

Approche de la diversité des champignons lignivores dans le bois d'œuvre en classe 4 (contact avec le sol)

Certains champignons lignivores causent des dégâts importants aux constructions en bois et dans certaines circonstances aux forêts et aux stocks de bois brut. La diversité de ces champignons commence à peine à être décrite. Au-delà des implications en termes sylvicoles, cette information est importante pour la compréhension des divers risques biologiques encourus dans les différentes classes d'emploi et de leurs conséquences en termes de protection du bois. FCBA a décidé de traiter cette problématique afin de soutenir le développement de nouvelles solutions techniques en expertise et protection du bois. Nous avons donc testé en 2012 la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic en masse par l'analyse de l'ADN (métagénomique) des champignons qui se développent en conditions de test normalisé de la durabilité du bois en contact avec le sol (classe d'emploi 4).

Introduction

Les champignons qualifiés de lignivores participent à de nombreux processus biologiques importants pour la filière forêt-bois. Outre la décomposition du bois mort en forêt et la dégradation du bois d'œuvre, ils interviennent selon leur espèce et les circonstances dans un ou plusieurs phénomènes importants pour la vie de l'arbre. La mycorhize, symbiose entre un ou plusieurs champignons et les racines de l'arbre, permet à chacun des partenaires d'échanger avec l'autre des nutriments qu'il a captés ou élaborés. Les champignons mycorhiziens facilitent ainsi la croissance de l'arbre et sa résistance aux stress, particulièrement ceux liés au sol (sécheresse, pauvreté minérale, calcaire, présence de substances toxiques...). Le feutrage mycélien (*mycelium*) constitue une véritable extension des racines de l'arbre.

Certains champignons mycorhiziens sont comestibles (truffes et cèpes pour ne citer que les plus appréciés). D'autres champignons mycorhiziens ou non sont des antagonistes de champignons pathogènes tels que les agents de pourriture (pourridiés ; fomes et armillaire notamment). La mycorhization naturelle ou artificielle facilite la croissance juvénile et la survie des jeunes plants. Certains de ces champignons favorables à l'arbre commencent à être cultivés de manière à en produire des inoculum utilisables comme agents de lutte



Figure 1: Les carpophore d'armillaire présents sur cet arbre ne représentent que la fructification du champignon mais permettent son identification visuelle rapide - : (Crédit photo L Harvengt).

biologique et/ou de fortification ("biofertilisation") des plants forestiers (mycorhizes et endophytes).

Jusque dans les années 90, l'identification des champignons n'était réalisable de manière plus ou moins rapide qu'à partir de leurs fructifications (c'est à dire le carpophore constitué par ce que nous appelons plus communément "le pied" et le "chapeau", cf. **figure 1**) qui ne sont formées que fugitivement par le mycélium, ou leurs spores (produites par les fructifications). Seuls des amateurs éclairés ou des professionnels spécialistes pouvaient également étudier les filaments (le mycélium) qui

constituent l'essentiel du "corps" des champignons et qui est présent en permanence. Des outils basés sur l'analyse de l'ADN sont apparus progressivement, permettant d'identifier plus précisément un nombre d'espèces initialement très restreint qui a fortement augmenté au fil des ans. FCBA a ainsi développé une boîte à outils d'identification de champignons prélevés dans des bâtiments comprenant des structures en bois dégradées (Maitre et al 2008).

Première étude de la mycoflore de la dégradation du bois en forêt au cours d'un essai normalisé

Dès la création de FCBA, les laboratoires de biotechnologie et de biologie des bio-agresseurs du bois ont uni leurs forces pour développer et mettre en place de nouveaux outils au service des problématiques liées à la dégradation du bois stocké ou mis en œuvre dans la construction. L'étude de l'ADN des champignons permet de les identifier. La mise au point de nouveaux outils de diagnostic nous permet d'identifier des champignons à partir de traces infimes prélevées sur un ouvrage en bois, un bâtiment ou un simple piquet. Diverses impuretés chimiques naturelles ou synthétiques telles que les polyphénols du bois et les traitements de protection compliquent toutefois le diagnostic en bloquant les réactions chimiques nécessaires à la mise en œuvre de l'analyse des échantillons. Des traitements poussés de purification de l'ADN sont alors nécessaires sans garantie de succès car, outre une élimination incomplète des substances bloquantes, ils peuvent en entraîner une dégradation physique accrue ou une perte plus ou moins importante d'ADN.

