** L'identification des champignons sur base des métabolites secondaires volatils est remise en question dans de nombreux



**Figure 4.** Biosynthèse des métabolites volatils à partir d'acétyl coenzyme A, précurseur principal des acides gras et du mévalonate — *Biosynthesis of volatile metabolites from acetyl CoA, major precursor of fatty acids and mevalonate* (adapted from Magans and Evans, 2000).

articles car un seul ou très peu d'isolats ont été étudiés et il est possible que certains aient été mal identifiés.

Cependant, des études ont révélé qu'il était possible de différencier les espèces d'*Aspergillus* et de *Fusarium* sur base de leur production en sesquiterpènes (Wilkins, Larsen, 1995 ; Sunesson *et al.*, 1995 ; Frisvad *et al.*, 1998) et il a été démontré qu'un grand nombre d'espèces de *Penicillium* pouvaient être classées suivant les profils en métabolites volatils (Börjesson *et al.*, 1990 ; Larsen, Frisvad, 1995a ; Larsen, Frisvad, 1995b).

Par exemple, Nilsson *et al.* (1996) ont utilisé la technique de microextraction sur phase solide (SPME) pour collecter les composés volatils émis par des *Penicillium*. Ils ont montré que les profils en métabolites volatils étaient caractéristiques d'une espèce (**Figure 9**).

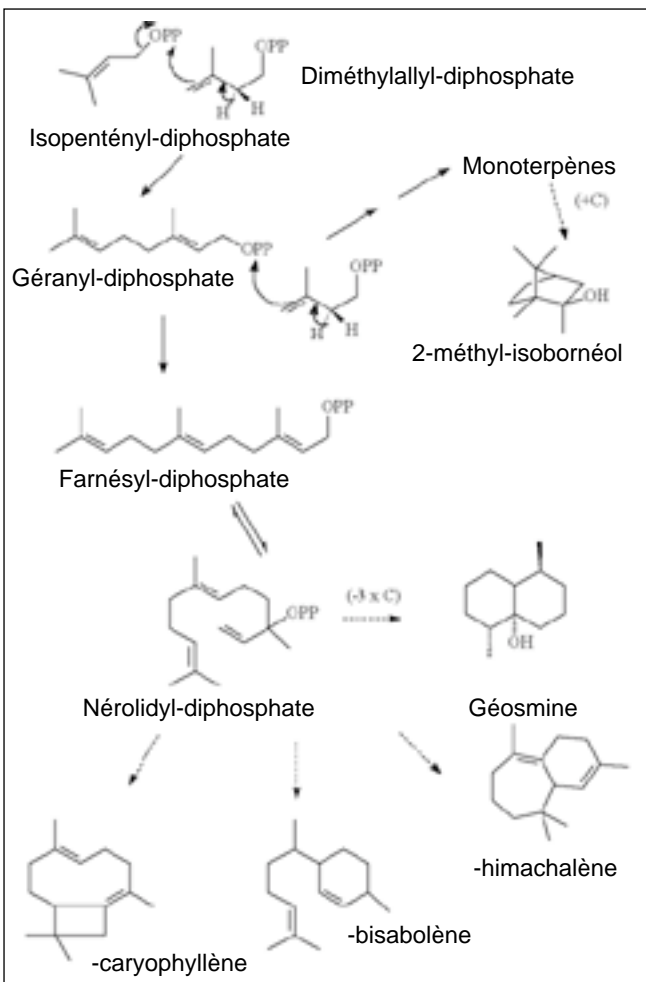
Larsen (1997) a identifié des terpènes volatils de champignons associés aux fromages par détection d'ions sélectionnés (SIM). Les volatils ont été échantillonnés par SPME à partir de cultures en boîtes de Pétri après 43 heures de croissance. Cet auteur a constaté que quelques espèces produisaient le même métabolite. Par exemple, *Penicillium commune*, *P. discolor* et *P. solitum* produisent tous les trois le 2-

méthyl-isobornéol. Toutefois, *P. discolor* produit le 2-méthyl-isobornéol et la géosmine, ce qui illustre le fait que c'est une combinaison de métabolites qui est spécifique à une espèce et non un métabolite unique.

