

Les forêts tempérées couvrent 31 % du territoire métropolitain français et ont un rôle écologique, économique et sociétal important. Il est maintenant clairement démontré que les racines des arbres sont massivement colonisées par des communautés complexes et très dynamiques de micro-organismes provenant du sol environnant. Certains micro-organismes peuvent avoir un rôle bénéfique pour l'arbre en contribuant fortement à la nutrition et à la santé de leur hôte tandis que d'autres peuvent être des pathogènes et donc être néfastes pour l'hôte. L'ensemble de ces micro-organismes constitue le microbiote racinaire de l'arbre.

L'arbre hôte et son microbiote forment une seule entité appelée « holobionte » (du grec *holos*, « tout », et *bios*, « vie »). Ce méta-organisme est en interaction permanente avec les autres arbres, les plantes des sous-bois, les champignons, les bactéries et d'autres micro-organismes au sein de l'écosystème complexe que forme la forêt.

## I. La rhizosphère, l'endosphère et leurs microbiotes

### 1. Définition et caractéristiques

La rhizosphère a été définie pour la première fois par Hiltner en 1904 comme étant le volume de sol directement sous l'influence des racines d'une plante (Hiltner, 1904 ; Hartmann et al., 2008). La racine peut être divisée en deux sous-compartiments distincts : le rhizoplan qui correspond à la surface externe et l'endosphère définit comme l'ensemble des tissus internes de la racine (**Figure 1**). Ce sont des zones très favorables à la prolifération et à l'activité de nombreux micro-organismes tels que les bactéries, champignons, archées, oomycètes, virus, protistes, algues et nématodes (Mendes et al., 2013).

L'« effet rhizosphère » est dû à la libération d'exsudats racinaires dans le sol, sous forme d'une multitude de composés tels que des acides organiques, des sucres, des acides aminés, des protéines, des acides gras, des composés de défense tels que les flavonoïdes et des facteurs de croissance telles que les hormones (Badri & Vivanco, 2009 ; Turner et al., 2013). On trouve également dans cette zone une accumulation de cellules végétales mortes et de mucilage participant à la nutrition des micro-organismes (Phillipot et al., 2013 ; **Figure 2**). La présence de ces molécules en fait donc une zone riche en composés carbonés et donc potentiellement de nutriments, augmentant ainsi la densité microbienne de l'ordre de 10 à 1000 fois par rapport au sol non en contact avec les racines (Ricon-florez et al., 2015). La colonisation de la rhizosphère par diverses communautés de micro-organismes (**Figure 1**) permet la mise en place d'importantes fonctions de défense contre des pathogènes et d'apports de nutriments bénéfiques à la plante-hôte (Adam et al., 2016).

L'émergence de racines latérales peut être à l'origine de l'apparition de disjonctions cellulaires à la surface de la racine principale formant alors des points d'entrée pour les micro-organismes de la rhizosphère vers l'intérieur de la racine. Les études de la composition microbienne de la rhizosphère, du rhizoplan et de l'endosphère de plusieurs espèces végétales indiquent que ces différents habitats écologiques contiennent des micro-organismes du sol avec des structures phylogénétiques distinctes (Bulgarelli et al., 2012 ; Lundberg et al., 2012).

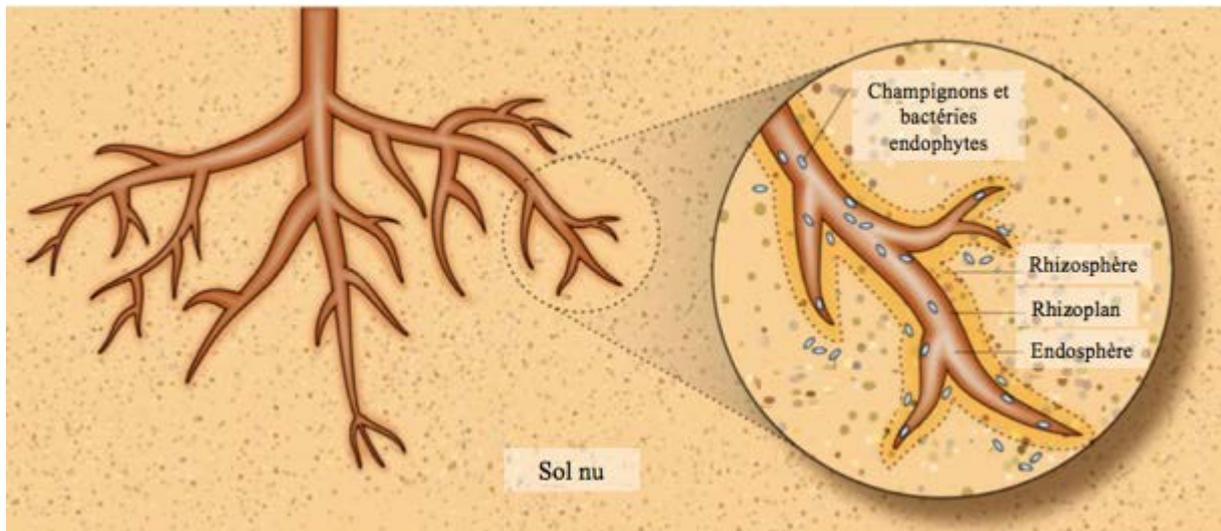


Figure 1 – Les différentes niches à l'interface racine-sol (d'après Mendes et al., 2013).  
Différentes parties existent au sein d'une racine : l'endosphère correspond à la partie interne des racines des plantes et abritent champignons et bactéries endophytes tandis que le rhizoplan correspond à la surface externe des racines des plantes.

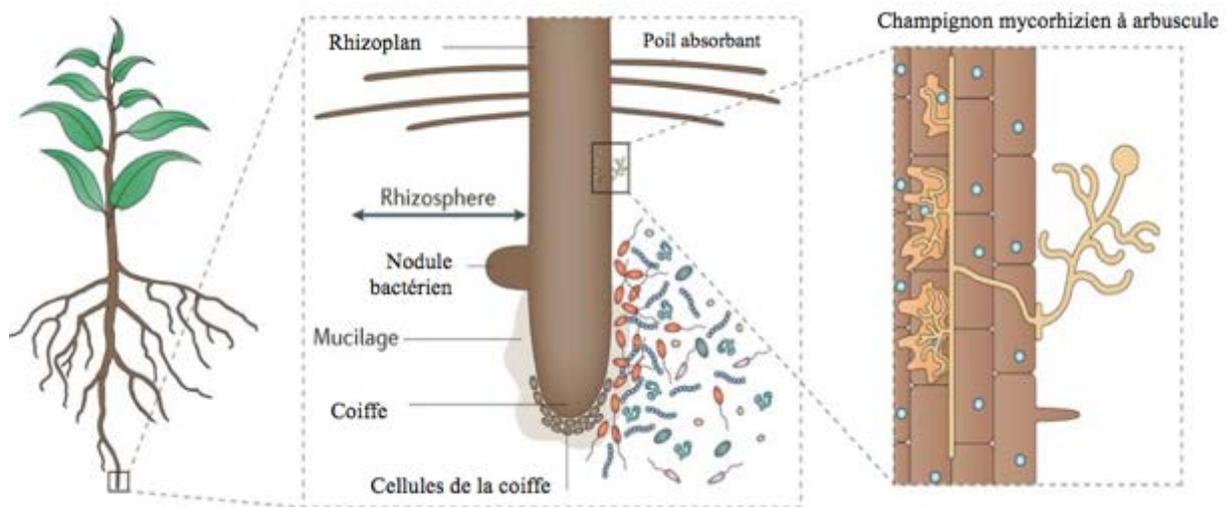


Figure 2 - La rhizosphère et les micro-organismes associés (Phillippot et al., 2013).

### 2. Des niches spécifiques

L'enrichissement des communautés de micro-organismes spécifiques de la rhizosphère et de l'endosphère a été décrit pour diverses plantes dont la plante herbacée modèle, *Arabidopsis thaliana* (Sperber & Rovira, 1959 ; Newman, 1985 ; Sørensen, 1997 ; Selosse et Le Tacon, 1998 ; Germida et al., 1998 ; Grayston et al., 1998 ; Bulgarelli et al., 2013 ; Lundberg et al., 2012).

L'ensemble des communautés rhizosphériques correspond à un assemblage de micro-organismes issus du sol adaptés aux conditions physico-chimiques associées à la rhizosphère et capables de consommer des métabolites produits par la plante via l'exsudation racinaire (Bulgarelli et al., 2013 ; Lundberg et al., 2012). Concernant les communautés endosphériques, il s'agit de l'ensemble des micro-organismes sous le contrôle de la plante hôte (Bulgarelli et al., 2012).

La composition et la structure du microbiote des plantes sont régulées par différents facteurs biotiques et abiotiques. Par exemple, le type de sol est un facteur déterminant dans le contrôle de la biomasse et de l'activité microbienne (Cao et al., 2016 ; Li et al., 2018). L'affinité de la plante ainsi que les interactions entre les micro-organismes ont également un impact majeur dans l'établissement du microbiote racinaire (Lou et al., 2014 ; Hassani et al., 2018).

Les récentes avancées technologiques en matière de séquençage nous permettent désormais d'étudier en profondeur la diversité microbienne et fongique associée aux plantes et au sol ainsi que de connaître l'influence de l'espèce hôte et de l'origine du sol sur les associations fongiques et bactériennes en interaction avec les racines (Bonito et al., 2014).

### 3. Régulation du microbiote racinaire : les facteurs biotiques

En écologie, les facteurs biotiques correspondent à l'ensemble des interactions du vivant sur le vivant dans un écosystème. Le génotype ou l'espèce de la plante hôte (appelé « effet hôte ») ont un rôle important dans la structuration et la composition taxonomique et fonctionnelle des communautés de micro-organismes de la rhizosphère et de l'endosphère. Plus précisément, il a été mis en évidence que les traits phénotypiques, la quantité et la qualité des exsudats racinaires ainsi que les systèmes de défense et de protection des plantes sont des facteurs clés de régulation du microbiote racinaire (Hu et al., 2018 ; Haichar et al., 2008 ; Doornbos et al., 2012 ; Turner et al., 2013).

#### 3. A. Les exsudats racinaires et les métabolites

Les plantes sont des organismes autotrophes c'est-à-dire des organismes vivants qui n'ont pas besoin d'une source de carbone organique pour se développer. Elles ont la capacité de fabriquer leur propre carbone grâce à la photosynthèse. La photosynthèse est l'ensemble des réactions permettant aux végétaux (algues et plantes) mais également à certaines bactéries de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisable pour la

synthèse de la matière organique. Durant ce processus, les glucides ( $C_6H_{12}O_6$ ) sont obtenus suite à l'assimilation du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) grâce à l'ensemble des réactions produisant le pouvoir réducteur (NADPH) et une source d'énergie (ATP) issue de la photolyse de l'eau couplée à un dégagement d'oxygène (Ziska & Brunce, 2006). Ces éléments (lumière,  $CO_2$ , eau et nutriments) sont indispensables à la croissance des plantes. Les échanges gazeux sont assurés par des organes particuliers situés sur la face supérieure des feuilles : les stomates. Ces derniers régulent leur ouverture et fermeture en fonction de la température, de la concentration en  $CO_2$ , du taux d'humidité et de la lumière qui joue également un rôle déterminant dans la croissance végétale et la réalisation de la photosynthèse.

La production primaire de sucre issu de la photosynthèse est le fructose-6-phosphate transformé par la suite en saccharose pour le transport et en amidon pour le stockage (Heller et al., 1993). Une partie de ces réserves sera utilisée pour la production de molécules plus complexes du métabolisme primaire (acides aminés, lipides, acides organiques...) et de composés associés à la formation des parois cellulaires (cellulose, lignines...) permettant à la plante de constituer sa biomasse aérienne et racinaire. Une autre fraction de ces sucres de réserve sera stockée dans les parties racinaires (Heller et al., 1993). On estime que 5 à 21 % du carbone assimilé par la photosynthèse n'est pas directement utilisé par la plante mais est acheminé dans les racines pour être directement libéré dans le sol, au niveau de la rhizosphère et, donc, transféré aux micro-organismes associés sous forme de sucres solubles, acides aminés ou de métabolites secondaires (Badri & Vivanco, 2009 ; Badri et al., 2013 ; Chaparro et al., 2012).

Les exsudats racinaires des plantes peuvent être divisés en deux classes : les composés de faible poids moléculaire comme les acides aminés, les acides organiques, les sucres, les composés phénoliques et les métabolites secondaires et les composés de haut poids moléculaire tels que les polysaccharides et les protéines (Bais et al., 2006 ; Badri & Vivanco, 2009). Les plantes sont capables de modifier la composition et la structure du microbiote du sol en contact avec les racines en sécrétant des molécules actives dans la rhizosphère. Le stade de croissance et de développement de la plante a un impact sur la quantité et la nature des composés carbonés libérés par la plante (Badri & Vivanco, 2009). La quantité et la qualité en termes de composition des exsudats racinaires dépend également de l'espèce végétale (Uren, 2000 ; Badri & Vivanco, 2009) qui influence la composition et la structure des communautés de micro-organismes du sol suggérant un certain degré de spécificité pour chaque espèce végétale. De plus, certains exsudats racinaires (e.g. acides organiques) sont également susceptibles de modifier le pH et les gradients redox influençant ainsi la composition et la structure des communautés microbiennes (Schmidt et al., 2011).

Les éléments sécrétés par les racines de la plante sont à l'origine de diverses interactions plantes-micro-organismes. Ces interactions peuvent être neutres, bénéfiques ou délétères pour les partenaires. L'ensemble de ces micro-organismes consomme différents types de composés sécrétés par les racines. Ils consomment très rapidement les métabolites primaires ce qui rend pratiquement impossible la collecte d'exsudats racinaires purs dans le sol (Oburger & Jones, 2018). Ces micro-organismes peuvent également affecter le processus

d'exsudation. Dans la rhizosphère des plantes herbacées comme la luzerne ou le blé, certains micro-organismes libèrent des composés secondaires qui stimulent l'exsudation d'acides aminés par les racines (Phillipps et al., 2004) alors que d'autres sont capables de modifier le métabolisme de la plante entière (Fernandez et al., 2012). Bien que beaucoup de recherches concernant l'impact des exsudats racinaires sur les communautés de micro-organismes du sol ont été menées sur les plantes de grandes cultures, relativement peu de travaux ont été menés dans la rhizosphère des arbres (Uroz et al 2016). L'allocation du carbone étant très différente entre les plantes annuelles et les plantes à long cycle de vie comme les arbres, les processus de régulation des composés exsudés via les racines devraient être différents. Chez le tremble, la concentration en composés carbonés non structuraux c'est-à-dire le carbone stocké dans les parties pérennes de l'arbre influence les taux d'exsudation du carbone organique et ainsi les communautés de micro-organismes de la rhizosphère (Karst et al., 2017). Les plantes utilisent les composés sécrétés dans le sol pour attirer les communautés de micro-organismes bénéfiques mais également pour se défendre contre les micro-organismes pathogènes grâce à la production des métabolites secondaires comme les phytohormones de défense.

### **3. B. Le système immunitaire des plantes**

Les plantes possèdent des barrières naturelles physiques et chimiques préformées dont l'une des fonctions principales est d'empêcher la pénétration de tissus par des micro-organismes pathogènes. Il s'agit de la cuticule et l'épiderme. Le pathogène doit adhérer sur ces barrières et les rompre pour pouvoir pénétrer à l'intérieur des tissus de la plante. En plus de ces barrières, la plante est capable de produire des molécules toxiques pour les micro-organismes pathogènes tels que des métabolites secondaires (acides phénoliques, flavonoïdes, hormones de défense). Les phytohormones comme l'éthylène, l'acide salicylique et l'acide jasmonique sont généralement impliquées dans la régulation de la résistance des plantes faces aux pathogènes et aux insectes ravageurs (Pusztahelyi et al., 2015). Enfin, le microbiote commensal des plantes défini comme l'ensemble des micro-organismes résidant à la fois dans la rhizosphère et sur la plante et ayant une relation mutualiste avec cette dernière constitue également une barrière. Le mécanisme le plus important de ces micro-organismes qui ne nuisent pas à la plante, lorsqu'elle est en bonne santé, est l'effet de compétition qui empêche l'établissement de micro-organismes pathogènes (Berendsen et al., 2012).

