

Des bactéries à la rescousse des champignons symbiotiques

Les champignons symbiotiques jouent un rôle majeur dans la nutrition des arbres. Cette symbiose est loin d'être une simple interaction bipartite entre plantes et champignons ; des bactéries interviennent en effet dans le processus de formation des mycorhizes. Si les mécanismes en jeu restent méconnus, le développement récent des techniques de génomique permet néanmoins d'espérer de nombreux progrès dans ce domaine.

* Inra, UMR Interactions arbres/micro-organismes, 54280 Champenoux
klett@nancy.inra.fr

Aurélie Deveau*, Jean Garbaye*, Pascale Frey-Klett*

Les champignons symbiotiques ne font pas seulement le régal des gastronomes ; cèpes, truffes, lactaires et autres russules font aussi le bonheur des arbres. Les petits chapeaux qui peuplent les sous-bois de nos forêts (carpophores), sont en réalité les fructifications du champignon. Les organes végétatifs, non reproducteurs, se cachent à l'abri des regards, en sous-sol. Là, de vastes réseaux de mycélium fongique explorent des dizaines de mètres cubes de sol et s'associent aux racines des arbres dès que celles-ci croisent leur chemin.

Alors débute un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Après plusieurs jours de pourparlers naîtra un organe mixte : l'ectomycorhize. Il s'agit d'une structure d'échange entre la plante et le champignon : la plante, auxotrophe, capable de fixer du carbone à partir du CO₂, de l'eau et de l'énergie lumineuse, fournit au champignon les sucres qu'il est incapable de synthétiser par lui-même (figure 1). En échange, le champignon alimente la plante en eau et en éléments nutritifs tels que le phosphore ou l'azote. Ces nutriments sont peu accessibles aux racines des arbres car prisonniers dans les premiers centimètres du sol ou dans les minéraux.

Les champignons quant à eux secrètent dans leur environnement proche la mycorrhizosphère, des enzymes et des acides qui libèrent ces éléments. Ils sont alors absorbés par le mycélium fongique, puis transférés à la plante au niveau de la mycorhize. Les champignons ectomycorhiziens jouent donc un rôle majeur dans la nutrition des arbres et ont de ce fait été l'objet de recherches approfondies au cours des vingt dernières années.

Physiologie, écologie et mécanismes des échanges nutritionnels entre le champignon et son hôte végétal sont aujourd'hui mieux compris. Ces propriétés ont d'ailleurs été mises à profit en sylviculture grâce au développement de la mycorrhization contrôlée de semis d'arbres en pépinière. Cette technique consiste à inoculer des souches sélectionnées de champignons ectomycorhiziens et permet d'augmenter la croissance des arbres en pépinière comme en plantation (1).