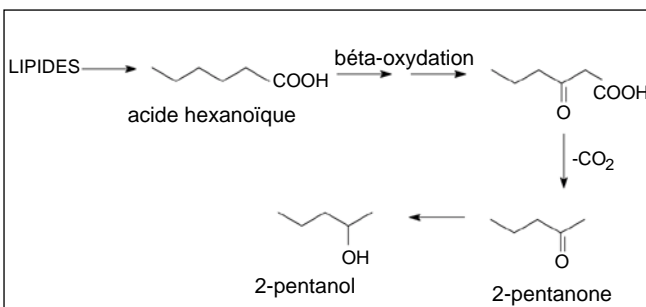
**Les métabolites secondaires non volatils.** Les métabolites secondaires non volatils peuvent être utiles à la caractérisation d'espèces et à la détermination des relations phylogénétiques car ils peuvent servir de signaux chimiques entre les organismes ou les espèces. Ils seraient donc complémentaires aux données morphologiques et moléculaires, et on obtiendrait une description complète d'une part importante du phénotype qui est perçu par d'autres organismes.

L'approche chimiotaxonomique consiste à analyser chimiquement ou à élucider les structures des métabolites secondaires spécifiques d'isolats dans un taxon particulier, et à comparer les résultats obtenus avec d'autres espèces du même genre.

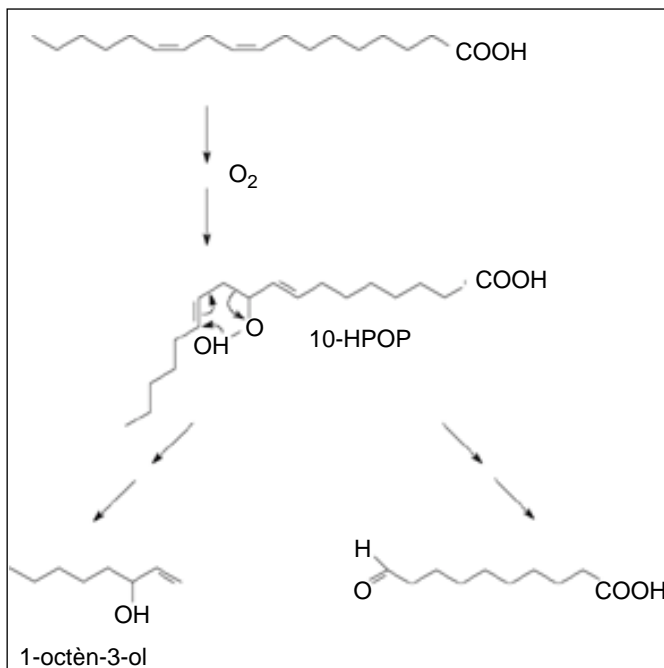
*Utilisation des métabolites secondaires non volatils en chimiotaxonomie.* Les métabolites secondaires non volatils ont été largement utilisés pour la taxonomie de quelques genres de champignons filamenteux.



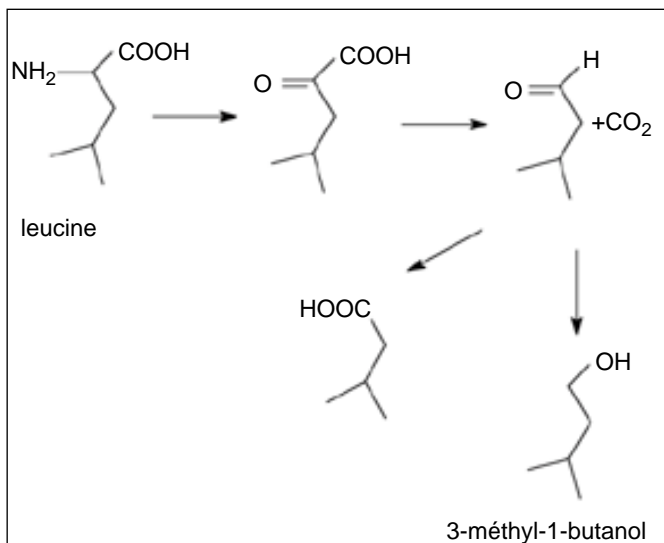
**Figure 5.** Formation de mono- et sesquiterpènes à partir d'isopentényl diphosphate et de diméthylallyl diphosphate — *Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes from isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate* (adapted from Frisvad *et al.*, 1998).



**Figure 6.** -oxydation des acides gras saturés et formation de méthyl cétone et des alcools correspondants — *-oxidization of saturated fatty acids and formation of methyl ketone and corresponding alcohols* (adapted from Frisvad *et al.*, 1998).