Ces analyses sont mises en œuvre en semi-routine dans des situations où la détermination visuelle (macro et/ou microscopique) est impossible ou pour la confirmer si elle est incertaine. Outre le recours au séquençage, nous avons mis au point une batterie de tests plus rapides (présence/absence) d'une vingtaine d'espèces fongiques de référence.

Ces tests étant adaptés à des analyses très ponctuelles, nous mettons progressivement au point des méthodes d'étude plus globales afin d'acquérir des données de référence décrivant de manière très large la diversité des champignons dégradant le bois dans des situations opérationnelles variées. Nous avons ainsi réalisé en 2012 une étude préliminaire de la dégradation progressive en forêt de bois de plusieurs essences en mettant en œuvre un outil d'analyse en masse de l'ADN (analyse métagénomique) jusque-là utilisé uniquement dans des recherches en écologie.

Le dispositif

Nous avons mis en place un dispositif expérimental adapté de la norme EN 252, qui permet de déterminer la durabilité d'un bois en classe d'emploi 4. Ce dispositif est constitué de piquets semi-enterrés

dans le sol d'une clairière située dans une forêt mixte (feuillus-résineux) située sur l'île d'Oléron (minimisant *a priori* l'apport de spores fongiques issues d'autres sites du fait de sa situation géographique et de la direction des vents dominants, **figure 2**). Des piquets (non traités) de trois essences de bois (chêne, hêtre et pin sylvestre ; 18 piquets de 50 cm de long par