(1) Bertaux J *et al.* (2007) *Biofutur* 283, 35-8

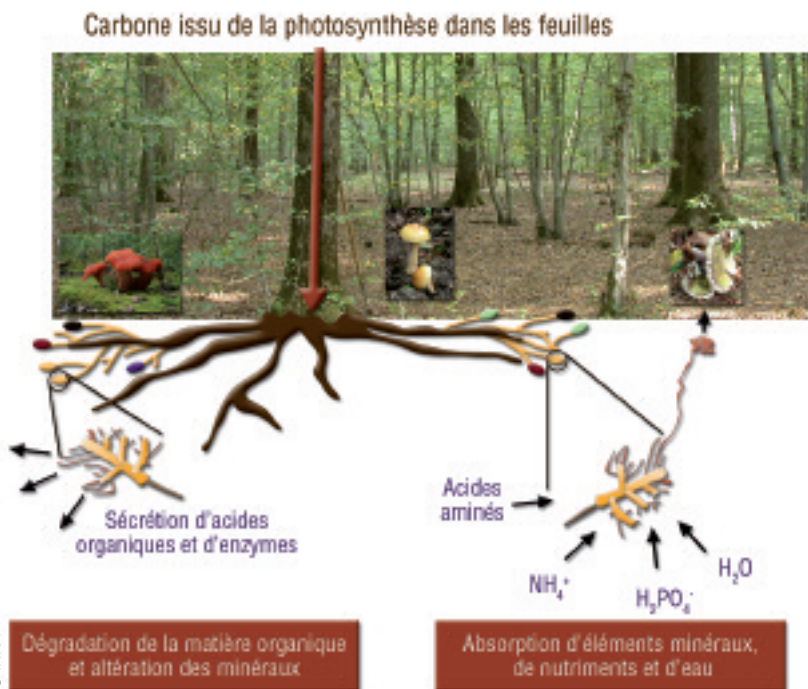


Figure 1 Échanges nutritionnels entre les champignons ectomycorhiziens et les arbres lors de la symbiose ectomycorhizienne

Les bactéries auxiliaires : une nouvelle dimension pour la symbiose ectomycorhizienne

Plus récemment, un regard nouveau s'est posé sur le monde des mycorhizes : celui des bactériologistes. En milieu naturel, les mycorhizes sont entourées de communautés bactériennes complexes qui interagissent avec la plante et le champignon. Certaines souches bactériennes de la mycorhizosphère ont un effet délétère sur la formation des mycorhizes tandis que d'autres les favorisent. Ces dernières ont été baptisées « bactéries auxiliaires de la mycorhization » (2, 3). Leur introduction dans un sol de pépinière forestière en compagnie de souches sélectionnées de champignons mycorhiziens augmente la croissance de jeunes plants d'arbre. Ces souches présentent donc un intérêt majeur pour la sylviculture dans le cadre des programmes de mycorhization contrôlée.

Bien que passées longtemps inaperçues, les bactéries auxiliaires de la mycorhization sont en fait répandues dans les sols. On soupçonne même certaines d'entre elles de se dissimuler à l'intérieur des cellules de champignon (1). Des bactéries auxiliaires ont pu être isolées dans tous les habitats où elles ont été recherchées (2) : le sol associé aux racines, aussi appelé rhizosphère, la mycorhize et son environnement, les carpophores des champignons, les nodules fixateurs d'azote de plantes légumineuses ou bien encore des galles.

Elles appartiennent à des groupes taxonomiques variés : des protéobactéries Gram négatives (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhizobium*), des firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*) et des actinomycètes gram-positives (*Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*).

Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si des bactéries auxiliaires existent aussi dans des groupes que l'on sait difficilement cultivables (par exemple *Acidobacterium*), bien que très représentés dans les sols. La présence de bactéries auxiliaires de la mycorhization ne se restreint pas aux écosystèmes forestiers boréaux et tempérés. Dans les écosystèmes forestiers tropicaux, de telles bactéries ont également été isolées, laissant entrevoir la généralité du concept de bactéries auxiliaires de la mycorhization.

Comment venir en aide aux champignons ectomycorhiziens ?

Les bactéries auxiliaires sont susceptibles d'intervenir aux différentes étapes du cycle biologique des champignons ectomycorhiziens et du processus de mycorhization. Dans les sols, les champignons sont présents sous trois formes principales : les spores, le mycélium saprophyte présymbiotique et le mycélium symbiotique. Toutes sont des cibles potentielles pour les bactéries auxiliaires. Plusieurs hypothèses ont été proposées dans le passé pour rendre compte des mécanismes de l'effet auxiliaire (3).