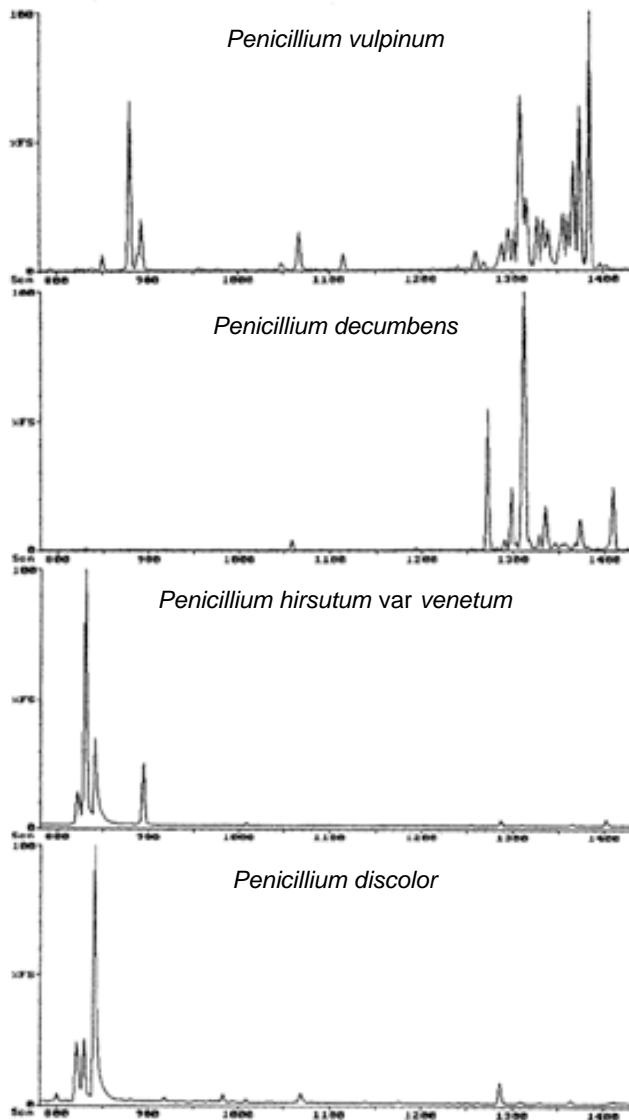
**Figure 7.** Lipoxygénation des acides gras : l'acide linoléique est oxydé en 10-hydroxyperoxyde, qui est clivé par une lyase en deux parties dont le 1-octèn-3-ol — *Lipoxygenation of fatty acids: linoleic acid is oxidized in 10-hydroxyperoxide which is cut by a lyase in two parts including 1-octen-3ol* (adapted from Frisvad *et al.*, 1998).



**Figure 8.** Formation de 3-méthyl-1-butanol à partir de leucine — *Formation of 3-methyl-1-butanol from leucine* (adapted from Frisvad *et al.*, 1998).

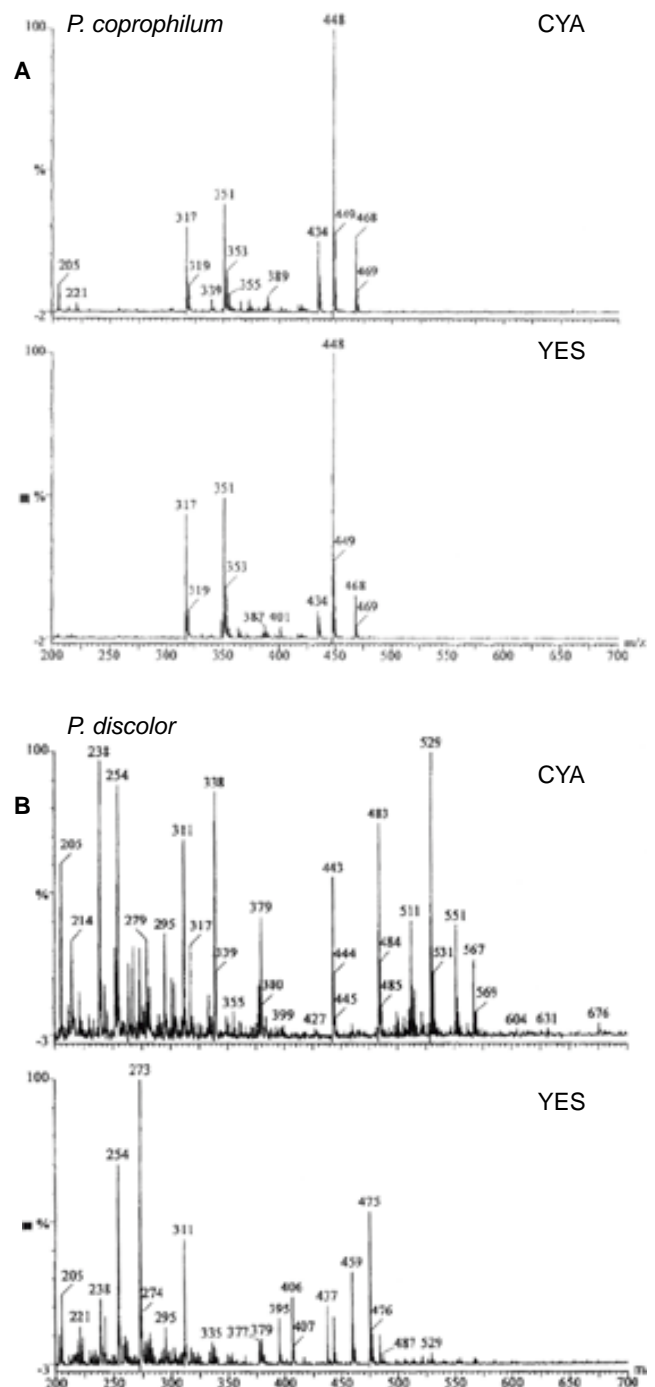
Lorsqu'un grand nombre d'isolats provenant de régions et d'habitats différents ont été examinés, la combinaison des données morphologiques et des métabolites secondaires a permis de délimiter les

