



**HAL**  
open science

# Rôle et diversité des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition du mycélium (matière organique fongique) dans les sols forestiers

Elsa Hilaire

► **To cite this version:**

Elsa Hilaire. Rôle et diversité des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition du mycélium (matière organique fongique) dans les sols forestiers. *Microbiologie et Parasitologie*. 2022. hal-04586397

**HAL Id: hal-04586397**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04586397>**

Submitted on 24 May 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

Mémoire diffusé sur recommandation des responsables du Master

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)  
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## Master Microbiologie 2<sup>ème</sup> année

Orientation Microbiologie Environnementale et Sanitaire  
Année universitaire 2021/2022

# Rôle et diversité des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition du mycélium (matière organique fongique) dans les sols forestiers

Elsa HILAIRE

Encadrée par Marc BUEE, directeur de recherche

INRAE Grand-Est  
Rue d'Amance, Champenoux  
Unité Interactions Arbres-Microorganismes – UMR 1136  
Equipe Ecogénomique des interactions

Du 17 janvier au 15 juillet 2022





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marc Buée de m'avoir accordée sa confiance tout au long de ce stage. Merci Marc pour votre aide, votre patience, votre écoute et votre bonne humeur quotidienne. Merci de vous être toujours rendu disponible lorsque j'en avais besoin et de m'avoir accompagnée dans de nombreuses sorties en forêt en compagnie de Rita afin de récolter nos échantillons. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés durant ce stage, qui a été pour moi très enrichissant et épanouissant.

Pour les équipes participant à ce projet : merci à Marie-France Dignac (IEES) et Michael Danger (LIEC) pour votre implication dans les analyses biochimiques ; aux équipes du BEF et à Bernd Zeller d'entretenir le réseau MOS sur lequel nous avons travaillé, à Bernd pour sa soudeuse, sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser les quelques 500 mesh-bags ; à Aurélie Cébron de m'avoir accueillie au sein du LIEC, merci pour le temps que vous m'avez accordé et pour votre aide précieuse dans les expériences de DNA-SIP.

Je remercie toute l'équipe Econématique pour son accueil et son aide.

Merci à Gabrielle pour son implication dans ce projet ; à Fadwa pour son aide sur R et sa bonne humeur ; à Félix pour ses conseils en statistiques ainsi qu'à Hugo pour son aide à la réalisation des mesh-bags et à la mise en place du dispositif expérimental.

Je remercie le "bureau des stagiaires" qui a permis à tous de travailler dans la joie, la bonne humeur et l'entraide. Lora, Lilian, Clément, Guillaume, Hugo, Maud, Charlotte et Lola, merci à tous pour ces bons moments passés à vos côtés, pour votre humour et votre bonne humeur.

Et enfin, je te remercie, Lisa, pour ces cinq années d'études passées à tes côtés, pour tous ces compte-rendu de TP, ces présentations orales, et ces projets que nous avons toujours réalisés ensemble. Merci pour ce binôme inséparable, cette belle amitié et ton soutien au quotidien.



# Sommaire

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>8</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>9</b>
1. Préambule et présentation de la structure d'accueil .....	9
2. Introduction générale et état de l'art.....	10
3. Différents outils et méthodes sont mobilisables en écologie fonctionnelle .....	12
4. Contexte socio-environnemental de l'étude .....	14
5. Description du projet d'étude.....	15
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>18</b>
1. Site d'étude et plan d'expérience .....	18
2. Matériel biologique, production de la nécromasse fongique et dosage de la mélanine .....	21
3. Mise en place du dispositif expérimental.....	22
4. Suivi et mesures des indicateurs de la décomposition fongique.....	23
5. Etude des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition par des méthodes de biologie moléculaire.....	24
<b>Résultats</b> .....	<b>27</b>
1. Impact de la qualité du mycélium (teneur en mélanine et C/N) sur la dynamique de décomposition des nécromasses de <i>H. incarcerationum</i> , <i>L. bicolor</i> et <i>P. robustus</i> dans un sol forestier en gestion conventionnelle .....	27
2. Conséquence de l'exportation des litières et de rémanents forestiers sur la dynamique de dégradation de la nécromasse fongique de <i>L. bicolor</i> et <i>P. robustus</i> .....	33
3. DNA Stable Isotope Probing : résultats techniques.....	35
<b>Discussion</b> .....	<b>37</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>41</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>42</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>45</b>
<b>Convention de stage</b> .....	<b>48</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>49</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>50</b>