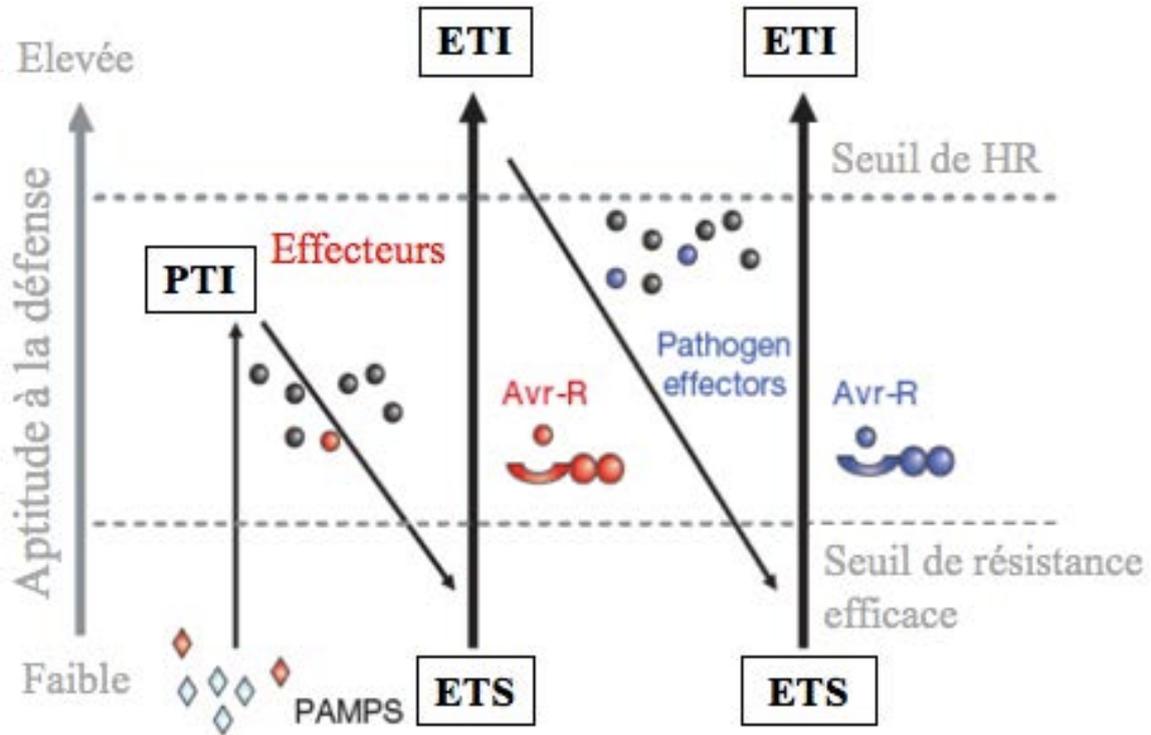


Figure 3 – Représentation schématique de l'immunité déclenchée par les Patrons Moléculaires Associés aux Micro-organismes (MAMPS, MTI, d'après Jones & Dangl, 2006). Durant la première phase, le système immunitaire des plantes détecte les PAMP microbiens grâce aux récepteurs PRR qui mettent en place la résistance basale (PTI, PAMP-Triggered Immunity). Durant la seconde phase, les agents pathogènes libèrent des effecteurs pour contrer la résistance basale et permettre l'installation du pathogène (ETS, Effector-Triggered Susceptibility). Durant la troisième phase, un des effecteurs (en rouge) est reconnu par la protéine R qui déclenche la résistance spécifique (ETI, Effector-Triggered Immunity). Enfin, durant la dernière phase, les agents pathogènes ayant perdu l'effecteur rouge et éventuellement gagné d'autres effecteurs (en bleu) sont sélectionnés. Chez la plante, la sélection va favoriser de nouveaux allèles de gènes R, capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, résultant en une résistance spécifique (d'après Jones & Dangl, 2006).

L'ensemble de ces barrières est efficace contre l'invasion de micro-organismes pathogènes mais une partie de ces derniers est capable de contrer cette première ligne de défense et d'initier la colonisation de la plante hôte. Les plantes peuvent alors répondre via des mécanismes de défense induits. Elles possèdent des systèmes de surveillance et de détections leur permettant de reconnaître des molécules de surface des micro-organismes qu'ils soient bénéfiques ou, au contraire, pathogènes. Ces molécules de défense constituent les « Patrons Moléculaires Associés aux Micro-organismes » (Microbes-Associated Molecular Patterns, acronyme de MAMPs en anglais, Newman et al., 2013). Ces MAMPs correspondent majoritairement à la flagelline, aux liposaccharides ou encore à la chitine des champignons ou aux glucanes des oomycètes et sont reconnus par la plante via des récepteurs de reconnaissances des MAMPs (Pattern Recognition Receptor ou PRR en anglais). Cette première étape intervenant dans les stades précoces de l'infection est appelée « immunité induite par les MAMPS » (MAMP Triggered Immunity, MTI). En 2006, les chercheurs Jones et Dangl ont proposé à la communauté scientifique un modèle général des mécanismes moléculaires impliqués dans l'immunité chez les plantes (Jones et Dangl, 2006, **Figure 3**).

Ce modèle appelé « zig-zag » est constitué de plusieurs étapes consécutives et intègre un aspect de coévolution entre la plante hôte et les micro-organismes. Il se divise en deux niveaux de reconnaissance. Le premier niveau correspond à la reconnaissance des MAMPs qui permet le déclenchement de la MTI. Le deuxième niveau correspond à la reconnaissance de protéines microbiennes appelées « effecteurs » qui jouent le rôle de suppresseurs de la MTI. Ce niveau d'immunité est appelé « Immunité médiée par la détection d'effecteur (Effector-triggered immunity ou ETI en anglais, Jones et Dangl, 2006, **Figure 3**). Enfin, le modèle intègre la notion de coévolution entre les deux protagonistes de l'interaction avec la phase ETS. A cette étape, un nouvel effecteur est sécrété par le micro-organisme et s'en suit une nouvelle phase ETI dans le cas où ce nouvel effecteur est reconnu par une protéine de résistance de la plante hôte.

Les micro-organismes commensaux sont également pourvus de flagelline ou de chitine pouvant être reconnues par la plante hôte. Plusieurs études illustrent comment ce type de micro-organismes a évolué pour échapper directement à la reconnaissance des récepteurs PRR de la plante hôte par la modification ou l'inhibition des MAMPs ou encore, par l'altération de leur paroi cellulaire (Félix et al., 1999 ; Wawra et al., 2016 ; Hacquard et al., 2017). Ces découvertes suggèrent alors un rôle de gestion plus complexe de la colonisation microbienne par le système immunitaire de la plante capable de contrôler l'accommodation des micro-organismes commensaux ou bénéfiques et l'élimination des pathogènes.

### 3. C. La régulation hormonale des défenses chez les plantes

Les phytohormones correspondent à des molécules endogènes qui régulent des processus essentiels tels que la croissance, le développement et la défense des plantes face aux stress biotiques et abiotiques. Certaines sont également synthétisées lors de la réponse immunitaire de la plante (Pieterse et al., 2009) lors d'interactions de la

plante avec des agents pathogènes. Il s'agit principalement de l'éthylène (ET), l'acide salicylique (AS) et l'acide jasmonique (AJ).

Bien que les voies de biosynthèse et de signalisation ainsi que le rôle de chacune de ces trois phytohormones dans la mise en place des réactions de défense de la plante soient très étudiées, les connections existant entre ces différentes voies de signalisation forment un réseau très complexe dont la compréhension reste à améliorer.

### *La voie de signalisation de l'acide jasmonique*

L'acide jasmonique est un composé hormonal dérivant de l'acide  $\alpha$ -linoléique. Il existe de nombreux dérivés actifs de l'AJ nommés jasmonates. Parmi ces derniers, l'AJ-Isoleucine (AJ-Ile) joue le rôle de régulateur central chez les plantes. Sa synthèse et son accumulation interviennent en réponse à des signaux développementaux et environnementaux. L'AJ-Ile joue un rôle important durant leur réponse immunitaire face aux attaques de pathogènes nécrotrophes et d'insectes herbivores (Turner et al., 2002).

La voie de signalisation de l'AJ est activée grâce à sa conjugaison avec l'isoleucine qui permet la production de la forme active de l'hormone, l'AJ-Ile. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'AJ-Ile est perçu par COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) qui forme un complexe avec des protéines de la famille JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN-CONTAINING). Ces dernières sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'AJ dont la dégradation entraîne l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la défense de la plante (Chini et al., 2007 ; Thines et al., 2007 ; Pauwels & Goossens, 2011). En l'absence de l'AJ, les répresseurs JAZ interagissent avec les protéines MYC. L'activation de la branche MYC lors de l'élimination de JAZ entraîne l'expression d'un grand nombre de gènes sensible à l'AJ (Li et al., 2019 ; **Figure 4**).

Des travaux réalisés sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ont permis de démontrer que l'activation de la voie de signalisation de l'AJ influence la composition des communautés bactériennes de la rhizosphère (Carvalhais et al., 2015 ; Doornbos et al., 2011). Il a été démontré que la mutation du facteur de transcription myc2 impliqué dans la voie de signalisation de l'hormone est responsable de l'altération de la composition des exsudats racinaires notamment en termes de production d'acides aminés entraînant alors des changements de la composition des communautés bactériennes associées aux racines. Plus précisément, la mutation a entraîné un changement de l'abondance relative de certains taxons bactériens connus pour être abondants dans la rhizosphère comme *Streptomyces* et *Bacillus* (Carvalhais et al., 2015). De plus, la mutation du gène jar1 impliqué dans la voie de biosynthèse de l'AJ est responsable de la diminution de la densité des communautés bactériennes telles que *Pseudomonas* dans la rhizosphère (Doornbos et al., 2011). Chez le blé (*Triticum aestivum*), il a été démontré que l'activation de la voie de signalisation de l'AJ entraîne une diminution de la diversité des communautés bactériennes de l'endosphère mais également des changements dans leur composition (Liu et al., 2017).

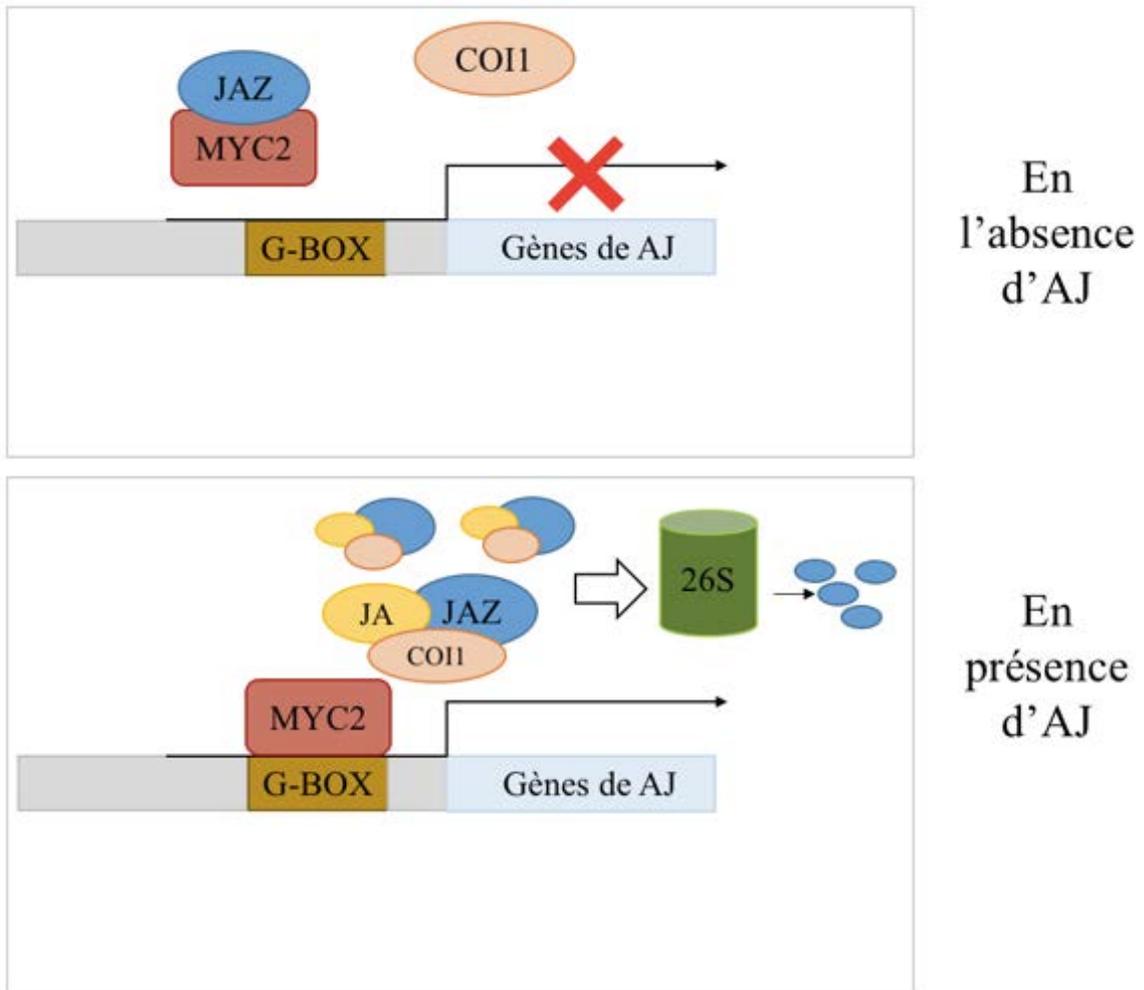


Figure 4 – Représentation schématique de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes de défense induits par l'acide jasmonique.

Par contre, l'AJ ne semble avoir aucun impact sur la structuration des communautés de bactéries et d'archées au niveau de l'interface sol-racines (le rhizoplan) chez le blé (Liu et al., 2017). Cependant, certaines communautés endophytes connues pour supprimer les phytopathogènes bactériens, fongiques et viraux deviendraient plus abondantes en réponse à l'AJ (Liu et al., 2017).

### *La voie de signalisation de l'acide salicylique*

L'acide salicylique (AS) est un petit composé phénolique intervenant durant les réponses immunitaires de la plante (Seyfferth, Tsuda, 2014). L'induction de l'expression des gènes de défense liée à la production d'AS est complexe mais il semble évident que le régulateur protéique NPR1 (Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes 1) y joue un rôle clé. Les plants mutants *npr1* d'*Arabidopsis thaliana*, ne sont plus capables de percevoir l'AS et sont donc plus sensibles à l'attaque de pathogènes biotrophes que les plants non transformés (Cao et al., 1997).

Un modèle existe à l'heure actuelle concernant l'activation de la voie de signalisation de l'AS dans les cellules végétales (Li et al., 2019). En cas d'attaque de pathogènes, la biosynthèse de l'AS augmente considérablement dans les plastides via la voie de ICS/PAL (Isochorismate Synthase/Phénylalanine Ammonia Lyase). L'enzyme SA methyl transferase (ou SAMT) catalise la conversion de l'AS en methyl-AS (MeSA) qui se diffuse dans le cytoplasme où il est converti à nouveau en AS grâce à l'activité de SABP2. L'augmentation de la concentration en AS dans le cytoplasme est alors responsable du passage de NPR1 de la forme oligomère à monomère et de sa migration vers le noyau. Dans ce dernier, le monomère de NPR1 active la transcription des gènes de défense induit par l'AS tels que les gènes PR (pour Pathogenesis Related, Durant & Dong, 2004 ; Pieterse & Van Loon, 2004) en interagissant avec les facteurs de transcription de la famille TGA (TGACG motif-binding factor) (Figure 5). Ces facteurs TGA activés se lient au promoteur de certains gènes codant les protéines PR et induisent leur transcription (Durrant & Dong, 2004). Durant son interaction avec les facteurs de transcription, NPR1 est phosphorylé puis dégradé par le protéasome.

Cette phytohormone peut avoir un effet positif ou négatif sur les micro-organismes du sol en interaction avec les racines. Il peut promouvoir la croissance de certains groupes de bactéries ou au contraire l'inhiber chez *A. thaliana* (Lebeis et al., 2015). En effet, le microbiote racinaire des plantes altérées dans la voie de signalisation de l'AS présente des différences dans l'abondance relative de groupes bactériens spécifiques par rapport au microbiote des plantes non transformées génétiquement. L'altération de la voie de signalisation de l'AS inhiberait la colonisation racinaire par les Firmicutes et, au contraire, améliorerait la colonisation par les Protéobactéries. Ces deux phyla appartiennent notamment au microbiome central bactérien (« core microbiome » en anglais). Chez *A. thaliana*, la mutation du gène *cpr1* impliqué dans la voie de signalisation de l'AS se traduit par un niveau élevé d'AS entraînant ainsi l'expression constitutive des voies de défense dépendantes de l'AS. Une diminution du nombre total de bactéries et particulièrement des bactéries *Pseudomonas* a été observée sur les racines de ces mutants (Doornbos et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'AS est un facteur clé de la régulation du microbiote racinaire (Lebeis et al., 2015).

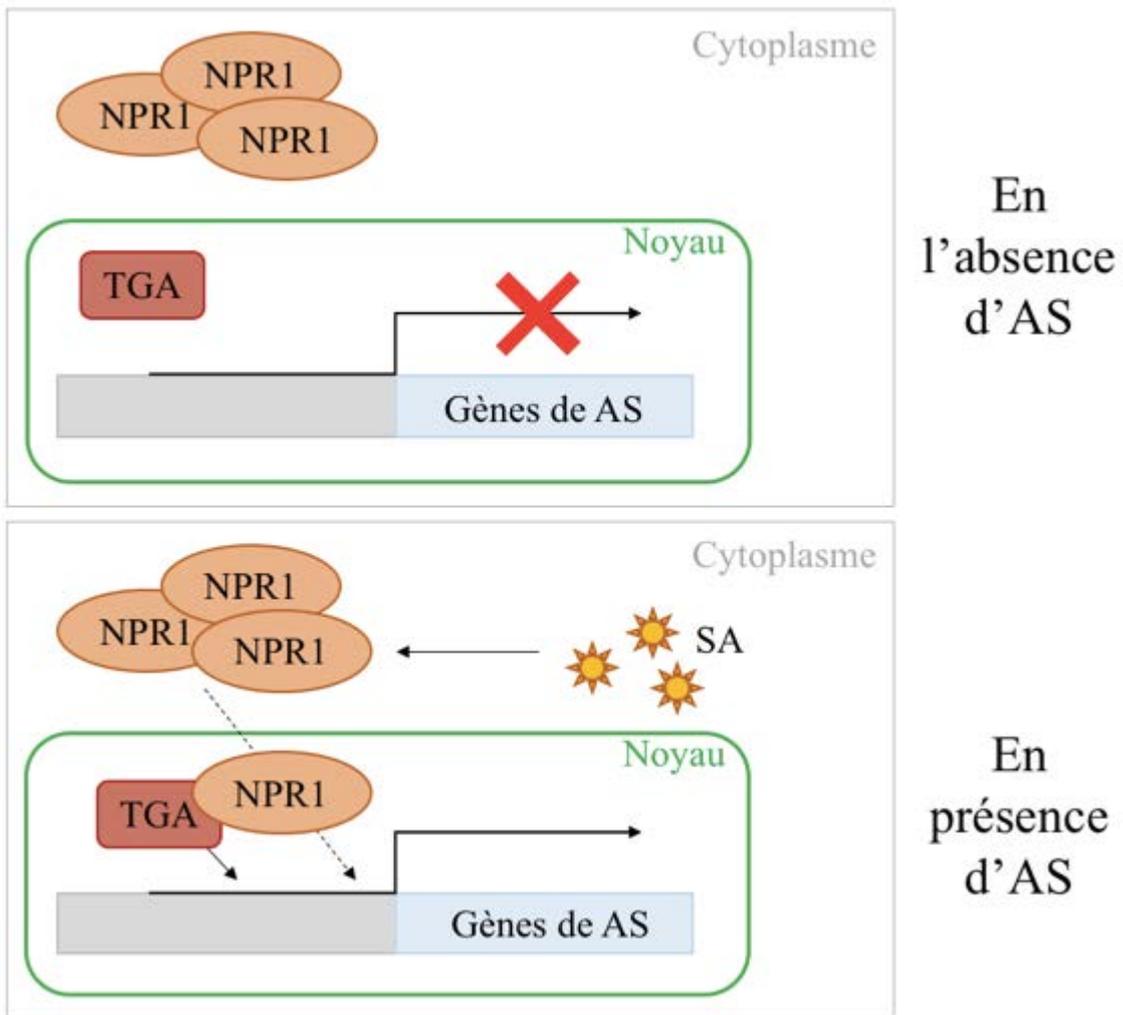


Figure 5 - Représentation schématique de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes de défense induits par l'acide salicylique.

