

LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS: DES BIOINDICATEURS DU FONCTIONNEMENT ET DE LA RESILIENCE DE L'ÉCOSYSTÈME FORESTIER

Mission 1 : Propositions de méthodes

Barbara Meyers

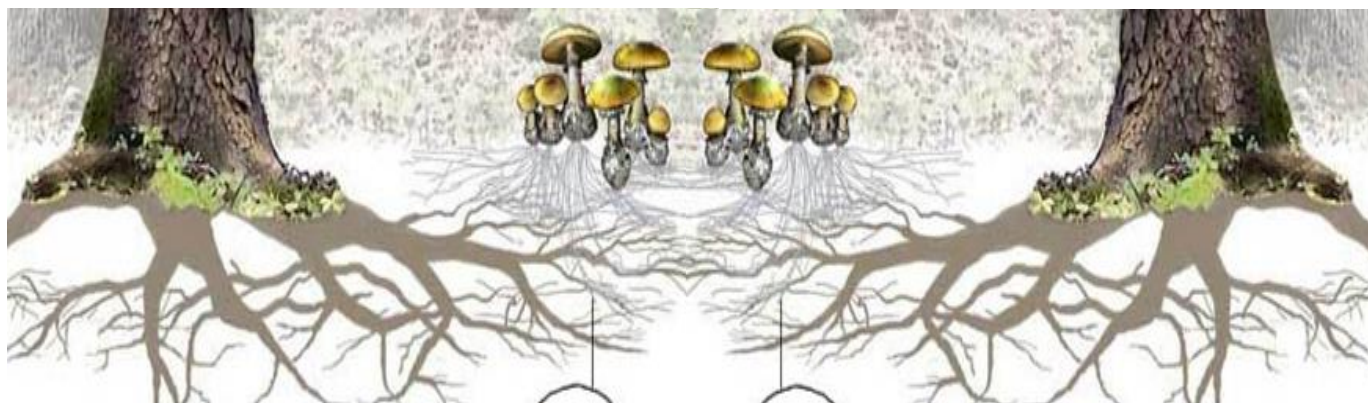


Table des matières

Table des matières

Résumé	3
Partie 1 : Introduction	4
<i>Projet Life intégré Artisan.....</i>	<i>4</i>
<i>Les sols et leurs communautés : des acteurs de la résilience des forêts.....</i>	<i>4</i>
<i>Les champignons mycorhiziens</i>	<i>4</i>
Partie 2 : Les associations mycorhiziennes face au changement climatique et aux activités anthropiques	8
Partie 3 : Problématique, objectifs et hypothèses	13
Partie 4 : Propositions de méthodes et indicateurs	14
<i>Métabarcoding (séquençage haut débit)</i>	<i>15</i>
<i>Analyse des racines colonisées par les mycorhizes.....</i>	<i>19</i>
<i>Décomposition de la matière organique</i>	<i>21</i>
<i>Quantifier la biomasse fongique</i>	<i>24</i>
<i>Analyses supplémentaires : Caractérisation des sols</i>	<i>25</i>
<i>Choix des Sites</i>	<i>26</i>
Conclusions et étapes suivantes	27
Références bibliographiques	28
Annexes	33

Résumé

Dans le cadre du projet Life intégré Artisan, porté par l'OFB, le PNR des Pyrénées ariégeoises a été sélectionné comme site pilote pour tester et développer des méthodes de gestion forestière fondées sur la nature. Ces méthodes ont pour but de maintenir les services écosystémiques rendus par la forêt dans le contexte des changements climatiques à venir. Pour mesurer les impacts de ces différentes méthodes de gestion, des indicateurs ont été sélectionnés comme l'indice de biodiversité potentielle, le diagnostic ARCHI et des mesures de taux d'accroissement. Néanmoins, la fertilité des sols définie par ses caractéristiques physiques et biologiques est un élément déterminant de la résilience des forêts et il est donc important d'inclure des indicateurs intégrant ces compartiments. En particulier, les champignons mycorhiziens (champignons qui établissent des associations symbiotiques avec les plantes) jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers en fournissant de l'eau et des nutriments aux plantes associées ainsi qu'en améliorant leur capacité à résister aux pathogènes et en améliorant la qualité des sols. De plus, les communautés de champignons mycorhiziens sont sensibles aux changements climatiques et aux perturbations liées aux activités anthropiques, en particulier, l'augmentation des températures, les variations des précipitations et les méthodes de gestion forestière intensives.

Le but de cette recherche est de présenter et de comparer les méthodes disponibles pour mesurer l'impact des pratiques sylvicoles sur les champignons mycorhiziens. Les méthodes proposées sont les suivantes :

- **Métabarcoding (séquençage haut débit) :** A partir d'échantillons de sols, cette méthode permet d'identifier les espèces présentes et d'estimer la diversité spécifique des sites étudiés. Cette méthode fournit aussi des informations sur la diversité fonctionnelle (ex : statut trophique) ainsi que des estimations de l'abondance des champignons mycorhiziens. Le budget nécessaire pour l'extraction d'ADN et pour le séquençage est très élevé et il faut compter 3 mois pour obtenir les résultats.
- **Analyse des racines colonisées par les mycorhizes :** Sur base de l'observation de racines de plantules ou extraites d'échantillons de sol, il est possible de mesurer les taux de mycorhization des racines soit à la loupe sur le terrain (pour les ectomycorhizes), soit au laboratoire (pour les ecto- et endomycorhizes). Ces observations apportent des informations sur la dépendance des hôtes envers les mycorhizes ainsi qu'une estimation de leur abondance. Cette méthode demande une plus grande expertise mais est peu coûteuse.
- **Décomposition de la matière organique :** Ce processus est impacté conjointement par les microorganismes du sol et par les champignons mycorhiziens mais aussi par les champignons saprotrophes et les bactéries ainsi que par la mésofaune (ex : vers de terre). En installant des sacs de litière ou de sachets de thé sur les différents sites sur une période de minimum trois mois, il est possible de calculer le taux de décomposition de la matière organique.
- **Quantification de la biomasse fongique :** Sur base d'échantillons de sol, il est possible de mesurer la concentration en ergostérol, molécule spécifique aux membranes des cellules fongiques. Cette mesure permet d'estimer l'abondance des champignons présents dans les sols.

Enfin nous proposons de combiner ces méthodes à une analyse physico-chimiques des sols. Ces méthodes seront testées en décembre 2021 pour s'assurer de leur faisabilité et de leur capacité à fournir des résultats pertinents pour atteindre les objectifs visés.

Partie 1 : Introduction

Projet Life intégré Artisan

Le projet Life intégré Artisan, porté par l'OFB de 2020 à 2027, a pour objectif de définir et d'expérimenter des solutions d'adaptation fondées sur la nature (SafN) pour généraliser leur usage et ainsi atteindre les objectifs de la stratégie nationale d'adaptation au changement climatique. Au niveau national, régional et local, de nombreux partenaires soutiennent le projet. Pour démontrer le potentiel des SafN, 10 sites pilotes ont été sélectionnés pour mettre en place différents projets SafN sur des territoires avec des superficies, des enjeux et des types de collectivités variées. Le PNR des Pyrénées Ariégeoises fait partie de ces sites pilotes et a pour objectif principal de développer des méthodes de gestion forestière fondées sur la nature permettant de maintenir les services écosystémiques rendus par la forêt dans le contexte des changements climatiques à venir dans les Pyrénées Ariégeoises. ¹

Les sols et leurs communautés : des acteurs de la résilience des forêts

En se basant sur la préservation de la biodiversité, les solutions développées sur ce territoire ont pour but d'augmenter la résilience des forêts (capacité à se reconstituer suite à des perturbations). La résilience des forêts peut être observée à différentes échelles mais est généralement mesurée au niveau de la strate arborée en se basant par exemple sur la performance de la plante, sur la diversité des espèces végétales et sur la structure de ces communautés ². Néanmoins, d'autres facteurs doivent être pris en compte comme la diversité des micro-habitats disponibles, l'ambiance forestière, l'étagement de la végétation et, surtout, les composantes du sol qui déterminent sa fertilité et son fonctionnement ¹.

D'une part, le sol est caractérisé par une composante physico-chimique comme la structure du sol, le taux d'humidité ou la réserve en éléments nutritifs disponibles et, de l'autre, la composante biologique incluant la macrofaune (vers de terre, fourmis, ...) et les microorganismes qui, ensemble, jouent un rôle crucial dans la dégradation de la matière organique, l'altération biologique des minéraux et le maintien de la porosité et cohésion des sols ³. Les modélisations actuelles sur la résilience des forêts excluent généralement les caractéristiques biologiques des sols et intègrent plutôt des caractères physicochimiques comme le taux d'humidité ou les concentrations en azote (N) et carbone (C) qui favorisent la régénération et la croissance de la végétation ^{2,4}. Au vu de leur rôle crucial notamment dans le recyclage des nutriments, il est primordial d'inclure les communautés de macro et microorganismes dans l'étude de la résilience des écosystèmes forestiers. Et, en particulier, d'inclure les communautés fongiques (champignons) qui constitueraient la majorité de la biomasse dans le sol ^{5,6}.

Les champignons mycorhiziens

Les champignons sont des organismes eucaryotes, ni végétaux, ni animaux qui appartiennent au règne des Fungi. Bien qu'il soit difficile de quantifier la diversité globale de ce groupe, on estime qu'il existe entre 2.2 millions et 3.8 millions d'espèces de champignons dont seulement 3 à 8 % ont été décrites jusqu'ici ^{6,7}. Dans les forêts, on les retrouve sous forme de mycelium, l'appareil végétatif constitué d'hyphes (longs filaments de cellules alignées) et de fructifications (sporophore ou carpophore, **Figure 1**)⁸.



Figure 1. (A) Un sporofore de Cèpe de Bordeaux (*Boletus edulis*). (B) Hyphes de champignons (espèce non identifiée)

Au contraire des plantes, les champignons sont des organismes hétérotrophes qui doivent acquérir le carbone dont ils ont besoin pour générer leur énergie et produire de la matière cellulaire. Les champignons peuvent être classés sur base de 3 stratégies alimentaires⁸ :

- 1) Les champignons **saprotrophes** acquièrent les éléments nutritifs nécessaires à leur métabolisme via la décomposition de la matière organique morte (ex : bois mort, litière).
- 2) Les champignons **parasites** se développent aux dépens du tissu vivant. Ils permettent de rééquilibrer les écosystèmes notamment en éliminant les individus plus faibles. Ils créent ainsi des perturbations locales qui influencent la structure des communautés végétales.
- 3) Les champignons **mycorrhiziens** sont en relation symbiotique avec l'hôte végétal. En échange de molécules organiques solubles obtenues par la plante via la photosynthèse, le champignon fournit à l'hôte de l'eau et des éléments nutritifs (principalement le phosphore mais aussi l'azote). La mycorhize désigne l'organe mixte entre un apex racinaire de la plante et une ou plusieurs espèces de champignons.^{6,8}

a. Types

Les champignons mycorrhiziens sont classés en différents types définis par leur mode d'interactions avec les racines et par les taxons auxquels ils appartiennent.

Tout d'abord, les **endomycorhizes** (ou « mycorhizes arbusculaires » (**AM**)) font partie des Glomeromycètes et Mucoromycètes et sont les premiers champignons ayant formé ces associations symbiotiques avec les plantes. Ils ont donc probablement permis aux plantes de coloniser la surface de la terre il y a 450 millions d'années^{9,10}. Ces champignons s'insèrent dans les racines et rhizomes où ils forment des structures intracellulaires appelées arbuscules (à l'origine de leur nom - voir **Figure 2**).

Il existe aussi d'autres types de champignons mycorrhiziens plus spécialisés qui forment aussi des structures intracellulaires comme les mycorhizes éricoïdes (**ErM**) et mycorhizes à orchidées. Les ErM ont évolué comme symbiote avec les Ericaceae (et les Diapensiaceae) il y a 100 millions d'années¹¹. Dans les racines de leurs plantes hôtes, ils forment des structures d'hyphes intracellulaires (peloton) qui remplissent presque toute la cellule présente dans la couche externe des racines (hypoderme)¹². Dans le cas des mycorhizes à orchidées, l'association se fait uniquement avec les espèces de cette famille de plante. De plus, le caractère symbiotique de ces associations reste débattu car l'apport en carbone des hôtes aux champignons est minime¹³.