Il a été montré que des bactéries sont capables de stimuler la germination des spores de champignons ectomycorhiziens (4). D'autres améliorent la survie et la croissance du mycélium présymbiotique dans le sol, lorsque les conditions lui sont défavorables, augmen-

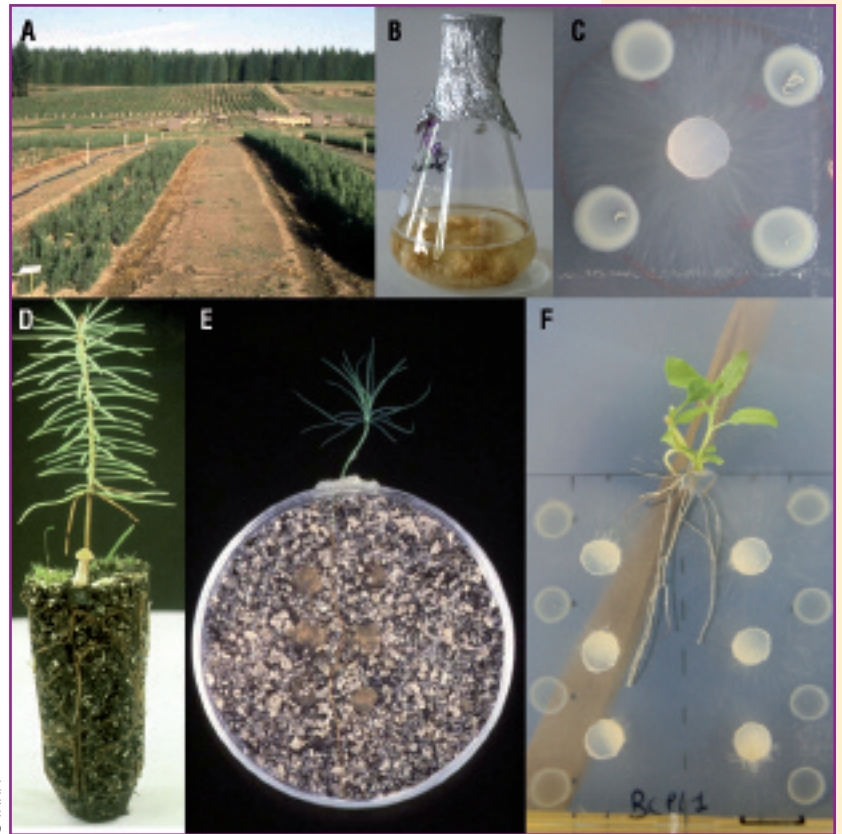


Figure 2 Modes d'expérimentation utilisés pour étudier les bactéries auxiliaires de la mycorhization

- A. Inoculation contrôlée en pépinière
- B. Co-culture bactérie-champignon en milieu liquide
- C. Co-culture bactérie-champignon en milieu solide
- D. Interaction tripartite en godet
- E. Interaction tripartite sur tourbe vermiculite en boîte de Petri
- F. Interaction tripartite en milieu gélosé

tant ainsi la probabilité que le champignon rencontre une racine d'arbre compétente et s'y associe (5). En effet, la croissance du mycélium présymbiotique dans le sol est fortement influencée par les paramètres du milieu, qu'ils soient abiotiques (pH, disponibilité en nutriments, présence de composés toxiques...) ou biotiques (compétition et antibiose avec les microflores résidentes). Les bactéries telluriques, de par le large éventail de leurs activités biologiques, peuvent également significativement modifier ces paramètres et ainsi favoriser indirectement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne.

Si certaines bactéries auxiliaires agissent sur la survie et la croissance présymbiotique des champignons ectomycorhiziens, d'autres ont un impact significatif sur les racines, augmentant par exemple leur ramification et le nombre de racines secondaires réceptives à la symbiose (6). En outre, certaines bactéries auxiliaires pourraient indirectement favoriser la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens, en induisant la synthèse de métabolites végétaux, tels que les flavonoïdes, responsables de l'attraction du mycélium vers les racines (7).