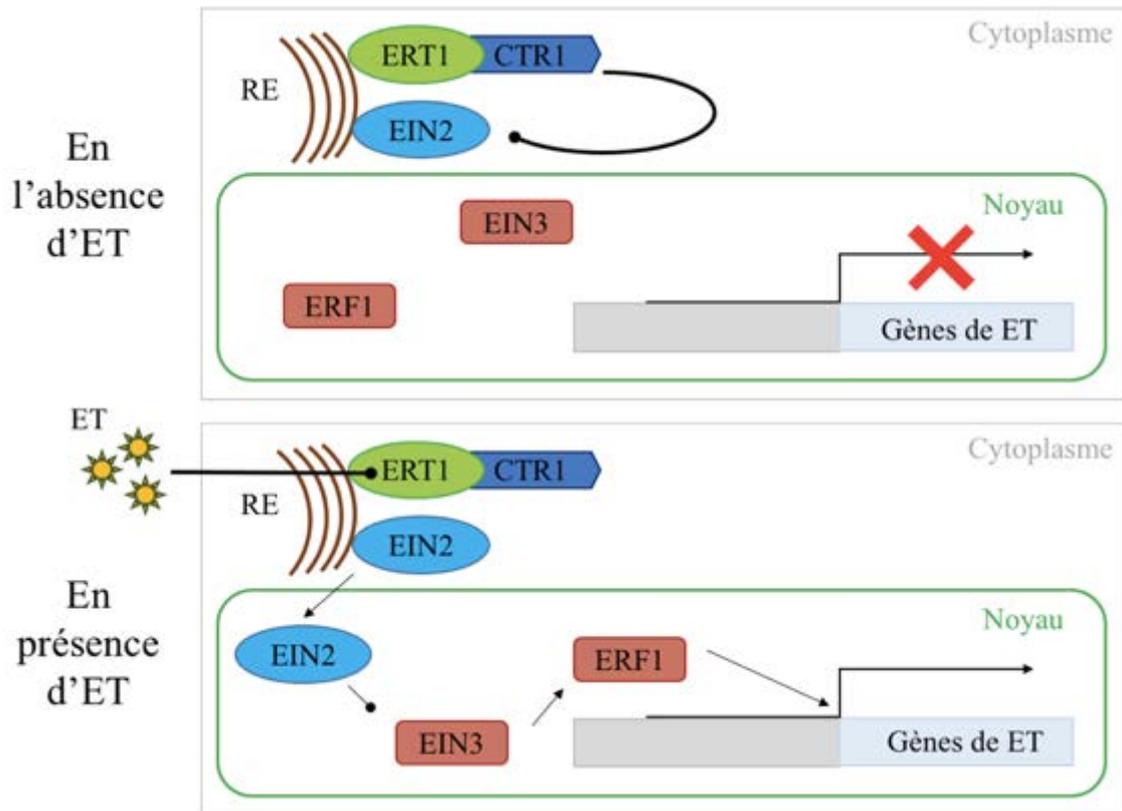


Figure 6 - Représentation schématique de la cascade de régulation conduisant à l'expression des gènes de défense induits par l'éthylène.

### La voie de signalisation de l'éthylène

L'ET est un métabolite volatil essentiel à la croissance et au développement des plantes. Il est synthétisé de façon endogène par la quasi-totalité des plantes mais également lors de stress biotiques et abiotiques. L'ET est perçu par des récepteurs membranaires tels que ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1), ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1), ETR2 (ETHYLENE RESPONSE 2), ERS2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2) et EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4 ; Hua et al., 1995 ; Ecker, 1995 ; Bleecker et al., 1988). Ces récepteurs correspondent à des régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'ET (**Figure 6**). Lorsque le niveau d'ET est faible, ils maintiennent la régulation négative d'une sérine à kinase CTR1 (Constitutive Triple Response 1) sur un régulateur positif localisé dans le réticulum endoplasmique EIN2 (ETHYLENE INTENSIVE 2) (Ju & Chang, 2015 ; Lee & Yoon, 2017 ; Bisson et al., 2009).

En absence d'ET, CTR1 interagit avec EIN2 (Clark et al., 1998). Suite à la perception d'ET, la répression de CTR1 sur EIN2 est levée entraînant alors l'activation des facteurs de transcription comme EIN3 (Chao et al., 1997 ; Ju & Chang, 2015). La présence d'ET et plus précisément EIN2 est à l'origine de l'inhibition de la dégradation des facteurs de transcription EIN3 par le protéasome. Ces facteurs de transcription activent ensuite d'autres facteurs de transcription tels que ERF1 conduisant ainsi à l'expression de gènes inducibles par l'ET (**Figure 6**).

En condition de salinité élevée, sécheresse, pollution aux métaux lourds ou encore contact avec des phytopathogènes, le niveau endogène d'ET augmente significativement chez les plantes et a un effet négatif sur la croissance (Ahemad, Kibret, 2014).

Les conséquences de l'augmentation de l'ET sur les plantes pourraient être évitées grâce à l'utilisation de rhizobactéries à activité 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase qui dégrade l'ET. En effet, ces bactéries seraient à l'origine de la réduction des stress abiotiques en contrebalançant l'ET produit par la plante responsable de l'inhibition de la division cellulaire, de la synthèse d'ADN et de la croissance (Gaiero et al., 2013 ; Ahemad, Kibret, 2014).

L'ET et l'ACC jouent un rôle important dans les interactions entre la plante hôte et les communautés bactériennes ayant colonisé l'intérieur des racines (Nascimento et al., 2018). Par exemple, il a été démontré par Iniguez et al., (2005) que l'ET inhibe la colonisation racinaire des bactéries endophytes fixatrices d'azote du genre *Klebsiella*. Dans le cas contraire c'est-à-dire en ajoutant au milieu de culture un inhibiteur de la voie de perception de l'ET (1-méthylcyclopropane), la colonisation racinaire de *Klebsiella* augmente. Une autre étude portant sur l'effet de l'hormone sur la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* a mis en évidence que l'expression des gènes de virulence de la bactérie est négativement affectée par l'ajout d'ET exogène entraînant ainsi la diminution de l'efficacité de prolifération de la bactérie et donc une réduction de sa pathogénicité (Nonaka et al., 2008).

A l'échelle du microbiote, il a été démontré que la mutation du gène *ein2*, au centre de la régulation de la voie de signalisation de l'ET, chez *A. thaliana* entraînait une diminution de la densité des populations bactériennes de la

rhizosphère telles que *Pseudomonas* par rapport aux plantes non modifiées génétiquement (Doornbos et al., 2011).

Aucune étude n'est aujourd'hui publiée concernant l'impact de l'ensemble de ces trois voies de signalisation sur le microbiote racinaire des plantes. L'ensemble des travaux de recherche évoqués dans cette partie de l'introduction ont été réalisés à partir de mutations génétiques affectant les voies de signalisation hormonale. Les hormones de défense étant toutes impliquées également dans la croissance et le développement de la plante, il semble être complexe de créer une plante mutante déficiente dans les trois voies de signalisation ou de synthèse de l'AJ, l'AS et l'ET.

### 4. Régulation du microbiote racinaire : les facteurs abiotiques

En écologie, les facteurs abiotiques correspondent à l'ensemble des actions du non-vivant sur le vivant d'un écosystème. Les paramètres physico-chimiques de la matrice sol ainsi que les variations environnementales et météorologiques constituent les facteurs abiotiques majeurs de régulation du microbiote racinaire des plantes.

#### 4. A. Le sol

Le sol forme un écosystème dynamique et complexe. Du fait de ses multiples fonctions, il n'en existe pas de définition universelle. Pour les agronomes, le sol est un milieu de croissance pour les plantes. Pour les géologues, il s'agit d'une phase courte dans le cycle géologique alors que pour les pédologues, le sol est le résultat de l'interaction entre le temps, les organismes vivants et morts, le climat et la topographie (Certini & Ugolini, 2013 ; Bockheim et al., 2014).

De grandes différences existent entre les caractéristiques des sols forestiers et celles des sols agricoles. Contrairement aux sols agricoles, les sols forestiers sont généralement peu ou pas amendés et ne sont que très faiblement travaillés. Les sols forestiers sont en moyenne bien plus acides, plus pauvres en éléments nutritifs mais plus riches en matière organique que les sols agricoles (Badeau et al., 1999).

Le sol offre de nombreux habitats pour les micro-organismes grâce à la diversité de sa structure et sa contenance en éléments nutritifs essentiels à la vie (Baldrian et al., 2017). Leur activité est notamment alimentée par la décomposition de la matière organique et par le carbone assimilé par la photosynthèse des plantes qui pénètre dans le sol sous forme d'exsudats racinaires et grâce au mycelium des champignons mycorhiziens (Clemmensen et al., 2013). La présence d'une grande quantité de mycéliums de champignons ectomycorhiziens est d'ailleurs une des caractéristiques des forêts tempérées et boréales. Cette quantité peut atteindre jusqu'à un tiers de la biomasse microbienne totale du sol (Högberg, 2002). Le sol apparaît donc comme un réservoir important de micro-organismes (Fierer, 2017) potentiellement capables de coloniser les racines des plantes. En effet, dans le sol forestier, on dénombre de  $10^7$  à  $10^9$  cellules bactériennes par gramme de sol, de 0,1 à 0,6

tonnes par hectare de biomasse fongique, de 0,2 à 0,7 milligrammes de mycélium fongique par gramme de sol et, enfin, la production de 0,2 tonne de carpophores par hectare et par année (Baldrian et al., 2017).

Chez les plantes de cultures et chez les arbres, le type de sol est un facteur important de structuration et de composition des communautés de micro-organismes du sol et de la rhizosphère (Berg & Smalla, 2009 ; Schreiter et al., 2014 ; Edwards et al., 2015 ; Bonito et al., 2014 ; Bonito et al., 2019). Chaque type de sol possède son propre cortège microbien. Cette spécificité est notamment due au pH qui peut varier considérablement d'un sol à un autre (Fierer & Jackson, 2006). Des études menées sur les arbres ont démontré que la composition et la diversité des communautés bactériennes semblent être largement influencées par le pH (Hartmann et al., 2008 ; Gottel et al., 2011 ; Shakya et al., 2013).

Si le pH est un facteur clé de la structuration et de la composition du microbiote du sol mais selon le type sol, d'autres paramètres sont également à prendre en considération car ils peuvent également agir sur la structure des communautés de micro-organismes. C'est le cas, par exemple, de (i) la disponibilité en nutriments et le contenu en carbone et en azote qui favorisent la prolifération de bactéries copiotrophes appartenant aux phyla des Bacteroidetes et Beta-Protéobactéries et des champignons de l'ordre des Agaricales (Fierer et al., 2007 ; Lauber et al., 2008), (ii) l'humidité des sols profitant aux bactéries des phyla Cyanobactéries, Verrucomicrobia et Chloroflexi ainsi qu'aux Ascomycètes (Meisner et al., 2018) et (iii) la salinité, responsables de l'augmentation de l'abondance relative des bactéries halophyles ou halotolérantes telles que les Protéobactéries, Actinobactéries et Bacteroidetes (Zhang et al., 2019).

### 4. B. Le climat et les variations saisonnières

Les micro-organismes du sol jouent un rôle essentiel dans le cycle du carbone et des nutriments dans les écosystèmes. Leurs activités sont régulées par différents facteurs abiotiques comme la quantité de litière apportée, la température et l'humidité.

Les changements atmosphériques comme la concentration en CO<sub>2</sub> et les variations météorologiques et saisonnières comme la température, le taux d'humidité et les niveaux de précipitations ont un impact à la fois sur les propriétés physico-chimiques du sol et sur la physiologie des plantes. De plus, ils peuvent modifier de façon directe ou indirecte les communautés de micro-organismes du sol (Compant et al., 2010).

L'augmentation de la concentration atmosphérique en CO<sub>2</sub> semble stimuler la physiologie des arbres et modifier la quantité et la qualité des exsudats racinaires (Pritchard, 2011). Il n'est donc pas étonnant que la composition et la structure des communautés de micro-organismes associées aux racines des plantes soient affectées par ces changements. Il a notamment été rapporté que des quantités élevées de CO<sub>2</sub> (jusqu'à trois fois supérieures aux quantités de CO<sub>2</sub> ambiant moyennes actuelles) modifient la structure et l'abondance des communautés de micro-organismes rhizosphériques des prairies et des sols agricoles (Hayden et al., 2012 ; Schortemeyer et al., 1996 ; Compant et al., 2010). L'altération des précipitations a un effet significatif sur les communautés actives des écosystèmes forestiers en favorisant certaines espèces microbiennes mieux adaptées aux environnements secs

ou humides telles que les champignons de la famille des *Cortinariaceae* et les bactéries de l'ordre des *Bacillales* (Richard et al., 2011 ; Felsmann et al., 2015). Enfin la hausse des températures, responsable de l'assèchement des sols et des périodes de sécheresse, affecte significativement les communautés bactériennes du sol directement en sélectionnant les communautés résistantes à la dessiccation ou indirectement en modifiant le métabolisme de la plante et/ou en altérant les propriétés du sol (Naylor & Coleman-Derr, 2018). Les réseaux bactériens et fongiques du sol ont des propriétés différentes et réagissent différemment à la sécheresse, cette dernière ayant un impact beaucoup plus prononcé sur les réseaux bactériens que sur les réseaux fongiques (De Vries et al., 2018).

Dans les écosystèmes forestiers, les variations saisonnières sont à l'origine de la variation de la disponibilité en nutriments ainsi que de la variation des températures et de l'humidité du sol. Ces fluctuations sont responsables de l'altération des processus microbiens du sol impliqués dans la dégradation de la matière organique. En effet, les changements temporels de l'activité enzymatique des communautés microbiennes du sol suggèrent un changement du substrat principal à décomposer entre l'été et l'automne (Kaiser et al., 2010, 2011). L'abattage des arbres empêchant ainsi l'augmentation de l'allocation du carbone dans le sol, comme c'est naturellement le cas en automne, affecte fortement ces processus microbiens (Ekberg et al., 2007). Toutefois, il a également été démontré que les altérations saisonnières et expérimentales de la disponibilité des ressources et des facteurs abiotiques induisent des changements dans la composition des communautés microbiennes du sol (Kaiser et al., 2010 ; Fierer et al., 2012) ainsi que des différences fonctionnelles entre les communautés microbiennes (Koranda et al., 2013).

### 5. Impact du microbiote sur la plante & ingénierie écologique

La plante modifie son environnement grâce à l'apport de la litière et de ses racines, au prélèvement de nutriments de la rhizosphère et grâce à la production des exsudats racinaires. La plante, par ce biais, est donc capable de réguler directement et indirectement les communautés de son microbiote racinaire et de sélectionner celles qui sont bénéfiques à sa croissance et sa santé (Mendes et al., 2013). Il est aujourd'hui établi que les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques terrestres et le fonctionnement des écosystèmes. Le microbiote est connu pour promouvoir la croissance et la résistance des plantes hôtes face aux facteurs biotiques et abiotiques. Plusieurs études ont fait le parallèle entre le microbiote intestinal des Hommes et des animaux et le microbiote racinaire des plantes (Berendson et al., 2012 ; Hacquard, 2015). Ces deux types de microbiotes possèdent les mêmes fonctions tels que l'acquisition de nutriments, la protection de l'hôte contre les micro-organismes pathogènes et la modulation de l'immunité de l'hôte (Berendson et al., 2012). Le microbiote constitue un véritable réservoir génétique pour la plante hôte. La théorie d'un « super-organisme » formé par l'hôte et son microbiote encourage les travaux de recherche actuels à adapter une vision plus holistique où l'hôte et son microbiote ne forment plus qu'une seule entité (Vandenkoornhuyse et al., 2015 ; Hacquard & Schadt, 2015).

Ainsi, le microbiote contribue au phénotype étendu de la plante. Du fait de sa très grande plasticité, de sa dynamique très rapide et de la présence d'un ensemble de gènes bien supérieur au génome des plantes, on pourrait se demander si le microbiome pourrait aider les plantes hôtes à s'adapter à des changements environnementaux et à répondre aux stress biotiques et abiotiques. Accroître nos connaissances sur le microbiote des arbres nous permettrait donc potentiellement de l'exploiter pour améliorer la croissance et la survie des plantes. Cette idée a notamment été vérifiée en démontrant que des manipulations sur le microbiote de l'arabette et du chou entraînent la modification de la date de floraison de ces végétaux (Panke-Buisse et al., 2015).

Enfin, des manipulations réalisées sur le microbiote de plusieurs plantes de grandes cultures ont pu réduire l'incidence de maladies, augmenter la production agricole et réduire l'utilisation d'intrants chimiques (Turner et al., 2013).

