

Figure 1: Racines de peuplier inoculées avec un champignon ectomycorhizien (*Laccaria bicolor* ou *Lactarius controversus*) ou endophyte (*Hyaloscypha finlandica* ou *Coniochaete*). Les cellules racinaires ont été colorées avec de l'iodure de propidium (rouge) et les cellules fongiques avec du WGA-Alexa fluor 488 (vert). HER= Hyphe Extra-Racinaire; HIR: Hyphe Intra Racinaire; HN: Réseau de Hartig

Comprendre les interactions entre le peuplier et les microbes : Du système modèle simple aux modèles synthétiques plus complexes

Responsable scientifique : Annegret KOHLER, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaires Labex : Claire VENAULT-FOURREY, Aurélie DEVEAU, Jose-Eduardo MARQUES-GALVEZ & Aline SAUVAGE - UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Action thématique concernée : WP1

Contexte — Des milliers d'espèces de champignons sont présentes dans le sol, mais seule une petite fraction d'entre elles est capable de former des symbioses contribuant à la croissance des arbres. Les champignons ectomycorhiziens (ECM), mais aussi les endophytes ayant des effets positifs, négatifs ou neutres sur leurs hôtes, sont de plus en plus reconnus comme des membres importants du microbiote des arbres. Malgré leur(s) rôle(s) cruciaux dans la croissance et la résistance aux stress, les mécanismes par lesquels ces champignons s'associent et communiquent entre eux et avec leurs arbres hôtes restent largement méconnus.

Objectifs — Les connaissances actuelles sur le dialogue moléculaire dans les interactions mutualistes ectomycorhiziennes ont été obtenues avec quelques systèmes modèles *in vitro*, dont notre modèle *Laccaria bicolor*-Peuplier. Alors que des progrès significatifs ont été réalisés dans l'élucidation des signaux échangés au cours du développement de l'ECM, les mécanismes d'interactions arbres-champignons endophytes sont, pour la plupart, méconnus. D'autre part, les éventuels effets inhibiteurs ou synergiques entre champignons endophytes et champignons ECM restent peu explorés. Dans ce projet, nous voulons déterminer si une même plante-hôte peut distinguer les champignons ectomycorhiziens des champignons endophytes lors d'inoculum complexe et identifier les déterminants moléculaires végétaux et fongiques permettant ces interactions.

Démarche — Dans notre expérience, nous avons étudié la colonisation des racines de *Populus tremula x alba* par deux champignons ectomycorhiziens (*Laccaria bicolor* et *Lactarius controversus*) et deux endophytes (*Hyaloscypha finlandica* et *Coniochaeta sp.*) selon un gradient de complexité allant de l'inoculation d'un seul champignon à l'inoculation de l'ensemble des souches fongiques sélectionnées. Notre but est de caractériser les profils de colonisation par le biais d'observations en microscopie confocale et d'en comprendre les mécanismes sous-jacents que ce soit au niveau transcriptomique ou métabolomique. Pour cela, des peupliers âgés de trois semaines ont été cultivés dans des pots stériles contenant 200 ml de sol forestier (stérilisé par irradiation gamma) et 5 % de volume d'inoculum fongique pendant 30 jours. Pour chaque traitement, 31 plantes ont été cultivées. Les parties aériennes et racinaires de chaque plante ont été récoltées et réparties en 5 pools de 5 plantes pour les analyses moléculaires (transcriptome et métabolome) et le système racinaire de 6 plantes a été conservé pour les observations en microscopie confocale. De plus, des prélèvements de sol ont été réalisés dans chaque pot afin d'étudier le transcriptome des champignons inclus dans les combinaisons fongiques. La biomasse fraîche des plantes a été déterminée lors de la récolte et, les systèmes racinaires ont été observés par microscopie confocale après coloration des cellules racinaires avec de l'iodure de propidium et des structures fongiques avec du WGA couplé à l'Alexa fluor. Les transcriptomes des systèmes racinaires ainsi que des échantillons de sol seront en cours d'analyse et les échantillons des parties aériennes et racinaires seront envoyés pour l'analyse de leur métabolome dans un futur proche. Des analyses des nutriments biodisponibles pour la plante seront également effectuées sur les sols.