Ensuite, les **ectomycorhizes** (**EcM**) sont classés dans les Basidiomycètes et Ascomycètes et, depuis son apparition il y a 200 millions d'année, ce mode d'interaction a évolué plusieurs fois de manière indépendante à partir d'ancêtres saprotrophes¹⁴. Dans les racines associées aux EcM, le champignon a formé un réseau d'hyphes entre les cellules de l'épiderme et du cortex (appelé le « réseau de Hartig ») via lequel se font les échanges de nutriments avec l'hôte végétal.

Le champignon recouvre aussi les racines des arbres formant une sorte de « manteau » ou « manchon » fongique (voir **Figure 2**).

Enfin, d'autres champignons, appelés endophytes, se développent et passent tout ou une partie de leur cycle de vie dans les tissus végétaux. Les endophytes peuvent avoir des effets neutres ou positifs sur le métabolisme de l'hôte. Parmi ceux-ci, il existe des endophytes associés uniquement aux racines qui sont appelés des endophytes bruns septés. Ces champignons augmentent la capacité des hôtes à résister au stress (notamment au stress hydrique). Leur rôle comme symbiote reste sujet à débat car ils ont aussi montré avoir des effets négatifs sur l'hôte dans certains cas.¹⁵⁻¹⁷

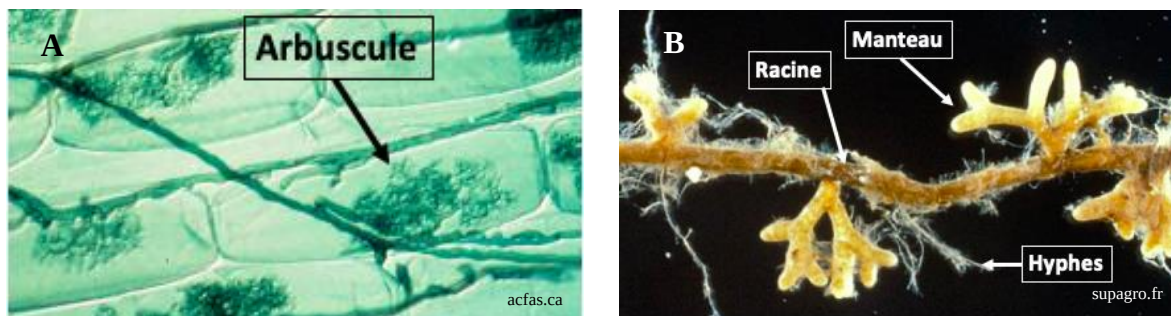


Figure 2. Deux types de mycorhizes. (A) Des structures intracellulaires typiques des endomycorhizes arbusculaires. (B) une racine colonisée par un champignons ectomycorhizien. Les bouts de racines végétales sont recouvertes par un manteau fongique.

b. Essences dominantes du territoire

Sur le territoire du PNR, les associations ectomycorhiziennes (EcM) sont dominantes (voir **Tableau 1**). Cela est généralement le cas dans les forêts tempérées dû à l'histoire évolutive de cette interaction mais aussi à l'avantage des hôtes EcM dans leur accès à l'azote grâce à la capacité des champignons EcM à décomposer les molécules azotées récalcitrantes.

Tableau 1 Sélection d’essences dominantes sur le territoire du PNR et les types d’associations mycorhiziennes associées à ces espèces (sur base de la base de données racinaires FungalRoot)¹⁸

Essences dominantes	Type de mycorhize associée
<i>Fagus sylvatica</i>	EcM
<i>Quercus sp.</i>	EcM
<i>Betula pendula</i>	EcM
<i>Carpinus betulus</i>	EcM
<i>Corylus avellana</i>	EcM
<i>Castanea sativa</i>	EcM
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	EcM
<i>Ilex aquifolium</i>	AM
<i>Prunus avium</i>	AM
<i>Populus tremula</i>	EcM/AM

c. Rôle

Les champignons mycorhiziens en association avec les plantes ont des fonctions diverses qui impactent leurs hôtes végétaux mais aussi pour l’écosystème forestier en général.

Tout d’abord, en développant leur réseau d’hyphe (mycélium) et en augmentant le volume de sol exploré, ces champignons fournissent à l’hôte végétal la majorité de ses besoins en eau et en nutriments. Cette augmentation du volume de sol exploré permet à la plante d’accéder à une plus grande quantité de nutriments présents dans la solution du sol (ex : phosphore et azote inorganique). De plus, les champignons mycorhiziens accélèrent l’altération des minéraux (ex : apatites) contenant des éléments nutritifs importants¹⁹. Les ectomycorhizes et, dans une moindre mesure, les endomycorhizes sont aussi capables de sécréter des enzymes qui décomposent la matière organique et leur permettent donc d’accéder à du phosphore et de l’azote organique.²⁰

Ensuite, cette relation symbiotique augmente la tolérance des hôtes à certains stress abiotiques mais aussi biotiques. En effet, les mycorhizes augmentent l’approvisionnement en eau de la plante et améliorent, au niveau des racines, la conductivité hydrique, la régulation stomatique et le contact avec les particules du sol. Enfin, la présence de ces associations semble aussi augmenter la capacité des plantes à résister à certaines concentrations de métaux lourds dans les sols. Les hyphes recouvrant les racines fines des hôtes sont aussi des protections importantes contre les agents pathogènes.²¹

Ensuite, certaines espèces de champignons mycorhiziens (principalement endomycorhiziens) participent aussi à faciliter la succession primaire (colonisation d’un milieu par les espèces pionnières)²².

De plus, la présence de ces champignons a aussi des impacts forts sur la qualité du sol notamment en augmentant la stabilité des particules et en représentant une part majeure de la biomasse présente dans les sols.⁶

Enfin, au niveau de l’écosystème forestier, les champignons mycorhiziens participent activement à la dynamique forestière en facilitant la régénération des plantules, en développant des réseaux mycorhiziens communs (« common mycorrhizal network) et en transférant aux jeunes plantes le carbone et les nutriments fournis par les plantes adultes. {Citation}

Partie 2 : Les associations mycorhiziennes face au changement climatique et aux activités anthropiques

a. Augmentation des températures

Les réponses des champignons mycorhiziens face à l'augmentation des températures sont extrêmement variables. En effet, une analyse incluant 152 études expérimentales a montré que les réponses étaient généralement positives ou négatives mais moins souvent neutres ²³. Les **réponses des champignons diffèrent selon les types d'association et les habitats**. Il semble, selon cette analyse, que les endomycorhizes soient plus résistantes aux hausses de températures et ainsi promeuvent la croissance des hôtes végétaux associées sous ces conditions ²⁴. Néanmoins, dans une expérience à long-terme en Alaska, les auteurs ont montré que le réchauffement climatique promeut aussi la croissance des champignons EcM et des plantes associées via des changements de la fertilité du sol et, en particulier, du cycle de l'azote ²⁵. Deux études réalisées au Japon et en Alaska, montrent que la hausse des températures a plutôt entraîné une baisse de la diversité spécifique des communautés EcM ^{26,27}. De manière intéressante, une autre étude montre que l'augmentation des températures impacte surtout la composition des communautés de champignons EcM avec une sélection pour les espèces « moins coûteuses » en carbone pour la plante associée ²⁸.

Enfin, sur base de ces quelques articles et revues de littérature, il semble que la croissance des champignons ne soit pas négativement impactée par la hausse des températures mais plutôt que **la composition des communautés change dû soit à une diminution du carbone transféré par la plante hôte soit à des changements de fertilité du sol**. Il est important de souligner que ces études sont réalisées dans des environnements très différents et qu'il est difficile de conclure sur l'impact des hausses des températures dans les Pyrénées sur base des recherches réalisées sur cette thématique.

b. Augmentation du CO₂

Les réponses des champignons mycorhiziens aux augmentations du taux de CO₂ ont principalement été étudiées dans des expériences en serres. Une revue de littérature sur l'impact des taux de CO₂ atmosphériques sur les mycorhizes incluant 300 articles scientifiques montre qu'un taux de CO₂ plus élevé entraîne des réponses majoritairement positives sur les champignons mycorhiziens (augmentation du taux de colonisation, biomasse fongique, longueur des hyphes)^{23,29,30}. Cette augmentation de la croissance et des taux de colonisation est probablement due à la productivité accrue des plantes hôtes. Néanmoins, les réponses varient selon les types de mycorhizes, les espèces de champignons et les espèces végétales associées ³¹. Les associations EcM ont des réponses plus fortes aux hausses de CO₂ combinés à des changements de composition des communautés plutôt que de performance, d'activité ou de diversité. La question reste de savoir si et comment ces variations auront des impacts sur la performance des hôtes ²⁹.

c. Variation des précipitations et sécheresses

La plupart des recherches sur les impacts des changements climatiques se sont concentrées sur la résistance à la sécheresse des champignons mycorhiziens, principalement sur les AM étant donné leur importance en agriculture. En général, une augmentation du stress hydrique entraîne une diminution du taux de colonisation des racines par les champignons mycorhiziens (AM et EcM) mais ces résultats dépendent largement des espèces étudiées. Pour les associations EcM,

cela a notamment été observé sur les racines de l'épicéa commun (*Picea abies*) et de plusieurs espèces d'arbustes méditerranéens ainsi que certaines espèces de pins américaines ³². Pour les racines EcM, ce serait principalement une réponse indirecte à la réduction de la biomasse de racines minces des plantes plutôt que d'une sensibilité de ces champignons à la sécheresse ³³. Concernant les associations AM, l'augmentation du pourcentage de racines colonisées et la diminution des hyphes extra radicales a été observé suite à des périodes de sécheresse mais semble aussi être plutôt une réponse à la diminution d'abondance des plantes liée au stress hydrique ³⁴.

Bien que les mycorhizes semblent être négativement impactées par la sécheresse, un nombre important d'études ont montré que **les AM et les EcM améliorent la résistance des hôtes au stress hydrique via le développement des hyphes capables d'accroître la stabilité des agrégats du sol, d'augmenter la surface absorbante, d'améliorer la conductance stomatique dans les cellules de l'hôte ainsi que la conduction de l'eau au travers des filaments mycéliens** ^{31,35,36}.

Ensuite, la tolérance au stress hydrique dépend largement des espèces étudiées. Par exemple, l'analyse de la conductivité hydraulique des racines de peuplier baumier (*Populus balsamifera*) était plus élevée lorsque celles-ci étaient colonisées par *Hebeloma crustuliniforme* plutôt que par *Wilcoxina mikolae* ³⁷. De même, sur base d'une étude dans des hêtraies (*Fagus sylvatica*) dans le Nord-Est de la France, les auteurs ont montré que *Lactarius* sp. était moins résistant à la diminution du potentiel hydrique du sol que *Cenococcum geophilum* ³⁸. Cette dernière est une espèce clé dans la protection des racines contre la dessiccation comme l'ont montré d'autres études ³⁹. Cette capacité à résister à la sécheresse serait due aux hautes concentrations en mélanine dans ses parois cellulaires ⁴⁰. La plus grande diversité spécifique et fonctionnelle des espèces EcM suggère que les plantes associées pourraient être plus adaptées aux changements de conditions hydriques en s'associant à des espèces plus adaptées à ces nouvelles conditions. **Les changements de précipitations et l'intensification des périodes de sécheresses entraîneraient donc théoriquement une altération de la composition des communautés de champignons associées** ⁴¹.

De manière intéressante, les DSE sont caractérisés par une concentration élevée en mélanine et ont montré joué un rôle dans l'augmentation de la résistance des hôtes aux stress abiotiques tels que les sécheresses. Leurs impacts physiologiques sur les plantes ne sont pas encore clairement établis néanmoins ils pourraient être des indicateurs importants de la résistance des hôtes à la sécheresse. ^{17,42}

d. Dispersion et migration

Dans le contexte du changement climatique, les espèces doivent, pour assurer leur survie, réussir à s'adapter à de nouvelles conditions locales ou être capables de migrer vers des nouveaux espaces pour retrouver des conditions plus favorables. Pour les plantes, l'association avec les champignons mycorrhiziens est primordiale pour promouvoir cette capacité à tolérer les nouvelles conditions locales. Pour assurer le succès de migration et de colonisation de nouveaux environnements, la migration des champignons mycorrhiziens avec leur hôte est cruciale mais est rarement systématique.

Initialement, l'hypothèse acceptée énonçait que tous les microorganismes, du fait de leur petite taille et aux nombreuses propagules produites, n'avaient pas de limitation de dispersion et que leur répartition était uniquement due aux contraintes liées aux conditions environnementales.