Concernant les arbres forestiers, de telles manipulations seraient difficiles à entreprendre à l'échelle d'une forêt entière. Cependant, des manipulations du microbiote racinaire ont été réalisées sur des arbres cultivés pour la production de biomasse tels que le saule, le peuplier, le frêne, le hêtre ou encore l'eucalyptus (Mercado-Blanco et al., 2018). Ces travaux ont montré que l'établissement d'interactions bénéfiques entre l'arbre et les communautés fongiques favorise l'adaptation des arbres dans des conditions pédologiques peu favorables. De plus, des effets positifs ont été également observés sur la croissance des arbres fruitiers quelques années après leur plantation (Mercado-Blanco et al., 2018).

## II. Interactions racines-champignons

Les deux types de mycorhizes les plus fréquents dans les écosystèmes tempérés sont les ectomycorhizes (EcM) et les endomycorhizes (AM). Ils se distinguent par le partenaire fongique mais également par les relations physio-anatomiques entre les deux partenaires (Smith & Read, 2008 ; **Tableau 1**). Quel que soit le type de symbiose mycorhizienne, cellules végétales et fongiques sont étroitement liées au cours de la formation de l'organe symbiotique. Selon le type de mycorhize, les hyphes fongiques peuvent traverser la paroi végétale et coloniser les cellules racinaires de la plante (AM) ou non (ECM).

	Ectomycorhizes		Endomycorhizes				
	EcM	Ectendomycorrhize	AM	ERM	Mycorhize arbutoïdes	Mycorhize monotropoïdes	Mycorhize à orchidée
<b>Anatomie des hyphes</b>	Septés	Septés	Aseptés	Septés	Septés	Septés	Septés
<b>Colonisation fongique intracellulaire</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>Manteau</b>	+	+ / -	-	-	+ / -	+	-
<b>Réseau de Hartig</b>	+	-	-	-	+	+	-
<b>Arbuscules ou vésicules</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>Pelotons</b>	-	-	-	+	-	-	+
<b>Taxon fongique impliqué</b>	Basidiomycètes Ascomycètes (Glomeromycètes)	Basidiomycètes Ascomycètes	Glomeromycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	Basidiomycètes	Basidiomycètes
<b>Taxon végétal impliqué</b>	Gymnospermes Angiospermes	Gymnospermes Angiospermes	Bryophytes Pteridophytes Gymnospermes Angiospermes	Ericales Bryophytes	Ericales	Monotropacées	Orchidées

Tableau 1 - Les principaux types de symbioses mycorhiziennes (d'après Smith & Read, 2008)

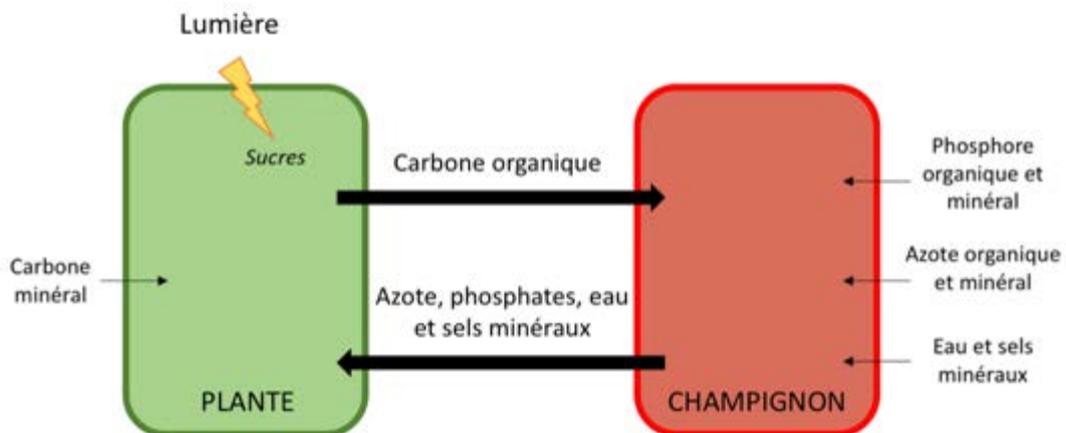


Figure 7 - Echanges de composés nutritifs entre les deux partenaires durant la symbiose ectomycorhizienne.

### 1. Les symbioses mycorhiziennes

Décrites pour la première fois en 1885 puis en 1887 par les botanistes Albert Bernhard Frank et Anton de Bary, les symbioses mycorhiziennes sont des associations mutualistes complexes entre les champignons du sol et les racines des plantes. Il s'agit de l'association symbiotique la plus commune et la plus répandue décrite à ce jour. Elle permet un échange mutualiste de nutriments entre la plante et le champignon favorisant leurs santés et leurs croissances. La plante transfère des composés carbonés issus de la photosynthèse à son partenaire fongique tandis que ce dernier améliore de manière très significative les prélèvements en eau et en nutriments du sol de la plante mais également l'acquisition de phosphore et d'azote (Harley & Smith, 1983 ; **Figure 7**).

#### 1. A. La symbiose ectomycorhizienne

La symbiose ectomycorhizienne (EcM) est caractérisée par la formation de mycorhizes externes. Elle concerne en majorité les arbres des forêts tempérées et boréales et, dans une moindre mesure, tropicales appartenant à la famille des Fagacées, des Pinacées, des Salicacées et des Bétulacées et des champignons appartenant majoritairement aux Basidiomycètes mais aussi aux Ascomycètes (**Tableau 1**). Les hyphes du champignon ectomycorhizien forment un manteau autour des racines et pénètrent entre les cellules du cortex racinaire pour former le réseau de Hartig, siège des échanges entre les deux partenaires symbiotiques. Un réseau d'hyphes extramatriciels se développe également en parallèle assurant ainsi le lien entre le sol et le manteau de l'ectomycorhize (**Figure 8**).

A noter également, l'existence des ectendomycorhizes caractérisées par leur capacité à former un manteau autour de la racine et une colonisation intracellulaire comme celle des endomycorhizes (Yu et al., 2001, **Tableau 1, Figure 8**).

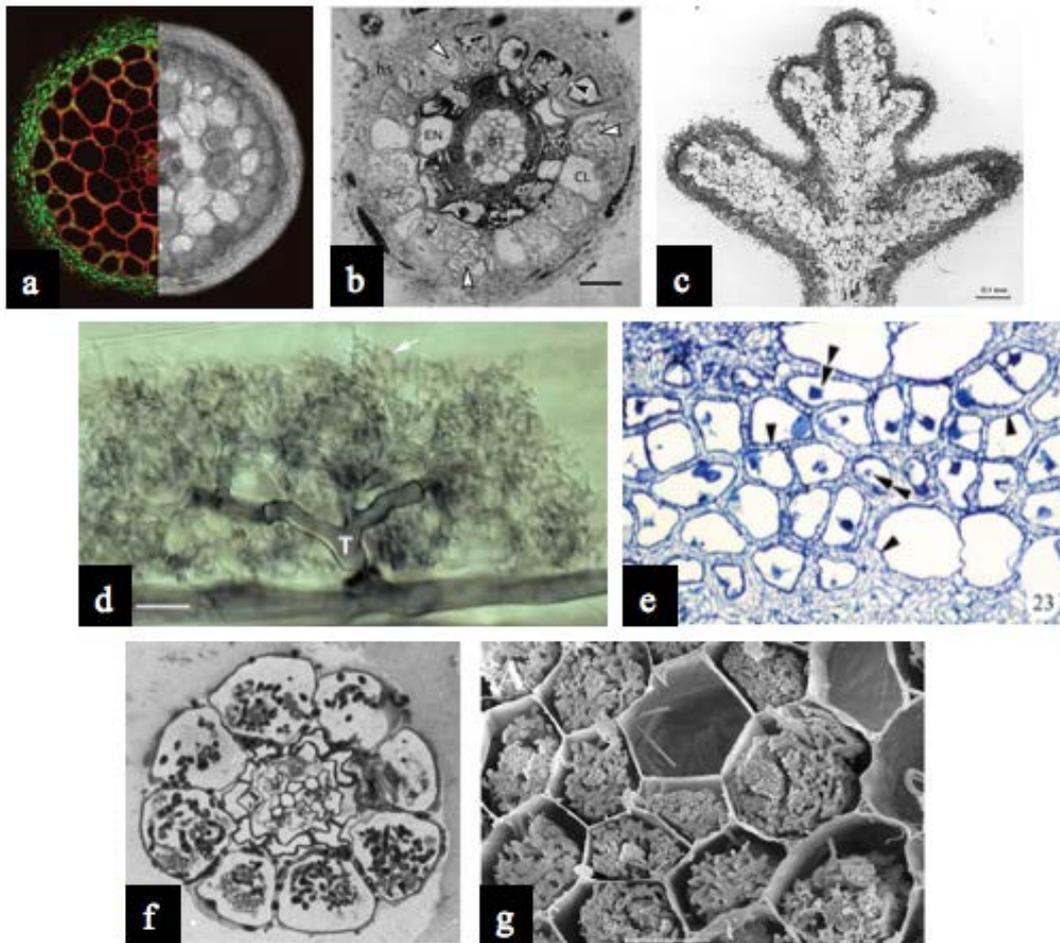


Figure 8 - Caractéristiques structurales des différents types de symbiose mycorhizienne

a – Ectomycorhize : Coupe transversale d'une racine de *Populus trichocarpa* colonisée par *Laccaria bicolor* au microscope confocal. Les hyphes du champignon (en vert) se développent entre les cellules épidermiques et corticales (en rouge) pour former le réseau de Hartig (Martin et al., 2016).

b – Ectendomycorhize : Coupe transversale d'une mycorhize de *Cavendishia nobilis* var. *capitata* avec gaine hyphale (hs), hyphes intercellulaires (flèche noire) et hyphes intracellulaires (flèche blanche). La racine présente une stèle (ST), un endoderme (EN) et une couche cellulaire corticale (CL). Barre, 20  $\mu\text{m}$  (Setaro et al., 2005).

c – Mycorhize arbutoïde : Observation au microscope électronique à balayage d'une mycorhize d'*Arbutus menziesii*-*Pisolithus tinctorius* (Massicotte et al., 1993).

d – Mycorrhizes à arbuscule : Observation au microscope optique d'arbuscules matures de *Glomus mosseae* dans une cellule corticale racinaire de *Allium porrum* L. (Brundrett et al., 1984).

e – Mycorhize monotropoïde : Observation au microscope optique d'une section paradermique de mycorhize de *Monotropa uniflora*. La pénétration du réseau de Hartig est exclusivement épidermique (Massicotte et al., 2005)

f – Mycorhize éricoïde : Observation au microscope optique de la coupe transversale d'une racine de *Calluna vulgaris* colonisée par un champignon mycorhizien éricoïde (Perotto & Bonfante, 2012).

g – Mycorhize à orchidée : Observation des pelotons de *Vanilla planifolia* au microscope électronique à balayage (Gonzalez-Chavez et al., 2017).

## 1. B. La symbiose endomycorhizienne

Les endomycorhizes sont la forme la plus répandue. Contrairement aux champignons ectomycorhiziens, les champignons endomycorhiziens pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires et forment différents types d'endomycorhizes (Tableau 1, Figure 8) :

- les endomycorhizes à arbuscules (AM) sont formées par des champignons appartenant aux Gloméromycètes et une importante variété de végétaux incluant les Bryophytes, les Angiospermes et les Gymnospermes. Ce type d'interaction concerne essentiellement les plantes herbacées, les arbres tropicaux et quelques dizaines d'essences des forêts tempérées et boréales appartenant par exemple aux genres *Fraxinus*, *Fagus*, *Populus* ou *Acer* (Hiesalu et al., 2014 ; Liu et al., 2015 ; Lang et al., 2015). Il s'agit de l'association mycorhizienne la plus ancienne puisqu'elle semble être apparue il y environ 450 millions d'années juste après la colonisation de la surface terrestre par les plantes, suggérant un rôle important de la mycorhization dans la survie et l'adaptation des plantes (Corradi et Bonfante, 2012 ; Strullu-Derrien et al., 2018).

- les mycorhizes éricoïdes (ERM) sont formées par des Ascomycètes des genres *Hymenocyphus* et *Oidiodendron*. Les hyphes de ces derniers se développent uniquement au niveau des cellules corticales des Ericacées dépourvus d'épiderme et forment des pelotons à l'intérieur des cellules racinaires.

- les mycorhizes arbutoïdes et les mycorhizes monotropoïdes sont formées par des Basidiomycètes. Les plantes impliquées dans ce genre de symbioses appartiennent aussi bien aux Ptéridophytes qu'aux Angiospermes.

- les mycorhizes à orchidées sont formés par des champignons appartenant au genre *Rhizoctonia*. Ce dernier type d'endomycorhize apparaît durant les premiers stades de développement des orchidées.

## 2. Les champignons endophytes

Le terme « endophyte » a été introduit pour la première fois en 1866 par Anton De Bary. L'endophytisme des champignons est une interaction biologique caractérisée par le fait d'effectuer, pour un individu, tout ou partie de son cycle de vie à l'intérieur d'une plante, sans provoquer aucun symptôme. Omniprésents dans le règne végétal, ces champignons endophytes sont majoritairement affiliés au phylum des Ascomycètes (Rodriguez et al., 2008). Ils prélèvent des nutriments à la plante hôte sans lui être délétère et peuvent croître de façon intracellulaire ou extracellulaire. Deux modes de transmission ont été observés chez les champignons endophytes : la transmission verticale et horizontale. Ces deux mécanismes sont très importants pour le champignon car ils lui permettent de coloniser une autre plante à partir de la plante hôte initiale. La transmission verticale correspond à la colonisation d'un nouvel hôte végétal descendant de l'hôte initial. Elle consiste à la pénétration de l'hyphes fongique dans une graine, un grain de pollen (Hodgson et al., 2014 ; Gibert et al., 2015) ou à un explant de l'hôte initial. Par conséquent, le champignon endophyte reste génétiquement identique mais peut coloniser un hôte génétiquement différent issu d'une ou plusieurs nouvelles générations ou coloniser un clone. La transmission horizontale correspond au mode de transmission le plus répandue chez les endophytes.

Elle se caractérise par la colonisation d'une nouvelle plante hôte grâce à la dissémination des spores fongiques ou par l'intermédiaire d'hyphes provenant du sol ou d'une autre plante. Généralement, après germination de ces spores, les hyphes pénètrent le nouvel hôte au travers de l'épiderme. Certains endophytes ne colonisent spécifiquement qu'une partie de la plante hôte. C'est le cas des Dark Septate Endophytes (DSE) qui colonisent uniquement les racines de la plante hôte. Ces endophytes se distinguent par l'anatomie de leurs hyphes : septés et mélanisés. Principalement présents dans le cortex racinaire, ils forment des micro-sclérotés (Jumpponen et al., 1998 ; Ban et al., 2012 ; **Figure 9**).

### 3. Les autres types de champignons de la rhizosphère

Outre les champignons mycorhiziens et endophytes, d'autres champignons sont fortement présents dans la rhizosphère. C'est le cas des champignons saprotrophes qui, comme les champignons ectomycorhiziens, sont responsables de la décomposition de la matière organique contenue dans la litière et les premiers horizons du sol (Lindahl & Tunlid, 2015). Les communautés fongiques saprotrophes minéralisent les produits de fractionnement issus de la décomposition assurée dans les premiers stades par la macrofaune et la mésofaune grâce à la production d'enzymes extracellulaires (Hättenschwiler et al., 2005 ; Pant et al., 2017). Les composés ainsi libérés sont disponibles pour les micro-organismes et les plantes.

On distingue également la présence de champignons pathogènes (Rey & Schornack, 2013). Bien que les plus fréquents colonisent les parties aériennes des arbres, certains champignons présents dans les sols infectent les racines ou bien s'introduisent dans les parties souterraines des plantes dans les systèmes vasculaires et colonisent petit à petit toute la plante en remontant les vaisseaux conducteurs provoquant des maladies telles que la pourriture vasculaire ou la pourriture des racines.

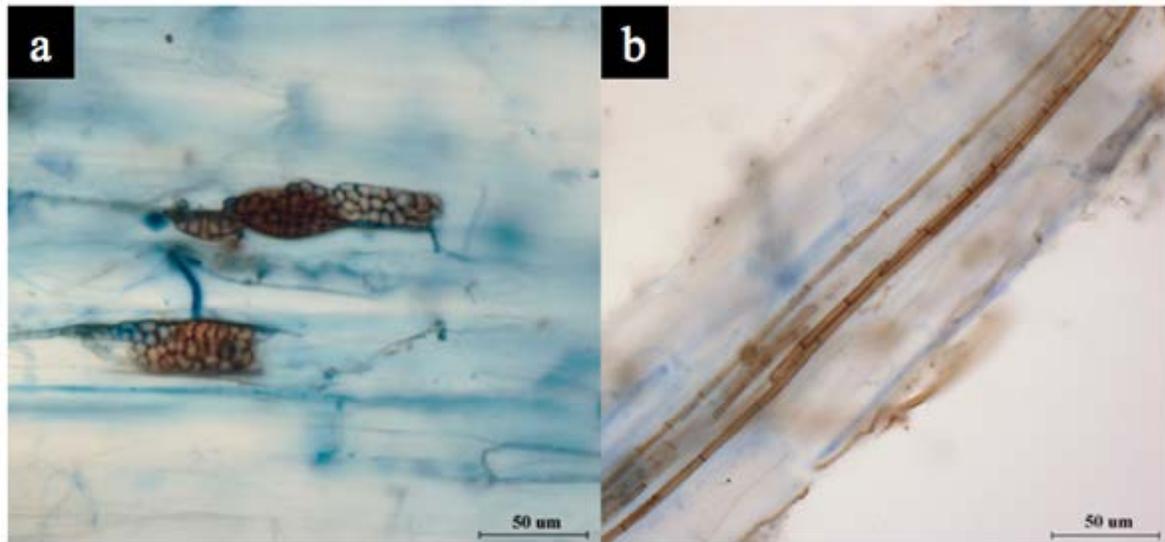


Figure 9 - Structures spécifiques des DSE dans les racines de la plante hôte. Micro-sclérotés formées par *P. chrysanthemicola* (a). Colonisation intracellulaire par un hyphe septé mélanisé formé par *G. cylindrosporum* (b) (Ban et al., 2012).

