



Dispositif d'incubation in situ de bûchettes de hêtre à différents stades de pré-dégradation causée in vitro par *Gloeophyllum trabeum*.

Fate of lignin altered by brown and white rot fungi

Responsable scientifique : Delphine DERRIEN, Unité Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers – BEF

Partenaires Labex : Eric Gelhaye, UMR 1136 « Interactions arbres microorganismes »

Collaborations : Matthieu Barrandon- IECL- Institut Elie Cartan de Lorraine, Université de Lorraine, Nancy, Gry Alfredsen – NIBIO – Norwegian Institute of Bioeconomy Research, Norway, Barry Goodell – Department of Microbiology, University of Massachusetts, USA

Contexte —

Au sein des écosystèmes forestiers, les champignons de pourritures blanches et brunes sont les acteurs majeurs du recyclage de la matière organique et plus particulièrement de la biomasse lignocellulosique. En effet, ils sont capables de dégrader ou d'altérer la lignine favorisant ainsi l'accès aux polysaccharides du bois. La stratégie des pourritures blanches est basée sur un système enzymatique extracellulaire capable de dégrader à la fois les polysaccharides et la lignine du bois. Les pourritures brunes, quant à elles utilisent une stratégie différente basée sur la production de radicaux hydroxyles qui engendre une dégradation des polysaccharides et génère une modification chimique de la lignine. La source de ces différences de stratégies se trouve au sein de l'histoire évolutive de ces champignons. En effet, l'apparition des pourritures brunes serait due à la perte des gènes codant pour des fonctions de dégradation de la lignine chez des pourritures blanches. Ces événements se seraient produits plusieurs fois au cours de l'histoire évolutive des champignons. Le fait que les pourritures brunes dominent les forêts de conifères laisse à penser que cette évolution pourrait leur conférer un avantage vis-à-vis des pourritures blanches.

Objectifs —

Au sein de ce projet, nous souhaitons tout d'abord comprendre l'impact des stratégies employées par les champignons de pourritures blanches et brunes sur les microorganismes et la persistance du carbone dans les sols forestiers. Deuxièmement, nous voulons tester l'hypothèse suivante : les pourritures brunes ont un avantage énergétique par rapport aux pourritures blanches et ceci à cause de leur histoire évolutive.

Démarche —

Pour répondre au premier objectif fixé, nous avons réalisé plusieurs expériences basées sur l'incubation sur une durée de deux mois à un an de différentes essences de bois au sein de placettes situées dans la forêt de Breuil-Chenu (Morvan). La première expérience a pour but l'étude de l'impact de différents stades de dégradation causé par *Gloeophyllum trabeum* sur la microflore associée et la persistance du carbone dans les sols forestiers. La seconde expérience vise à étudier les différences entre les stratégies de dégradation employées par les champignons de pourritures brunes et blanches sur la microflore associée et la persistance du carbone dans les sols forestiers. Enfin, un troisième axe a pour but de confirmer la théorie du « home field advantage » connue pour la litière mais très peu étudiée sur des substrats ligneux.

Dans le cadre de ces expériences, deux stratégies ont été mises en place i) l'utilisation d'outils omiques pour accéder à des données fonctionnelles (métatranscriptomique) ou de diversité (métabarcoding) de la microflore associée, et d'autre part ii) l'utilisation de méthodes chimiques afin de suivre l'évolution de la composition du bois au cours du temps.

Par ailleurs, afin de tester l'hypothèse d'avantage énergétique, nous avons réalisé une expérience *in vitro* dans laquelle des champignons de pourritures blanches et brunes sont cultivés sur de la sciure de hêtre afin de suivre au cours du temps des paramètres tels que : la respiration, la production de biomasse fongique, l'évolution de la composition du bois et la production de CO₂, et la production d'enzymes extracellulaires. Tous ces paramètres serviront également à valider un modèle mécanistique de devenir du carbone.

Résultats marquants —

Nous présentons ici des jalons méthodologiques atteints car le projet est en cours, les résultats importants seront obtenus dans les 10 prochains mois.

1. Expérience d'incubation in situ :
 - Obtention d'épicéa, de hêtre et de peuplier dégradé par *Gloeophyllum trabeum* et *Trametes versicolor*
 - Composition chimique de bois non dégradé (épicéa, hêtre et peuplier)
 - Composition chimique d'épicéa dégradé par *Gloeophyllum trabeum*
 - Obtention d'ADNg à partir de bois provenant d'une expérience in situ
2. Expérience in vitro sur l'hypothèse d'avantage énergétique :
 - Réalisation d'un suivi de la respiration de *T. versicolor* et *G. trabeum* sur 3 mois

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

A ce stade, nous avons dû faire face à plusieurs problèmes expérimentaux :

1. Expérience d'incubation in situ : Nous nous sommes confrontés à l'impossibilité d'extraire des ARN de qualités suffisante pour faire de la méta-transcriptomique. C'est pourquoi, nous avons décidé de réaliser une approche de méta-barcoding à partir d'ADN extrait et non plus d'ARN. De plus, nous avons observé lors de l'expérience de deux mois une mauvaise colonisation des buchettes de bois par la microflore pouvant s'expliquer par une année sèche. Afin d'éviter ces problèmes, le temps d'incubation prévu initialement en novembre 2019 des autres expériences a été repoussé de 6 mois (mai 2020).
2. Expérience in vitro sur l'hypothèse d'avantage énergétique : Dans un premier temps, des conditions expérimentales ont été testées et optimisées sur du matériel spécifique (chromatographie gazeuse) dans le but de suivre la respiration fongique sur 3 mois. Cependant, nous avons dû faire face à un défi expérimental symbolisé par le maintien de condition stérile au cours du temps, notamment lors des étapes de prélèvement de gaz pour analyse en chromatographie. Nous avons envisagé l'ajout d'antibiotiques afin d'éviter des contaminations bactériennes. Ceci a eu pour effet un fort ralentissement de la croissance fongique. Par la suite, nous avons contourné le problème en utilisant des filtres à très faible porosité lors du prélèvement des gaz. Après avoir optimisé nos conditions, une panne est survenue sur la machine permettant le suivi de la respiration fongique. C'est pourquoi, nous avons mis en place un nouveau protocole pour suivre la respiration sur un analyseur de CO₂ utilisant une technologie infrarouge.

Perspectives —

Pour le premier objectif, deux expériences sont encore en cours d'incubation dans la forêt de Breuil-Chenu. Nous travaillons sur l'amplification des régions 16S et ITS à partir de l'ADNg extrait ce qui permettra par la suite d'obtenir des données de diversité sur la microflore des sols forestiers en fonction de l'essence incubée.

En ce qui concerne le second objectif, une première incubation avec suivi de respiration sur 3 mois a été réalisée. Trois nouvelles cinétiques à 15, 30, 60 jours vont être réalisées entre février et avril. Ces résultats seront ensuite valorisés sous la forme d'articles scientifiques



Valorisation

Nicolas Valette, Eric Gelhaye, Gry Alfredsen, Barry Goodell, Delphine Derrien. **2019** The Home Field Advantage theory could be used for carbon sequestration and forest management ? Soil Organic Matter 2019 conference. Adéalide, Australie. Poster.