espèces. Dans le cas des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* (considérés comme étant très difficiles à identifier et à classer), les métabolites secondaires se sont révélés très utiles.



**Figure 9.** Profils en métabolites volatils obtenus par prélèvement SPME et analyse GC-MS pour 4 espèces de *Penicillium* après 4 jours de croissance en boîtes de Pétri — *Volatile metabolites obtained by SPME and analysis by GC-MS for 4 Penicillium species grown in Petri dishes after 4 days* (adapted from Nilsson *et al.*, 1996).

Par exemple, Smedsgaard et Frisvad (1997) ont étudié la production des métabolites secondaires émis par des espèces du genre *Penicillium*. Ces auteurs ont montré qu'en injectant des extraits fongiques bruts, cultivés sur milieu Czapek yeast autolysate (CYA) et Yeast extract sucrose agar (YES), directement dans une source electrospray d'un spectromètre de masse (transformation d'un échantillon liquide en gouttelettes par application d'un champ électrique et production d'ions), on obtenait un profil en masses caractéristique de l'espèce (**Figure 10**). De plus, ces profils fournissent une information taxonomique complémentaire.



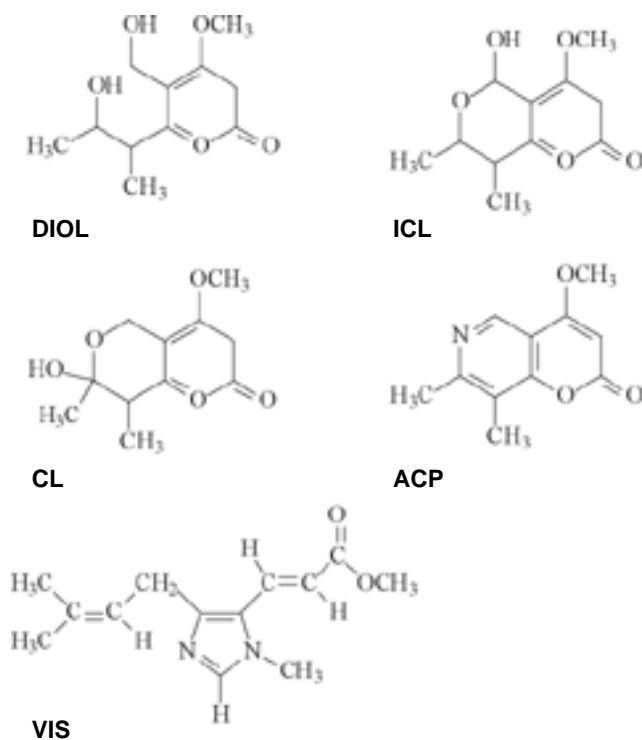
**Figure 10.** Analyse par ESMS des métabolites secondaires produits par des espèces du genre *Penicillium*. **A** : *Penicillium coprophilum* (319 uma – dechlorogriseofulvin ; 353 et 355 uma – griseofulvin ; 434 uma – meleagrins ; 448 uma – oxaline) sur CYA et sur YES. **B** : *P. discolor* (238 uma – viridicatin ; 254 uma – viridicatol ; 279 uma – dehydrocyclopeptin ; 281 uma – cyclopeptin ; 295 uma – cyclopenin ; 311 uma – cyclophenol ; 529 et 551 uma – chaetoglobosin A-D ; 531 et 567 uma – chaetoglobosin E-F) sur CYA et sur YES — *Analysis by ESMS of secondary metabolites produced by species belonging to the genus Penicillium* (adapted from Smedsgaard and Frisvad, 1997).