### III. Les interactions racines-bactéries

Les bactéries jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques tels que les cycles du carbone et de l'azote. La décomposition de la matière organique est une des activités microbiennes les plus importantes dans les sols forestiers. La capacité de dégradation de composés organiques carbonés chez les bactéries (et les champignons) est bien connue. Elles sont capables de dégrader des molécules complexes telles que la cellulose, la pectine, la lignine, la lignocellulose ou encore la chitine (De Boer et al, 2005 ; Khatoon et al., 2017). Ces molécules peuvent être décomposées par des enzymes aspécifiques telles que les peroxydases (Tian et al., 2014). L'ensemble de ces activités de décomposition de la matière organique participe de façon intense à l'apport de carbone du sol et des plantes. Les bactéries libres fixatrices d'azote atmosphérique telles que les bactéries du genre *Azotobacter* et *Nostoc* contribuent à compenser une partie des pertes en azote, élément indispensable à la croissance des plantes, des sols résultant du lessivage et de la dénitrification. Cette fixation n'est possible que par les organismes procaryotes et constitue une des formes d'acquisition de l'azote les plus importantes chez les plantes terrestres bien qu'elle soit rare chez les arbres (Cleveland et al., 1999). Toutefois, de nombreuses plantes et en particulier les légumineuses, réalisent cette fixation d'azote, de manière indirecte, en symbiose avec des bactéries du genre *Frankia* et *Rhizobium* qui se localisent généralement dans des nodosités situées sur les racines (Brockwell et al., 1995).

Les bactéries jouent également un rôle indirect dans la nutrition des plantes grâce à leur capacité d'altération minérale permettant d'augmenter la concentration des éléments nutritifs essentiels au développement et à la croissance des plantes. Cette dissolution microbienne des minéraux est réalisée principalement via la production de protons, d'acides organiques ou de molécules chélatantes comme les sidérophores. Les genres bactériens *Collimonas*, *Bulkholderia* et *Bacillus* sont été décrits comme étant particulièrement efficaces pour altérer les minéraux du sol. Outre leur capacité à altérer les minéraux, les bactéries participent aussi activement à la dégradation de la matière très récalcitrante (Pérez et al. 2002 ; Bugg et al. 2011 ; Tian et al. 2016).

Enfin, certaines bactéries du sol vont également avoir une influence directe sur la production végétale de manière positive ou négative. Celles ayant un effet négatif sur la croissance végétale sont des bactéries pathogènes et parasites des plantes (Mendes et al., 2013). Certaines bactéries pathogènes sont capables de transformer génétiquement leur hôte végétal pour créer un habitat favorable. C'est le cas, par exemple, d'*Agrobacterium tumefaciens* provoquant la galle du collet (Escobar et Dandekar, 2003 ; Abarca-Grau et al., 2011). A l'inverse, d'autres bactéries sont connues pour leur capacité à stimuler la croissance des plantes. Il s'agit des bactéries promotrices de la croissance des plantes (ou PGPR, acronyme de Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui ont également la capacité d'interférer avec les voies de signalisation de la plante via différents mécanismes comme la phytostimulation qui correspond à l'amélioration directe de la croissance végétale grâce à la production de phytohormones (Gaeiro et al., 2013). Les PGPR produisent également des substances antibiotiques, des enzymes bactériolytiques et diverses toxines capables d'éliminer certaines bactéries compétitrices (Beneduzi et al., 2012 ; Backer et al., 2018). C'est notamment grâce à la production de ces

composés qu'elles sont utilisées comme agents de biocontrôle et de lutte biologique contre la colonisation des racines par des micro-organismes pathogènes.

Les micro-organismes endophytes bactériens correspondent aux individus résidant au moins une partie de leur vie à l'intérieur des tissus racinaires de la plante, l'endosphère. Ils présentent des caractéristiques métaboliques différentes par rapport aux micro-organismes de la rhizosphère suggérant que tous ces derniers ne peuvent pas entrer dans la plante (Turner et al., 2013). Les travaux de Timm et al., (2015) ont notamment démontré que les souches bactériennes *Pseudomonas fluorescens* isolées à partir de l'endosphère du peuplier étaient davantage pourvues d'éléments génomiques dédiés au métabolisme des composés d'origine végétale comme la synthèse ou la modification des hormones végétales ou le catabolisme des nucléosides et des acides sucrés, molécules complexes riches en carbone et très abondantes dans les racines. Comme les autres bactéries rhizosphériques, les endophytes utilisent les ressources de la plante hôte comme source principale de nutriments mais elles ont, en retour, un effet neutre sur la plante hôte grâce à différents mécanismes. La distribution des endophytes dépend de leur capacité de colonisation mais également des ressources de la plante qui diffèrent d'un organe à l'autre.

Concernant les archées, peu d'informations sont disponibles par rapport aux communautés bactériennes. Bien que ces micro-organismes soient probablement très abondants dans la rhizosphère et l'endosphère de certaines plantes, leurs activités fonctionnelles et les liens qu'ils entretiennent avec leurs hôtes sont méconnus (Buée et al., 2009). Les archées jouent également un rôle clé dans les cycles globaux du carbone et de l'azote, par exemple dans la méthanogénèse, l'oxydation anaérobie du méthane et l'oxydation de l'ammoniac (Deveau et al., 2018). Une étude récente réalisée sur la végétation naturelle des tourbières alpines a révélé que ce type de micro-organismes interagit avec la plante. Cette interaction basée sur des fonctions telles que la promotion de la croissance de la plante par la biosynthèse d'auxines, l'apport de nutriments et la protection de la plante contre le stress abiotique ont été détectés par des approches de métagénomique (Taffner et al., 2018).

#### IV. Les interactions champignons-bactéries

Champignons et bactéries du sol et de la rhizosphère partagent le même habitat mais également souvent les mêmes ressources. Ces micro-organismes interagissent donc en permanence par l'intermédiaire de multiples types d'interactions bénéfiques ou, au contraire, délétères. Ces interactions peuvent être indirectes ; un micro-organisme peut avoir un effet sur un autre grâce à la production de composés modifiant les propriétés physico-chimiques du milieu (Raaijmakers & Mazzola, 2012 ; Hassani et al., 2018). En parallèle, ces interactions entre micro-organismes peuvent être directes. Champignons et bactéries peuvent interagir de façon mutualiste en collaborant pour acquérir une même ressource qu'ils ne pourraient pas acquérir individuellement. Une telle coopération a déjà été décrite dans les sols forestiers concernant la dissolution des minéraux (Uroz et al., 2007). Des interactions directes et délétères existent également entre bactéries et champignons du sol. Des

phénomènes de compétitions ont déjà été décrits dans les sols. Ce type d'interactions est très répandu entre les bactéries et les champignons et se produit quand les micro-organismes exploitant une même ressource présente dans le milieu en quantité limitée comme, par exemple, le carbone et l'azote (Frey-Klett, et al., 2011). Certains micro-organismes sont également capables de produire des composés ayant un effet délétère sur d'autres micro-organismes. Ce type d'interactions appelé antibiose est courant dans les sols et contribue fortement à la sélection des micro-organismes des différents compartiments. Par exemple, le champignon EcM *Amanita muscaria* entraîne la suppression de la production d'antibiotiques par la souche bactérienne *Streptomyces* Ach505 par production d'acides organiques (Riedlinger et al., 2006).

Les hyphes des champignons fournissent des microhabitats pouvant être colonisés par des communautés bactériennes spécifiques (Frey-Klett et al., 2011). La diversité de ces communautés peut varier de quelques centaines à plusieurs centaines d'espèces bactériennes selon le champignon (Shulz-Bohm et al., 2016 ; Ghodsalavi et al., 2017). Alors que certaines bactéries, comme *Burkholderia* sont capables de coloniser un grand nombre d'espèces fongiques en raison de leur capacité à utiliser des métabolites dérivés de champignons et à surmonter les systèmes de défense fongiques, d'autres peuvent avoir une relation plus spécifique avec leurs hôtes fongiques (Stopnisek et al., 2016 ; Warmink et al., 2009).

Les bactéries qui vivent à l'intérieur des cellules fongiques sont appelées bactéries endofongiques ou endobactéries. Ce type de bactéries, dont les mieux étudiées appartiennent à la famille des *Burkholderiaceae*, a été signalé dans des champignons aux modes de vie très variés et d'origine taxonomique très diverse comme les champignons saprotrophes ou symbiotiques. Les endobactéries peuvent avoir des effets sur la biologie de l'hôte fongique, y compris sur certains aspects de sa reproduction, sa croissance et le métabolisme primaire et secondaire (Deveau et al., 2018).

Ainsi, de nombreux types d'interactions existent entre les bactéries et les champignons du sol et de la rhizosphère et ont probablement un rôle important dans la structuration du microbiote. Elles sont dynamiques et très dépendantes des conditions environnementales mais également de la physiologie des micro-organismes. Elles mettent en avant la complexité des études à réaliser pour comprendre comment le microbiote racinaire d'une plante se met en place et est régulé.

#### IV. Les modèles d'étude *Populus* et *Laccaria bicolor*

##### 1. Le peuplier

Le peuplier est une appellation générique qui désigne un nombre important d'espèces d'arbres à feuilles caduques du genre *Populus* de la famille des Salicacées. Répartis dans l'hémisphère nord, des écosystèmes subtropicaux aux écosystèmes boréaux, les peupliers dominent les bords de rivières et les peuplements forestiers inondés tandis que les trembles correspondent aux feuillus boréaux les plus importants (Peterson & Peterson, 1992). D'après la classification de Eckenwalder (1966), les différentes espèces de peupliers se répartissent en six sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques. Les sections *Aigeiros*, *Tacamahaca* et *Populus* regroupent le plus d'espèces (Figure 10).

En plus des peuplements naturels, les arbres du genre *Populus* sont cultivés dans des plantations en Amérique, en Europe et en Asie. En Europe, les 940 000 ha de plantations produisent actuellement environ 8 millions de m<sup>3</sup> de bois par an. Bien que le bois de peuplier soit aujourd'hui exploité par l'industrie pour produire des objets à faible valeur ajoutée (contreplaqué, pâte à bois, bois scié...), l'utilisation du peuplier comme source de combustible et de biomasse pour la production énergétique a suscité un intérêt croissant durant ces dernières années. C'est un arbre à croissance rapide avec une floraison possible au bout de quatre à cinq ans, permettant ainsi les croisements génétiques. Les espèces de peupliers *Populus deltoides*, *Populus nigra*, *Populus alba* et *Populus trichocarpa* ainsi que leurs hybrides sont les plus couramment utilisés en populiculture (Figure 10). L'intérêt du peuplier en phytoremédiation est également très étudié (Rugh et al., 1998 ; Pillipovic et al., 2006 ; Castro-Rodriguez et al., 2016 ; Foulon et al., 2016). Sur la base des travaux de recherche disponibles, l'utilisation de cultivars est déjà couramment appliquée à la phytoremédiation. L'utilisation du peuplier en phytoremédiation présente l'avantage de stocker du carbone et de produire du bois.

Le peuplier est le premier arbre dont le génome a été entièrement séquencé et mis à disposition de la communauté scientifique (Tuskan et al., 2006). En effet, c'est le génome de *Populus trichocarpa* qui a été séquencé en 2001 par le Joint Genome Institute (JGI, Département de l'énergie américain, Etats-Unis, <http://www.jgi.doe.gov/>). Il possède un génome diploïde de 485 Mb réparti sur 19 chromosomes (Tuskan et al., 2006). Certains clones de peupliers sont également facilement manipulables par génie génétique. Il peut être transformé génétiquement par agrottransformation et micro-propagé en conditions stériles (Fillatti et al., 1986 ; Parsons et al., 1986). En plus de ces qualités, le peuplier possède la particularité de développer des associations mutualistes avec des champignons mycorhiziens (EcM et AM), des champignons endophytes et des bactéries (Gehring et al., 2006 ; Karlinski et al., 2010, Gottel et al., 2011 ; Shakya et al., 2013, Bonito et al., 2014 ; Bonito et al., 2016 ; Cregger et al., 2018 ; Bonito et al., 2019).

Dans le cadre de cette thèse, deux génotypes de peupliers ont été étudiés : le peuplier gris (*Populus tremula* x *alba* clone 717-1B4) et le peuplier noir (*Populus nigra* L.).



*Populus deltoides*

*Populus nigra*

*Populus trichocarpa*

*Populus alba*

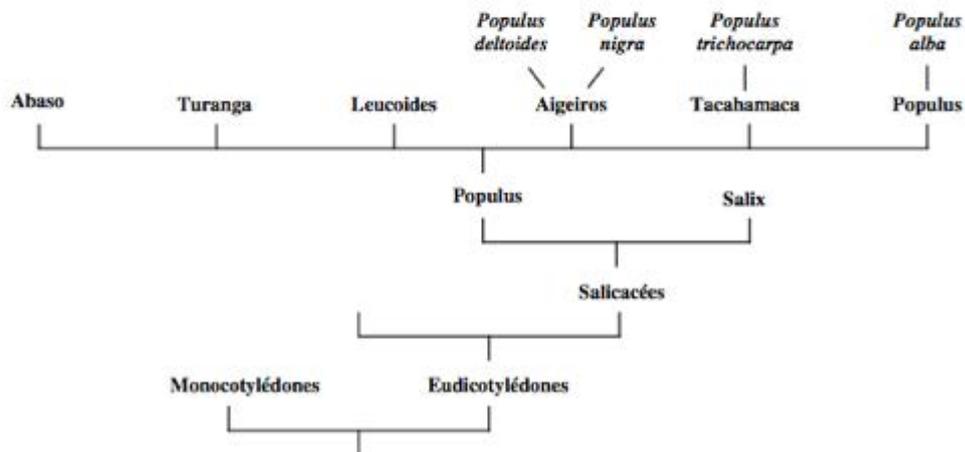


Figure 10 – Les différentes espèces de peuplier. Elles se répartissent en six sections selon leurs caractéristiques phénotypiques et biologiques. Les quatre espèces les plus connues sont indiquées au sein des populations auxquelles elles appartiennent (D'après Eckenwalder, 1996).

### 1. A. *Populus tremula x alba*

*Populus tremula x alba* est un hybride interspécifique femelle initialement créé par l'INRA en 1959 dans le but d'obtenir des lignées d'arbres à forte croissance, avec un bois de qualité et résistantes aux pathogènes. Le clone « INRA 717-1B4 » a été remarqué du fait de sa très forte infection par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Il s'agit d'un clone femelle, issu d'un croisement entre un individu femelle *Populus tremula* récolté en 1959 dans la forêt de Palroy (Meurthe-et-Moselle, France) et un individu mâle *Populus alba* récolté en 1960 près du Pont du Gard (Gard, France). Cet hybride faisait partie d'un programme de sélection initié par le docteur Michel Lemoine dans les années 1960 (Lemoine, 1973 ; Mader et al., 2016).

Le clone 717-1B4 possède l'avantage d'être facilement manipulable en génie génétique lors de transformation par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, c'est pourquoi il est largement utilisé en laboratoire dans des expériences de transformations génétiques pour analyser l'expression et la fonction de gènes d'intérêt. La première transformation génétique de *Populus tremula x alba* a été réalisée en 1992 par Leple et al. De nombreuses lignées de peupliers transgéniques basées sur ce clone ont ensuite été testées notamment pour une application commerciale (Walter et al., 2010 ; Pilate et al., 2012). Dans le cadre des études physiologiques et génomiques, le nombre de publications scientifiques qui ont utilisé le clone INRA 717-1B4 comme modèle était de 245 publications en 2016 (Mader et al., 2016). Une ébauche du génome de *Populus tremula x alba* est aujourd'hui disponible grâce à la combinaison d'assemblages *de novo* et d'assemblage de référence (Mader et al., 2016).

### 1. B. *Populus nigra*

Le peuplier noir (*Populus nigra* L.) est une espèce suscitant de nouveaux intérêts. En effet, il s'agit d'une espèce colonisant un habitat particulier : la forêt alluviale à bois tendre qui représente une zone tampon entre l'espace terrestre largement occupé par l'agriculture et l'urbanisation et le milieu aquatique. Le peuplier noir couvre une aire naturelle très vaste, allant de l'Europe de l'Ouest à l'Ouest de la Chine en passant par le Nord de l'Afrique (Villar & Forestier, 2009).

Cette espèce pionnière, exigeante en lumière et en eau, est une espèce dioïque (sexes séparés) dont les graines peuvent être transportées par le vent et l'eau. Ces dernières possèdent une viabilité très courte de l'ordre de quelques jours. La régénération du peuplier noir dépend donc étroitement du fonctionnement du cours d'eau auprès duquel il est installé. En effet, les graines produites ne peuvent germer que sur des sédiments frais et sont soumises à la dynamique fluviale et aux phénomènes de crues et de décrues. L'espèce possède également un mode de reproduction végétative, par l'intermédiaire de boutures qui peuvent être transportées par l'eau ou, et un mode de reproduction par clonage naturel par l'intermédiaire de drageons (Villar & Forestier, 2009).

Le peuplier noir présente de nombreux atouts écologiques ; il est notamment pourvu d'un important système racinaire, piègeur de sédiment, fixateur de berges et épurateur naturel de nutriments (Ruffinoni et al., 2003). Enfin, le peuplier noir apparaît comme un élément clé dans l'attractivité et la qualité des paysages.

Cependant, les populations de peupliers noirs ont beaucoup souffert au cours des cinquante dernières années en raison de l'augmentation de l'impact de l'Homme sur les bassins et les corridors fluviaux qui ont fortement affecté la phase critique de recrutement des semis (Corenblit et al., 2014). Le peuplier noir est également menacé par le risque d'abâtardissement des peuplements naturels par des clones de peupliers cultivés dont le pollen peut féconder les fleurs des peupliers noirs femelles (Bastien et al., 2009). Deux types de cultivars présentent des menaces pour les populations sauvages : le peuplier d'Italie (*Populus nigra* var. *italica*) de sexe mâle et les hybrides de peupliers développés pour la production de bois tels que les clones *Populus deltoides* x *Populus nigra* ou *Populus deltoides* x *Populus trichocarpa* de sexe mâle et femelle.

