

Figure 1 : Racines de peuplier *Populus tremula x alba* inoculées avec un champignon ectomycorhizien ou un endophyte. Les cellules racinaires ont été colorées avec de l'iodure de propidium (rouge) et les cellules fongiques avec du WGA-Alexa fluor 488 (vert).

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

Prénom, Nom du porteur : Annegret Kohler, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaires Labex : Claire Veneault-Fourrey (UMR IAM), Aurélie Deveau (UMR IAM), Jose-Eduardo Marqués-Gálvez (UMR IAM) & Aline Sauvage (CDD, recrutée pour ce projet), Gaurav Pandharikar (Post-doc projet PMI)

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 et comment les plantes interagissent simultanément avec plusieurs microorganismes.

Démarche —

Dans cette nouvelle 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 (*Cadophora 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. 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 après coloration des cellules racinaires avec de l'iodure de propidium et des structures fongiques avec du WGA couplé à l'Alexa fluor, les systèmes racinaires ont été observés par microscopie confocale. Des racines colonisées, des racines témoins et des échantillons de sol (pour mycélium fongique témoin) ont été utilisés pour l'extraction des ARN totaux. En raison des faibles rendements d'ARN obtenus, la technologie SMART pour la construction de banques de séquençage (« very low input ») a été testée pour 10 échantillons représentatifs.

Résultats marquants

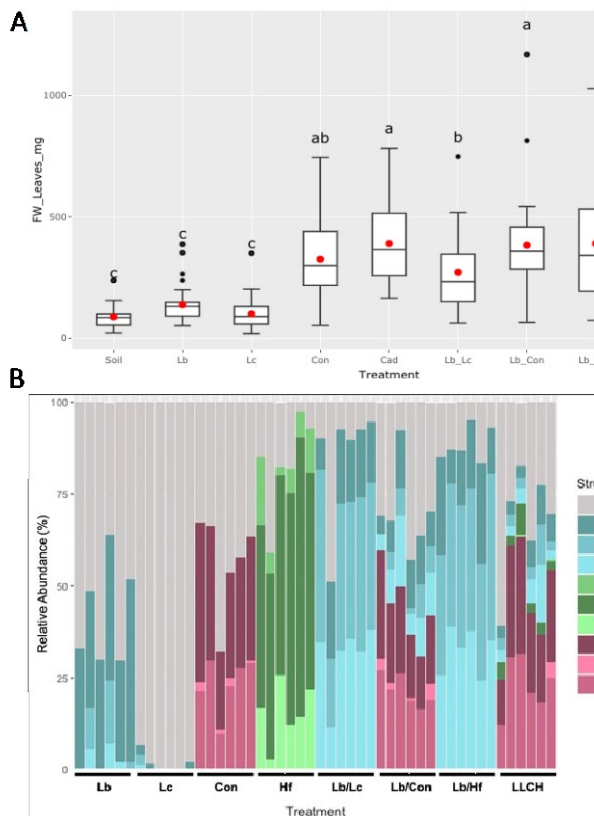


Figure 2 : Biomasse aérienne et colonisation racinaire de *P. tremula x alba* inoculés avec différentes combinaisons de champignons ectomycorhiziens et endophytes. La biomasse des parties aériennes a été mesurée lors de la récolte (A). Abondance relative (%) des structures fongiques dans le système racinaire de *Populus tremula x alba* WT après 30 jours de croissance. *Laccaria bicolor* (Lb), *Lactarius controversus* (Lc), *Coniochaeta sp.* (Con), *Hyaloscypha finlandica* (Hf), *Laccaria bicolor/Lactarius controversus* (Lb/Lc), *Laccaria bicolor/Hyaloscypha finlandica* (Lb/Hf), *Laccaria bicolor/ Coniochaeta sp.* (Lb/Con), toutes les souches fongiques (LLCH) (B). M manteau ; HN Hartig net ; HER mycélium extra-racinaire ; HIR mycélium intra-racinaire

