
De la croissance des arbres à la production de champignons comestibles : la symbiose ectomycorhizienne

Claude Murat

UMR1136 Inra Université de Lorraine « Interactions Arbres/Micro-organismes », IFR110 EFABA, Centre Inra de Nancy, 54280 Champenoux

Résumé

Près de 95% des espèces végétales établissent des associations symbiotiques avec les champignons appelées mycorhizes. Il existe différents types de symbiose mycorhizienne impliquant des partenaires différents. Parmi ces différentes symbioses, l'ectomycorhize est réalisée entre des gymnospermes et angiospermes comprenant la majorité des espèces forestières de la région tempérée et des champignons ascomycètes et basidiomycètes appartenant à plus de 5 000 espèces. Dans l'ectomycorhize, le champignon s'insinue dans la lamelle moyenne des cellules corticales de la racine pour former le réseau de Hartig. Contrairement à l'endomycorhize, le champignon ne rentre pas dans la cellule végétale. Ce réseau d'interface entre cellules végétales et fongiques est très important puisqu'il est le lieu d'échanges entre les deux partenaires. Le champignon entoure également la racine d'un manteau de structure variable en fonction des espèces végétales et fongiques impliquées. Dans notre unité de recherche, nous nous intéressons à cette interaction entre les champignons ectomycorhiziens et les plantes, en nous focalisant surtout sur les facteurs génétiques sous-jacents. Pour cela, nous coordonnons différents projets de séquençage de génomes de champignons mycorhiziens, ce qui nous permet de mieux comprendre l'évolution de cette symbiose et les dialogues entre les partenaires.

Depuis maintenant plusieurs décennies, des expériences en serre, pépinière et in situ ont démontré que les champignons ectomycorhiziens peuvent favoriser la croissance des plantes. Pour exploiter l'effet bénéfique de cette symbiose, un protocole d'inoculation du pin douglas avec un champignon ectomycorhizien, *Laccaria bicolor*, a été mis au point dans les années 1980 au sein de notre laboratoire. Aujourd'hui, ce savoir-faire fait l'objet d'une licence d'exploitation pour la production de plants de pins douglas mycorhizés avec *L. bicolor* par deux pépiniéristes français.

Les champignons ectomycorhiziens sont aussi connus pour produire des fructifications très recherchées, comme les bolets et les truffes. Dans les années 1970,

des chercheurs de l'Inra ont mis au point un protocole d'inoculation de jeunes plants de chênes et noisetiers avec la truffe noire du Périgord. Ce protocole est maintenant exploité par de nombreux pépiniéristes de par le monde, produisant plusieurs centaines de milliers de plants par an. Les progrès de l'inoculation des plants avec la truffe noire, associés aux améliorations des techniques culturales et aux progrès de la recherche, ont permis de stabiliser la production de truffes et, en France actuellement, 90% de cette production provient de plantations.

Introduction

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, ils ont donc dû, au cours de l'évolution, développer différentes stratégies pour se procurer du carbone. Ils peuvent être saprotrophytes, endophytes, parasites ou symbiotiques. Parmi les symbioses mutualistes, un grand nombre ont lieu entre les champignons et les plantes, formant des organes appelés mycorhizes. Les mycorhizes ont été décrites pour la première fois en 1885 par Frank, qui avait observé au niveau des racines des arbres une structure anatomique et morphologique dans laquelle étaient impliqués des *Mycelia* fongiques. Ce n'est qu'en 1950 que les observations de Frank ont été confirmées par Melin et Nilsson. Les mycorhizes constituent une association symbiotique bénéfique aux deux partenaires. Le végétal profite des capacités exploratrices du champignon qui, quant à lui, profite de la phototrophie de la plante. Au total, 95 % des végétaux forment des symbioses mycorhiziennes (Malloch *et al.*, 1980).

Il existe plusieurs types de mycorhizes. Les plus anciennes, les endomycorhizes arbusculaires, sont apparues avec les premières plantes terrestres il y a environ 300 millions d'années (Le Tacon & Selosse, 1994). Les changements de climat, dont une baisse de température, ont provoqué la formation, dès le ter-

tiaire, d'un deuxième type de mycorhizes, l'ectomycorhize, impliquant plus de 5 000 espèces fongiques basidiomycètes ou ascomycètes (Molina *et al.*, 1992). Cette association est dominante dans les écosystèmes forestiers tempérés sous latitudes et longitudes intermédiaires. Les autres types de mycorhizes décrits sont les endomycorhizes à pelotons éricoïdes et orchidées, et les ectendomycorhizes. Ces types ne concernent que peu d'espèces de champignons et ils sont encore mal connus.