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	Acide désoxyribonucléique environnemental
BEF	Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers
C	Carbone
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
CsCl	Chlorure de césium
DNA-SIP	DNA Stable Isotope Probing
DYNAMOMIES	DYNAMique de la Matière Organique MicrobiennE dans les Sols forestiers
FD	Forêt domaniale
HCl	Chlorure d'hydrogène
IAM	Interactions Arbres-Microorganismes
IEES	Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
LIEC	Laboratoires Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
MBF	Marc Buée Fungi
MO	Matière Organique
MOS	Matière Organique des Sols
N	Azote
P	Phosphate
P5	Milieu Pachlewski 5
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Organigramme de l'unité IAM (INRAE) .....	10
<b>Figure 2</b> : Stabilisation et assimilation du carbone par les microorganismes du sol .....	11
<b>Figure 3</b> : Placettes du réseau MOS dans la forêt domaniale de Champenoux, 54280, France .....	16
<b>Figure 4</b> : Dispositif de l'expérience 1 .....	19
<b>Figure 5</b> : Dispositif de l'expérience 2 .....	20
<b>Figure 6</b> : Pourcentage de mélanisation des masses sèches de <i>H. incarcerationum</i> , <i>L. bicolor</i> et <i>P. robustus</i> .....	27
<b>Figure 7</b> : Perte de masse des trois types de nécromasse fongique ( <i>H. incarcerationum</i> , <i>L. bicolor</i> , <i>P. robustus</i> ), entre les trois temps d'incubation dans la placette 1 (gestion forestière conventionnelle) .....	28
<b>Figure 8</b> : Dynamique de décomposition de la nécromasse fongique de <i>L. bicolor</i> et <i>P. robustus</i> non complémentée en azote, après incubation dans le sol forestier avec une gestion conventionnelle .....	29
<b>Figure 9</b> : Effet de l'ajout d'azote sur la perte de masse in situ (gestion conventionnelle) de <i>L. bicolor</i> et les activités enzymatiques associées .....	32
<b>Figure 10</b> : Effet de l'ajout d'azote sur la perte de masse in situ (gestion conventionnelle) de <i>P. robustus</i> et les activités enzymatiques associées .....	32
<b>Figure 11</b> : Impact de l'exportation des rémanents forestiers et des litières sur la dynamique de dégradation de <i>L. bicolor</i> et <i>P. robustus</i> .....	34
<b>Figure 12</b> : Identification des fractions du gradient de densité contenant l'ADN enrichi ( <sup>13</sup> C et <sup>15</sup> N) et des fractions contenant l'ADN non enrichi ( <sup>12</sup> C et <sup>14</sup> N), à partir de la nécromasse de <i>H. incarcerationum</i> complémenté ou non en azote .....	36

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Amorces PCR « rallongées » utilisées pour le séquençage Illumina MiSeq .....24

**Tableau 2** : Dosage de l'azote et du carbone moléculaire et rapports C/N dans la nécromasse fongique à T0 (nécromasse initiale, non dégradée) et T1 (après 15 jours d'incubation dans le sol forestier) .....31