Cependant, de nombreuses études montrent aujourd'hui que cette dispersion est limitée comme celle des autres organismes par des barrières telles que l'isolation mais aussi par des propriétés particulières aux propagules.⁴³

La symbiose AM est très répandue dans le règne végétal et ces champignons ont une large distribution (97% des taxons AM se retrouvent sur plusieurs continents)⁴⁴. En outre, de nombreuses espèces extrêmement invasives et, avec des taux de répartition très larges, sont associées avec des champignons AM²³. Il est donc peu probable que la répartition de ce type de symbiote soit limitée par des barrières de dispersion importantes⁴⁵.

Pour les champignons EcM, la majorité des spores est rarement dispersée à plus de quelques mètres et une partie de celles-ci perd sa viabilité au cours de ce processus. De plus, **la dispersion des champignons EcM est nécessaire pour assurer la migration des hôtes car une grande partie des hôtes EcM sont obligatoirement dépendants de leur symbiote**⁴⁵. Cela a notamment été démontré lors de l'introduction échouée de nombreuses espèces de Pinaceae⁴⁶. Enfin, ces deux facteurs soulignent la faible capacité des hôtes EcM à migrer avec succès et donc leur sensibilité face aux changements de conditions locales et à la fragmentation des paysages⁴⁷.

e. Augmentation des dépôts d'azote

L'augmentation des concentrations d'azote atmosphérique (surtout d'azote réactif NO_x) due aux activités humaines peut être mesurée dans les Pyrénées où les dépôts d'azote varient aujourd'hui entre 797 et 1463 mg N m⁻² par an⁴⁸. Ce processus a des effets néfastes sur les écosystèmes notamment sur les microorganismes du sol et particulièrement les champignons EcM⁴⁹.

Les champignons EcM sont capables d'absorber l'azote minéral ainsi que de l'azote plus récalcitrant (provenant de la matière organique). Ils permettent donc à la plante d'accéder à des sources d'azote que cette dernière ne peut transformer. Néanmoins, si la concentration d'azote minéral (plus facilement accessible) augmente dans les sols, l'avantage des plantes à s'associer aux EcM diminue et celles-ci réduisent donc leurs apports en carbone à leur symbiote. De plus, ces conditions favorisent la prolifération de certaines espèces de champignons (nitrotolérants ou nitrophiles) avec un type de mycélium court qui sont donc peu capables de récupérer l'azote ce qui augmente encore les concentrations azotées dans les sols. **La hausse des dépôts d'azote entraîne donc des changements drastiques de composition fonctionnelle de communautés, une baisse de la biomasse fongique dans les sols, ainsi que consécutivement des variations dans la croissance des plantes** (voir **Figure 3**). Ces prédictions sont soutenues par l'observation de changements de composition de communautés EcM de chêne (*Quercus petraea* et *Quercus robur*) à travers l'Europe déterminés par l'augmentation des dépôts d'azote.^{50,51}

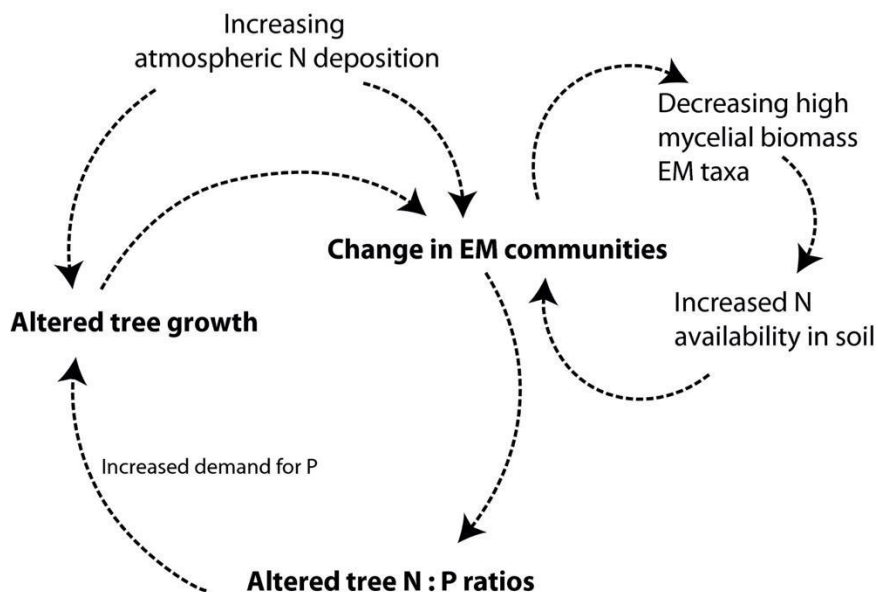


Figure 3 Schéma de l'impact de la hausse des dépôts d'azote sur les communautés EcM ⁵¹

f. Impact de la sylviculture

Les deux principales caractéristiques du sol impactées par les activités sylvicoles sont la matière organique sur les sites exploités et la porosité du sol. La sévérité de ces impacts dépend des méthodes utilisées et surtout de l'utilisation ou non de machines lourdes qui amplifient la compaction du sol (surtout en période humide). Ces effets sur les sols ont des répercussions sur différents processus pédologiques comme le régime hydrique, le cycle des nutriments, la séquestration du carbone et, consécutivement, sur les communautés de microorganismes. (Grigal, 2000; Marshall, 2000; Powers et al., 2005).

Il existe à ce jour encore très peu d'études sur l'impact à long terme de l'exploitation des forêts sur les communautés de microorganismes dans les sols, néanmoins, sur base de ce qui a été publié, il semble que les microorganismes et, en particulier les ectomycorhizes, soient des indicateurs importants de ces perturbations. Notamment, une étude à long terme (10-15 ans après les coupes claires) a été réalisée dans les forêts de Colombie-Britannique (forêts dominées par des résineux tels que l'épinette blanche, le sapin de Douglas et le sapin subalpin)⁵². Sur des parcelles de 0.28 ha, cette étude a testé différents régimes de compaction des sols et d'exportations des rémanents sur les communautés de microorganismes. Les résultats montrent que **les communautés de microorganismes ne recouvrent pas leur état initial même 15 ans après la coupe**. Les assemblages fongiques sont les plus impactés (surtout les champignons EcM) et restent perturbés surtout après le retrait de la litière et l'exploitation par arbres entiers^{52,53}. Le retrait des rémanents a des impacts variés sur la diversité des sols et plusieurs articles sont recensés à ce sujet par Emila Akroume dans le cadre de sa thèse encadrée par Marc Buée (Tableau X)³. Il semble que **les coupes ont des répercussions plus fortes sur les mycorhizes probablement car elles privent les symbiotes de leur hôte et donc, de leur source en énergie (carbone) mais aussi parce que la compaction des sols perturbe les réseaux mycorhiziens et empêche les hyphes de se développer**.

D'autres études corroborent ces résultats. Dans d'autres forêts en Colombie-Britannique, une étude souligne aussi que, suite à une coupe à blanc sur des sites de 10 ha, la richesse **spécifique des champignons EcM n'était pas modifiée mais qu'on observait surtout des changements de cortèges d'espèces symbiotiques**⁵⁴. Dans le Maine, une étude mise en place sur des sites

entre 0.08 et 0.2 ha a montré que, entre 9 et 11 ans après les coupes, la diversité des espèces rares ainsi que l'abondance des Russules (*R. purpureotincta*, *R. roseostipitata*) ont diminué, alors que l'abondance des Laccaires a augmenté⁵⁵. Sur des sites (0.4 ha) ayant subi des pratiques sylvicoles différentes (coupes fortes vs pas de coupes) dans des hêtraies du Nord-Est de la France, les structures des communautés aussi été fort impactées même si dans ce cas-ci la diversité spécifique était plus élevée dans les forêts exploitées⁵⁶.

Tableau 2. Impacts de différents régimes d'extraction des rémanents sur différents taxons³

	taxons observés	effets	pas de temps	zone biogéographique	références
retrait de litière	champignons	diminution des fructifications saprotrophes augmentation des fructifications EcM	2 ans	sub-boréale	Tyler, 1991
Retrait des branches + litière	biomasse microbienne (bactéries + champignons)	diminution	1-2 ans	tropicale	Mendham et al., 2003
	biomasse microbienne (bactéries + champignons)	ns	1 an	tempérée	Pérez-Batallon et al., 2001
	biomasse microbienne (bactéries + champignons)	modification des assemblages	5 ans 13 ans	LTSP	Hartmann et al. 2012 Hartmann et al. 2009
	mésosofaune (Acariens)	diminution de la densité diminution de la richesse spécifique	10 ans	LTSP	Batigelli et al. 2003; Jordan et al. 2000
Retrait des branches	champignons	diminution de la densité de mycorhizes + diminution de la diversité et de la richesse	30 ans 5 ans	boréale	Mahmood et al. 1999 Huusko et al. 2015
	nématodes	ns	5 ans	boréale	Dighton et al. 2012
	marcoarthropodes	diminution de l'abondance	5 à 15 ans	boréale	Bengtsson et al. 1997; Bengtsson et al. 1998; Dighton et al. 2012;
	enchytréides	modification des assemblages		boréale	Work et al. 2013

Table 1. 2 : Effets de différentes intensités de prélèvement plusieurs taxons des sols forestiers (ns = non significatif)

Partie 3 : Problématique, objectifs et hypothèses

Au vu de leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers ainsi que de leur sensibilité face au changement climatique et aux activités anthropiques, les mycorhizes (principalement EcM) apparaissent comme des indicateurs importants et utiles pour évaluer l'impact des solutions fondées sur la nature testée dans le cadre du projet Life intégré Artisan sur la résilience des forêts.

Dans ce contexte, cette mission a pour but de répondre aux deux questions suivantes :

- Comment mesurer l'impact des différents chantiers mis en place dans le cadre du projet Life intégré Artisan sur les communautés de champignons mycorhiziens ?
- Comment mettre en avant l'impact de ces chantiers sur leur capacité à augmenter l'adaptation des forêts face au changement climatique ?

La mission a ainsi pour objectif de :

- Développer un/des indicateur(s) pour évaluer les impacts des chantiers sur les communautés de champignons mycorhiziens.

L'indicateur choisi devra être conforme aux attentes suivantes :

- Mettre en avant un ou plusieurs traits des communautés de champignons mycorhiziens en lien avec leur rôle dans l'adaptation des forêts face aux changements climatiques, tel que :
 - Diversité fonctionnelle et/ou spécifique
 - Structure des communautés
 - Biomasse fongique
 - Taux de colonisation
 - Rôle (résistance aux stress abiotiques, aide à la régénération des plantules, décomposition de la matière organique)
- Être parlant et pertinent
- Réalisable en moins d'une journée par une personne (par site)
- Fournir des données comparables avant/après chantiers (t et t+1) et/ou comparables entre chantiers (sites)

Partie 4 : Propositions de méthodes et indicateurs

Tableau 3. Liste récapitulative des méthodes proposées

Méthode	Informations	Budget total (€)	Terrain (par site)	Délai analyses
Métabarcoding	Indice de diversité • Richesse spécifique • Abondance quantitative relative • Présence/absence d'espèces clés • Simpson, Shanon (Nombres de Hill) • Comparaison inter-sites (beta) Indice de structure/composition • Réseaux de cooccurrences	5000-12000	1h30	2-3 mois
Analyse des racines	• Taux de mycorhization • Taux de ramification • Détermination des morphotypes d'EcM	0-100	2h00	1 jour
Décomposition de la matière organique	Méthode du sac de litière/ Sachets de thé • Pourcentage de masse perdue • Le taux de décomposition • Longueur totale des racines et des hyphes dans les sacs Analyse de l'activité des enzymes	Max. 100	30 min.	4 jours (séchage 48h)
Analyse des acides gras/ergostérol	• Ratio bactéries : champignons • Biomasse fongique	1000	30 min.	1 mois

Métabarcoding (séquençage haut débit)

a. Informations générales sur la méthode

Les approches moléculaires à partir de l'ADN des organismes et, surtout, les techniques de métabarcoding d'échantillons environnementaux (sol, racines, bois mort, ...) sont aujourd'hui les techniques les plus utilisées pour quantifier et étudier les communautés de microorganismes. Ces techniques consistent, tout d'abord, en l'extraction de l'ADN des échantillons prélevés. Cet ADN est ensuite amplifié via PCR (Polymerase Chain Reaction) et séquencé à haut débit en utilisant un marqueur génétique (« code-barre »). Pour les champignons, le marqueur génétique utilisé est la région de l'espaceur intergénique transcrit (ITS) pour deux raisons principales : (1) cette région est répétée en de nombreux exemplaire dans la cellule car elle fait partie de l'ADN ribosomal nucléaire, (2) cette région est très représentée dans les bases de données ce qui facilite l'identification des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs). Enfin, après avoir été filtrées, les données sont regroupées selon un seuil de similarité des séquences en (OTUs) (97% de similarité est le seuil généralement utilisé) (voir **Figure 4**).^{6,57}