Résultats

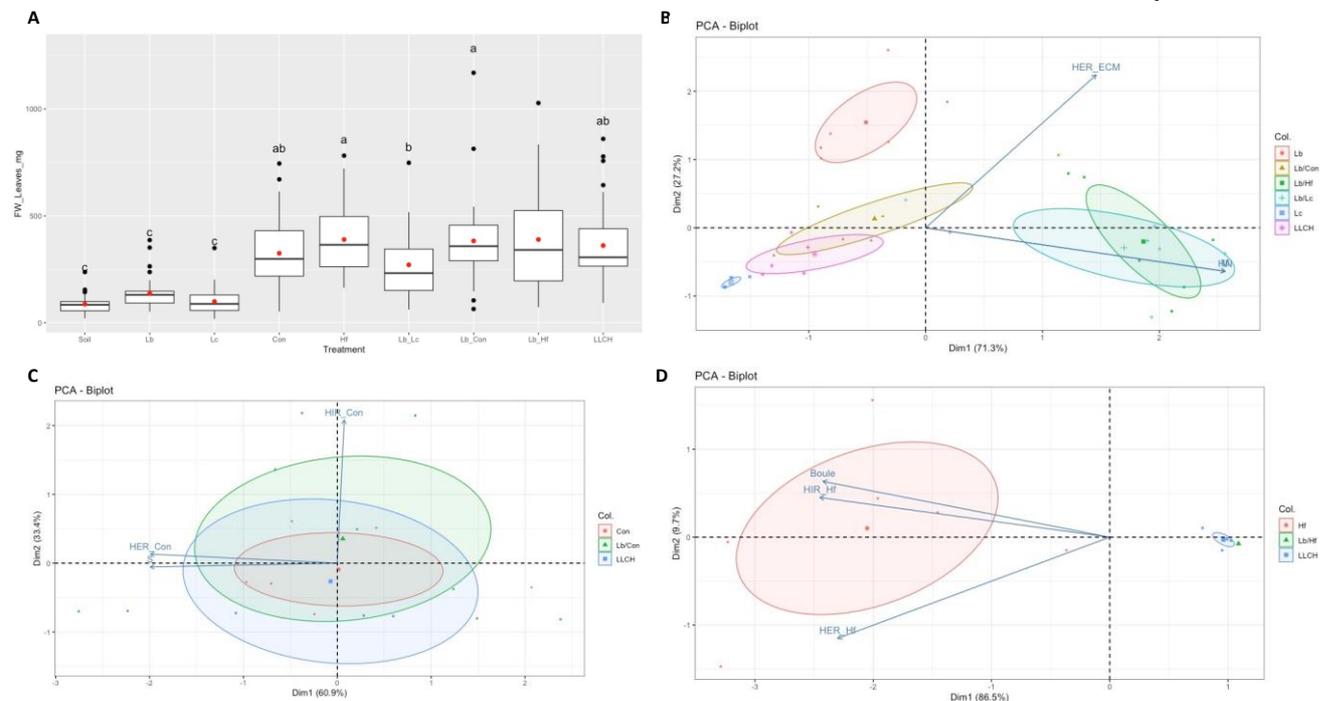


Figure 2 : Biomasse aérienne et colonisation racinaire de *Populus tremula x alba* inoculés avec différentes combinaisons de champignons ectomycorhiziens et endophytes. La biomasse des parties aériennes a été mesurée lors de la récolte (A). La fréquence d'apparition des structures caractéristiques de chaque espèce a été quantifiée selon la méthode McGonigle (1990). Ainsi, nous avons distingué le manteau (M), le Hartig Net (HN) et le mycélium extra-racinaire (HER) pour les champignons ectomycorhiziens (B), le mycélium intra-racinaire (HIR) et extra-racinaire (HER) pour les champignons endophytes ainsi que les spores (S) propres à *Coniochaeta sp.* (C) et les structures globulaires (« Boule ») formées par *H. finlandica* (D). Les résultats ont été analysés sous la forme d'analyse en composante principale (ACP) (package Factoextra-Rstudio).