Dans l'ectomycorhize, le champignon s'insinue dans la lamelle moyenne des cellules corticales de la racine pour former le réseau de Hartig. Contrairement à l'endomycorhize, le champignon ne rentre pas dans la cellule végétale. Ce réseau d'interface entre cellules végétales et fongiques est très important puisqu'il est le lieu d'échanges entre les deux partenaires. Le champignon entoure également la racine d'un manteau de structure variable en fonction des espèces végétales et fongiques impliquées. Dans notre unité de recherche, nous nous intéressons à cette interaction entre les champignons ectomycorhiziens et les plantes, en nous focalisant surtout sur les facteurs génétiques sous-jacents. Pour cela, nous coordonnons différents projets de séquençage de génomes de champignons mycorhiziens, ce qui nous permet de mieux comprendre l'évolution de cette symbiose et les dialogues entre les partenaires.

Les ectomycorhizes ont plusieurs rôles importants dans les écosystèmes forestiers, comme leur implication dans l'alimentation minérale du végétal et la protection de la racine hôte contre diverses agressions (Selosse, 1998). Le manteau a un rôle d'écran contre les micro-organismes du sol, mais aussi des interactions plus complexes dans la rhizosphère amènent une modification locale de la microflore (Frey *et al.*, 1997). D'autre part, la plante hôte accumule des composés antibiotiques en réponse à la mycorhization (Weiss *et al.*, 1997). Enfin, les mycorhizes protègent l'hôte contre les agressions physico-chimiques : tolérance au calcaire (Chevalier & Frochot, 1997), tolérance aux métaux lourds (Leyval *et al.*, 1997), tolérance au stress hydrique (Guelh *et al.*, 1992). Enfin, certains champignons ectomycorhiziens sont aussi connus pour produire des fructifications très recherchées, comme les bolets et les truffes.

Utilisation des ectomycorhizes pour améliorer la croissance des arbres

Depuis maintenant plusieurs décennies, des expériences en serre, pépinière et *in situ* ont démontré que les champignons ectomycorhiziens peuvent favoriser la croissance des plantes. L'effet bénéfique des mycorhizes ouvre la porte à des applications en sylviculture, par la mycorhization contrôlée de plants en pépinière. En foresterie, la vitesse de croissance initiale des plants détermine des surcoûts, comme l'immobilisation en pépinière et la durée de dégageant. Souvent, l'engrais est utilisé pour augmenter la vitesse de croissance initiale. Toutefois, les hauts niveaux de fertilité défavorisent la mycorhization (Marx *et al.*, 1977). Un cortège mycorhizien optimal constituerait donc un « engrais vert », compatible avec une gestion durable de l'écosystème forestier. Enfin, une meilleure reprise des plants à la plantation réduit les coûts de plantation ; or les ectomycorhizes, en protégeant les racines contre les agressions extérieures (voir ci-dessus), améliorent cette reprise.

Si beaucoup de sols possèdent naturellement un inoculum ectomycorhizien (spores et/ou mycélium), certains ne permettent pas une mycorhization spontanée. Des sols n'ayant jamais abrité d'ectomycorhiziens ne permettent pas la survie des essences ectomycorhizées, et les sols agricoles où poussent essentiellement des essences endomycorhiziennes sont également pauvres en inoculum ectomycorhizien.

L'inoculation en pépinière de souches sélectionnées permet d'apporter l'inoculum ectomycorhizien initial. Les premières tentatives d'inoculation datent de 1920, en Australie (Mikola, 1970). En Europe, plus précisément en Autriche dans les années 1950, la mycorhization du pin cembro par *Suillus plorans* a permis des plantations dans des zones alpines peu favorables (Moser, 1958). L'inoculation d'arbres forestiers à grande échelle a d'abord été développée aux États-Unis dans les années 1980.

En Europe, la mycorhization contrôlée d'essences forestières s'est développée dans les mêmes années, notamment sur un conifère d'origine américaine, le douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Cette essence doit posséder à la sortie de la pépinière un cortège ectomycorhizien pour être efficace. Après une première étape de sélection réalisée dans notre unité, une souche de *Laccaria bicolor* a été sélectionnée pour être utilisée pour l'inoculation de pin douglas à grande échelle.