D'après Smedsgaard et Frisvad, ces données chimiques en combinaison avec d'autres caractéristiques (morphologie, physiologie ou production de métabolites volatils) pourraient présenter une classification améliorée des espèces constitutives du genre *Penicillium*.

Solfrizzo et Visconti (1996) ont utilisé la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec un détecteur à barrettes de diode pour quantifier les cinq métabolites secondaires (chlamydosporol, isochlamydosporol, chlamydosporol, acuminotaryrone, visoltucin) caractéristiques du genre *Fusarium* (Figure 11). Ils ont étudié la production de ces métabolites par plusieurs souches de *Fusarium tricinctum* et de *F. chlamydosporum* (Tableau 2). Ils ont trouvé que la visoltricine n'était produite que par *F. tricinctum* tandis que les quatre autres composés étaient produits par les deux espèces, mais en proportions différentes.

À côté des profils en métabolites secondaires non volatils caractéristiques d'une espèce, des auteurs ont pu mettre en évidence la présence d'un métabolite spécifique à une espèce. Par exemple, Larsen *et al.* (1998) ont montré que l'espèce *Penicillium verrucosum* pouvait être identifiée sur base de la présence



**Figure 11.** Métabolites secondaires produits par des espèces appartenant au genre *Fusarium* — *Secondary metabolites produced by species belonging to the genus Fusarium* (adapted from Solfrizzo and Visconti, 1996). DIOL : chlamydosporol ; ICL : isochlamydosporol ; CL : chlamydosporol ; ACP : acuminotaryrone ; VIS : visoltucin.

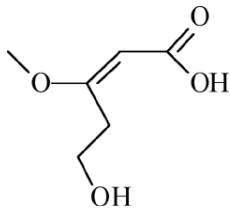
**Tableau 2.** Analyse par HPLC-DAD des cinq métabolites secondaires produits par les espèces *Fusarium chlamydosporum* et *Fusarium tricinctum* — *Analysis by HPLC-DAD of five secondary metabolites produced by the species Fusarium chlamydosporum and Fusarium tricinctum*. (DIOL : chlamydosporol ; ICL : isochlamydosporol ; CL : chlamydosporol ; ACP : acuminotaryrone ; VIS : visoltucin) (adapted from Solfrizzo and Visconti, 1996).

Souche	Concentration (µg/g)				
	DIOL	ICL	CL	ACP	VIS
<i>Fusarium chlamydosporum</i>					
7-729	2200	800	3200	1800	ND*
T-731	260	900	400	459	ND
T-826	1200	1800	1400	1460	ND
T-513	170	ND	ND	441	ND
T-669	777	ND	ND	230	ND
T-746	353	ND	ND	36	ND
<i>Fusarium tricinctum</i>					
T-460	74	ND	ND	37	ND
T-226	40	ND	40	6	40
T-387	225	200	200	13	29
T-511	130	650	780	3	271
T-693	110	ND	220	10	1350
T-823	70	ND	40	6	22
KF 260	50	80	110	20	100
T-545	ND	ND	ND	ND	30
T-904	ND	ND	ND	ND	1165

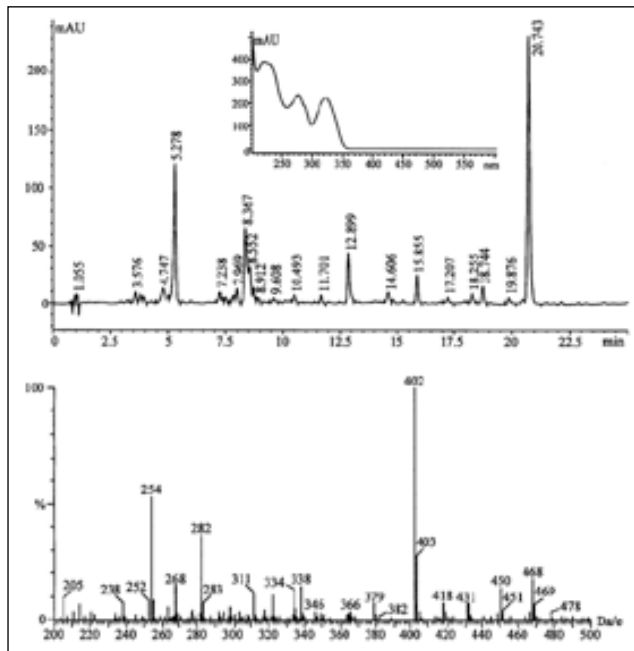
\* ND = non détecté ; < 3 µg/g pour DIOL, ICL, CL, ACP et < 1 µg/g pour VIS.