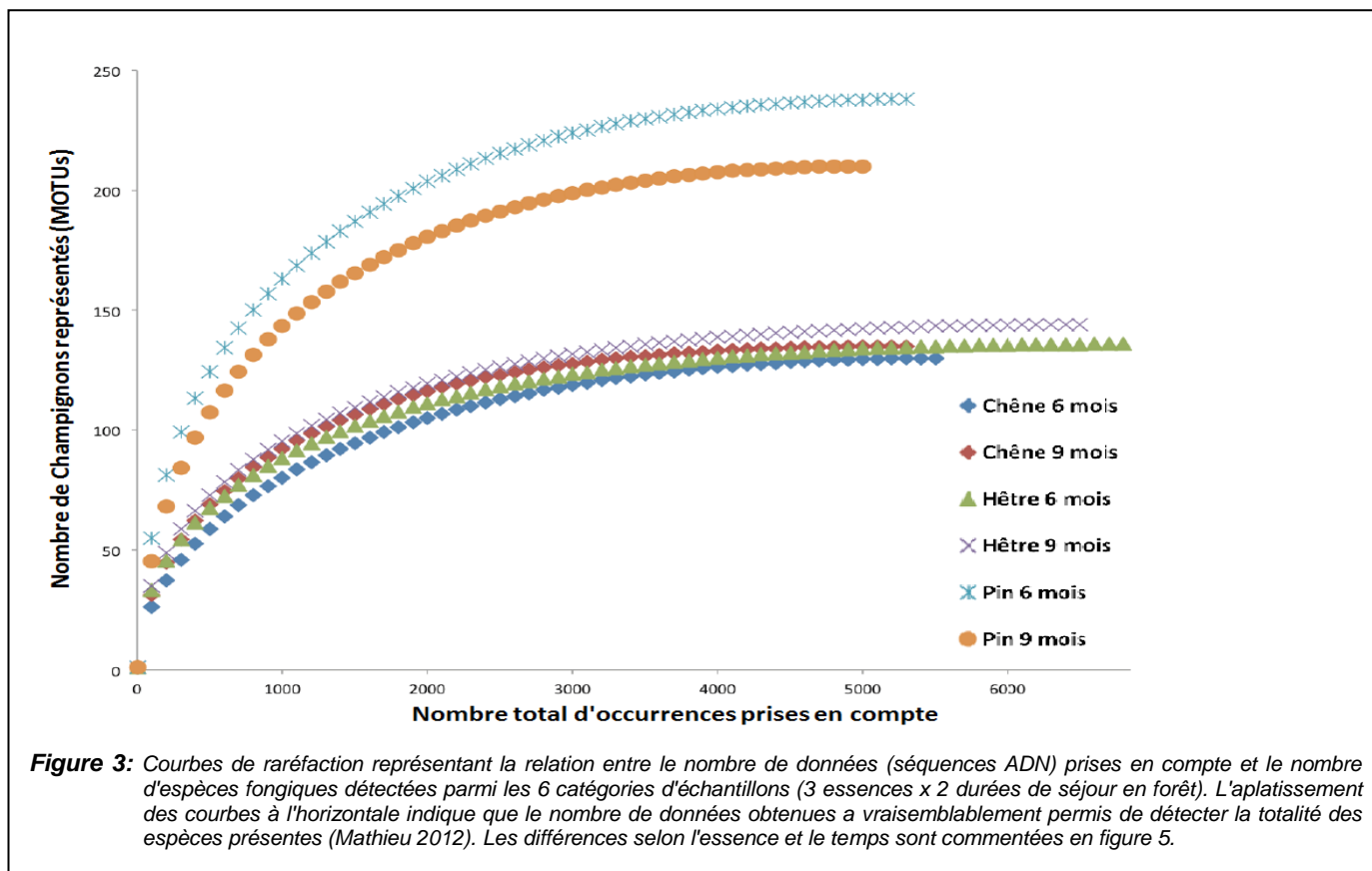


Figure 2: Aperçu du dispositif EN 252 à Oléron dont la mycoflore a été caractérisée en 2012 par une approche métagénomique (Crédit photo FCBA).

essence) ont été plantés jusqu'à mi-longueur dans le sol de la parcelle selon un schéma aléatoire avec trois blocs (trois sous-parcelles comprenant chacune 6 piquets de chaque essence).

Echantillonnage et analyses

Un prélèvement aléatoire de 3 piquets de chaque essence par zone a été effectué 3 et 6 mois après leur mise en place. Après nettoyage de la surface extérieure des piquets, de la sciure a été prélevée à l'aide d'une perceuse en trois points répartis sur leur partie enterrée. La mèche a été stérilisée entre les prélèvements. Un échantillon de sol a également été prélevé par deux fois au voisinage des piquets, au moment de leur implantation puis de leur arrachage pour analyse. Les échantillons de sciure des trois points de forage des trois piquets d'une même essence, échantillonnés en même temps dans un même bloc ont été rassemblés pour constituer un seul « méta-échantillon » qui a fait l'objet d'une extraction chimique de l'ADN. Les échantillons de sols ont été traités de la même façon, fournissant trois échantillons d'ADN de sol pour chaque zone à chacune des trois dates de prélèvement (0, 3 et 6 mois après installation des piquets). Les piquets restants ont été arrachés trois mois plus tard sans faire l'objet d'une analyse ADN. Ils ont été conservés pour un projet ultérieur.



Le niveau de dégradation du bois de tous les piquets a été noté selon l'échelle de 0 à 4 de cotation visuelle définie par la norme EN 252. Même pour les piquets laissés en place 9 mois, la dégradation n'a jamais dépassé le niveau 1 (très faible dégradation).

L'ADN total obtenu a fait l'objet d'une PCR (sorte de "photocopiage" permettant d'amplifier de façon exponentielle une partie de l'ADN ciblée avec une spécificité contrôlée). Les produits de cette PCR ont alors fait l'objet d'un séquençage en masse, générant au total 85 000 séquences ADN, dont 48 000 (un quart provenant des échantillons de sol et trois quart du bois) ont été gardées après filtrage selon leur qualité ("lisibilité"). La comparaison avec les bases de données de références ont permis d'en attribuer 87% à des champignons tandis que 1,4 % correspondent à de l'ADN végétal. Les organismes auxquels appartiennent les 11,6 % restants sont inconnus (bactéries, champignons ou éventuellement plantes ou animaux dont la séquence de l'ADN ribosomal ne figure pas encore dans les bases de données).

Les 6 espèces les plus abondantes sont des coprins qui représentent collectivement 6% des champignons retrouvés (espèces ou genre). On retrouve également en bonne place l'armillaire et l'hypholome. *Phlebiopsis gigantea*, l'espèce utilisée pour la lutte biologique contre le fomes (Rotstop®) est retrouvée parmi les espèces mineures (ici uniquement dans le bois de pin).