Ces menaces ne portent pas sur la survie de l'espèce qui n'est globalement pas menacée de disparition en France. Néanmoins, la diminution de la qualité et de la diversité de ses ressources génétiques peut présenter un risque important dans ses capacités d'adaptation et de maintien à long terme (Villar & Forestier, 2009).

Dans ce contexte et au cours des deux dernières décennies, plusieurs projets scientifiques européens ont vu le jour afin de mieux comprendre la dynamique écologique et génétique actuelle du peuplier noir et de proposer des stratégies ciblées pour sa conservation et son maintien. C'est le cas, par exemple, du projet POPMICROCLIM (méta-programme INRA) qui vise à étudier le rôle du microbiote racinaire dans la réponse adaptative du peuplier noir au changement climatique et auquel j'ai participé (<http://www.accaf.inra.fr/Actions-et-Projets/Adaptation-et-biodiversite/POPMICROCLIM>).

### 2. Le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

*Laccaria bicolor* (ou Laccaria bicolore) est une espèce de champignon basidiomycète de la famille des *Hydnangiaceae* et de l'ordre des *Agaricales*. Il s'agit d'un champignon ectomycorhizien vivant en symbiose avec plusieurs essences d'arbres comme le pin, le bouleau, le hêtre, et dans une moindre mesure, le peuplier dans les lisières, clairières et bords de chemins en forêts boréales et tempérées (**Figure 11**).

La souche utilisée couramment dans le laboratoire « Interactions Arbres-Micro-organismes » est la souche S238N. Cette souche a été isolée à partir d'un carpophore recueilli sous un pin Douglas *Tsuga menziana* par Molina et Trappe (Oregon, États-Unis) puis transféré au laboratoire de Microbiologie de Nancy en 1980. Plus tard, la souche S238N dicaryotique s'est révélée particulièrement efficace pour augmenter la croissance des semis de Douglas *Pseudotsuga menziesii* en pépinière forestière (Le Tacon & Bouchard, 1986). En effet, la croissance des arbres a été doublée par rapport aux plants spontanément mycorhizés par les champignons naturellement présents (Villeneuve et al., 1991).

En 1988, plusieurs monocaryons ont été obtenus à partir de la germination de spores isolées d'un carpophore issu d'une expérience de mycorhization contrôlée de *L. bicolor* S238N avec *Pseudotsuga menziesii* (Selosse et al., 2000). C'est l'une de ces souches monocaryotiques, S238N-H82 qui a été sélectionnée pour être séquencée. Le génome de *Laccaria bicolor* a été séquencé et publié par le JGI en 2006 (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi2/Lacbi2.home.html>). L'analyse à l'échelle génomique a été réalisée par le Consortium du Génome de *L. bicolor* (Martin et al., 2008). *L. bicolor* possède un génome de 65 Mb réparti en 12 chromosomes, riche en transposons et en éléments répétés (environ 20% du génome). Comme le peuplier pour l'ensemble des arbres, *L. bicolor* est le premier champignon symbiotique à avoir été séquencé. De plus, sa croissance plus rapide en culture pure en comparaison avec d'autres EcM, sa forte capacité à former des mycorhizes en conditions stériles et contrôlées (**Figure 11**), et sa transformabilité génétique font de cette espèce de champignon ectomycorhizien un excellent modèle d'étude.

### 3. Rôle de l'effecteur MiSSP7 dans la formation de la symbiose ectomycorhizienne

Les effecteurs correspondent à des petites protéines sécrétées par les micro-organismes pour modifier la structure et/ou la fonction de la cellule hôte (Kamoun, 2006). Ces effecteurs sont capables de contourner les réactions de défense de la PTI et permettent au micro-organisme pathogène qui les a produits d'infecter la plante hôte malgré les premières lignes de défense. Ils sont très étudiés dans le cadre des interactions plante-pathogènes mais sont également produits par les champignons mycorhiziens (Jones & Dangl, 2006 ; Dodds & Rathjen, 2010 ; Plett et al., 2011 ; Klopffholz et al., 2011).

Les effecteurs sont sécrétés par les micro-organismes pour aider ces derniers à coloniser une plante hôte de différentes manières. Ils permettent aux micro-organismes de pénétrer dans les tissus ou bien dans les cellules de la plante mais également de faciliter l'acquisition de nutriments provenant de la plante. De plus, les effecteurs peuvent contourner le système immunitaire de la plante hôte en empêchant la reconnaissance des MAMPs, en inactivant les phytoenzymes de défense ou encore en inactivant les voies de signalisation impliquées dans la mise en place des mécanismes de défense et l'expression des gènes de défense de la plante hôte.

Lors de la mise place de la symbiose ectomycorrhizienne entre le champignon *L. bicolor* S238N et le peuplier *P. trichocarpa*, l'effecteur fongique MiSSP7 (acronyme de Mycorrhizal Induced Small Secreted Protein 7 kDa) est sécrété par *L. bicolor* et pénètre dans le noyau des cellules racinaires où il se lie avec la protéine régulatrice JAZ6, bloquant ainsi l'induction de la voie de signalisation de l'AJ (Plett et al., 2011).

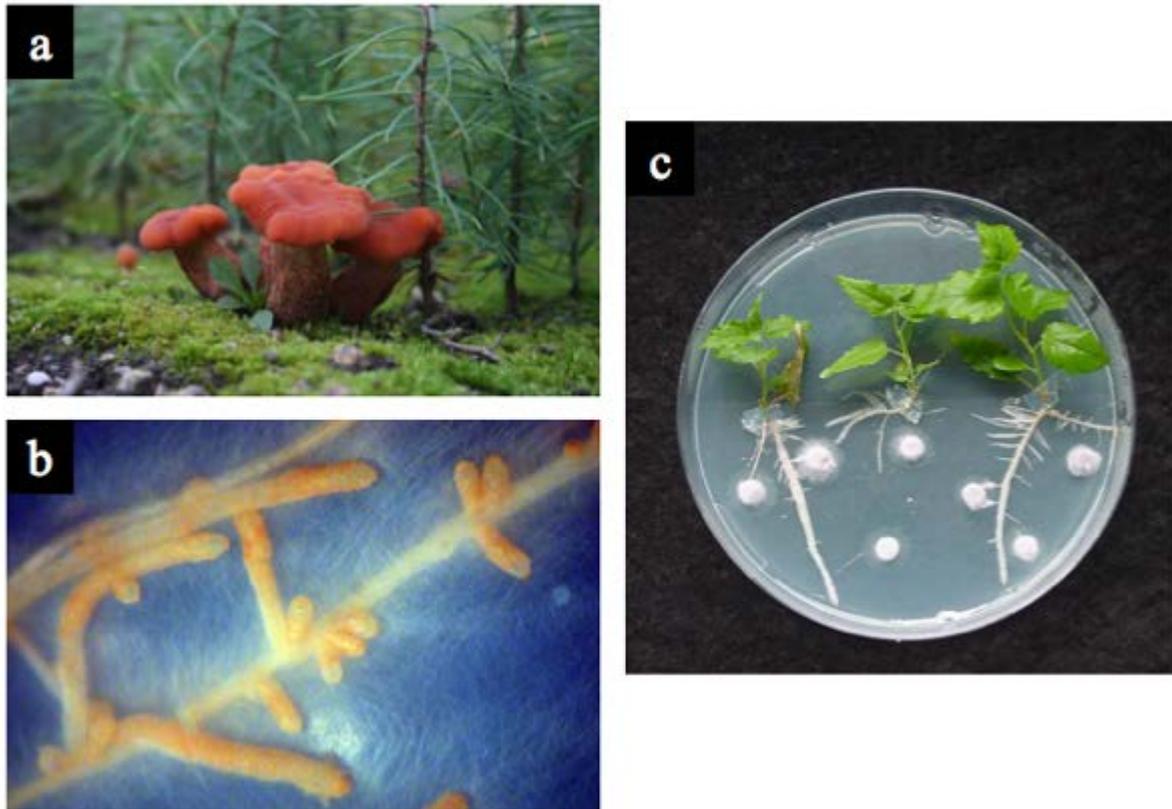


Figure 11 - Le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (d'après Martin et al., 2016). Carpophores de *L. bicolor* (a). Ectomycorhizes de *L. bicolor* obtenues avec *Populus tremula x alba* (b). Développement in vitro de la symbiose ectomycorhizienne entre *L. bicolor* et *P. tremula x alba* par la méthode sandwich (c).

Selon le modèle actuel, MiSSP7 serait ainsi capable de moduler les mécanismes de défense dans les racines du peuplier, et notamment la voie de signalisation de l'AJ, ce qui permettrait la colonisation fongique de l'hôte et ainsi la mise en place de l'interaction. Bien que les gènes impliqués dans l'induction de la voie de signalisation de l'AJ ne soient pas encore totalement connus chez le peuplier, l'action de MiSSP7 dans le noyau des cellules racinaires de l'hôte est aujourd'hui établie.

L'effecteur MiSSP7 sécrété par le champignon *Laccaria bicolor* est capable de moduler la voie de signalisation de l'AJ dans les racines du peuplier. La protéine JAZ6 est une protéine végétale qui bloque l'expression des gènes défensifs induits par l'AJ permettant ainsi aux voies de défense de rester inactives dans les cellules des racines non colonisées. JAZ6 interagit avec des facteurs de transcription comme MYC2. Leur liaison avec JAZ6 empêche ces facteurs de transcription de se lier aux sites de reconnaissance de la boîte G située en amont des gènes répondant à l'AJ. Après la pénétration des hyphes fongiques, l'AJ est libérée et détectée par la protéine COI1 qui entraîne la formation du complexe JAZ6-COI1. COI1 est un composant du complexe d'ubiquitine ligase SCFCOI1. Le complexe est alors dégradé par le protéasome 26S. Par conséquent, MYC2 n'est plus inhibé par JAZ6 et peut jouer son rôle de facteur de transcription en activant la transcription des gènes de défense induits par l'AJ. Après la pénétration des hyphes fongiques dans l'espace apoplastique des racines du peuplier, *Laccaria bicolor* sécrète MiSSP7 qui supprime les mécanismes de défense liés à l'AJ en se liant à JAZ6. Cette liaison empêche sa reconnaissance avec AJ-COI1 et donc sa dégradation maintenant ainsi l'inhibition sur MYC2 et la répression des gènes sensibles à l'AJ (Plett et al., 2014 ; Martin et al., 2016, **Figure 12**).

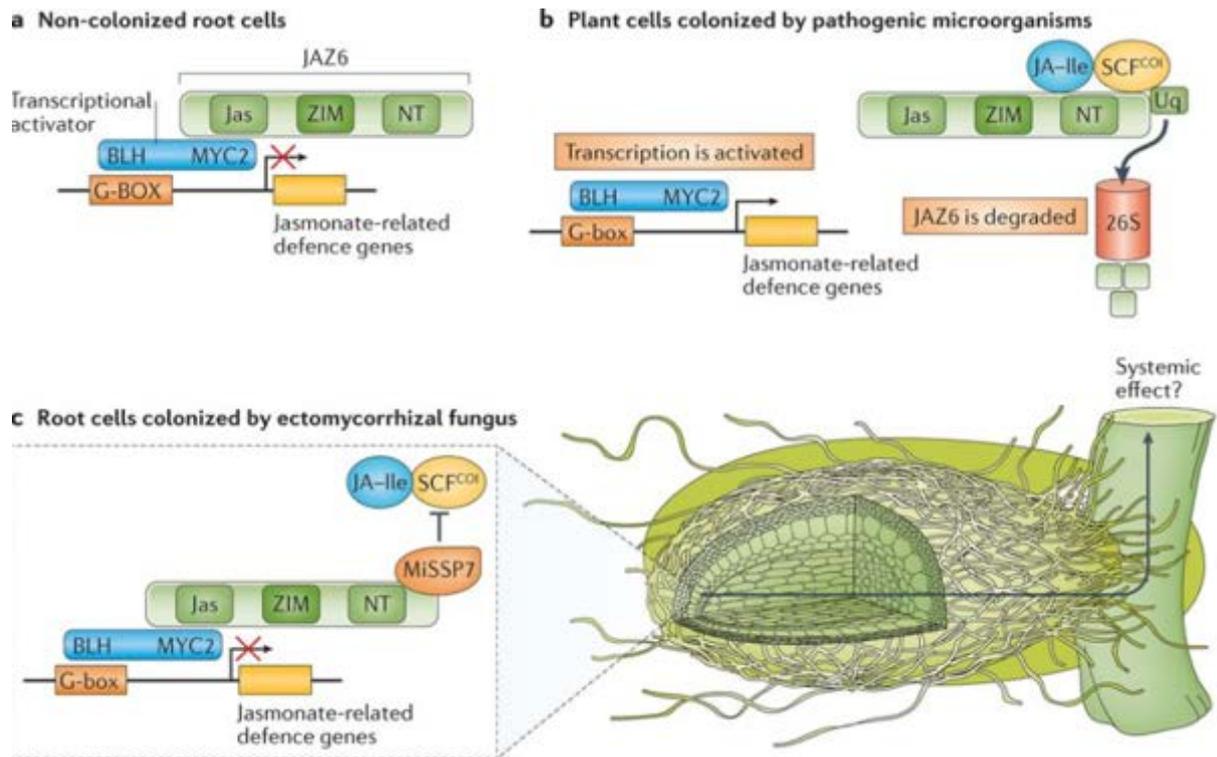


Figure 12 – Représentation schématique du modèle de régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique du Peuplier par l'effecteur fongique MiSSP7 (d'après Martin et al., 2016).

a - Liaison des facteurs de transcription avec JAZ6 qui empêche les facteurs de transcription associés de se lier aux sites de reconnaissance de la boîte G située en amont des gènes répondant à l'AJ.

b - Formation du complexe JAZ6-CO11 et dégradation par le protéasome 26S suite à la présence d'AJ. MYC2 n'est plus inhibé par JAZ6 et peut jouer son rôle de facteur de transcription en activant la transcription des gènes sensibles à l'AJ.

c - Liaison entre MiSSP7 et JAZ6 qui supprime les mécanismes de défense liés à l'AJ. Cette liaison empêche sa reconnaissance avec AJ-CO11 et donc sa dégradation.

## V. Le microbiote du peuplier

Cette partie correspond à un article de synthèse en préparation (et non finalisé dans sa version présentée dans ce manuscrit de thèse) rédigé en anglais.

Dans cet article de synthèse intitulé « **Current knowledge of the *Populus* microbiome : improving the holistic perception of tree-microbes interactions** », je présente les connaissances scientifiques acquises jusqu'à aujourd'hui concernant la composition et les mécanismes de régulation du microbiote du peuplier. Bien que cette thèse se concentre exclusivement sur les facteurs de régulation du microbiote racinaire, cet article présente également les facteurs de régulation des communautés de micro-organismes associées aux parties aériennes de l'arbre tels que les feuilles et le tronc.

Après un travail exhaustif de recherche bibliographique sur les microbiotes du peuplier et également ceux d'autres arbres, j'ai personnellement pris en charge la rédaction de l'article qui constitue une partie importante de l'introduction générale à ma thèse.

## Current knowledge of the *Populus* microbiome: improving the holistic perception of tree-microbes interactions

Lauralie Mangeot-Peter<sup>1</sup>, Aurélie Deveau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRAE, Université de Lorraine, UMR IAM Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136, Laboratoire d'excellence Recherches Avancées sur la Biologie de l'Arbre et les Ecosystèmes Forestiers (LabEx ARBRE), Centre INRAE Grand-Est, 54280 Champenoux, France.

---

\*Corresponding author: Mailing address: UMR1136 INRAE Université de Lorraine, Interactions Arbres Micro-organismes, 54280 Champenoux, France. Phone: +33 3 83 39 40 88, Fax: +33 3 83 39 40 69.  
E-mail: aurelie.deveau@inrae.fr

---

### Abstract

*Populus* have played an increasing role in environmental, commercial and research projects in the past few decades. Thanks to its multiple specificity, *Populus* became an excellent tree model to improve our knowledge on tree microbiome. Interactions between trees and microorganisms are multiple and extremely diverse according to the different tissues of the tree. These associations play important role for tree nutrition, growth and health but they could also help trees to improve their adaptation to environmental conditions, opening exciting opportunities for forestry. Although most of the factors influencing the composition and structure of the microbiome are currently known, there is a real lack of knowledge regarding the specific function of each member of the microbiome and the molecular dialogue occurring between microorganisms and tree host. Filling these knowledge gaps would allow us to improve our holistic perception of tree microbiome.

We review recent studies in *Populus* to highlight the importance of this holistic vision across the rhizosphere, phyllosphere, stem and wood, and discuss potential improvement for future research in *Populus* microbiome and forest ecosystem.