Figure 4 Démarche expérimentale d'une approche moléculaire pour étudier des communautés biologiques ⁵⁸

L'analyse des données taxonomiques permet de calculer les variables suivantes :

- **Richesse spécifique** : nombre d'espèces/OTU observées par échantillon/parcelle. Cette variable est la plus simple et permet d'avoir une estimation de la diversité spécifique néanmoins cet indicateur de diversité ne tient pas compte des différences d'abondance entre espèces, ni du potentiel nombre d'espèces rares non détectées.
- **Abondance quantitative relative** (ex : champignons mycorrhiziens comparés aux champignons saprotrophes)
- **Présence d'espèces indicatrices**
- Diversité des guildes fongique (ex : modes trophiques) : information relative à la **diversité fonctionnelle** des communautés
- **Indices de diversité** (Shannon, Simson via les nombres de Hill) au sein d'un site (α) et entre les sites (β)
- **Composition de la communauté** : comparaison intersites et avant-après chantiers des espèces recensées

Il est important de noter que les données provenant d'analyses de métabarcoding sont extrêmement hétérogènes avec certaines OTUs ayant des valeurs très élevées et certaines très faibles. Ces différences ne sont pas directement corrélées à des différences d'abondance des espèces mais peuvent provenir de différents taux d'amplification de l'ADN avec certaines séquences plus représentées que d'autres sans lien avec leur abondance dans l'écosystème. Une manière de prendre en compte ces différences dans le calcul de la diversité est l'usage des nombres de Hill. Ces nombres sont basés sur une formule modulable selon un paramètre q (de 0 à l'infini). Plus la valeur de q est grande plus l'abondance est prise en compte : $q=0$ est synonyme de richesse spécifique, $q=1$ inclut seulement les espèces légèrement abondance (Shannon), $q=2$ (Simpson). De plus, il est important, lors de l'analyse des données moléculaires, de prendre en compte les espèces rares non détectées, l'indice de Chao permet notamment de donner une approximation du nombre d'espèces non identifiées sur base du nombre d'espèces recensé dans les échantillons.^{6,59}

b. Informations sur l'écosystème forestier et sa résilience

Tout d'abord, cette méthode permet d'estimer la diversité des microorganismes présents dans les sols ainsi que d'avoir un **aperçu de la diversité fonctionnelle**. Ces variables sont centrales dans l'étude de la résilience des forêts car **une plus grande diversité augmente la capacité d'adaptation des communautés face aux changements** de conditions climatiques et aux perturbations. Ensuite, cette méthode peut être utilisée pour mettre en avant la présence d'espèces clés comme *Cenococcum geosporum*, particulièrement résistantes à la sécheresse, ou des espèces nitrotolérantes comme *Laccaria bicolor*⁶⁰ L'identification de ces **espèces clés met en avant des réponses des communautés aux changements de conditions de l'environnement**. De plus, la présence d'espèces sur un ou plusieurs sites permettrait d'identifier les espèces les plus isolées et les moins représentées sur le territoire. Un large nombre d'espèces co-occurentes souligne une capacité de dispersion élevée et une connectivité accrue.

c. Spécificités de l'indicateur pour la mission

Selon la question de recherche et les spécificités des sites étudiés, plusieurs choix doivent être faits concernant (1) le type d'échantillon, (2) taille des sites, (3) disposition et le nombre d'échantillons.

- (1) **Type d'échantillon** : Dans le cadre de l'étude des communautés de champignons mycorhiziens, deux types d'échantillons peuvent être prélevés : les racines et le sol. Selon les résultats obtenus par Aurore Coince dans son travail de thèse, les différences entre les données des échantillons de racines et de sol n'étaient pas significativement différentes et les deux types d'échantillons permettaient de décrire des communautés fongiques similaires ⁶. Etant donné le temps limité de travail de terrain prévu et les difficultés liées à l'extraction des racines, nous conseillons d'extraire des échantillons de sol pour cette mission.
- (2) **Étendue des sites** : il est important de déterminer l'espace minimal qu'il est possible de mettre en évidence via les approches moléculaire. Les sites étudiés pour déterminer les communautés de champignons mycorhiziens dépassent rarement 0.5 ha ⁶. Dans le cadre de ce projet, les sites mesurent entre 1 et 2 ha mais nous conseillons de travailler avec ces approches sur des parcelles entre 0.25 et 0.5 ha
- (3) **Disposition et nombre d'échantillons** : Plus le nombre d'échantillons analysés sur un site est élevé, plus les résultats permettront de déterminer précisément la composition des sites et de mettre en avant de possibles hétérogénéités au sein du site. Aussi, un nombre élevé d'échantillons permet de s'assurer qu'un pourcentage suffisant des espèces présentes a été identifié (voir **Encadré 1**). Dans le cadre de ce projet, nous proposons de tester le protocole d'échantillonnage présenté sur la **Figure 5**. Ce protocole permet de souligner l'hétérogénéité intra-sites et inter-sites et garantit d'obtenir un jeu de données suffisamment complet pour mettre en place des analyses statistiques correctes. Ce protocole sera mis en place par Alexandre Raimbault sur ses parcelles et sur base de ces données nous pourrions conclure quel aurait été le nombre minimum d'échantillons nécessaires pour obtenir les mêmes réponses sur les sites étudiés. D'autres protocoles pourraient être envisagés (voir **Annexe 1**).

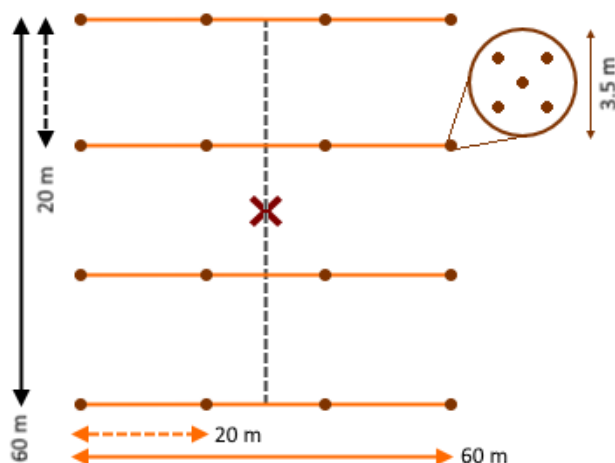
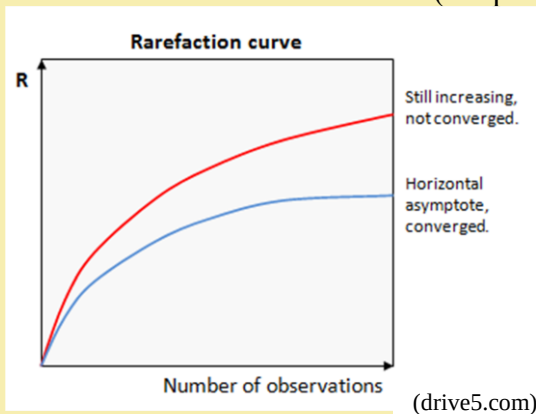


Figure 5 Disposition des 16 échantillons à prélever sur une parcelle de 0.36 ha. Chaque échantillon est composé de 8 échantillons composites. Une parcelle est prévue par hectare. Les échantillons sont prélevés sur 10 cm de profondeur. (Communication personnelle Roy, M. et Raimbault, A.)

Encadré 1 - Courbe de raréfaction

Courbe de raréfaction permet de s'assurer qu'un effort d'échantillonnage plus intense n'aurait pas permis de mesurer une richesse spécifique plus élevée. Si la courbe est saturée, on peut conclure que le nombre d'échantillons et de séquences obtenues est suffisant pour représenter la communauté étudiée. Le problème avec un nombre d'échantillon insuffisant est qu'il ne permet pas de tirer des conclusions ni sur la diversité spécifique, ni sur d'autres indices incluant notamment l'abondance (tel que Shannon ou Simpson).



d. Temps – Budget

Le temps nécessaire à l'échantillonnage dépend du nombre d'échantillons prélevés. Pour le protocole proposé, nous estimons un temps de 2 heures maximum par site.

Pour les analyses, il faut prévoir en moyenne une semaine pour les extractions PCR, une autre semaine (voir 15 jours) pour la préparation du matériel génétique au séquençage (« librairie »), et un mois et demi de délai pour le séquençage et l'obtention des résultats. Au total, les données sont donc disponibles trois mois après l'échantillonnage.

Le budget présenté ci-dessous (**Tableau 4**) donne un aperçu du budget à prévoir pour les tests et les deux séries de prélèvements prévues dans le cadre du projet Life intégré Artisan. Ce budget est prévu dans le cas où la collaboration avec A. Raimbault et le laboratoire EDB (Evolution et diversité biologique – Université de Toulouse III Paul Sabatier) est maintenue. Le budget est calculé pour Février 2022 et Février 2027 pour un échantillonnage sur 15 sites. Des estimations de budget si nous décidons de réduire le nombre d'échantillons ou de faire appel à un prestataire externe sont présentées en **Annexe 2**.

Tableau 4 Estimation du budget pour le protocole proposé avec le soutien du laboratoire EDB et des financements de thèse d'A. Raimbault

	Protocole (n=16) – Soutien EDB (€)
Tests - Novembre 2021	(financé par A.Raimbault)
Chantier –Février 2022	8480
Chantier –Février 2027	8480
Total	16 960

Analyse des racines colonisées par les mycorhizes

a. Informations générales sur la méthode

Analyser les racines des plantes hôtes permet de mesurer l'intensité de la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens en se basant sur l'observation au microscope des extrémités de racines typiques des ectomycorhizes et des cellules racinaires pour repérer la présence d'endomycorhizes.

Les extrémités de racines colonisées par des ectomycorhizes sont observables au microscope ou à la loupe car, dès que l'association est établie, les hyphes forment un « manteau » autour des racines (**Figure 6**). Ensuite, ces structures fongiques continuent de grandir et de se ramifier en différentes structures selon les espèces. Sur base de cette observation, il est possible de calculer deux variables :

- Taux de mycorhization (nombre d'extrémités de racines EcM divisé par le nombre total de d'extrémités de racines)
- Taux de ramification (nombre d'extrémité de racines EcM pour 10 cm racine)
- Détermination des morphotypes d'extrémités de racines EcM selon la méthode d'Agerer (basée sur la couleur des extrémités, la structure des hyphes, la texture du « manteau », et les types d'exploration). Cette analyse permet d'avoir des informations sur les espèces colonisant les racines étudiées. Néanmoins cette technique nécessite une expertise élevée pour être fiable.

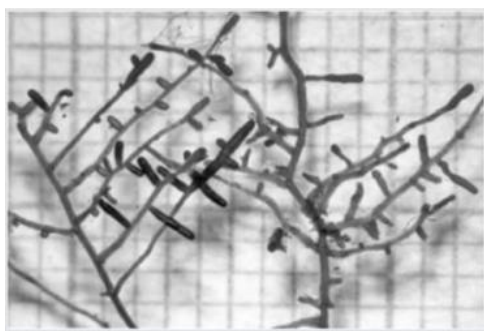


Figure 6 Image à faible magnification d'une racine courte de bouleau (*Betula alleghaniensis*) prise à l'aide d'un microscope optique

Concernant les endomycorhizes (AM), les racines doivent être d'abord décolorées pour ensuite être teintées en utilisant généralement du bleu de Trypan. Cette teinture fait apparaître les structures intracellulaires formées par les champignons (**Figure 7**).