Les courbes de raréfaction (nombre d'organismes représentés en fonction de la quantité de données prises en compte) que nous avons tracées (figure 3) plafonnent rapidement, ce qui montre que la méthodologie mise en oeuvre a très probablement permis de détecter la quasi-totalité des champignons présents dans nos échantillons.

Les 50 espèces les plus abondantes dans les échantillons de bois considérés globalement sont présentées en figure 4 ainsi que les 50 les plus abondantes dans le sol. La très faible proportion d'espèces (7 au total) retrouvées dans les deux types d'échantillons (sol et bois) indique que la majorité des champignons dégradant le bois l'a colonisé par voie aérienne. Cela confirme également que la contamination des échantillons de bois par le sol, qui pourrait être liée à notre intervention pour leur prélèvement, est très limitée.

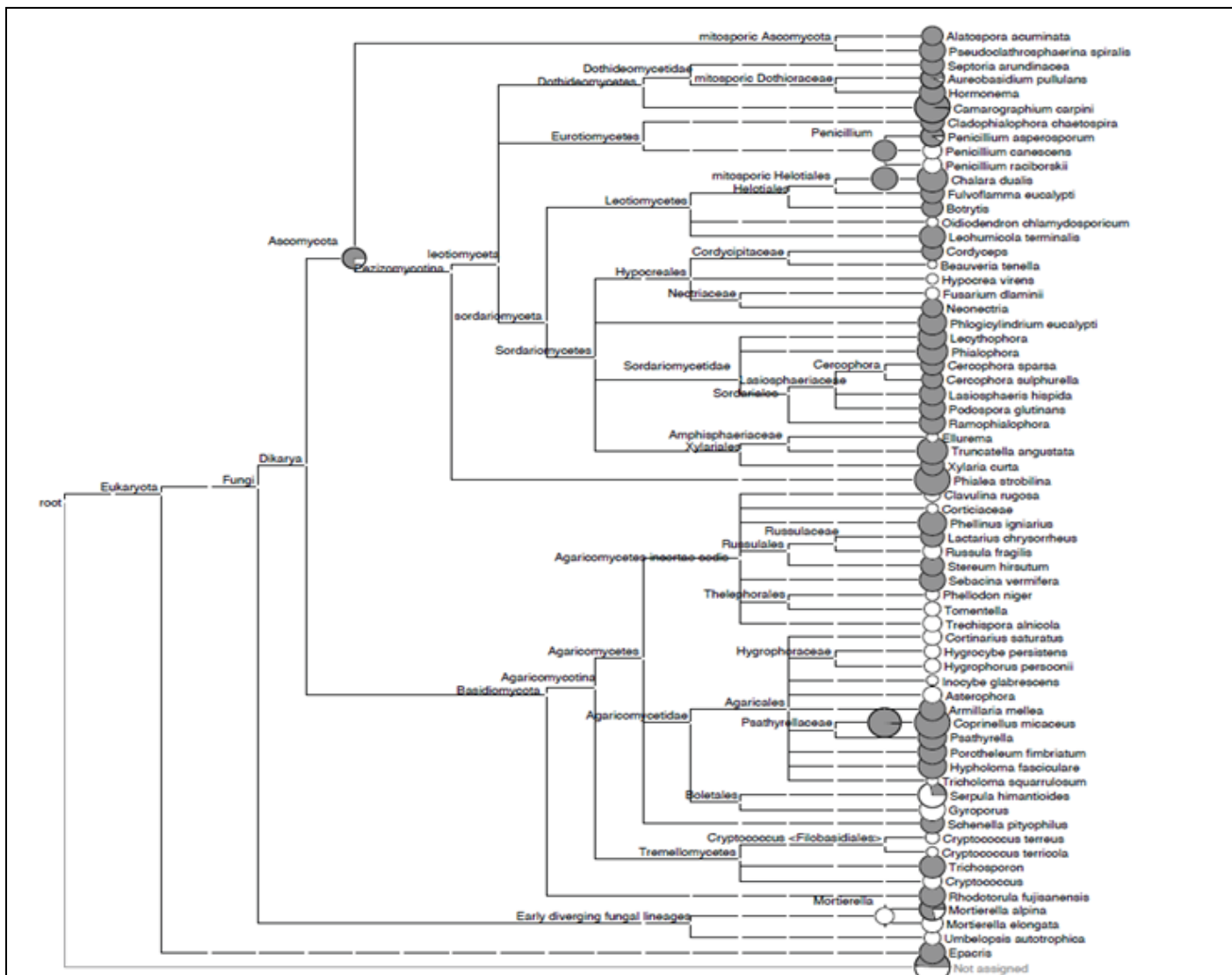


Figure 4 : Représentation des différents groupes de champignons retrouvés par séquençage ADN en fonction de l'essence de bois après 3 et 6 mois de contact des piquets avec le sol. Ce dendrogramme répartit les 50 espèces (ou groupes d'espèces) les plus représentées dans le sol et les 50 espèces les plus représentées dans le bois (toutes essences, sous-parcelles et moments de prélèvement confondus) selon leur proximité taxonomique. Le cercle figurant sur les branches du dendrogramme a un diamètre proportionnel au nombre de fois où cette espèce a été détectée. La proportion de blanc et de gris à l'intérieur du cercle correspond à la représentation relative de l'espèce dans le sol (en blanc) et dans le bois (en gris). Trente séquences d'ADN fongiques détectées ne correspondent à aucune référence connue (mention "not assigned"). La mention d'Epacris - genre d'Ericaceae spécifique de l'Océanie - correspond en fait à un champignon (probablement endophyte) dont l'ADN de référence a été décrit à partir de prélèvement de la plante qui l'abrite.