Ce procédé d'inoculation fait l'objet d'un contrat de licence entre l'Inra et les pépinières Naudet et Robin. Depuis, les pépiniéristes ont développé d'autres asso-

ciations en fonction de l'essence forestière et du sol à reboiser. Il est possible de trouver sur le marché des arbres mycorhizés entre autres avec *Hebeloma crustiniforme*, *Suillus collinitus*, *Pisolithus tinctorius* et *Rhizopogon rubescens*.

Les champignons ectomycorhiziens comestibles

Parmi les premières mycorhizes décrites par Frank (1885), certaines appartenaient à la truffe de Bourgogne (*Tuber aestivum*). En fait, Frank, physiologiste végétal et forestier, a entrepris ses recherches à la demande du Service Forestier de la Prusse, afin de trouver un moyen d'augmenter la production de truffes dans le royaume. Il a observé que les vraies truffes (*T. aestivum*) et les fausses (*Elaphomyces sp.*) ne se développaient qu'en étroite relation avec certains arbres (hêtres, charmes, chênes). Il en a conclu que « certaines essences forestières, en particulier les cupulifères, ne se nourrissent pas dans le sol de manière indépendante, mais établissent une symbiose avec un mycélium fongique qui affectait l'intégrité du système racinaire ; ce mycélium avait une fonction nourricière et assurait l'alimentation de l'arbre, à partir du sol » (Frank, 1885).

Dès le début du xx^e siècle, Mattiolo a étudié les mycorhizes de truffes, mais il faudra ensuite attendre 1962 pour que des chercheurs italiens de l'Institut de recherche sur les plantes ligneuses de Turin (Fassi et De Vecchi) décrivent pour la première fois avec exactitude les mycorhizes d'un *Tuber* : *T. maculatum*. Quelques années plus tard, Palenzona (1969) décrivit les mycorhizes de trois truffes comestibles : *T. melanosporum*, *T. brumale* et *T. aestivum*. Dans les années 1970, les premiers plants mycorhizés en pépinière avec *T. melanosporum* sont obtenus (Chevalier et Grente, 1979). Ce protocole, mis au point par des chercheurs de l'Inra, a porté à la réalisation d'une licence d'exploitation pour la production de plants mycorhizés avec la truffe du Périgord et la truffe de Bourgogne, tout d'abord avec la pépinière Agritruffe puis, depuis la fin des années 1990, avec les pépinières Robin également. En France, une vingtaine d'autres pépiniéristes produisent aussi des plants inoculés avec ces deux espèces de truffes, qui sont contrôlés par le CTIFL. Actuellement, plus de 200 000 plants inoculés avec les truffes sont vendus par an en France. Les progrès dans l'inoculation des plants, associés aux améliorations des techniques culturales et aux progrès de la recherche, ont permis de stabiliser la production de truffes et en France actuellement, plus de 90% de cette production provient de plantations. Les pépiniéristes, en association avec les laboratoires de recherche, continuent à développer

de nouveaux protocoles, comme le prouve la mise en place récemment d'une nouvelle licence entre l'Inra et la pépinière Robin pour la production de plants mycorhizés avec la truffe blanche *T. magnatum*. Afin de continuer à améliorer la qualité des plants qui sont produits, les techniques de contrôle évoluent puisque maintenant, en complément du traditionnel contrôle morphologique, l'Inra a mis en place un contrôle biomoléculaire utilisant l'ADN pour ses licences.

Les truffes ne sont pas les seuls champignons ectomycorhiziens comestibles. En effet, de bons champignons comestibles comme, entre autres, l'amanite des césars, les bolets, les lactaires et les chanterelles sont aussi des espèces ectomycorhiziennes. Pour certaines d'entre elles, comme *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus* et *Suillus luteus*, il est possible de trouver des plants mycorhizés commercialisés et produits sous licence Inra par les pépinières Robin. En revanche, d'autres espèces sont encore récalcitrantes à la production en pépinière. C'est le cas de *Tricholoma matsutake* et *Boletus edulis*, pour lesquels il n'existe pas encore de protocole permettant la production de plants inoculés à grande échelle.