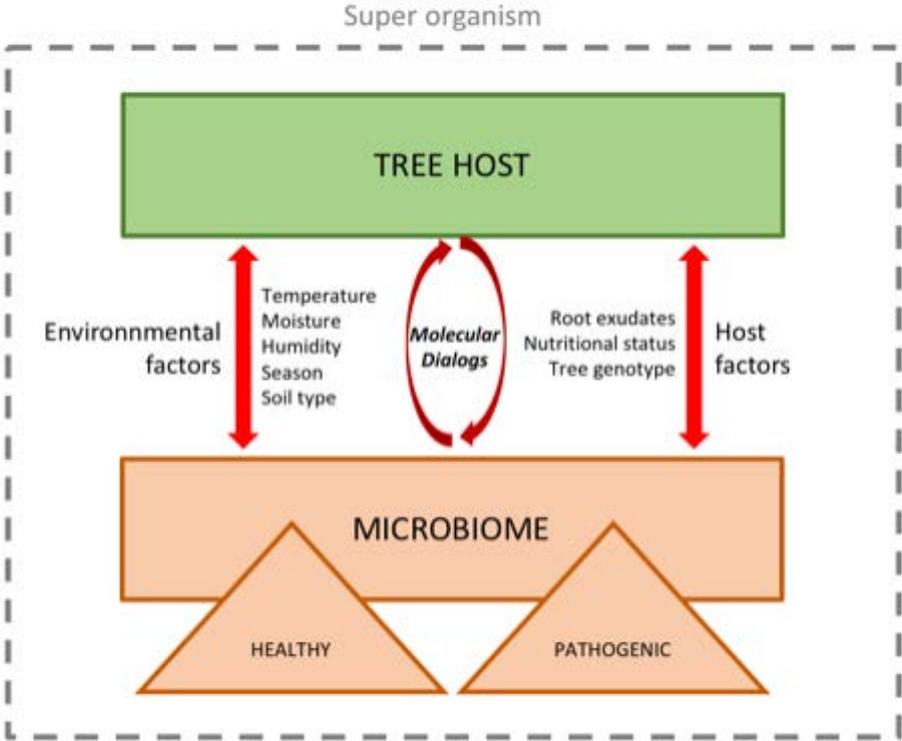


Figure 13 - Factors driving reciprocal interactions between trees and their microbiome

### Introduction

Like any other plants, nearly all tissues of trees are colonized by complex and diverse communities of microorganisms, so-called the tree microbiome. The most studied microbial associates of trees are the mycorrhizal fungi that establish mutualistic interactions with the roots of most trees (Lang et al., 2011). Yet tree tissues are home for other fungal types (e.g. endophytic fungi), bacteria, protists, algae and some invertebrates that tightly interact together and with their hosts (Sieber, 2007; Beck et al., 2014; Tedersoo et al., 2016; Proença et al., 2017;). These microorganisms colonize both the surfaces and the inner tissues of trees and fulfil a broad range of functions that overall enhance the health and development of trees (Taghavi et al., 2009; Mercado-Blanco, 2018). If some microorganisms have beneficial effect on their host, some others are deleterious to tree growth and health. Pathogenic agents integrated in the microbiome is called pathobiome (Vayssier-Taussat et al., 2014). Some members of the tree microbiome also contribute to biogeochemical cycles in soils (Akroume et al., 2019) and in the atmosphere (Yip et al., 2018). Understanding the contribution of these different groups of microorganisms and the balance regulating both is therefore crucial. Interactions between trees and their associated microbial communities are extremely complex and the network occurring between these multiple organisms have key role in tree health and disease. Trees and their microbiome should be considering as superorganisms. This observation gave birth to the concept of holobiont which consist of a collective view of the function and interactions between host organism and its associated microorganisms (Vandenkoornhuysen et al., 2015; **Figure 13**).

Recently, interest for plant microbiome increase and more and more important highlights appears. Most of the researches carried out so far on the interaction between plants and their microbiome have been done on model annual herbaceous plant such as *Arabidopsis thaliana*, which present a very different life cycle compared to the one of tree and which is not able to form association with mycorrhizal partners. In perennial woody plant, nutrient allocations which correspond to a major factor shaping the microbiome are different from those in non-perennial plant. In addition, trees are colonized by other types of microorganisms such as ectomycorrhizal fungi which could modify formation mechanisms of microbiome and response of tree host. They could help tree to have a higher capacity to adapt to many kinds of environmental conditions and climate change (Bulgarelli et al., 2013; Timm et al., 2016) thanks to a higher degree of plasticity, a shorter-term dynamic and a larger pool of genes of tree-associated microorganisms which form an extension of tree host genome (Panke-Buisse et al., 2015).

*Populus* has emerged as a model tree to study interactions between trees and their microbiomes (Shakya et al., 2013; Hacquard et al., 2015; Beckers et al., 2017; Cregger et al., 2018). This is likely due to the fact that poplar has become one of the main and powerful model systems in tree research in the past 15 years. Poplars have the advantages to grow rapidly, to have prolific and early sexual reproduction, and to show tight coupling between physiological traits and biomass productivity (Rae et al., 2004). In addition, some hybrids can be genetically modified and a number of species can be clonally propagated. Altogether with the numerous molecular tools and

databases that were generated following the sequencing of its genome (Tuskan et al., 2006), all these elements fostered the establishment of Poplar as the main model system for research in biology, genetics, molecular biology of trees and more recently tree-microbiome interactions. *Populus* was notably used to dissect the molecular mechanisms of the establishment of the ectomycorrhizal symbiosis, highlighting the prominent roles of fungal and Poplar small secreted proteins in the molecular dialog between the symbionts (Martin et al., 2016).

The scientific interest for *Populus* not only lies in its usefulness for basic science but also in its environmental and commercial importance. According to the classification established by Eckenwalder in 1996, the genus *Populus* regroups 29 species (plus an important number of hybrids) of deciduous trees in the family of Salicaceae. Distributed across the Northern hemisphere from subtropical to boreal ecosystems, poplars and cottonwoods dominate riparian forests and flooded forest stands (Rood & Mahoney, 1990; Braatne et al. 1996) while aspens are the most important boreal broadleaf trees (Peterson & Peterson, 1992). *Populus* species are cultivated in plantations across America, Europe and Asia. The 940.200 ha of *Populus* plantations in Europe produce about 8 millions m<sup>3</sup> per year. Although most of *Populus* products are nowadays exploited by the wood industry to produce plywood, sawn timber and pulpwood, there has been an increasing interest in the past years for using *Populus* as a source of fuel source and biomass for energy production. Thanks to their high tolerance to pollution and their ability to purify organically polluted soils, fast-growing poplar hybrids are being more and more utilized for phytoremediation (Yadav et al., 2010). New usages of *Populus* have recently stimulated the development of large scale breeding and biotechnology programs across the world to produce new varieties of fast growing Poplars that could be cultivated as crops for large scale production (Bredemeier et al., 2015; Hart et al., 2018).

We reviewed recent advances in *Populus* microbiome study to show the importance of improving holistic view across the different tissues of the tree and to highlight future key elements to be discovered. We will focus only on bacteria, archaea and fungi, as they are considered to be the main contributors to the tree phenotype and they are also the most studied.

### The root microbiome

Tree roots are an oasis of nutrients for microorganisms. Trees transfer 20 to 40 % of their photosynthetates to their roots and 10 to 30 % of this carbon is allocated to the root microbiome. Part of it is directly transferred to mycorrhizal fungi, which themselves offer a habitat to specific microbial community, while the other part is secreted as exudates in the zone of soil directly under the influence of roots, the rhizosphere (Lakshmanan et al., 2014). The main compounds of root exudates are the product of photosynthesis and secondary metabolites with important roles as chemical attractants and repellents in the rhizosphere. The composition of root exudates has been studied mainly to understand the potential of some species of *Populus* trees for phytoremediation allowing for the identification of secreted organic acids that are induced upon treatment with heavy metals such as malic acid, citric acid or oxalate (Qin et al., 2007; Naik et al., 2009) but not the one's that are constitutively produced. Thus, a complete description of the compounds secreted by *Populus* roots and their respective roles in selecting for the microbiome is still lacking.

### Root microbiome composition

In root, we could distinguish two major habitats: the rhizoplane which corresponds to the external surface of the root directly under the influence of the rhizosphere, and the endosphere which corresponds to the interior of the root. Composition and structure of microbial communities associated with these two different tissues but also the factors that contribute to this assembling were examined in many trees such as *Pinus* (Gallart et al., 2018), *Quercus* (Maeden et al., 2016) and *Fagus* (Goldmann et al., 2016; Colin et al., 2017). A recent study performed by Toju and colleagues in 2018 explored hubs within metacommunity-scale networks of tree-fungi interactions across 8 forest ecosystems.

Dominant bacterial phyla in *Populus deltoides* roots (rhizosphere and endosphere) were Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria and Verrucomicrobia and dominant fungal phyla were Ascomycota, Basidiomycota and Chytridiomycota. Observation of rhizosphere and endophyte communities of both bacteria and fungi associated with roots in *Populus deltoides* showed that dominant phyla were present in rhizosphere but in difference abundance, suggesting that endosphere constitute a unique niche for microbial communities (Gottel et al., 2011; Shakya et al., 2013).

Ratio of EcM and AM colonization are different according to different factors such as type of soil and *Populus* genotype (Karlinski et al., 2010). EcM fungi associated with *Populus* included species of *Laccaria*, *Hebeloma*, *Tuber* and *Cortinarius* (Gottel et al., 2011; Guevara et al., 2013). Recent works insighted the key role of Mycorrhizal-Induced Small Secreted Protein (MiSSP) in the formation of EcM-tree symbiosis formation. By studying the interaction model between *Populus* and *Laccaria*, Plett et al. (2014) showed that the production of a MiSSP of 7kDa (MiSSP7) by the EcM fungus and its interactions with the *Populus* transcriptional repressor JASMONATE ZIM DOMAIN protein 6 (JAZ6) altered the hormonal balance of the tree defence system allowing the formation of symbiosis. Future investigations are needed to understand the signalling interactions of *Populus* species with other EcM fungi to improve our knowledge related to model pattern of interactions. For example, other MiSSP are currently be taken in account such as role of MiSSP8 in the ectomycorrhizal symbiosis establishment (Pellegrin et al., 2017).

AM fungi associated with *Populus* roots mostly belonged to the genus *Glomus* (Beauchamp et al., 2006; Bonito et al., 2014). AM fungi colonization dominated in early stages of *Populus* life then the ratio of EcM and AM fungi changed during development (Takacs et al., 2005).

Endophytes were defined as microorganisms such as bacteria and fungi inhabiting the plant endosphere during all part of their life cycle regardless of the outcome of association. In roots, both bacterial and fungal endophytes were isolated from endosphere. Bacterial endophytes attached to the rhizoplane and entered in the endosphere by openings where root hairs and lateral roots emerged (Hardoim et al., 2015). In *Populus*, most abundant bacterial endophytes have been characterized to belong to Gammaproteobacteria with *Serratia* spp, *Pseudomonas* spp and *Enterobacter* spp., and Actinobacteria with *Rhodococcus* spp (Taghavi et al., 2009). Dark-septate fungi and other fungal endophytes have been discovered in most *Populus* roots (Helm et al., 1996).

Fungal endophytes associated with *Populus* roots belonged to *Cadophora*, *Exophiala* and *Leptodontidium* (Bonito et al., 2016).

Some studies have examined the fungal community composition and structure (Bonito et al., 2016) whereas some others have studied the bacterial community composition and structure (Beckers et al., 2017). But recently, some root microbiome studies have included bacterial and fungal community composition observation in the same experimental set-up (Shakya et al., 2013; Bonito et al., 2014; Cregger et al., 2018; Table 1). In these works, different compartments of the soil and the roots have been defined. The shift in the microbial community composition across these different compartments are today well known (Gottel et al., 2011; Beckers et al., 2017) but these works give important insight concerning the effect of different drivers of the root microbiome composition.

### **The main drivers of the root microbiome composition**

The root microbiome composition is influenced by environmental factors, host factors but also by complex molecular dialogs occurring between host plant and microbial communities, particularly for both EcM and AM symbiosis establishment. The factors impacting the structure of bacterial and fungal communities in trees were soil type, temperature variation (Baum and Makeschin, 2000; Bonito et al., 2014), host genotype or host species and tree age (Shakya et al., 2013; Cregger et al., 2018).

Both bacterial and fungal community composition varied more so across root compartment (rhizosphere vs. endosphere) than between host genotype. This observation suggests an environmental filtering and a selective force for microbial communities of tree roots. Soil type and nutrient availability played an important role on microbial community composition. Soil type had a stronger effect on fungal community composition of *Populus* (Bonito et al., 2014). For example, nitrogen and phosphorus fertilization significantly reduced EcM colonization rate in *P. trichocarpa* and *P. tremula x tremuloides* (Baum & Makeschin, 2000) whereas moisture increased mycorrhizal fungi colonization (Lodge, 1989). In *P. deltoides*, bacterial communities in the roots are more structured by plant host species than by soil type (Bonito et al., 2014). In a lower extent, seasonal variation has been shown to also impact microbial community composition in *Populus* root endosphere (Shakya et al., 2013).

One of *Populus* hybrid, *Populus tremula x alba* also called 717-1B4 clone, and also *P. deltoides* are particularly appreciated by researchers due to its ability to be easy genetically transformed. Comparison between microbial communities associated with wild-type *Populus* and transgenic lines is particularly helpful to study the main drivers of the root microbiome composition. Some studies have been performed with this strategy with trees modified in their cellulose biosynthesis and cell wall composition (Veach et al., 2018) and with trees modified in their lignin biosynthesis (Beckers et al., 2015). Taken together, these works from both greenhouse and field conditions showed that potential modifications in microbial community structure and diversity in roots of *Populus* are the results of some alteration in the host tree primary and secondary metabolism. In ectomycorrhizal (EcM) symbiosis, the fungi exchange soil-derivate nutrients for carbohydrates from the host tree. In 2014, Tschaplinski et al., compared metabolomes of EcM root tips in compatible (*P. trichocarpa* with *L. bicolor*) and incompatible (*P. deltoides* with *L. bicolor*) interactions. The result of this study showed that incompatible relationship was

characterized by a reduced number of regulated metabolites in roots in contact with fungus hyphae and a higher accumulation of metabolites related to tree defence.

### Main functions of *Populus* root microbiome

The basic functions of mycorrhizal fungi in terms of nutrients and water exchange with tree are well characterized (Bücking et al., 2012). In the tree root microbiome, archaea community composition has been less examined than bacterial community composition probably because their ecological functions for tree host remain unclear. Novel insights obtained by metagenomics analyses shows archaea is an important functional component of the plant microbiome thanks to its ability to promote plant growth through auxin biosynthesis and nutrient supply (Taffner et al., 2018).

*Populus* is also able to interact with a variety of bacterial and fungal root endophytes. Bacterial root endophytes have been well characterized to have different functions for host *Populus*. They promote *Populus* growth with an important increase of total biomass through production of auxin (IAA), phytohormone involved in plant growth processes (Khan et al., 2016). If many studies on interactions between *Populus* and mycorrhizal fungi are available, few works have been performed on fungal root endophytes. The presence of fungal endophytes in plants (Carroll, 1988) and in *Populus* in natural conditions is well established but the diversity and ecological function for host tree are still not well known. Some studies revealed that fungal root endophytes have an important role for plant physiology and health (Varma et al., 1999; Lugtenberg et al., 2016; Patle et al., 2018). One species of this order, *Atractiella rhizophila*, was characterized and *Populus* inoculation assays revealed a faster plant growth and elevated photosynthesis rates (Bonito et al., 2017).

Currently, one of the most important wide-scale perturbation is drought, which has recently been shown to alter the composition and structure of forest. In temperate forest but also in boreal and tropical forest, drought and heat related physiological stress promote tree mortality (Law, 2015). A study observed how the bacterial communities associated with *P. deltoides* roots changed in response to water (drought) and light (shade) limitation. It has been shown that these treatments resulted in significant shifts in bacterial community at the phylum level and that a cluster of OTUs either increase or decrease in abundance (Timm et al., 2018). Inoculation of 10 endophytes (9 bacteria and 1 yeast) in *P. deltoides* x *nigra* resulted in substantial growth promotion with improved leaf physiology after periods of drought (Khan et al., 2016). *Populus* form also associations with EcM fungi communities that are known to help tree contend to drought. *P. euphratica*, a drought-sensitive *Populus* displayed an improved water status in roots thanks to the presence of the EcM fungi *Paxillus involutus* although no mycorrhizae were formed (Luo et al., 2009).

As one of the most often used tree species in phytoremediation, *Populus* play significant role in remediation of contaminated sites thanks to its to high biomass production and rapid growth. Study of bacterial communities associated to the roots of *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* planted in an industrial phytomanaged site contaminated with mercury revealed contrasting bacterial communities in different tree habitats (soil, roots, leaves and stem; Durand et al., 2018). Copper stress was compared to water and light limitation stress in *Populus deltoides*. Even if metal stress was likely the least severe of the three, as indicated by growth measurements and

transcriptional responses of tree, changes in the microbiome response was observed (Timm et al., 2018). A variety of studies have examined the response of AM fungi to different soil pollutant or to different abiotic stress in *Populus* clones selected for phytoremediation of contaminated soil (Takacs et al., 2005; Lingua et al., 2008; Liu et al., 2015). It is clear AM fungi enhanced tree growth and reduced biomass losses during stress but the mechanism and functioning of AM and EcM fungi dual symbiosis in *Populus* roots are currently not known.

### The phyllosphere, stem and wood microbiome

The phyllosphere corresponds to the leaves of plants. It is considered relatively nutrient poor but a much more dynamic habitat in comparison with the rhizosphere because of strong environmental constraints with high fluctuation along the day such as temperature, humidity and solar radiation. Phyllosphere and stem microbiota play a critical role in protecting plants from diseases and promoting their growth by different mechanisms (Turner et al., 2013).

#### Phyllosphere and stem microbiome composition

Associated microbial communities structure and diversity have been observed in several tree species such as European beech (Cordier et al., 2012), pines (Beule et al., 2017) or olive tree (Pascazio et al., 2015). Some other studies have compared the bacterial (Laforest-Lapointe et al., 2016; Lambais et al., 2006) and fungal (Izuno et al., 2016) community structure of phyllosphere of tree inhabiting the same type of forest.

Concerning, microbial communities associated with *Populus* leaves and stem, recent works begin to appear. In field-grown *P. tremula x alba* trees, bacterial colonization of the stem and leaves was highly variable compared to rhizosphere colonization in terms of diversity and community composition. This observation confirmed that additional skills are required to colonize the different tree niches (Beckers et al., 2017). In *Populus* leaves (surface and endosphere), dominant bacteria phyla were Alphaproteobacteria (43% in terms of relative abundance), Gammaproteobacteria (42%), Actinobacteria (5%), Betaproteobacteria (3%) and Bacteroidetes (3%) and dominant fungal phyla were Ascomycota (85%) and Basidiomycota (9%). In *Populus* stem (surface and endosphere), dominant bacterial phyla were Alphaproteobacteria (58%), Actinobacteria (20%), Gammaproteobacteria (9,5%) and Bacteroidetes (7,5%) and dominant fungal phyla were Ascomycota (70%) and Basidiomycota (25 %) but also Chytridiomycota and Glomeromycota (3% each; Cregger et al, 2018).