# Introduction

## 1. Préambule et présentation de la structure d'accueil

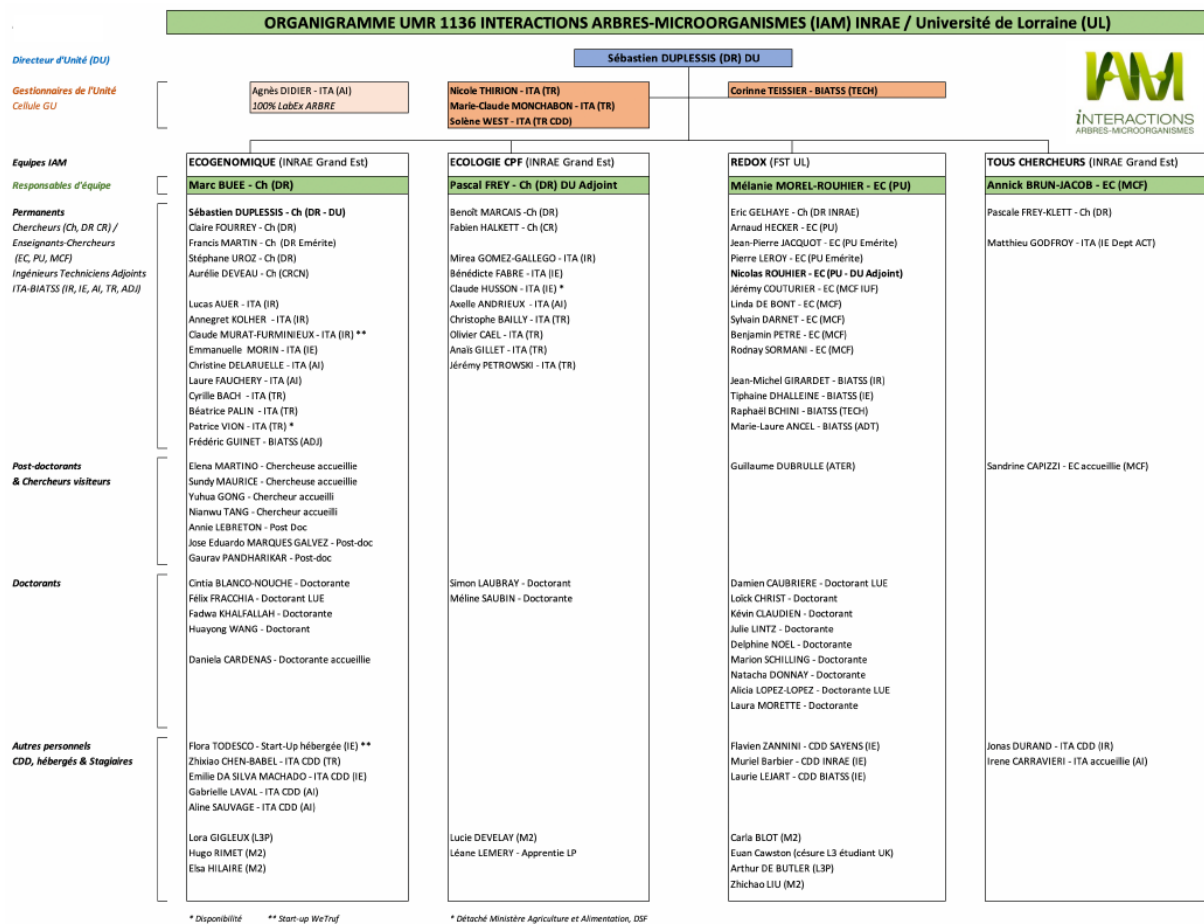
Le travail présenté ici s'inscrit dans un projet d'étude pluridisciplinaire réalisé en collaboration entre l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) et le Centre National de Recherche Scientifique (CNRS). Il réunit différentes équipes : l'Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES), le Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), les unités de recherche Biologie des Ecosystèmes Forestiers (BEF) et Interactions Arbres-Microorganismes (IAM) de l'INRAE.

Le stage de recherche (Master 2) présenté dans ce rapport a été réalisé sous la responsabilité de Marc Buée, dans le centre INRAE Grand-Est à Champenoux, au sein de l'Unité Mixte de Recherche IAM. Cette unité est divisée en trois équipes de recherche (Figure 1) dont le but est d'améliorer les connaissances et la compréhension des interactions entre les arbres, les champignons et les bactéries, qui contribuent au fonctionnement des écosystèmes forestiers. Les trois équipes de recherche sont les suivantes :

- Réponses aux stress et régulations redox (Université de Lorraine)
- Ecogénomique des interactions (Campus INRAE de Champenoux)
- Ecologie des champignons pathogènes forestiers (Campus INRAE de Champenoux)

L'unité accueille également sur le site de Champenoux un groupe de recherche en science participative, l'équipe « Tous Chercheurs ».

Le travail présenté ici fut réalisé au sein de l'équipe écogénomique des interactions. Cette équipe de recherche étudie l'écologie microbienne des écosystèmes forestiers par une approche génomique et moléculaire.



**Figure 1 : Organigramme de l'unité IAM (INRAE)**

## 2. Introduction générale et état de l'art

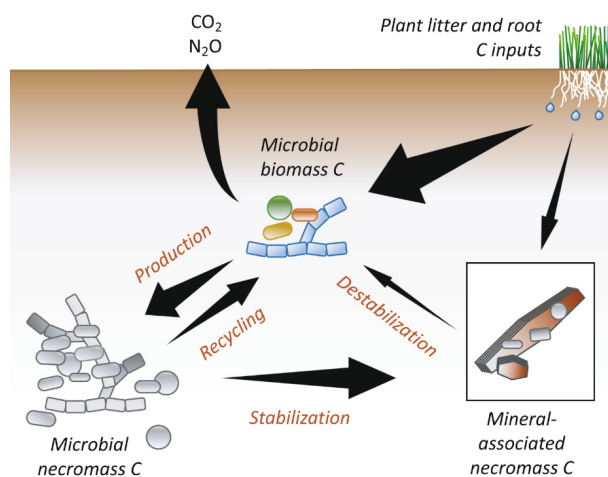
A travers la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique dans leur biomasse, les forêts constituent des puits de carbone importants à l'échelle mondiale, sachant que ces écosystèmes couvrent 31% des terres émergées (FAO, 2020 - Etat des forêts du monde). L'ensemble des forêts tempérées, qui sont majoritaires en France métropolitaine, participe à environ 30% du puit de carbone des forêts mondiales (Pan et al., 2011). De ce fait, ces écosystèmes ont un rôle majeur dans le cycle du carbone, mais aussi dans celui d'autres éléments, notamment l'azote (Schlesinger & Bernhardt, 2013).