exclusive de l'acide arabénoïque (Figure 12). En effet, cette molécule n'est pas produite par les autres espèces de *Penicillium*. Un deuxième exemple est celui de Larsen *et al.* (1999) qui ont analysé par CLHP les métabolites produits par l'espèce *Penicillium scabrosum*. Ils ont trouvé que les profils en métabolites étaient très semblables d'un point de vue qualitatif (Figure 13). En effet, tous les isolats étudiés produisaient les penigequinolones A et B (Figure 14) en tant que produits majoritaires, en plus des molécules de cyclopinine, cyclopinol et viridicatine déjà rencontrées chez plusieurs espèces de *Penicillium*. Les auteurs ont observé que la combinaison de ces cinq métabolites était unique à l'espèce *Penicillium scabrosum* et constitue donc un excellent indicateur chimique pour identifier cette espèce.

Le troisième exemple est l'étude par Larsen *et al.* (2000) de la production de benzodiazépines (Figure 15) par 53 isolats de *Penicillium*. Ils ont trouvé que tous les isolats contenaient une grande quantité de sclérotigénine dans leur mycélium et que ce produit dont l'activité biologique a été démontrée auparavant pourrait jouer un rôle de défense chimique.



**Figure 12.** Structure de l'acide arabeoïque, métabolite secondaire à l'espèce *Penicillium verrucosum* — *Chemical structure of arabeoic acid, secondary metabolite specific to the species Penicillium verrucosum* (adapted from Larsen *et al.*, 1998).



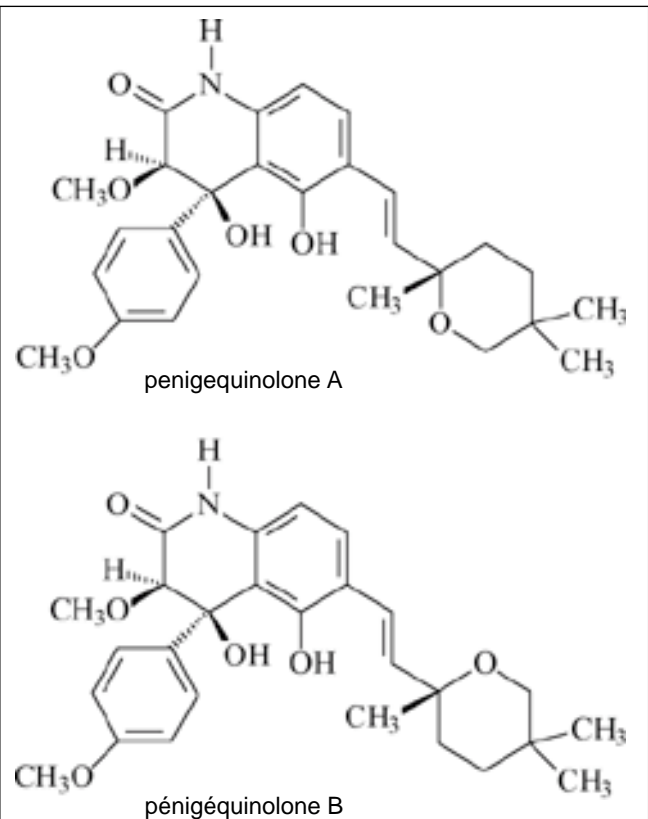
**Figure 13.** Profil chromatographique (en haut) et profil en masses (en bas) des métabolites secondaires produits par l'espèce *Penicillium scabrosum* en culture sur le milieu CYA — *Chromatographic profile (top) and mass profile (bottom) of secondary metabolites produced by species Penicillium scabrosum cultivated on CYA* (adapted from Larsen *et al.*, 1999).