Une autre étape clé du processus de mycorhization est la reconnaissance des deux partenaires plante-champignon. Il est en effet indispensable, pour sa survie, qu'une plante fasse la différence entre un sympathique mycélium de bolet et celui d'un quelconque pathogène qui va lente-

- (2) Frey-Klett P *et al.* (2007) *New Phytol*, sous presse
- (3) Garbaye J (1994) *New Phytol* 128, 197-210
- (4) Ali AN, Jackson RM (1989) *Mycol Res* 93,182-6
- (5) Brulé C *et al.* (2001) *Soil Biol Biochem* 33, 1683-94
- (6) Poole EJ *et al.* (2001) *New Phytol* 151, 743-51
- (7) Xie ZP *et al.* (1995) *Plant Physiol* 108, 1519-25

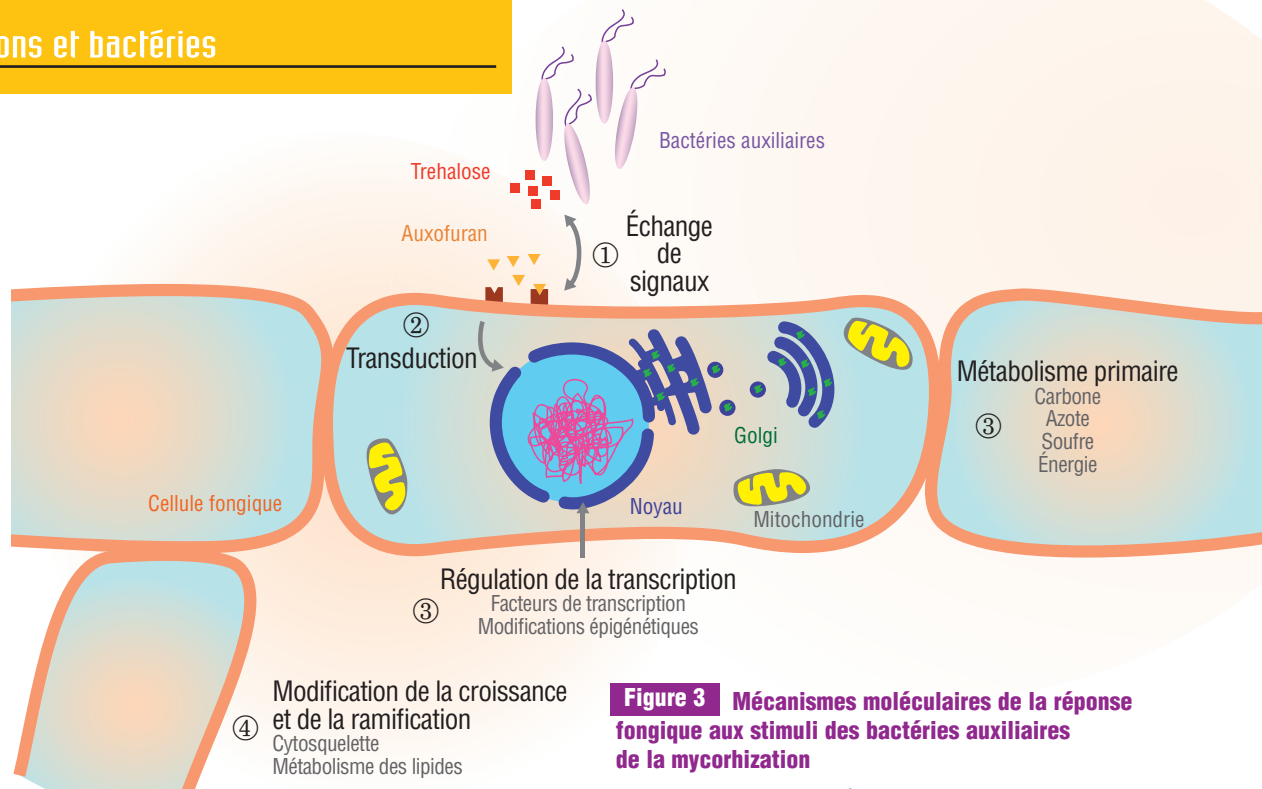


Figure 3 Mécanismes moléculaires de la réponse fongique aux stimuli des bactéries auxiliaires de la mycorhization