Les variables mesurées par cette technique sont :

- Pourcentage de racine colonisée (nombre de racines colonisées/nombre de racines non colonisée)
- Pourcentage de longueur de racine colonisée

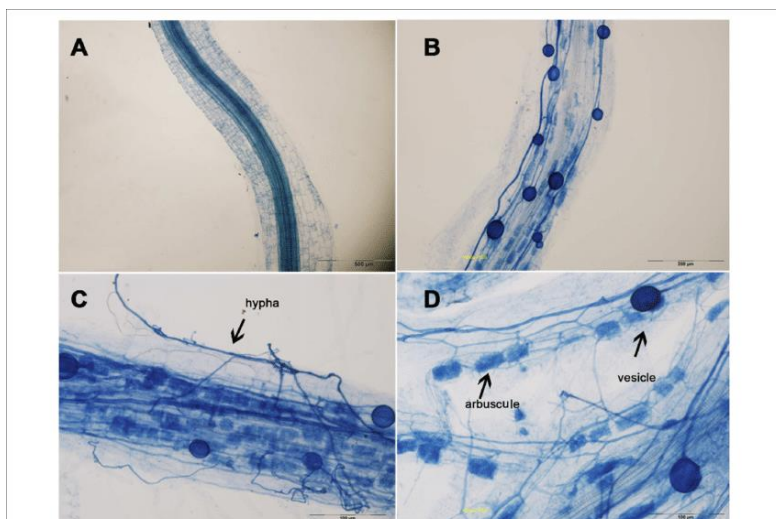


Figure 7 Observations des endomycorhizes dans des racines de pastèque teintes au bleu de Typran. (A) Racines non mycorhizées (500 µm), (B) cellules racinaires inoculées avec les champignons AM (200 µm), (C) images des hyphes (100 µm) et (D) image des structures intracellulaires (arbuscule). Images extraite de ⁶¹.

b. Informations sur l'écosystème et sa résilience

Des études analysant la croissance relative des plantes en fonction de l'intensité de la colonisation des racines ont pu démontrer qu'une intensité plus élevée était corrélée à une dépendance plus forte de l'hôte à cette symbiose. De plus, une intensité de colonisation plus élevée est aussi liée à une plus forte concentration de hyphes mycorhiziens dans les sols environnants et donc à une biomasse plus élevée de mycorhizes dans les sols. Enfin, plus un arbre est dépendant de son hôte, plus la quantité de carbone fournie par la plante augmente. Cela entraîne une augmentation du flux de carbone de l'atmosphère vers les racines et donc, vers les sols. **Cet indicateur est donc pertinent pour comparer l'abondance des mycorhizes et la dépendance des arbres à ses symbiotes dans les sites étudiés. Néanmoins, excepté la détermination des morphotypes, ces indicateurs ne fournissent pas d'information concernant la diversité des espèces ou la structure des communautés ni intra-sites, ni intersites.** ^{62,63}.

c. Spécificités de l'indicateur pour la mission

D'abord, les forêts tempérées, comme celles du territoire du PNR, sont dominées par des espèces ligneuses qui sont associées aux ectomycorhizes. Pour cette raison, la quantification des racines colonisées par les champignons AM semble moins pertinente dans le cas du projet Artisan sur le territoire du PNR.

Ensuite, la méthode d'identification des morphotypes permet de **classifier les ectomycorhizes et pourrait être très utile en combinaison avec des techniques moléculaires** car cette

identification apporte des informations sur la diversité fonctionnelle des espèces EcM ⁶⁴. Néanmoins, cette identification demande une expertise et un entraînement plus long que les autres techniques pour permettre une identification précise ce qui ne convient pas aux demandes du PNR concernant les particularités de l'indicateur.

Ensuite, pour pouvoir comparer les taux de mycorhization, il est nécessaire de les comparer entre individus de la même espèce. Il faudrait donc s'assurer de trouver une ou deux espèces qui soient présentes sur chaque site. Les mesures permettront seulement d'identifier si, sur plusieurs sites différents, une même espèce est plus ou moins dépendante des associations mycorhiziennes.

Dans le cadre du projet, nous proposons donc de sélectionner 2 espèces EcM (avec 3 réplicats par espèces donc 12 individus par site). Sur les sites, deux options d'échantillonnage seront testées :

- (1) Choisir des jeunes individus séparés d'au moins 5 mètres et extraire le système racinaire complet de chaque individu ⁵⁷. Le désavantage de cette méthode est la destruction de jeunes plantules.
- (2) Échantillonner des sols à 10-15 cm de profondeur autour des espèces hôtes La distance entre les échantillons est de 8 m minimum et de 0.2- 15 m entre les arbres. Ensuite, au laboratoire, les échantillons sont rincés à l'eau pour en extraire les racines. ⁶⁵

Temps-Budget

Sur le terrain, le temps pour échantillonner les racines et le sol est estimé à 1h30 par site. Si les racines sont directement analysées à la loupe sur le terrain, il faudrait compter 2h00 supplémentaires par site. Au laboratoire, il faudrait compter 1h00 par site avec un peu d'entraînement (à tester en novembre). Si la méthode d'analyse des racines AM est appliquée, il faudrait compter 1 journée minimum pour l'analyse des racines sur les 15 sites.

Le budget pour l'observation des racines EcM inclut seulement l'achat de sachets plastiques pour conserver les racines (30 € pour 200 sachets). L'observation à la loupe ou au microscope se fera dans un laboratoire de l'école d'ingénieurs de Purpan.

Si les analyses des champignons AM sont incluses, les produits chimiques suivants seront nécessaires :

- Bleu de Typran (100 mL : 12.80 €)
- Hydroxide de potassium (KOH) (0.1 M 1L : 36.2 €)
- Chlorure d'hydrogène (HCl)(100 mL 0.1M : 34.70 €)

Le budget total estimé est de 83.70 € sur base du catalogue :
<https://www.sigmaaldrich.com/BE/en>

Décomposition de la matière organique

a. Informations générales

La dégradation de la matière organique (MO) ainsi que l'altération biologique des minéraux sont les principaux processus de recyclage des nutriments vers le sol et sont des indicateurs importants du fonctionnement du sol, particulièrement dans les écosystèmes forestiers. Les acteurs principaux de ces transformations sont la macrofaune (nématodes surtout), les microorganismes du sol dont font partie les communautés fongiques ^{3,66}. D'un côté, les champignons saprotrophes qui acquièrent tous leurs nutriments via cette décomposition et de

l'autre, les champignons mycorhiziens qui transfèrent ces nutriments (azote et phosphore) à leurs hôtes végétaux.

Ces champignons sont actifs dans les processus de décomposition via :

- (1) La sécrétion d'enzymes extracellulaires permettant l'accès aux molécules organiques. Les champignons saprotrophes sont particulièrement actifs dans les premières phases de décomposition de la MO via la sécrétion d'enzymes de type hydrolytique mais aussi de type oxydatif. Ces enzymes dégradent des molécules organiques complexes comme la cellulose, l'hémicellulose et la chitine, et le phosphore organique. Les champignons ectomycorhiziens ont conservé cet appareil enzymatique de leur ancêtres saprotrophes ce qui leur permet de décomposer la matière organique particulièrement les composés récalcitrants azotés (ex : protéines) mais aussi le phosphore organique et les molécules organiques complexes comme la lignine⁶⁷⁻⁶⁹. Selon les données accessibles aujourd'hui, les champignons arbusculaires sont incapables de sécréter ces enzymes.
- (2) Le développement des hyphes accélérant l'altération des sols permet ainsi d'accéder aux nutriments minéraux notamment dans les micropores et la solution du sol.

Cette capacité des champignons ectomycorhiziens à participer à la décomposition de la matière organique est un avantage important pour les arbres hôtes particulièrement pour l'accès à l'azote (généralement limitant dans les forêts tempérées). Néanmoins, il est difficile de séparer l'activité des EcM du reste des organismes actifs dans ces transformations. Aussi, il est important de noter que l'implication des mycorhizes dans la décomposition de la MO n'accélère pas systématiquement ce processus. En effet, certaines études rapportent un ralentissement de la décomposition de la MO dû à la présence des mycorhizes (effet de Gadgil)^{70,71}.

Deux méthodes sont présentées ici pour analyser et comparer le processus de décomposition de la matière organique sur les sites étudiés.

La première est la **méthode des sacs à litière ou des sachets de thé** qui consiste, soit à placer des feuilles prélevées sur le terrain dans des sacs maillés perméables, soit à utiliser des sachets de thé (vert et rooibos) sous la litière dans les sites. La taille des mailles des sacs et des sachets permet de contrôler les organismes étudiés (ex : une maille < 2 mm exclut les nématodes). Ces sacs sont enterrés dans les différents sites sélectionnés et récupérés entre 3 mois et un an plus tard, de préférence à plusieurs reprises. Le désavantage de la méthode des sacs de litière est que les résultats vont être impactés par le choix du contenu des sacs (choix de la litière utilisée). Les sachets de thé sont souvent utilisés et il existe donc une base de données assez large pour permettre de comparer les résultats obtenus⁷².

Via ces méthodes, les variables mesurées peuvent être les suivantes :

- Le **pourcentage de masse perdue** calculé sur base du poids sec de la litière dans les sacs mesurés au début et à la fin de l'expérience.
- Le **taux de décomposition** calculé si des sous-échantillonnages sont réalisés durant la période d'étude (ex : 1 sac par site est récupéré tous les trois mois sur une période de 1 an) ou en utilisant la méthode des sachets de thé
- La **longueur totale des racines et des hyphes** calculée en mesurant la longueur des hyphes s'étant développées dans le sac et ayant donc participé à la décomposition de la litière contenue dans le sac

La deuxième méthode consiste en l'**analyse de l'activité des enzymes** qui peut être mesurée sur des échantillons de sol ou directement sur les extrémités de racines EcM. Ces mesures sont réalisées en laboratoire en utilisant des méthodes basées sur la fluorescence et permettent

d'identifier les enzymes actives dans les sols. Ces méthodes sont devenues relativement courantes sur des échantillons de sols mais peu de laboratoires le font sur des extrémités racinaires. Certaines études ont prouvé que l'activité des enzymes était partiellement contrôlée par les champignons donc un échantillon de sol est une mesure indirecte suffisamment intéressante. Néanmoins, étudier les extrémités de racines EcM permet d'avoir des données précises sur les enzymes sécrétées par ces champignons et donc sur la diversité fonctionnelle des communautés EcM actives sur les sites étudiés ⁷³. Les enzymes incluses dans les analyses des EcM sont généralement les suivantes :

- β -glucosidase (BG, hydrolyse la cellobiose en glucose)
- N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG, décompose la chitine)
- Acid phosphatase (AP, dégrade le phosphore organique)
- Leucine aminopeptidase (LAP, décompose les polypeptides).

b. Informations sur l'écosystème et son fonctionnement

Les méthodes présentées ici permettent d'obtenir des informations indirectes sur l'activité des mycorhizes dans les sols au contraire d'autres méthodes qui soulignent uniquement la présence de ces champignons.

La méthode des sacs de litière (ou sachets de thé) met en avant la capacité des microorganismes et des organismes du sol (selon la taille des mailles) à recycler le substrat présent dans les sacs et souligne donc l'impact de ces acteurs sur un substrat in situ. Cette méthode montre un « bon fonctionnement » de cette décomposition ou un dysfonctionnement si les résidus persistent dans les sachets. La décomposition est un processus dépendant de nombreux facteurs tels que les conditions climatiques, l'acidité des sols et le taux de compaction. Il est donc difficile d'interpréter les causes des différences observées entre les sites.

L'analyse de l'activité des enzymes est une mesure qui permet de souligner l'activité des microorganismes. Suite à des coupes rases, des études ont remarqué des changements dans la composition des communautés fongiques via l'analyse de l'activité enzymatique ^{53,56}.

c. Spécificités par rapport à la mission du parc

Au vu des demandes de cette mission, les deux méthodes présentent le désavantage de ne pas donner d'informations particulières aux champignons mycorhiziens.

Dans le cadre du projet Life Artisan, nous proposons de concentrer les efforts sur la méthode des sacs de litière et/ou des sachets de thé. Cette méthode, bien que indirecte, met en lumière un processus important de l'écosystème forestier. De plus, cette méthode a pour avantage de pouvoir inclure la participation de différents acteurs (public, gestionnaires forestiers, propriétaires) et de générer des résultats compréhensibles et visuels.

Par contre, malgré les intérêts d'analyser l'activité des enzymes, nous déconseillons sa mise en place dans le cadre du projet. En effet, l'activité des enzymes dépend des conditions météorologiques (ex : variations saisonnières) et de l'acidité du sol ce qui complique la comparaison entre les sites et empêche toute comparaison avant et après les chantiers prévus par le PNR. De plus, les analyses doivent se faire sur sol frais ce qui complique l'organisation logistique si cette méthode est mise en place à grande échelle. (Communication personnelle avec E. Akroume)

d. Temps – Budget

Pour préparer le placement des sacs de litière et des sachets de thé, il faut prévoir de collecter la litière sur chaque site et de sécher cette litière ainsi que les sachets de thé au moins 48h à

l'avance. Sur le terrain, poser les sacs et sachets sur les sites ne devrait pas prendre plus de 10 minutes. Ensuite, ces sacs devront être récupérés 3 mois plus tard et sécher pendant 48h. Le budget à prévoir est estimé à 40 euros incluant les sachets maillés et les sachets de thé.