- Les champignons endophytes ainsi que les co-inoculations (doubles et multiples) de champignons ectomycorhiziens et endophytes ont apporté un bénéfice de croissance aux peupliers. (Fig.2A)
- Dans nos conditions expérimentales, les champignons ectomycorhiziens n'ont que peu ou pas colonisé les racines des peupliers lorsqu'ils sont inoculés seuls mais uniquement lorsqu'ils sont co-inoculés. (Fig.2B)
- Les deux endophytes *Cadophora 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 *C. finlandica* présente une colonisation intra-racinaire, avec des structures intercellulaires, ponctuées de structures globulaires. (Fig.1)



- Au sein de notre condition la plus complexe, mélangeant l'ensemble des souches étudiées, 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 au sein des différentes combinaisons fongiques. Fig.2B)
- Un test RNA-Seq avec le protocole « very low input » pour 10 échantillons a donné des résultats prometteurs. L'analyse des transcriptomes du peuplier, mais aussi de la plupart des transcriptomes fongiques, a été possible (tableau 1).

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 et des profils de colonisation distincts ont été observés au sein des co-inoculations avec les endophytes. Leur capacité à coloniser les racines pourrait être promue par des mécanismes d'interaction champignon/champignon relevant soit de la synergie, soit de la compétition ou bien être directement liée à leur vitesse de croissance leur donnant le primo accès aux racines.
- Les deux champignons endophytes étudiés colonisent les racines de peuplier très différemment : *C. 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 guilda peuvent former d'autres types d'interactions dépendamment des conditions environnementales.
- Indépendamment de leurs profils de colonisation, les champignons ectomycorhiziens et endophytes apportent un réel bénéfice de croissance aux peupliers. Cela suggère que l'effet promoteur de croissance tire son origine du transfert direct de nutriments à l'interface champignon/plante mais aussi indirect grâce au champignon qui dégrade les nutriments présents dans la rhizosphère, contribuant ainsi à leur bio-disponibilité pour la plante. En outre, au sein du système le plus complexe, les structures 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 ce bénéfice sans engendrer de coût carboné. Cela suggère qu'en plus de la perception du champignon par la plante-hôte, l'établissement des différents types d'association serait fonction de la balance nutritionnelle.

Sample	paired reads	mapped reads Poplar	mapped reads Hyaloscypha	mapped reads Laccaria	mapped reads Lactarius	mapped reads Coiochaeta
ControlRoot4	71 626 942	56 163 320				
HfRoot3	69 904 626	43 905 152	8 308 348			
LLCHRoot6	70 734 330	51 421 320	588 684	1 225 644	48 658	725 526
LbRoot4	81 294 236	58 576 756		3 460 698		
LbConSoil4	76 058 014			1 337 314		27 248 126
P20Lc1	68 210 012				46 214 862	
P20Lb2	67 950 032			48 674 434		
LbConSoil1	60 693 830			896 032		25 945 148
LbHfRoot6	78 906 054	47 465 864	1 329 102	11 384 938		
LbConRoot6	72 494 648	48 783 580		6 547 172		472 388

Tableau 1 Résumé des mappings contre le génome de référence du peuplier ainsi que contre les quatre références fongiques.

Perspectives —

En raison des résultats prometteurs de RNA-Seq pour 10 échantillons de test, les 90 échantillons d'ARN restants ont été envoyés pour un séquençage « very low input ». Les résultats sont attendus pour la fin mars / début avril 2024.

Valorisation —

Présentation des premiers résultats dans les séminaires du laboratoire, aux collaborateurs du projet PMI et à la journée annuelle du LABEX Arbre en Novembre 2023. Un résumé a été soumis pour une présentation orale ou poster à l'ICOM12 (Conférence internationale sur les mycorhizes), qui se tiendra à Manchester en août 2024.

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.