### 3. CONCLUSIONS

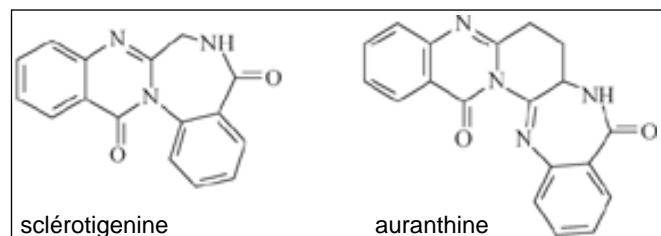
La systématique des champignons est principalement basée sur l'observation des caractéristiques morphologiques propres à une espèce donnée.

Lorsque les caractéristiques morphologiques sont inefficaces pour identifier un champignon (isolats sensibles aux conditions environnementales ou peu différenciés), on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Cependant, pour des champignons filamenteux peu différenciés tels que *Penicillium*, *Aspergillus* ou *Alternaria*, ces méthodes sont laborieuses, longues et quelquefois insuffisantes.

Les méthodes moléculaires et les méthodes chimiques ont été développées dans le but d'obtenir un



**Figure 14.** Structure chimique des pénigéquinolones A et B, deux métabolites secondaires non volatils produits par l'espèce *Penicillium scabrosum* — *Chemical structure of penigequinolones A and B, two non volatile secondary metabolites produced by species Penicillium scabrosum* (adapted from Larsen *et al.*, 1999).



**Figure 15.** Structure des deux benzodiazépines produites par certaines espèces appartenant au genre *Penicillium* — *Chemical structure of two benzodiazepines produced by several species belonging to the Penicillium genus* (adapted from Larsen *et al.*, 2000).

complément d'informations sur la taxonomie d'un isolat étudié. Ces méthodes se regroupent dans la chimiotaxonomie.

À l'heure actuelle, les méthodes moléculaires sont utilisées en routine dans les laboratoires de mycologie car elles permettent d'établir un système de classification basé sur l'étude de marqueurs génétiques.

À côté des méthodes moléculaires, les méthodes chimiques peuvent fournir des résultats complé-

mentaires à la description morphologique et/ou à la biologie moléculaire.

Les composés étudiés en chimiotaxonomie sont les polysaccharides, les lipides insaponifiables, les acides gras, les métabolites secondaires volatils et non volatils.

L'étude des polysaccharides se révèle très complexe car la détermination de leur structure demande des analyses détaillées.

Les lipides insaponifiables comprennent les ubiquinones, les stéroïdes et les caroténoïdes. Les stéroïdes sont les lipides insaponifiables les plus étudiés car les champignons sont généralement composés d'ergostérol. Cependant, ce dernier n'est pas présent dans tous les cas.

L'analyse des acides gras indique qu'il est possible de différencier des espèces sur base de la concentration relative en acides gras mais pas sur base de la composition.

L'étude des métabolites secondaires volatils a été fortement critiquée car peu d'isolats ont été étudiés mais il a été démontré qu'il était possible de différencier des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* sur base de la production en métabolites secondaires volatils. De plus, ils pourraient être utiles à la détection rapide de champignons indésirables qui sont soit des contaminants des bâtiments soit des contaminants de certaines denrées alimentaires.

Les métabolites secondaires non volatils peuvent être caractérisés par des méthodes chimiques standardisées et disponibles dans de nombreux laboratoires. Ils pourront aussi jouer un rôle majeur lors de la révision des genres des champignons parce qu'ils procurent des données précises et complémentaires aux observations morphologiques de la mycologie classique. On peut donc s'attendre à ce que les métabolites secondaires non volatils fassent partie de la description de nouvelles espèces.

En conclusion, lors d'études taxonomiques, les caractéristiques morphologiques seront toujours étudiées mais seront combinées avec les études moléculaires et chimiques pour identifier et classer correctement un champignon. Cependant, il est nécessaire de standardiser les méthodes chimiques et de réaliser la caractérisation d'un grand nombre d'isolats.

### Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier le Dr A. Wilmotte (Université de Liège, Centre d'ingénierie des protéines) ainsi que le Dr Ph. Jacques (FUSAGx, Unité de Bio-industries) pour leur aide précieuse dans la rédaction de cette revue.