① Les deux partenaires échangent des signaux, tels que l'auxofuran bactérien ou le tréhalose fongique. ② Ces molécules signal sont reconnues par le champignon, activent des voies de transduction du signal et ③ induisent des modifications de la transcription de gènes fongiques, codant notamment pour des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, la régulation de la transcription, le cytosquelette ou le métabolisme lipidique. ④ Ces modifications aboutissent à l'échelle macroscopique à une modification de la croissance et de la ramification du mycélium.

ment décomposer ses racines. Pour se défendre, la racine dispose d'un arsenal de moyens que le champignon ectomycorhizien doit désamorcer et/ou contourner pour que puisse s'établir la symbiose : enceinte protectrice pectino-cellulolitique des cellules végétales, cortège de molécules enzymatiques ou oxydantes... Dans ce contexte, toute bactérie capable de produire des enzymes de dégradation des parois végétales (8) ou des métabolites inhibiteurs des réactions de défense de la plante (9) est une bactérie auxiliaire en puissance.

Après leur rencontre, leur reconnaissance et leur mariage, racines et champignons sont prêts pour une longue vie à deux, dans une demeure bâtie rien que pour eux, l'ectomycorhize. Mais sans les communautés bactériennes qui leur sont associées, les ectomycorhizes ne pourront pleinement accomplir les différentes tâches qui leur incombent. C'est ce que suggèrent des recherches récentes sur la mobilisation des nutriments dans les sols, la fixation de l'azote atmosphérique ou bien encore la protection des racines vis-à-vis des champignons phytopathogènes (2).

Les connaissances actuelles sur les mécanismes d'action des bactéries auxiliaires

Une des difficultés de l'étude des mécanismes d'action des bactéries auxiliaires tient à la complexité biologique de l'écosystème sol dans lequel elles évoluent. Des dispositifs de culture simplifiés, aux paramètres contrôlés et associant un nombre limité de partenaires, ont été développés pour modéliser le plus finement possible les effets de ces bactéries sur les champignons ectomycorhiziens (figure 2). Il a ainsi été montré que certaines bactéries auxiliaires induisent de fortes modifications de la morphologie des hyphes, semblables à celles observées dans les premières étapes de la mycorhization. Certaines stimulent aussi la croissance apicale du mycélium (10). Cet effet est d'autant plus marqué que le milieu de croissance est carencé, expliquant ainsi l'effet promoteur de croissance observé lorsque le champignon se trouve dans des conditions de sol qui lui sont défavorables (5).

À quelques exceptions près, les modifications de comportement du champignon se produisent alors même que les cellules bactériennes ne sont pas encore en contact physique avec leur partenaire. Ceci implique que des signaux soient émis par les bactéries et reconnus par les champignons. Peu de ces signaux ont jusqu'à présent été isolés mais les études préliminaires laissent à penser qu'ils sont de nature variable : certains sont volatils tandis que d'autres sont solubles. Le mieux caractérisé à l'heure actuelle est l'auxofuran, une molécule structurellement proche de l'auxine et produite par une souche bactérienne de *Streptomyces* sp. (11). L'ajout de cette molécule à une culture mycélienne d'amanite tue-mouche (*Amanita muscaria*) permet de provoquer chez le champignon des modifications morphologiques identiques à celles occasionnées par la présence de la bactérie. Il s'agit d'un véritable dialogue entre les deux partenaires puisqu'en retour, le champignon multiplie par quatre la production d'auxofuran chez la bactérie.

D'autres métabolites secondaires ne jouent pas uniquement un rôle de signal. C'est le cas du tréhalose, un disaccharide accumulé par de nombreux champignons ectomycorhiziens et préférentiellement consommé par les bactéries de la mycorhizosphère de champignons accumulateurs. Il a été montré qu'un souche bactérienne de *Pseudomonas fluorescens* auxiliaire perçoit à distance la présence de ce sucre puis se déplace jusqu'à lui grâce à son flagelle et s'en nourrit. Les événements qui s'en suivent et qui sont à l'origine de l'effet auxiliaire restent mystérieux mais il a été démontré que la présence de tréhalose accroît l'effet promoteur de croissance du mycélium dans le cas d'une souche de *Pseudomonas monteilii*, elle aussi auxiliaire (12).