Le stockage du carbone dans les forêts est estimé à 44% dans le sol (dans la matière organique et minérale), 42% dans la biomasse vivante en surface et dans le sol (végétaux, macrofaune, mésofaune et microorganismes), 8% dans le bois mort et 5% dans les litières (Pan et al., 2011). Les plantes contribuent à un apport de carbone dans les sols par le dépôt de litière, en surface, et par le développement de leurs racines dans le sol. La fragmentation des litières et des résidus ligneux par la macrofaune et la mésofaune permet d'augmenter la



surface de contact entre le substrat et les organismes décomposeurs et en particulier de faciliter sa colonisation par les microorganismes du sol et des litières.

Une partie du carbone sera stabilisée dans le sol minéral, et l'autre partie est stockée sous forme de matière organique (MO), produite en grande partie par la décomposition des débris végétaux (litières, racines, bois morts) par les organismes fongiques (Cotrufo et al., 2015). La MO végétale est assimilée par les microorganismes du sol pour produire de la biomasse. Ces microorganismes vont contribuer à la formation de la matière organique du sol (MOS) et représentent également une source de carbone en produisant des molécules sécrétées dans le sol, lorsqu'ils sont vivants, et en générant de la nécromasse en mourant (Figure 2) (Angst et al., 2021). La nécromasse microbienne pourra être recyclée par d'autres microorganismes vivants ou être stabilisée dans le sol minéral. Des déchets du métabolisme microbien, tel que le CO<sub>2</sub>, seront libérés dans l'atmosphère (Buckeridge et al., 2022).



**Figure 2** : Stabilisation et assimilation du carbone par les microorganismes du sol (Buckeridge et al., 2022)

Le carbone provenant des végétaux est stabilisé sur la matière minérale ou assimilé par les microorganismes du sol (production de biomasse, respiration, produits microbiens). A leur mort, les microorganismes forment de la nécromasse qui peut être assimilée par d'autres microorganismes ou stabilisée sur la matière minérale. La taille des flèches indique des flux hypothétiques différents entre les pools de carbone. (Buckeridge et al., 2022)

En forêts boréales, sur les premiers centimètres du sol, plus de 50% du carbone proviendrait de l'association des champignons mycorhiziens avec les racines fines des arbres (Clemmensen et al., 2013), importante source de matière organique lors du turnover des racines fines des arbres. Au sein des écosystèmes forestiers tempérés, la nécromasse fongique, quant à elle, représenterait plus de 25% du carbone organique du sol au sein des écosystèmes forestiers tempérés (Liang et al., 2019). Son taux de production est équivalent à son taux de consommation ce qui la rend plus abondante que la nécromasse bactérienne qui est consommée plus rapidement qu'elle n'est produite (Hu et al., 2018).

La dynamique de décomposition de la nécromasse fongique est décrite comme relativement rapide dans les premiers temps (jours et semaines), puis un plateau est atteint après quelques

semaines (Brabcová et al., 2016; Fernandez et al., 2019; Maillard et al., 2020). Ce ralentissement dans la décomposition de la nécromasse fongique pourrait être expliqué par la présence de composés plus stables. En effet, la décomposition du mycélium serait influencée par la qualité chimique de la matière organique fongique, en particulier sa stœchiométrie et sa teneur en mélanine (Fernandez & Koide, 2014). Le taux de mélanisation semble négativement corrélé à la vitesse de décomposition de la nécromasse fongique (Fernandez & Koide, 2014).

La mélanine est un polymère complexe de la paroi cellulaire, récalcitrant à la dégradation, et communément retrouvé chez les organismes fongiques, en proportions variables selon les espèces (Siletti et al., 2017). Elle est composée de monomères de phénol et d'indole et elle est responsable de la coloration foncée de certains hyphes fongiques et spores (Butler & Day, 1998).