Quantifier la biomasse fongique

a. Informations générales

Deux méthodes permettent de mesurer la biomasse fongique présente dans les sols. La première consiste en l'extraction et l'analyse des acides gras des phospholipides microbiens. En effet, les phospholipides sont des éléments essentiels de la membrane cellulaire qui ont démontré être d'importants indicateurs pour l'analyse des communautés microbiennes du sol pour trois principales raisons :

- Ils ne sont présents que dans les cellules vivantes (ni dans les tissus de stockage, ni dans les cellules mortes) ce qui permet de s'assurer que la biomasse mesurée s'applique aux microorganismes vivants.
- La concentration de phospholipides est proportionnelle à la biomasse des organismes (LeChevalier, 1989)

La composition des membranes cellulaires varie selon le type de microorganisme (ex: gram-négative, gram-positive, champignons,...). En particulier, la concentration des différents types d'acides gras peut être utilisée (après conversion) comme indicateur de la biomasse de ces différents types de bactéries et champignons. L'acide gras utilisé pour quantifier la biomasse fongique est la molécule 18 :2 ω 6 car la concentration de cette molécule est très élevée dans les cellules fongiques et est comparable à celle de l'ergostérol.

La seconde méthode implique de directement quantifier la quantité d'ergostérol dans les échantillons de sol. L'ergostérol est une molécule quasiment exclusivement synthétisée par les champignons qui se retrouve dans la membrane cellulaire des tissus fongiques vivants, entre les phospholipides (**Figure 8**) ou dans le cytoplasme.⁷⁴

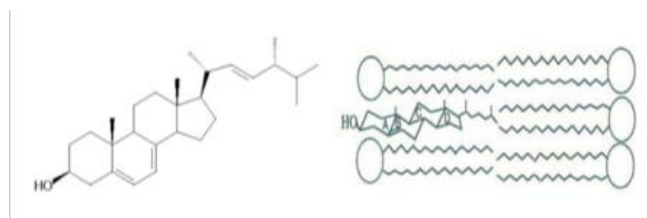


Figure 8 Structure de l'ergostérol et sa disposition dans la membrane cellulaire (bicouche lipidique)

Les variables qui sont mesurées avec ces deux approches :

- Biomasse fongique
- Ratio bactéries/champignons (seulement avec l'analyse des phospholipides)

b. Informations concernant l'écosystème et sa résilience

La biomasse fongique est un indicateur intéressant car cette variable répond à deux facteurs importants dans le cadre de la résilience des écosystèmes⁷⁵ :

- Les caractéristiques du sol, notamment **la compaction du sol** et la présence de polluants dûs aux activités anthropiques telles que les pratiques agricoles et sylvicoles mécanisées.

- La composition des communautés végétales et leur âge ont une influence forte sur la composition des communautés mais aussi sur la quantité de microorganismes dans les sols.

c. Spécificités par rapport à la mission du parc

Tout d'abord, le désavantage de cette méthode au vu de l'indicateur recherché est qu'il n'inclut pas uniquement les champignons mycorhiziens. Cet indicateur devrait donc être couplé à une autre méthode permettant de cibler les mycorhizes en particulier.

De plus, les conditions climatiques ont un impact important sur les résultats obtenus concernant la biomasse. Les échantillons doivent donc être prélevés à une période de l'année à distance d'une période de gel ou de sécheresse (printemps ou automne de préférence). Les caractéristiques physicochimiques du sol sont aussi à prendre en compte notamment le pH, la teneur en matière organique, et la texture du sol.⁷⁵

Enfin, étant donné que la mission s'intéresse principalement aux communautés fongiques, nous proposons de nous concentrer sur l'analyse du contenu en ergostérol. Nous préconisons de prélever deux échantillons par site à faire analyser par un prestataire.

d. Temps – Budget

Sur le terrain, le prélèvement de deux échantillons par site devrait prendre environ 30 minutes par site. Les analyses seront confiées à Ecolab, laboratoire recommandé par l'université de Toulouse-Paul Sabatier. Les résultats des analyses sont disponibles entre 3 semaines et 1 mois après réception des échantillons.

Le budget à prévoir pour des analyses de contenu en ergostérol est de 18 euros par échantillon. Si on inclut les 15 sites prévus pour le début des chantiers, le budget serait donc de 540 euros.

Analyses supplémentaires : Caractérisation des sols

Pour pouvoir analyser les résultats obtenus par les méthodes proposées, il est conseillé de faire des analyses de sol sur les différents sites étudiés. Ces informations physico-chimiques permettront aussi d'apporter des informations générales sur les sols forestiers du territoire. Les caractéristiques choisies et le prix des analyses sont présentés dans le **Tableau 5**. Les paramètres proposés sont très courants ce qui permettra de mettre en perspective les résultats obtenus avec d'autres analyses déjà publiées. De plus, ce sont des caractéristiques en lien avec l'activité des champignons mycorhiziens permettant ainsi de lier les résultats physico-chimiques avec les résultats obtenus via les méthodes présentées plus haut.

Paramètres analysés	Prix euros H.T
pH (H ₂ O)	6
Taux de matière organique	15 (à vérifier)
Carbone total	15
Azote total	12
Phosphore total	12
Phosphore biodisponible	12
Total (par site)	72

Choix des Sites

Dans le cadre du projet Life Artisan, 15 chantiers seront mis en place (1-2 ha) accompagnés de sites témoins dont le nombre n'a pas encore été décidé. Pour tester les indicateurs qui seront mesurés au début et à la fin de ces chantiers, nous proposons de choisir 3 sites répartis de préférence sur un gradient de diversité (des essences et des champignons) et un gradient climatique.

En 2020, une étude mycologique sur base de l'identification des carpofores a été réalisée par Carole Hannoire et Gilles Corriol dans 6 forêts témoins du réseau du PNR Pyrénées ariégeoises (Barjac, Camarade, Montgauch, Rimont, Rivèrenert, Sainte-Croix-Volvestre)⁷⁶. Les sites choisis pour cette étude sont caractéristiques des peuplements les plus représentés sur le territoire. De plus, les résultats montrent une variation importante du nombre d'espèces de champignons identifiées présents sur les sites (**Figure 10**).

Sur base de ces résultats, nous proposons de sélectionner trois sites pour prélever les échantillons et tester les quatre méthodes proposées. Les sites sont les suivants :

- BARJAC, forêt feuillue mélangée des Barrals
- MONTGAUCH, plantation de feuillus mélangée de Las Illetes
- RIVERENERT, hêtraie-chênaie des Cravives
- RIMONT, parcelle de la forêt communale (hêtraie-chênaie)

Pour la mise en place de la méthode 2 (taux de colonisation des racines), nous devons nous assurer que deux espèces (EcM) sont présentes sur les trois sites. Selon les données présentées dans le rapport, *Quercus* sp. et *Fagus sylvatica* devraient se retrouver sur les trois sites.

Le choix des sites « tests » n'est pas définitif étant donné qu'il dépend aussi des spécificités demandées par l'expérience de Alexandre Raimbault qui sera mise en place en parallèle (**Annexe 3**).

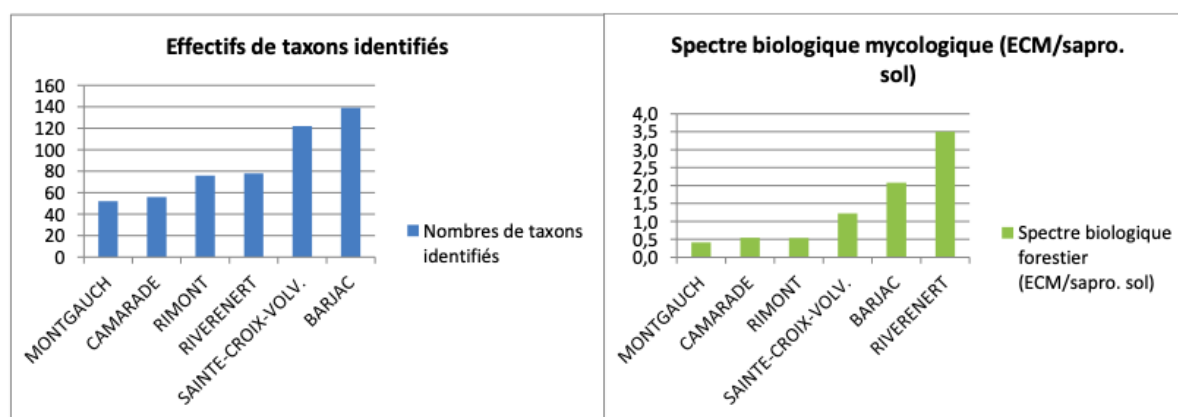


Figure 10 Nombre de taxon identifiés (à gauche) et de spectre biologique mycologique (à droite) sur les 6 sites étudiés ⁷⁶

Conclusions et étapes suivantes

À la suite de cette recherche bibliographique, nous avons décidé de tester une série de différentes méthodes présentées dans ce rapport afin de s'assurer que les résultats obtenus permettent de répondre à la problématique posée et donc, de mieux comprendre le rôle des mycorhizes dans le fonctionnement et la résilience de l'écosystème forestier. Aussi, le but de ces tests est de vérifier la praticité des méthodes et le temps nécessaire à leur mise en place sur le terrain. De plus, nous voulons aussi vérifier que ces méthodes soient des indicateurs pertinents qui permettent de souligner des différences entre sites, notamment entre différents types de peuplement et de gestion forestière.

Plus précisément, les méthodes suivantes seront testées :

- **Métabarcoding** : Bien que le budget nécessaire pour l'extraction ADN et le séquençage est très élevé, les informations acquises permettent d'apporter les réponses les plus précises et complètes sur la composition des communautés de champignons. Un total de 16 échantillons par site sera échantillonné et séquencé.
- **Analyse des racines EcM** : Cette méthode rapide et peu coûteuse permet d'apporter des informations complémentaires au métabarcoding comme sur la dépendance des hôtes. L'observation des taux de mycorhization EcM seront réalisés sur le terrain (à la loupe) et au laboratoire (au microscope).
- **Taux de décomposition de la MO (via les sachets de thé)** : un indicateur plus général et facile à mettre en place qui apporte des informations sur le rôle conjoint des microorganismes dans le recyclage des nutriments. Les sachets de thé seront utilisés car ils permettent de comparer les résultats entre les sites et au sein d'un site.
- **Quantification de la biomasse fongique** : cette analyse assez simple et peu coûteuse permet, elle aussi, de compléter les analyses de métabarcoding en apportant une mesure plus précise de l'abondance des champignons dans les sols. Trois échantillons par site seront analysés auprès d'un laboratoire.

Enfin, ces tests permettront d'élaborer un protocole définitif pour l'utilisation de ces indicateurs lors de l'installation des chantiers dans le cadre du projet Life Artisan.