(8) Mosse B (1962) *J Gen Microbiol* 27, 509-20
 (9) Lehr NA *et al.* (2007) *New Phytol* 174, 892-903
 (10) Deveau A *et al.* (2007) *New Phytol* 157, 743-55
 (11) Riedlinger J *et al.* (2006) *Appl Environ Microbiol* 72, 3550-7
 (12) Duponnois R, Kisa M (2006) *Can J Bot* 84, 1005-8

La régulation transcriptionnelle, une étape clé de l'interaction

Les modifications de la croissance et de la morphologie des hyphes induites par les bactéries auxiliaires, nécessitent des réarrangements du cytosquelette, le convoyage de métabolites utilisés pour la synthèse de nouvelles parois... Ces modifications sont mises en place suite à la perception de signaux, eux-mêmes transmis *via* des cascades de signalisation cellulaire. Comme nous venons de le voir, l'analyse de ces signaux, loin d'être connue dans le cas des interactions champignons ectomycorhiziens-bactéries auxiliaires, mériterait d'être approfondie. Une autre étape clé de la régulation des processus cellulaires est la transcription : l'expression de chacun des milliers de gènes d'une cellule est précisément contrôlée et modulée en fonction des besoins cellulaires et de l'environnement biotique et abiotique des cellules.

Divers outils permettent à l'heure actuelle de suivre la transcription de milliers voire de l'ensemble des gènes d'un organisme (PCR quantitative, puces à ADN, hybridation soustractive...), et donc d'identifier les gènes dont la transcription est modifiée en réponse à un signal. Ces technologies ont été utilisées chez deux champignons ectomycorhiziens cultivés en présence de bactéries auxiliaires. Qu'il y ait contact physique ou non avec les bactéries auxiliaires, il a été montré que la transcription de gènes impliqués dans de multiples fonctions cellulaires est affectée par la présence de bactéries auxiliaires : synthèse lipidique et protéique, cytosquelette, voies de transduction du signal, régulation épigénétique, transport de métabolites... (figure 3). Ces études transcriptomiques sont une première étape permettant d'identifier des gènes candidats impliqués dans la synthèse de molécules fongiques en réponse à la présence de bactéries auxiliaires. Il reste maintenant à démontrer leur rôle réel via leur inactivation par mutagenèse ou interférence à ARN. Ces technologies sont encore difficiles à mettre en œuvre chez certains champignons ectomycorhiziens mais devraient être disponibles d'ici quelques années.

Pour une analyse croisée des modèles d'interaction bactéries-champignons

Vingt ans après la découverte de l'existence des bactéries auxiliaires de la mycorhization, leurs mécanismes d'action commencent peu à peu à se dévoiler. Leur multiplicité s'explique peut-être par la diversité des espèces bactériennes et fongiques en jeu. Il est à noter que des mécanismes similaires ont été décrits dans des systèmes d'interactions bactéries-champignons très éloignés de la symbiose mycorhizienne. C'est par exemple le cas des interactions entre la levure pathogène de l'homme *Candida albicans* et la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*, qui modifie la morphologie et la croissance de la levure au détriment de la santé humaine. Les microorganismes qui affectent notre santé, peuplent nos fromages ou bonifient nos vins prolifèrent naturellement dans un même environnement, le sol, où ils interagissent depuis des millions d'années. Il n'est donc pas si surprenant de retrouver des similitudes dans les mécanismes d'interactions entre ces différents modèles d'étude. Une comparaison approfondie de ces modèles serait des plus profitables pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans chaque interaction. ●