Effets de l'essence et du temps d'incubation dans le sol

L'analyse statistique complète des données obtenues (analyse en composantes principales) a confirmé que l'essence de bois est le facteur majeur influençant le nombre et la nature des espèces de champignons qui se sont installées dans les piquets. Le second facteur est le temps écoulé depuis l'installation en forêt.

La **figure 5** en donne un aperçu très visuel via la répartition en groupes écologiques ("styles de vie") des 50 espèces les plus abondantes dans chaque combinaison essence x durée de dégradation en forêt. Pour chaque essence, la représentation des différents groupes de champignons évolue nettement entre le prélèvement à 6 mois et le prélèvement à 9

mois après installation. Pour chaque prélèvement, les groupes présents sont très différents selon l'essence, avec une plus forte différenciation entre le pin et les feuillus qu'au sein des feuillus.

Perspectives

Nous allons prochainement mettre en œuvre les outils métagénomiques pour étudier la répartition à différentes échelles spatiales des armillaires et du fomes. Nous utiliserons en outre ces données pour calibrer des outils plus légers de diagnostic sur parcelles forestières. C'est l'objet du projet MDP (Meta Diagnostic Pourridiés) qui aborde également le cas des champignons dans les bâtiments, coordonné par FCBA avec l'équipe Biogeco de l'INRA, financé par le conseil régional Aquitaine avec le FEDER, 2015-2017).