Références bibliographiques

- (1) Roulier, E. Dossier de demande d'informations complémentaires à l'Appel à Manifestations d'Intérêt ARTISAN; Agence française pour la biodiversité, 2018.
- (2) Ibáñez, I.; Acharya, K.; Juno, E.; Karounos, C.; Lee, B. R.; McCollum, C.; Schaffer-Morrison, S.; Tourville, J. Forest Resilience under Global Environmental Change: Do We Have the Information We Need? A Systematic Review. *PLOS ONE* **2019**, *14* (9), e0222207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222207>.
- (3) Akroume, E. Impacts d'un Retrait Intense Des Rémanents Sur La Fertilité Des Sols Forestiers et Sur Leur Biodiversité. *Rev. For. Fr.* **2014**.
- (4) Albrich, K.; Rammer, W.; Turner, M. G.; Ratajczak, Z.; Braziunas, K. H.; Hansen, W. D.; Seidl, R. Simulating Forest Resilience: A Review. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **2020**, *29* (12), 2082–2096. <https://doi.org/10.1111/geb.13197>.
- (5) Baldrian, P.; Větrovský, T.; Cajthaml, T.; Dobiášová, P.; Petránková, M.; Šnajdr, J.; Eichlerová, I. Estimation of Fungal Biomass in Forest Litter and Soil. *Fungal Ecol.* **2013**, *6* (1), 1–11.
- (6) Coince, A. Richesse et Diversité Des Assemblages de Champignons et d'oomycètes de Hêtraies, En Relation Avec Des Facteurs Climatiques et Édaphiques : De La Parcelle Au Continent, 2013.
- (7) Hawksworth, D. L.; Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5* (4), 5–4.
- (8) Rondet, J.; Borderie, T.; Seegers, N. *Sylviculture et Champignons Comestibles : L'exemple Du Sud-Ouest de La France - Mycosylva*; Chambre d'agriculture de Dordogne/Chambre d'agriculture des Hautes Pyrénées/eplefpa 65, 2011.
- (9) Brundrett, M. C. Mycorrhizal Associations and Other Means of Nutrition of Vascular Plants: Understanding the Global Diversity of Host Plants by Resolving Conflicting Information and Developing Reliable Means of Diagnosis. *Plant Soil* **2009**, *320* (1), 37–77. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>.
- (10) Strullu-Derrien, C.; Selosse, M.-A.; Kenrick, P.; Martin, F. M. The Origin and Evolution of Mycorrhizal Symbioses: From Palaeomycology to Phylogenomics. *New Phytol.* **2018**, *220* (4), 1012–1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>.
- (11) Tedersoo, L.; Bahram, M. Mycorrhizal Types Differ in Ecophysiology and Alter Plant Nutrition and Soil Processes. *Biol. Rev.* **2019**, *94* (5), 1857–1880.
- (12) Morrisette, N. Les Mycorhizes Éricoïdes: Un Potentiel Biotechnologique Pour Favoriser l'établissement de Plants de Bleuets Sur Les Sites Perturbés Par l'exploitation Des Sables Bitumineux En Forêt Boréale Canadienne. **2011**.
- (13) Merckx, V. *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi*; 2012; p 356. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5209-6>.
- (14) Brundrett, M. C.; Tedersoo, L. Evolutionary History of Mycorrhizal Symbioses and Global Host Plant Diversity. *New Phytol.* **2018**, *220* (4), 1108–1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>.
- (15) Berthelot, C. Les Endophytes Bruns Septés Dans Les Sols Pollués Aux Éléments Traces Métalliques (ETM). **2017**.
- (16) He, C.; Wang, W.; Hou, J. Characterization of Dark Septate Endophytic Fungi and Improve the Performance of Liquorice Under Organic Residue Treatment. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01364>.
- (17) Jumpponen, A. Dark Septate Endophytes—Are They Mycorrhizal? *Mycorrhiza* **2001**, *11* (4), 207–211.
- (18) Soudzilovskaia, N. A.; Vaessen, S.; Barcelo, M.; He, J.; Rahimlou, S.; Abarenkov, K.; Brundrett, M. C.; Gomes, S. I. F.; Merckx, V.; Tedersoo, L. FungalRoot: Global Online

- Database of Plant Mycorrhizal Associations. *New Phytol.* **2020**, 227 (3), 955–966. <https://doi.org/10.1111/nph.16569>.
- (19) Landeweert, R.; Hoffland, E.; Finlay, R. D.; Kuyper, T. W.; van Breemen, N. Linking Plants to Rocks: Ectomycorrhizal Fungi Mobilize Nutrients from Minerals. *Trends Ecol. Evol.* **2001**, 16 (5), 248–254. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02122-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02122-X).
 - (20) Van Der Heijden, M. G.; Bardgett, R. D.; Van Straalen, N. M. The Unseen Majority: Soil Microbes as Drivers of Plant Diversity and Productivity in Terrestrial Ecosystems. *Ecol. Lett.* **2008**, 11 (3), 296–310.
 - (21) Singh, S. R.; Singh, U.; Chaubey, A. Mycorrhizal Fungi for Sustainable Agriculture-a Review. *Agric. Rev.* **2010**, 31 (2).
 - (22) Kikvidze, Z.; Armas, C.; Fukuda, K.; Martínez-García, L.; Miyata, M.; Oda-Tanaka, A.; Pugnaire, F. I.; Wu, B. The Role of Arbuscular Mycorrhizae in Primary Succession: Differences and Similarities across Habitats. *Web Ecol.* **2010**, 10 (1), 50–57.
 - (23) Bennett, A. E.; Classen, A. T. Climate Change Influences Mycorrhizal Fungal–Plant Interactions, but Conclusions Are Limited by Geographical Study Bias. *Ecology* **2020**, 101 (4), e02978. <https://doi.org/10.1002/ecy.2978>.
 - (24) Bunn, R. A.; Simpson, D. T.; Bullington, L. S.; Lekberg, Y.; Janos, D. P. Revisiting the ‘Direct Mineral Cycling’ Hypothesis: Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonize Leaf Litter, but Why? *ISME J.* **2019**, 13 (8), 1891–1898. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0403-2>.
 - (25) Deslippe, J. R.; Hartmann, M.; Mohn, W. W.; Simard, S. W. Long-Term Experimental Manipulation of Climate Alters the Ectomycorrhizal Community of *Betula Nana* in Arctic Tundra. *Glob. Change Biol.* **2011**, 17 (4), 1625–1636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02318.x>.
 - (26) Miyamoto, Y.; Terashima, Y.; Nara, K. Temperature Niche Position and Breadth of Ectomycorrhizal Fungi: Reduced Diversity under Warming Predicted by a Nested Community Structure. *Glob. Change Biol.* **2018**, 24 (12), 5724–5737.
 - (27) Morgado, L. N.; Semenova, T. A.; Welker, J. M.; Walker, M. D.; Smets, E.; Gempl, J. Summer Temperature Increase Has Distinct Effects on the Ectomycorrhizal Fungal Communities of Moist Tussock and Dry Tundra in Arctic Alaska. *Glob. Change Biol.* **2015**, 21 (2), 959–972.
 - (28) Fernandez, C. W.; Nguyen, N. H.; Stefanski, A.; Han, Y.; Hobbie, S. E.; Montgomery, R. A.; Reich, P. B.; Kennedy, P. G. Ectomycorrhizal Fungal Response to Warming Is Linked to Poor Host Performance at the Boreal-temperate Ecotone. *Glob. Change Biol.* **2017**, 23 (4), 1598–1609.
 - (29) Alberton, O.; Kuyper, T. W.; Gorissen, A. Taking Mycocoentrism Seriously: Mycorrhizal Fungal and Plant Responses to Elevated CO₂. *New Phytol.* **2005**, 167 (3), 859–868. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01458.x>.
 - (30) Treseder, K. K. A Meta-analysis of Mycorrhizal Responses to Nitrogen, Phosphorus, and Atmospheric CO₂ in Field Studies. *New Phytol.* **2004**, 164 (2), 347–355.
 - (31) Worchel, E. R.; Giauque, H. E.; Kivlin, S. N. Fungal Symbionts Alter Plant Drought Response. *Microb. Ecol.* **2013**, 65 (3), 671–678.
 - (32) Compant, S.; Van Der Heijden, M. G.; Sessitsch, A. Climate Change Effects on Beneficial Plant–Microorganism Interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2010**, 73 (2), 197–214.
 - (33) Cudlín, P.; Rudawska, M.; Grebenc, T.; Alberton, O.; Lehto, T.; Bakker, M.; Børja, I.; Konôpka, B.; Leski, T.; Kraigher, H.; Kuyper, T. Fine Roots and Ectomycorrhizas as Indicators of Environmental Change. *Plant Biosyst.* **2007**, 141, 406–425. <https://doi.org/10.1080/11263500701626028>.

- (34) Staddon, P. L.; Thompson, K.; Jakobsen, I.; Grime, J. P.; Askew, A. P.; Fitter, A. H. Mycorrhizal Fungal Abundance Is Affected by Long-term Climatic Manipulations in the Field. *Glob. Change Biol.* **2003**, 9 (2), 186–194.
- (35) Brunner, I.; Herzog, C.; Dawes, M. A.; Arend, M.; Sperisen, C. How Tree Roots Respond to Drought. *Front. Plant Sci.* **2015**, 6, 547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>.
- (36) Aryal, P.; Meiners, S. J.; Carlswald, B. S. Ectomycorrhizae Determine Chestnut Seedling Growth and Drought Response. *Agrofor. Syst.* **2021**, 95 (7), 1251–1260. <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00488-4>.
- (37) Siemens, J.; Zwiazek, J. Root Hydraulic Properties and Growth of Balsam Poplar (*Populus Balsamifera*) Mycorrhizal with *Hebeloma Crustuliniforme* and *Wilcoxina Mikolae* Var. *Mikolae*. *Mycorrhiza* **2008**, 18, 393–401. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0193-2>.
- (38) Jany, J.-L.; Martin, F.; Garbaye, J. Respiration Activity of Ectomycorrhizas from *Cenococcum Geophilum* and *Lactarius* Sp. in Relation to Soil Water Potential in Five Beech Forests. *Plant Soil* **2003**, 255 (2), 487–494.
- (39) Di Pietro, M.; Churin, J.-L.; Garbaye, J. Differential Ability of Ectomycorrhizas to Survive Drying. *Mycorrhiza* **2007**, 17 (6), 547–550.
- (40) Fernandez, C. W.; Koide, R. T. The Function of Melanin in the Ectomycorrhizal Fungus *Cenococcum Geophilum* under Water Stress. *Fungal Ecol.* **2013**, 6 (6), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.08.004>.
- (41) Lankau, R. A.; Zhu, K.; Ordóñez, A. Mycorrhizal Strategies of Tree Species Correlate with Trailing Range Edge Responses to Current and Past Climate Change. *Ecology* **2015**, 96 (6), 1451–1458. <https://doi.org/10.1890/14-2419.1>.
- (42) Sato, H.; Tanabe, A. S.; Toju, H. Contrasting Diversity and Host Association of Ectomycorrhizal Basidiomycetes versus Root-Associated Ascomycetes in a Dipterocarp Rainforest. *PLOS ONE* **2015**, 10 (4), e0125550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125550>.
- (43) Peay, K. G.; Bidartondo, M. I.; Elizabeth Arnold, A. Not Every Fungus Is Everywhere: Scaling to the Biogeography of Fungal–Plant Interactions across Roots, Shoots and Ecosystems. *New Phytol.* **2010**, 185 (4), 878–882. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03158.x>.
- (44) Davison, J.; Moora, M.; Öpik, M.; Adholeya, A.; Ainsaar, L.; Bâ, A.; Burla, S.; Diedhiou, A.; Hiiesalu, I.; Jairus, T. Global Assessment of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Diversity Reveals Very Low Endemism. *Science* **2015**, 349 (6251), 970–973.
- (45) Pringle, A.; Bever, J. D.; Gardes, M.; Parrent, J. L.; Rillig, M. C.; Klironomos, J. N. Mycorrhizal Symbioses and Plant Invasions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2009**, 40 (1), 699–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173454>.
- (46) Nuñez, M. A.; Horton, T. R.; Simberloff, D. Lack of Belowground Mutualisms Hinders Pinaceae Invasions. *Ecology* **2009**, 90 (9), 2352–2359. <https://doi.org/10.1890/08-2139.1>.
- (47) De Frenne, P.; Baeten, L.; Graae, B. J.; Brunet, J.; Wulf, M.; Orczewska, A.; Kolb, A.; Jansen, I.; Jamoneau, A.; Jacquemyn, H. Interregional Variation in the Floristic Recovery of Post-agricultural Forests. *J. Ecol.* **2011**, 99 (2), 600–609.
- (48) Boutin, M.; Lamaze, T.; Couvidat, F.; Pornon, A. Subalpine Pyrenees Received Higher Nitrogen Deposition than Predicted by EMEP and CHIMERE Chemistry-Transport Models. *Sci. Rep.* **2015**, 5 (1), 12942. <https://doi.org/10.1038/srep12942>.
- (49) Sala Osvaldo E.; Stuart Chapin F.; III null; Armesto Juan J.; Berlow Eric; Bloomfield Janine; Dirzo Rodolfo; Huber-Sanwald Elisabeth; Huenneke Laura F.; Jackson Robert B.; Kinzig Ann; Leemans Rik; Lodge David M.; Mooney Harold A.; Oesterheld