Conclusions

Avec plusieurs milliers d'espèces fongiques s'associant à la plupart des arbres forestiers, les champignons ectomycorhiziens sont des partenaires importants des écosystèmes naturels. L'ectomycorhize a de nombreuses applications, de par son action positive sur la croissance des arbres, sa protection contre les stress biotiques et abiotiques et les possibles retombées économiques par la récolte de leurs fructifications. Toutefois, la maîtrise de l'inoculation *in vitro* et en pépinière est encore limitée à quelques espèces fongiques. En effet, il est souvent difficile de produire de l'inoculum en conditions contrôlées. Afin de mieux connaître la symbiose ectomycorhizienne, et ainsi en favoriser les applications, notre unité de recherche développe plusieurs projets de recherches sur les mécanismes permettant l'établissement de la symbiose, son maintien, son fonctionnement, mais aussi son évolution. Pour cela, nous sommes fortement impliqués dans les projets de séquençage des génomes d'espèces ectomycorhiziennes comme le projet « Mycorrhiza 25 Genome » (<http://mycor.nancy.inra.fr/blogGenomes/?p=1334>). Le séquençage du génome des champignons ectomycorhiziens a commencé en 2005 avec celui de *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008), une espèce importante en reforestation (voir ci-dessus). Cette étude a permis de mettre en évidence que, lors de l'interaction entre *L. bicolor* et le pin douglas, le champignon émet de nombreux signaux sous

forme de petites molécules sécrétées, appelées MiSSP (« Mycorrhizal induced small secreted proteins ») dont au moins une (MiSSP7) rentre dans les cellules végétales pour modifier l'expression des gènes de la plante (Plett *et al.*, 2011). Cette « boîte à outils » de la symbiose ectomycorhizienne basée sur le dialogue ne semble pas la seule existante. En effet, lors de l'analyse du génome du deuxième champignon ectomycorhizien séquencé, la truffe noire *T. melanosporum* (Martin *et al.*, 2010), nous n'avons pas retrouvé de MiSSP exprimées lors de la symbiose. En revanche, nous avons retrouvé plusieurs enzymes de dégradation. Nous pensons que la truffe est plus agressive pour établir la symbiose ; elle utiliserait une autre « boîte à outils » pour l'ectomycorhize. Les différents projets en cours devraient donc nous permettre de mieux connaître la symbiose ectomycorhizienne et, par conséquent, en favoriser l'utilisation par les pépiniéristes et les forestiers.

Bibliographie

- Chevalier G. & Grente J., 1979. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne : production à grande échelle de plants mycorrhizés par la truffe. *Mushr. Sci.* 10 (2), 483-505.
- Chevalier G., Frochot H., 1997. *La truffe de Bourgogne*, Ed. Pétrarque, 257p
- Fassi B., De Vecchi E., 1962. Ricerche sulle micorrize ectotrofiche del Pino strobo in vivaio. I. Descrizione di alcune forme più diffuse in Piemonte. *Allionia*, 8, 133-152
- Frank, B., 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Berlin, v. 3, 128-145.
- Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., Berge O., Heulin T., 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1852-1860
- Guelh J.M., Garbaye J., Wartinger A., 1992. The effects of ectomycorrhizal status on plant-water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. In *Mycorrhizas ecosystems* (édité par D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter et I.J. Alexander). CAB International, Wallingford, p. 323-332
- Le Tacon F., Selosse M.A. 1994. La place des symbioses mycorrhiziennes dans l'évolution et la colonisation des continents pour la vie. *Acta botanica Gallica*, 141, 405-419
- Leyval C., Turnau K., Haselwandter K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7 (3), 139-153
- Malloch D.W., Pirozynski K.A., Raven P.H., 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77, 2113-2118
- Martin *et al.* 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464, 1033-1038
- Martin F *et al.* 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452, 88-92
- Marx DH, Hatch AB, Mendicino JF, 1977. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, 55, 1569-1574
- Melin E., Nilsson H., 1950. Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiologia Plantarum* 3, 88-92
- Mikola P, 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. *International Review of Forestry Research* 3, 123-196.
- Molina R.H., Massicotte H., Trappe J., 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses : community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal functioning- an integrated plant-fungal process* (édité par M.F. Allen). Chapman and Hall, New York, 357-417
- Moser, M. 1958. Der Einfluss tiefer Temperaturen auf das Wachstum und die Lebensfähigkeit höherer Pilze mit spezieller Berücksichtigung von Mykorrhizapilzen. *Sydowia* 1 2:386-99
- Palenzona M., 1969. Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Coryllus avelana*. *Allionia*, 15, 121-131
- Plett J, Kemppainen M Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for the symbiosis development. *Current Biology* 21, 1197-1203
- Selosse M.A., 1998. Etude de populations de champignons basidiomycètes ectomycorhiziens du genre *Laccaria*, introduits ou spontanés sous Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Thèse de l'université Paris XI, Orsay
- Weiss M., Mikolajewski S., Peipp H., Schmitt U., Schmitt J., Wray V., Strack D., 1997. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. *Plant physiology*, 114, 15-27