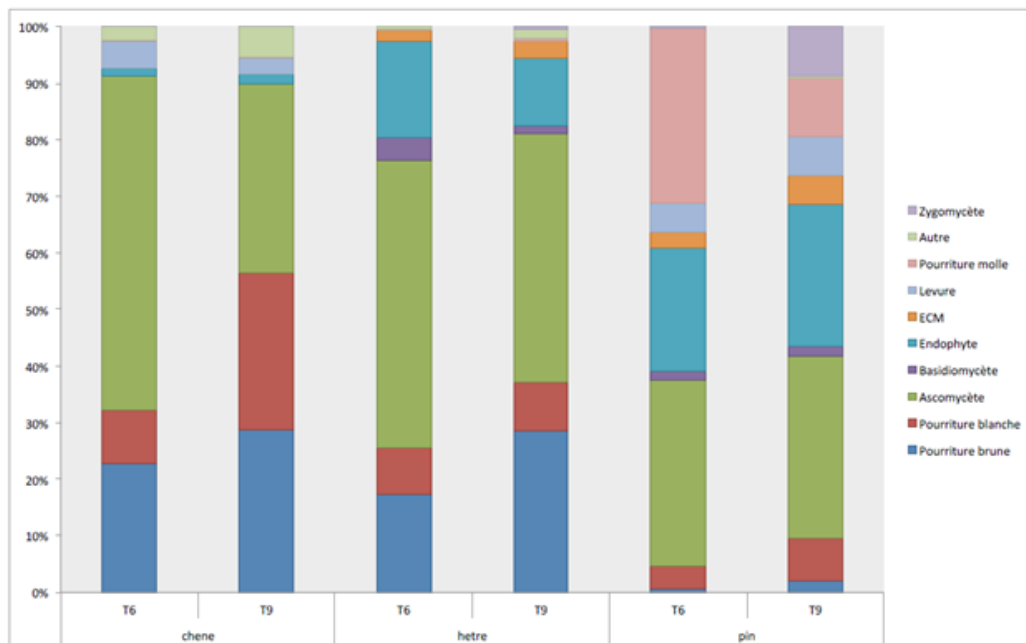


Figure 5 : Représentation des différents groupes de champignons retrouvés par séquençage ADN en fonction de l'essence de bois après 3 et 6 mois de contact des piquets avec le sol. Les histogrammes correspondent à la proportion de ces groupes parmi les séquences d'ADN obtenues. Les champignons sont en priorité classés en fonction de leur implication dans la pourriture blanche ou brune, et ensuite seulement (pour ceux qui n'ont pas déjà été cités) de leur classification taxonomique (ainsi le groupe désigné par "basidiomycètes" ne reprend que les basidiomycètes qui ont été détectés mais qui ne sont pas déjà listés dans la pourriture blanche ou brune). ECM= endomycorhiziens. Les endophytes recensés correspondent probablement à des champignons changeant de mode de vie selon que le bois appartient à un arbre vivant ou non. Les différences entre 3 et 6 mois pour une même essence sont peu significatives. Les différences entre essence ne sont ici significatives qu'entre résineux et feuillus. L'analyse des résultats obtenus à des durées plus longues et pour des répétitions supplémentaires permettront de préciser ces éléments.

Ces travaux seront également développés afin de comprendre les phénomènes de croissance différenciée des arbres selon le précédent cultural ou l'association de plusieurs essences.

Des démarches similaires seront entreprises pour l'étude de la flore fongique dans les bâtiments et sur les sites de stockage.

Bien qu'intégrés de préférence à des projets de recherche partenariale, ces travaux auront pour finalité l'optimisation de solutions techniques répondant aux besoins opérationnels des professionnels concernés.

Bibliographie

- Maître M, Kutnik M, Le Bayon I, Harvengt, L. (2008) Molecular methods: a reliable tool for identification of wood decay fungi in construction timber. International Research Group on Wood Protection, Stockholm, Sweden. Document no. IRG/WP: 08-20386
- Mathieu Y. (2012) Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme. Thèse soutenue le 11 décembre 2012, Université de Lorraine, 289 pages
- Varrachaud T. (2012) La durabilité du bois (classes d'emploi et bio-agresseurs). Présentation FCBA à la Conférence Eurobois, 60 pages
<http://www.fibra.net/docs/conference%20durabilite%20Eurobois%20v2.pdf>

Pour en savoir plus...

- Garbaye J. (2013) La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons. Editions Quae, 280 pages, ISBN 9782759219636
- Quetier F. et Wincker P. (2013) L'avènement de la métagenomique. Dossier Pour la Science.
http://www.pourlascience.fr/ewb_pages/a/article-l-avenement-de-la-metagenomique-32171.php

Contact(s) :

Luc HARVENGT

Responsable scientifique biotechnologie
 Tél. : 05 56 79 95 02
luc.harvengt@fcba.fr

Magdalena KUTNIK – Isabelle LEBAYON

Laboratoire Biologie – FCBA, Bordeaux

FCBA – Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée
 Campus recherche Forêt-Bois de Pierroton,
 71 route d'Arcachon
 33610 CESTAS



INSTITUT TECHNOLOGIQUE

Etude réalisée conjointement avec



Université de Lorraine dans le cadre de la thèse CIFRE de Yann Mathieu

Contact INRA : Marc BUEE
 INRA-UMR 1136
 Interactions Arbres/Micro-organismes
 IFR 110, EFABA, Centre INRA de Nancy, Route d'Amance, 54280 Champenoux