About 1000 fungal endophytic isolates belonging to *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes* and *Helotiales* were obtained from 175 *P. tremula* leaves (Albrechtsen et al., 2010). A total of 513 bacterial endophytic isolates were found in several poplar clones leaves and the majority of these isolates were related to common endophytic and soil bacteria. They belonged to *Curtobacterium*, *Plantibacter*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* (Ulrich et al., 2008).

Endophytic microbes colonized plant roots are able to enter in the plant vascular system to be transferred and thus colonize the aerial tissues of the plant (Whipps et al., 2008). In their *Populus* holobiont study of 2017, Beckers et al. demonstrated that *P. tremula x alba* stem endosphere present a decreased richness comparable

with those of the phyllosphere compared to the roots. These results are in concordance with the general view of endophytic colonization. Bacterial and fungal endophytes can be horizontally acquired from the environment in each generation. Endophytic lifestyle is dependent to the ability of bacteria from the soil to actively or passively pass the endodermis and the pericycle, reach the xylem vessels and finally lead to systemic colonization of the plant (Hardoim *et al.*, 2008). Microbial endophytes can be also vertically transmitted from generation to generation via seed (Zilber-Rosenberg *et al.*, 2008).

In spite of several studies performed on phyllosphere microbial communities in leaves and stem of *Populus* (Balint *et al.*, 2014; Busby *et al.*, 2015; Doty *et al.*, 2016), our knowledge related to the structure and composition of both bacterial and fungal communities associated with *Populus* leaves and stem remains partial in comparison with *Populus* root microbiome.

Recently, new studies carried out on the whole tree microbiome (soil, root, leaves and stem) allow us to better understand the specific interactions, mechanisms and functions associated with microbial colonization of the aerial tissues of *Populus* (Beckers *et al.*, 2015, 2017; Cregger *et al.*, 2018; Durand *et al.*, 2017, 2018; Table 1).

### **The main drivers of the phyllosphere and stem microbiome composition**

While the microbiome of *Populus* roots is influenced by soil type and host genotype, less is known about the main drivers that impact microbial communities of the phyllosphere and stem. The phyllosphere corresponds to the plant-air interface which is characterized by permanently changing abiotic conditions.

Microorganisms associated with leaves or stem provide and vary in composition and diversity according to seasonal variations as well as in response to environmental disturbance such as rainfall or wind. Both bacterial and fungal community composition shifted more so across habitat (soil, roots, stem and leaves) than between *Populus* tree genotype (Cregger *et al.*, 2018). In *P. balsamifera*, warming strongly influenced the diversity and structure of the foliar fungal microbiome especially fungal endophytic communities (Balint *et al.*, 2014). These observations agree with the hypothesis that microbial communities vary across the different tree compartment due to different environmental stress associated with the different geographical range of *Populus* genotype.

In *P. deltoides* and in *P. trichocarpa x deltoides*, stem had similar bacterial alpha diversity than roots but fungal alpha diversity was higher in stems than in leaf or root habitat (Cregger *et al.*, 2018). In *P. balsamifera*, fungal communities associated with leaves of trees growing in a common garden were differently structured according to host genotype (Balint *et al.*, 2013). These results, in comparison with those of Beckers *et al.*, suggest that host tree genotype play also a key role in the composition of microbial communities in phyllosphere and stem. Fungal microbiome within leaf habitat varied more so between tree genotypes compared to habitat, likely due to the greater abundance of two dominant fungal pathogens (*Massonina* and *Septoria* cause leaf spots and stem cankers) in the hybrid *P. trichocarpa x deltoides* (Cregger *et al.*, 2018). Bacterial communities associated with *Populus* phyllosphere are also influenced by volatile organic compound (VOC) produced by trees. Of the same age as the root exudates, these VOC are emitted by the tree and condition the installation of specific microbes. Isoprene is a climate-active gas produced in huge amount by tree. This compound promoted the *Populus* leaves

colonization by active isoprene-degrading bacterial populations belonging to the genus *Rhodococcus* (Crombie et al., 2018).

### Main functions of *Populus* phyllosphere and stem microbiome

As mentioned previously, microbiome is important for plant health and nutrient acquisition. Microbial interactions in the phyllosphere could affect the fitness of tree but in comparison to the roots system and the soil, this tree niche is less studied. In 2016, Doty et al. showed that nitrogen ( $N_2$ ) fixation is possible in wild *Populus trichocarpa* branch by using both  $^{15}N_2$  incorporation and acetylene reduction assay. Nitrogen fixation could be performed by endophytic or closely associated nitrogen-fixing microorganisms.

Fungal pathogen presence in leaves raises some questions about the climate change reactions known to increase pathogen abundances in tree host (Balint et al., 2014). But some recent works have shown that common foliar fungal antagonist could be used to bolster resistance to rust disease in *Populus* plantations, suggesting that naturally occurring fungal foliar endophytes partially determine disease severity (Busby et al., 2015; 2016). In pedunculated oak, another important tree model, a non-pathogenic bacteria strain (*Streptomyces* sp. AcH505) protects tree host from the pathogen responsible of oak powdery mildew (Kurth et al., 2014).

Characterization of fungal communities from different *Populus trichocarpa* × *maximowiczii* compartment at a Hg-contaminated phytomanagement site had led to isolate some Hg-resistant yeast strains from the leaf habitat. *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp., and *Alternaria alternate* were highly represented in *Populus* leaves and were known to be an active phyllosphere colonizer with specific capacity to bind heavy metals to the cell surfaces (Durand et al., 2017). The bacterial communities from the phyllosphere were altogether less resistant than the communities of the soil and roots, potentially due to the direct contact between soil bacterial communities and higher amounts of Hg in the soil. In the leaf and stem, OTUs from the genus *Deinococcus* the most abundant OTU and were not detected in soil and roots. This genus of bacteria corresponds to extremophile bacteria resistant to very high doses of radiation and long periods of desiccation (Durand et al., 2018).

### The wood microbiome

Microbiome of wood have been studied in several woody plant such as *Pinus* (Proença et al., 2017) and *Quercus* (Denman et al., 2017) with the goal to provide new insight into microbial interactions and tree disease.

The number of publications on *Populus* wood microbiome is very low as compared to root and phyllosphere microbiome (Figure 14), but only few studies recently provided some interesting results concerning the composition of microbial communities associated with wood and factors shaping wood microbiome. Culturable fungal endophytes have been examined within the woody tissues of branches of *Populus angustifolia* (Lamit et al., 2014). In *Populus deltoides*, wood environments are dominated by anaerobic microbes with a prominence

of methanogens in heartwood compared to sapwood. Contrary to root and phyllosphere microbiome, wood associated microbial communities are only shaped by environmental conditions (Yip et al., 2018).

### Understanding complex tree host – microbes interactions

#### The *Populus* core microbiota

The principle of a core microbiota has been proposed to describe the microbial community that is systematically associated with a given plant genotype. Based on its taxonomic composition, the core microbiota could provide some key basis related to component species colonizing *Populus* tree and gain further insight into the complex host-microbe interactions.

In addition to this taxonomical approach, functional approach is also possible by using metagenomics and metatranscriptomic analyses to predict potential functions of tree microbiome (Vandenkoornhuysen et al., 2015).

In *Populus tremula x alba*, core bacterial microbiome has been defined as the 10 most abundant OTUs of each of the studied tree compartments (rhizosphere soil, roots, stem and leaves). Beckers et al. (2017) observed significant tree compartment effects across core bacterial OTUs with only 16,4 % of total OTUs shared by all tree compartments. In *Populus deltoides* tree, core microbiome of both fungal and bacterial OTUs was identified in root rhizosphere and endosphere of the set of sampled trees. The core bacterial microbiome in the rhizosphere was comprised of 35 OTUs belonging to the order of *Bulkholderiales* and *Rhizobiales* and only one OTU in the root endosphere. The core fungal microbiome was comprised of four rhizosphere OTUs and one endosphere OTU represented by genus *Exophiala*, *Metarhizium*, *Neoseptia* sp. and *Mortierella* known to promote plant growth (Shakya et al., 2013). During abiotic stress (drought, shading and copper pollution), the relative abundance of some communities of the core bacterial microbiome in *Populus deltoides* roots changed. This shift highlighted the presence of a “core stress microbiome”, opening some interesting ways in tree-microbial community manipulation to promote and improve tree growth and productivity (Timm et al., 2018).

As these two studies on poplar microbiome show, the number of fungal and bacterial OTUs shared by the different compartments of the tree is rather low. A small set of OTUs forming the core microbiome should encourage genome sequencing of isolates and controlled inoculations experiments for understanding the detailed mechanisms of interactions between microbial communities and host *Populus*.

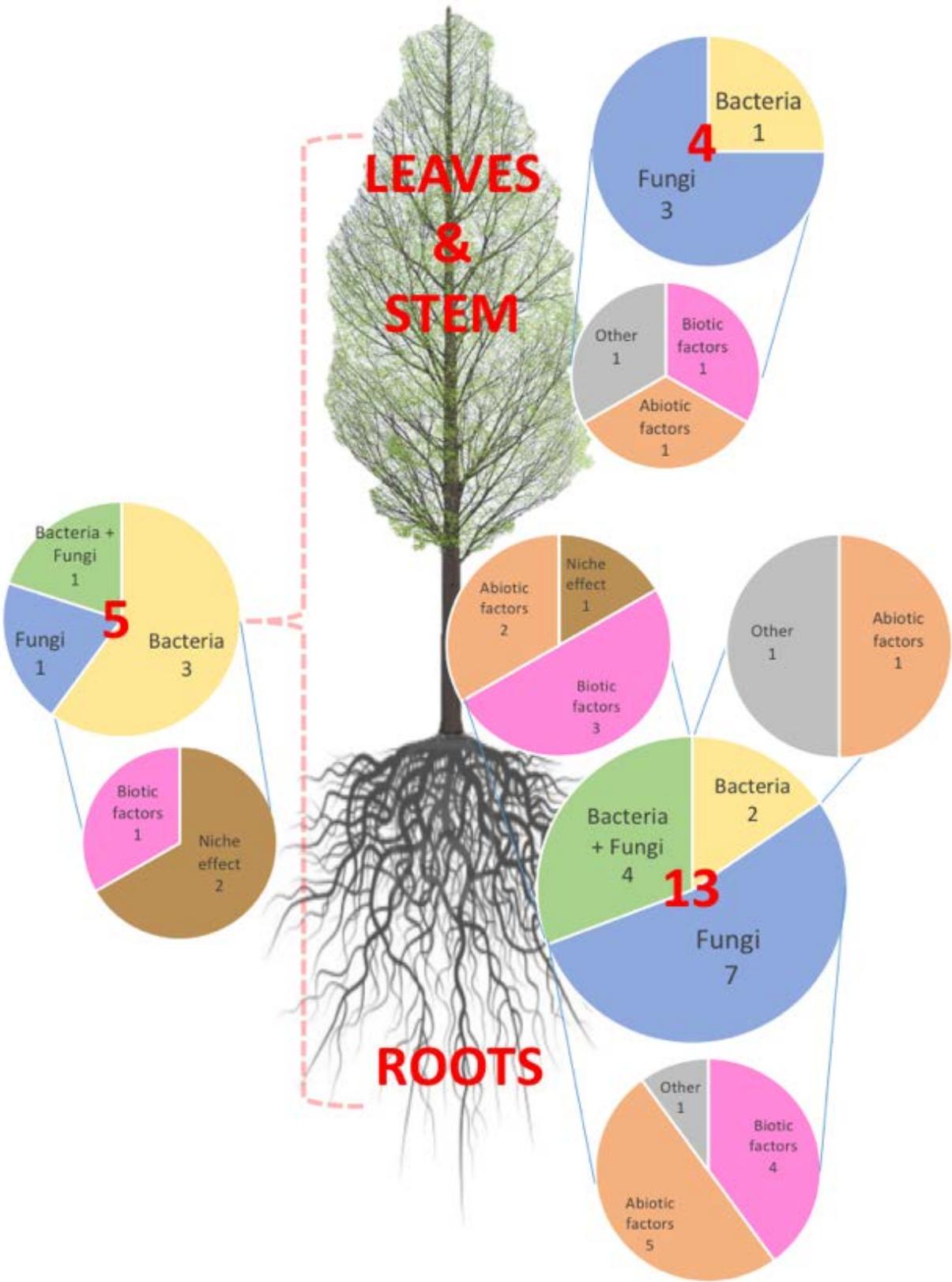


Figure 14 - Number of available publications dealing with *Populus* microbiome by studied microorganisms and influence factors

### The *Populus holobiont*

Understanding microbial community composition and structure variations in the different plant-habitat from leaves to roots and soil is crucial to improve our knowledge of the impact of microbiome on plant. To understand the role of microbiome, it is very important to pay attention to the different factors which contribute to the microbiome shaping in order to understand the effect of *Populus holobiont* on tree health. A new field of research is currently appearing in which the *Populus holobiont* is taking account (Beckers *et al.*, 2017; Cregger *et al.*, 2018) but some key informations are still lacking and should be a priority (**Figure 14**). They concern (1) the function of the microbiome, (2) the molecular dialog occurring between microorganism and tree host, and (3) the assemblage mechanism of microbial community shaping by tree host. Microorganisms live in complex interactions with other members of the microbiome, host plant but also environment. Despite the different omics techniques and data available (Zuniga *et al.*, 2017), deciphering the nature and function of these multitude of interactions is a great challenge for scientists. Investigating the biosynthetic potential of the *Populus* microbiome is now possible by analysing metagenomic data and pool of sequences bacterial isolates taken from the *Populus* roots. The development of this strategy based on bacterial natural products isolation is a great opportunity to discover new bacterial molecules involved in important functions for the tree host or involved in communication and control in the microbiome (Blair *et al.*, 2018).

Understanding the complex host-microorganisms interaction could provide some important basis and help to realize the goal of engineering host phenotype through microbiome manipulation for example the use of these interactions in phytoremediation and sustainable tree culture management (Timm *et al.*, 2016). We described recent studies performed on *Populus* microbiome but comparison with other tree model such as *Pinus*, *Quercus* or *Eucalyptus* should provide additional key information to understand the role of tree-associated microorganisms of forest ecosystem.

## VI. Objectifs de la thèse

Les associations entre les plantes, les champignons et les bactéries sont ubiquistes dans le règne végétal. Elles peuvent être de différents types, allant de la symbiose mutualiste à des interactions neutres (endophytes) ou néfastes avec les micro-organismes pathogènes. Les communautés microbiennes (microbiote) associées aux plantes jouent donc un rôle majeur dans leur croissance et leur développement.

La plupart des études menées sur le microbiote racinaire concernent la plante modèle herbacée *Arabidopsis thaliana* et les plantes de grandes cultures telles que le blé ou le riz (Lundberg et al., 2012 ; Rascovan et al., 2016 ; Edwards et al., 2015). Les communautés fongiques et bactériennes associées aux racines sont modulées par de nombreux facteurs abiotiques, tels que le type de sol (Bonito et al., 2014 ; Veach et al., 2019) et le climat (variations saisonnières, température, humidité et sécheresse extrême) (Shakya et al., 2013 ; Felsmann et al., 2015 ; Mercado-Blanco et al., 2018), mais également par des facteurs biotiques, tels que la composition des exsudats racinaires, les métabolites secondaires accumulés dans les tissus racinaires et le génotype de l'hôte (Compant et al., 2019).

Sur la base des connaissances acquises et évoquées précédemment, il est clairement établi que la constitution du microbiote racinaire des arbres dépend fortement du réservoir de micro-organismes disponibles dans le sol environnant et de la capacité des arbres à sélectionner activement certains de ces micro-organismes. Toutefois, l'importance relative de ces deux grands facteurs ainsi que les mécanismes par lesquels les arbres sélectionnent leur microbiote ne sont pas encore complètement connus.

Dans ce contexte, nous avons émis trois hypothèses :

1. Les variations naturelles au sein des communautés microbiennes (champignons et bactéries) du sol ont un effet majeur sur la formation du microbiote racinaire de l'arbre,
2. Les modifications du microbiote racinaire altèrent la physiologie de l'holobionte et sa capacité d'adaptation aux potentielles modifications climatiques,
3. La manipulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique via l'effecteur fongique MiSSP7 influence la composition et la structuration du microbiote racinaire et la physiologie de l'holobionte.

Pour tester ces différentes hypothèses, nous avons choisi le peuplier comme système modèle. De plus, différentes approches expérimentales et analytiques ont été employées : couplage du séquençage haut débit de l'ADN microbien (en anglais, DNA metabarcoding), de la microscopie confocale pour caractériser les micro-organismes de la rhizosphère et de l'endosphère de l'arbre, des analyses métabolomiques pour étudier l'impact du microbiote sur le métabolisme de l'holobionte et/ou des analyses métatranscriptomiques pour connaître les communautés de micro-organismes les plus actifs du microbiote racinaire de l'arbre.

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

Ma thèse est divisée en quatre chapitres avec pour objectifs de répondre aux questions suivantes :

- ✓ Chapitre II : Comment se fait la colonisation des racines vierges de l'arbre par les communautés de champignons et de bactéries du sol ? Cette colonisation de la racine par les micro-organismes rhizosphériques est-elle simultanée ou obéit-elle à une chronoséquence ?
- ✓ Chapitre III : Quelle est la contribution relative du sol, du génotype et du climat sur la composition et la structuration du microbiote racinaire du peuplier noir ?
- ✓ Chapitre IV : Quel est l'impact des variations naturelles au sein des communautés microbiennes du sol sur la composition et la structure du microbiote racinaire de l'arbre ?
- ✓ Chapitre V : En modulant la voie de signalisation de l'acide jasmonique, les champignons ectomycorhiziens influencent-ils la composition et la structure du microbiote racinaire ?