### Bibliographie

- Ahrazem O., Gomez-Miranda B., Pireto A., Barasoain I., Bernabé M., Leal JL. (1999). Structural characterization of a cell wall polysaccharide from *Penicillium vermoesenii*: chemotaxonomic application. *Can. J. Bot.* **77**, p. 961–968.
- Andersen A., Thrane U. (1996). Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolites profiles and cultural characteristics. *Can. J. Microbiol.* **42**, p. 685–689.
- Arisan-Atac IHE., Kubicek CP. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, p. 249–256.
- Börjesson T., Stöllman U., Schnürer J. (1990). Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (12), p. 3705–3710.
- El Menyawi I., Wögerbauer M., Sigmund H., Burgmann H., Granonger W. (2000). Identification of yeast species by fatty acid profiling as measured by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **742**, p. 13–24.
- Frisvad JC., Bridge PD., Arora DK. (1998). *Chemical fungal taxonomy*. New York: Marcel Dekker, p.
- Grandmougin-Ferjani A., Dalpé Y., Hartmann MA., Laruelle F., Sancholle M. (1999). Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* **50**, p. 1027–1031.
- Guarro J., Gené J., Stchigel AM. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12** (3), p. 454–500.
- Jiménez-Barbero J., Prieto A., Gomez-Miranda B., Leal JA., Bernabé M. (1995). Chemical structure of fungal cell-wall polysaccharides isolated from *Microsporum gypseum* and related species of *Microsporum* and *Trychophyton*. *Carbohydr. Res.* **272**, p. 121–128.
- Kano ROK., Nakamura Y., Ooka S., Kashima M., Mizoguchi M., Watanabe S., Hasegawa A. (2000). Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med. Mycol.* **38**, p. 47–50.
- Larsen TO. (1997). Identification of cheese-associated fungi using selected ion monitoring of volatile terpenes. *Lett. App. Microbiol.* **24**, p. 463–466.
- Larsen TO., Frisvad JC. (1995a). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycol. Res.* **99** (10), p. 1153–1166.
- Larsen TO., Frisvad JC. (1995b). Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycol. Res.* **99** (10), p. 1167–1174.
- Larsen TO., Frisvad JC., Christophersen C. (1998). Arabenoic acid (verrucolone), a major chemical indicator of *Penicillium verrucosum*. *Biochem. Syst.*

- Ecol.* **26**, p. 463–465.
- Larsen TO., Smedsgaard J., Frisvad JC., Anthoni U., Christophersen C. (1999). Consistent production of penigequinolone A and B by *Penicillium scabrosum*. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**, p. 329–332.
- Larsen TO., Frydenvang K., Frisvad JC. (2000). UV-guided screening of benzodiazepine producing in *Penicillium*. *Biochem. Syst. Ecol.* **28**, p. 881–886.
- Lopes da Silva T., de Sousa E., Pereira PT., Ferrao AM., Roseiro JC. (1998). Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, p. 303–310.
- Lübeck MPSK., Lübeck P.S., Jensen D., Thrane U. (2000). Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.*, p. 129–134.
- Magan N., Evans P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stored Prod. Res.* **36**, p. 319–340.
- Makimura KTY., Murakami A., Kano R., Nakamura Y., Hasegawa A., Uchida K., Yamaguchi H. (2001). Cluster analysis of human and animal pathogenic *Microsporium* species and their teleomorphic states, *Arthroderma* species, based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer I. *Microbiol. Immunol.* **45** (3), p. 209–216.
- Micales JA. (1986). The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* **27**, p. 405–449.
- Mullis KB., Faloona FA., Scharf SJ., Saiki RK., Horn GT., Erlich HA. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, p. 263–273.
- Nilsson T., Larsen TO., Montanarella L., Madsen JO. (1996). Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *J. Microbiol. Methods*, **25**, p. 245–255.
- Okada K., Takizawa K., Maebayashi Y., Xi L., de Campos-Takaki GM., Nishimura K., Miyayi M., Fukushima K. (1996). Ubiquinone systems of the genus *Cladosporium* and morphologically similar taxa. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, p. 39–43.
- Smedsgaard J., Frisvad C. (1997). Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts. I. Chemosystematics. *Biochem. Syst. Ecol.* **25** (1), p. 51–64.
- Solfrizzo M., Visconti A. (1996). Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of visoltricin, acuminatopyrone and chlamydosporols in *Fusarium* cultures on maize. *J. Chromatogr. A* (730), p. 69–73.
- Sunesson AL., Vaes W., Nilsson, Blomquist G., Andersson B., Carlson R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (8), p. 2911–2918.
- Wilkins K., Larsen K. (1995). Variation of volatile organic compound patterns of mold species from damp building. *Chemosphere* **31** (5), p. 3225–3236.

(28 réf.)