- L'inoculation simple par un champignon endophyte et les co-inoculations de champignons ectomycorhiziens et endophytes (doubles et multiples) ont apporté un bénéfice de croissance des parties aériennes du peuplier. (Fig.2A)
- Dans nos conditions expérimentales, les champignons ectomycorhiziens en simple inoculum n'ont que peu ou pas colonisé les racines des peupliers, au contraire des conditions de co-inoculation avec un champignon endophyte ou ECM. (Fig.2B)
- Les deux endophytes *Hyaloscypha finlandica* et *Coniochaeta* ont colonisé les racines des peupliers : *Coniochaeta* présente des hyphes extra-racinaires fins fortement mélanisées et des structures

ressemblant à des spores, tandis que *H. finlandica* présente une colonisation intra-racinaire, avec des structures intercellulaires, ponctuées de structures globulaires. (Fig.1)

- Les structures typiques de l'ectomycorhize (manteau et réseau de Hartig) sont retrouvées dans le système racinaire pour chacune des co-inoculations ECM-endophyte ou ECM-ECM. Toutefois, en co-inoculation avec l'endophyte *H. finlandica*, seules les structures ectomycorhiziennes sont retrouvées. En association avec l'endophyte *Coniochaeta*, les structures caractéristiques des deux souches (ECM- et endophyte) sont retrouvées avec une occurrence plus faible des structures ectomycorhiziennes que dans les autres co-inoculation. (Fig.2, B-D)
- Au sein de notre condition d'inoculum la plus complexe (mélange des champignons étudiés), les quatre champignons ont colonisé les racines de peupliers mais à de faible fréquence à l'exception de *Coniochaeta* dont les structures sont observées de façon constante. (Fig.2, B-D)

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion

- La formation d'ectomycorhizes a été observée seulement lorsque le/les champignon(s) ectomycorhizien(s) étaient co-inoculés avec un autre champignon (endophyte ou ECM). Ainsi, la capacité de colonisation des racines par les champignons ECM pourrait être promue par des mécanismes d'interaction champignon/champignon relevant soit de la synergie, soit de la compétition ou être directement liée à leur vitesse de croissance leur donnant le primo accès aux racines ou un effet de « priming » ou de défense par le premier champignon colonisant le système racinaire autorisant ou empêchant, respectivement la colonisation par un autre champignon.
- Malgré un effet positif sur la croissance du peuplier, les deux champignons endophytes étudiés colonisent très différemment les racines de peuplier. *H. finlandica* présente un mode de colonisation intra-racinaire tandis que *Coniochaeta* reste au voisinage des racines à la manière d'un champignon épiphyte. Cela suggère que deux champignons appartenant à la même guildes trophique peuvent (1) former différents structures d'interactions à l'échelle cellulaire dont il reste à démontrer si elles permettent l'échange bidirectionnelle ou non de nutriments et (2) favoriser la croissance des plantes avec des mécanismes différents (transfert direct de nutriments à l'interface champignon/plante vs transfert indirect grâce à la dégradation fongique des nutriments présents dans la rhizosphère ou le sol, contribuant ainsi à leur bio-disponibilité pour la plante ou encore production de métabolites ou d'hormones).

Lors du système d'inoculation le plus complexe, les structures extracellulaires de *Coniochaeta* prédominent par rapport à celles des autres champignons ectomycorhiziens et endophytes. Ainsi, le peuplier s'associerait préférentiellement avec ce champignon qui lui confère un bénéfice de croissance sans engendrer de coût carboné (mais plus d'expériences concernant les coûts du carbone sont nécessaires).

Perspectives

En plus de la microscopie confocale, des analyses du transcriptome et du métabolome sont en cours de réalisation pour élucider les différences de perception des champignons par l'arbre hôte et pour comparer les gènes fongiques ectomycorhiziens et/ou endophytes induits par l'interaction.

Valorisation — Présentation des premiers résultats dans les séminaires du laboratoire et aux collaborateurs du projet PMI.

Effet levier du projet — Le projet POPmodel est étroitement lié à notre projet international à long terme Plant-Microbe Interfaces (PMI ; <https://pmiweb.ornl.gov/> ; depuis 2010). Les résultats intermédiaires présentés ici ont déjà été discutés dans le cadre du PMI et ont été pris en compte pour les orientations futures du projet.