- Martín; Poff N. LeRoy; Sykes Martin T.; Walker Brian H.; Walker Marilyn; Wall Diana H. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* **2000**, 287 (5459), 1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>.
- (50) Lilleskov, E.; Kuyper, T.; Bidartondo, M.; Hobbie, E. Atmospheric Nitrogen Deposition Impacts on the Structure and Function of Forest Mycorrhizal Communities: A Review. *Environ. Pollut.* **2018**, 246. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.074>.
- (51) Suz, L. M.; Bidartondo, M. I.; van der Linde, S.; Kuyper, T. W. Ectomycorrhizas and Tipping Points in Forest Ecosystems. *New Phytol.* **2021**.
- (52) Hartmann, M.; Howes, C. G.; VanInsberghe, D.; Yu, H.; Bachar, D.; Christen, R.; Henrik Nilsson, R.; Hallam, S. J.; Mohn, W. W. Significant and Persistent Impact of Timber Harvesting on Soil Microbial Communities in Northern Coniferous Forests. *ISME J.* **2012**, 6 (12), 2199–2218. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.84>.
- (53) Kyaschenko, J.; Clemmensen, K. E.; Hagenbo, A.; Karlton, E.; Lindahl, B. D. Shift in Fungal Communities and Associated Enzyme Activities along an Age Gradient of Managed Pinus Sylvestris Stands. *ISME J.* **2017**, 11 (4), 863–874. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.184>.
- (54) Walker, J. K. M.; Ward, V.; Paterson, C.; Jones, M. D. Coarse Woody Debris Retention in Subalpine Clearcuts Affects Ectomycorrhizal Root Tip Community Structure within Fifteen Years of Harvest. *Sel. Pap. 2011 Soil Ecol. Soc. Conf.* **2012**, 60, 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.017>.
- (55) Dickie, I. A.; Richardson, S. J.; Wiser, S. K. Ectomycorrhizal Fungal Communities and Soil Chemistry in Harvested and Unharvested Temperate Nothofagus Rainforests. *Can. J. For. Res.* **2009**, 39 (6), 1069–1079. <https://doi.org/10.1139/X09-036>.
- (56) Buée, M.; Vairelles, D.; Garbaye, J. Year-Round Monitoring of Diversity and Potential Metabolic Activity of the Ectomycorrhizal Community in a Beech (Fagus Silvatica) Forest Subjected to Two Thinning Regimes. *Mycorrhiza* **2005**, 15 (4), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s00572-004-0313-6>.
- (57) Nagati, M. Effet Du Couvert Végétal et Des Microorganismes Sur l'établissement Du Sapin En Forêt Boréale, 2019.
- (58) Lindahl, B. D.; Nilsson, R. H.; Tedersoo, L.; Abarenkov, K.; Carlsen, T.; Kjølner, R.; Kõljalg, U.; Pennanen, T.; Rosendahl, S.; Stenlid, J.; Kauserud, H. Fungal Community Analysis by High-Throughput Sequencing of Amplified Markers – a User's Guide. *New Phytol.* **2013**, 199 (1), 288–299. <https://doi.org/10.1111/nph.12243>.
- (59) Alberdi, A.; Gilbert, M. T. P. A Guide to the Application of Hill Numbers to DNA-Based Diversity Analyses. *Mol. Ecol. Resour.* **2019**, 19 (4), 804–817. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13014>.
- (60) Gorissen, A.; Kuyper, TH. W. Fungal Species-Specific Responses of Ectomycorrhizal Scots Pine (Pinus Sylvestris) to Elevated [CO₂]. *New Phytol.* **2000**, 146 (1), 163–168. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00610.x>.
- (61) Mo, Y.; Wang, Y.; Ruiping, Y.; Zheng, J.; Liu, C.; Li, H.; Ma, J.; Zhang, Y.; Wei, C.; Zhang, X. Regulation of Plant Growth, Photosynthesis, Antioxidation and Osmosis by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus in Watermelon Seedlings under Well-Watered and Drought Conditions. *Front. Plant Sci.* **2016**, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00644>.
- (62) Soudzilovskaia, N. A.; Douma, J. C.; Akhmetzhanova, A. A.; van Bodegom, P. M.; Cornwell, W. K.; Moens, E. J.; Treseder, K. K.; Tibbett, M.; Wang, Y.; Cornelissen, J. H. Global Patterns of Plant Root Colonization Intensity by Mycorrhizal Fungi Explained by Climate and Soil Chemistry. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **2015**, 24 (3), 371–382.

- (63) Treseder, K. K. The Extent of Mycorrhizal Colonization of Roots and Its Influence on Plant Growth and Phosphorus Content. *Plant Soil* **2013**, 371 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1681-5>.
- (64) Sakakibara, S. M.; Jones, M. D.; Gillepsie, M.; Hagerman, S. M.; Forrest, M. E.; Simard, S. W.; Durall, D. M. A Comparison of Ectomycorrhiza Identification Based on Morphotyping and PCR-RFLP Analysis. *Mycol. Res.* **2002**, 106 (8), 868–878. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006263>.
- (65) Tedersoo, L.; Bahram, M.; Jairus, T.; Bechem, E.; Chinoya, S.; MPUMBA, R.; LEAL, M.; RANDRIANJOHANY, E.; RAZAFIMANDIMBISON, S.; SADAM, A.; NAADEL, T.; KÖLJALG, U. Spatial Structure and the Effects of Host and Soil Environments on Communities of Ectomycorrhizal Fungi in Wooded Savannas and Rain Forests of Continental Africa and Madagascar. *Mol. Ecol.* **2011**, 20 (14), 3071–3080. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05145.x>.
- (66) Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G. Microbial Diversity and Soil Functions. *Eur. J. Soil Sci.* **2003**, 54 (4), 655–670.
- (67) Cheeke, T. E.; Phillips, R. P.; Brzostek, E. R.; Rosling, A.; Bever, J. D.; Fransson, P. Dominant Mycorrhizal Association of Trees Alters Carbon and Nutrient Cycling by Selecting for Microbial Groups with Distinct Enzyme Function. *New Phytol.* **2017**, 214 (1), 432–442. <https://doi.org/10.1111/nph.14343>.
- (68) Lindahl, B. D.; Tunlid, A. Ectomycorrhizal Fungi–Potential Organic Matter Decomposers, yet Not Saprotrophs. *New Phytol.* **2015**, 205 (4), 1443–1447.
- (69) Phillips, R. P.; Fahey, T. J. Tree Species and Mycorrhizal Associations Influence the Magnitude of Rhizosphere Effects. *Ecology* **2006**, 87 (5), 1302–1313. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1302:TSAMAI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1302:TSAMAI]2.0.CO;2).
- (70) Fernandez, C. W.; Kennedy, P. G. Revisiting the ‘Gadgil Effect’: Do Interguild Fungal Interactions Control Carbon Cycling in Forest Soils? *New Phytol.* **2016**, 209 (4), 1382–1394.
- (71) Gadgil, P. D.; Gadgil, R. L. *Suppression of Litter Decomposition by Mycorrhizal Roots of Pinus Radiata*; New Zealand Forest Service, 1975.
- (72) Keuskamp, J. A.; Dingemans, B. J. J.; Lehtinen, T.; Sarneel, J. M.; Hefting, M. M. Tea Bag Index: A Novel Approach to Collect Uniform Decomposition Data across Ecosystems. *Methods Ecol. Evol.* **2013**, 4 (11), 1070–1075. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12097>.
- (73) Cullings, K.; Courty, P.-E. Saprotrophic Capabilities as Functional Traits to Study Functional Diversity and Resilience of Ectomycorrhizal Community. *Oecologia* **2009**, 161, 661–664. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1434-6>.
- (74) Montgomery, H.; Monreal, C.; Young, J.; Seifert, K. Determination of Soil Fungal Biomass from Soil Ergosterol Analyses. *Soil Biol. Biochem.* **2000**, 32 (8–9), 1207–1217.
- (75) mycoagra. Fiche Technique : Détermination de La Biomasse Fongique via Le Dosage de l’ergostérol. 2019.
- (76) Hannoir, C.; Corriol, G. *Etude Mycologique de 6 Forêts Témoins Du Réseau Du PNR Pyrénées Ariégeoises (Barjac, Camarade, Montgauch, Rimont, Rivèrenert, Sainte-Croix- Volvestre)*; Conservatoire botanique national et Parc Naturel Régional Pyrénées Ariégeoises, 2020.
- (77) Taylor, D. L.; Hollingsworth, T.; McFarland, J.; Lennon, N.; Nusbaum, C.; Ruess, R. A First Comprehensive Census of Fungi in Soil Reveals Both Hyperdiversity and Fine-Scale Niche Partitioning. *Ecol. Monogr.* **2014**, 84, 3–20. <https://doi.org/10.1890/12-1693.1>.

Annexes

Annexe 1

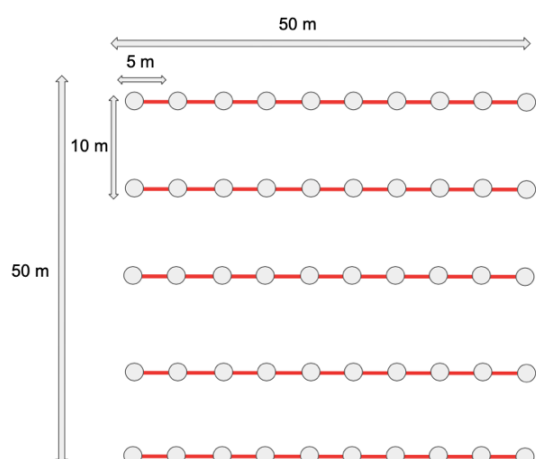


Figure A1 50 échantillons sont prélevés par parcelle (organique (0-10 cm) et minéral (10-20 cm)). Les échantillons sont mis en commun par transect et par horizon de sols. Au total, 10 échantillons sont analysés ⁷⁷.

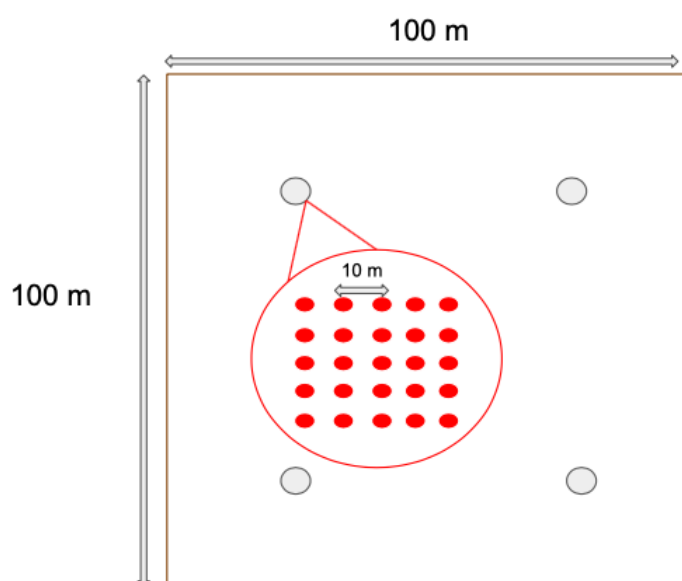


Figure A2 4 échantillons sont prélevés (0-5 cm de profondeur) par parcelle de 2 ha. Chaque échantillon est composé de 25 échantillons).

Annexe 2

	Protocole 1 (n=16)	Protocole 3 (n=4)	Protocole 4 (n=1)
Tests Novembre 2021 (€)	(4485)	/	/
Total Chantier 1 –Février 2022 (€)	8480	3774	2686
Total Chantier 2 –Février 2027 (€)	8480	3774	2686
Nombre d'échantillons	528	132	33
Total budget – EDB (€)	16960	7 548	5 372
Total budget – Aurea (€) HT	158 400	39 600	9 900

Annexe 3 : Expérience sur les réseaux d'EcM

Informations générales

La capacité des champignons ectomycorhiziens à former des réseaux participe à leur rôle dans la régénération des espèces en favorisant la croissance des semis et plantules. Dans le cadre de l'étude de la résilience des forêts du territoire face aux changements climatiques, il est important de comprendre dans quelle mesure ces réseaux sont (1) présents et abondants dans le territoire et (2) jouent un rôle dans cette régénération. Ces questions font partie des questions de recherche de la thèse d'Alexandre Raimbault supervisé par Mélanie Roy à l'Université de Paul Sabatier. Dans le cadre de son projet, Alexandre Raimbault prévoit de tester le rôle de réseaux EcM dans la croissance de plantules de hêtre et de chênes sur différents sites du PNR. Le choix de ces sites doit encore être défini. Les plantules devront subir trois types de traitements leur permettant d'avoir accès :

- Au réseau mycorhizien et aux racines des arbres environnants
- Au réseau mycorhizien uniquement
- À aucun de ces réseaux (Isolement de la plantule)

Les variables qui seront mesurées sur les plantules après l'expérience :

- Biomasse végétale (poids frais-poids sec)
- État hydrique semis et sol (teneur en eau des racines et des feuilles)
- Analyse du carbone et de l'azote (feuilles)
- Analyse des pigments photosynthétiques

a. Intérêts pour les objectifs de la mission

Les informations obtenues associées aux données obtenues via les analyses moléculaires permettront d'établir une corrélation entre la régénération des plantules et les résultats moléculaires observés. Par exemple, si une des conclusions de l'expérience d'Alexandre

Raimbault prouve qu'une diversité plus élevée d'ECM entraîne une meilleure régénération des plantules, cela permet de conclure qu'une méthode sylvicole augmentant la diversité des espèces entraîne aussi une amélioration de la régénération des plantules.