De plus, la qualité biochimique de la biomasse fongique serait également corrélée à la présence d'azote (Beidler et al., 2020) et donc plus largement à la stœchiométrie des espèces. Les organismes de « bonne qualité » (faible taux de mélanine et fort taux d'azote) seraient donc plus rapidement dégradés que les organismes de « faible qualité » (fort taux de mélanine et faible taux d'azote) (Fernandez & Koide, 2014). De plus, la qualité chimique de la nécromasse fongique influence les communautés microbiennes impliquées dans sa dégradation. En effet, les différents taux de mélanisation, et par conséquent le temps de dégradation, affecteraient l'abondance relative des guildes fongiques associés à cette nécromasse (Fernandez & Kennedy, 2018) : des champignons pathotrophes seraient plus abondants sur une nécromasse de faible qualité et leur proportion diminuerait dans le temps, alors que sur une nécromasse de bonne qualité, les champignons ectomycorhiziens (ECM) sont plus abondants au cours du temps. Les communautés bactériennes, quant à elles, sont moins impactées par le taux de mélanisation de la nécromasse fongique à dégrader. Mais l'abondance de certaines bactéries capables de dégrader rapidement les tissus végétaux augmente (Fernandez & Kennedy, 2018).

### 3. Différents outils et méthodes sont mobilisables en écologie fonctionnelle et microbienne

Des analyses fonctionnelles montrent que les enzymes impliquées dans la dégradation de la nécromasse fongique ont une production dynamique dans le temps (Maillard et al., 2018) et plus particulièrement en fonction du niveau de dégradation (Maillard et al., 2021). La mobilisation du carbone est active durant les premiers temps de décomposition puis diminue.

L'assimilation de l'azote est constante durant la dégradation de la MO. Cependant, différentes enzymes impliquées dans son acquisition se succèdent, ce qui montre que la source d'azote microbienne varie au cours de la dégradation de la MO. Cette approche permet de déterminer les ressources utilisées par les microorganismes dégradeurs de la matière organique et ainsi de mieux appréhender les mécanismes enzymatiques impliqués au cours de la dynamique de dégradation de la nécromasse.

Le devenir de la nécromasse microbienne peut être également étudié par un enrichissement isotopique artificiel des substrats. Ainsi, Akroume et al., (2019) ont démontré que le champignon ECM *Paxillus involutus* pouvait incorporer l'azote organique ( $^{15}\text{N}$ ) à partir de nécromasse fongique et que cet azote était ensuite retrouvé chez sa plante hôte.

Pour s'affranchir des étapes de cultures, des techniques de DNA Stable Isotope Probing (DNA-SIP) permettent d'identifier les groupes d'organismes capables de dégrader de la matière organique avec un marquage isotopique, en conditions environnementales (Radajewski et al., 2000). Le substrat enrichi, le plus souvent en  $^{13}\text{C}$  et plus rarement en  $^{15}\text{N}$ , est incorporé dans un écosystème ou un dispositif expérimental contrôlé. Il sera alors dégradé par des organismes qui vont incorporer des molécules enrichies en  $^{13}\text{C}$  et/ou  $^{15}\text{N}$ , et notamment dans leur ADN. Ainsi, L'ADN (environnemental) enrichi / lourd peut être isolé de l'ADN environnemental non enrichi / naturel (Neufeld et al., 2007). Cette méthode a, par exemple, permis de mettre en évidence la dynamique de succession d'espèces fongiques dégradeurs de la nécromasse microbienne (Drigo et al., 2012).

Enfin, des analyses par « metabarcoding » (barcode moléculaire) permettent d'étudier la diversité des organismes vivants sur différents supports ou colonisant diverses matrices (Buée et al., 2009; DeAngelis et al., 2015) en étudiant l'ADN environnemental (ADNe), extrait de ces matrices (sol, bois mort, litières, plantes, etc.).

Beidler et al. (2020) ont ainsi montré que les communautés bactériennes et fongiques impliquées dans la dégradation de la nécromasse fongique étaient moins diversifiées que les communautés du sol, tout en hébergeant plus d'organismes copiotrophes. En effet, au début de la dégradation de la nécromasse fongique, les bactéries dominantes seraient copiotrophes. Puis, elles laisseraient place à des communautés oligotrophes (Maillard et al., 2021). La dynamique de colonisation de la nécromasse fongique correspondrait à la limitation des sources en carbone au cours du temps.

Les différentes méthodes d'analyses de la dégradation de la nécromasse fongique, et plus largement de la matière organique, permettent de mettre en parallèle les fonctions de dégradation avec la succession des organismes dégradeurs de la nécromasse (Viotti et al., 2021).

#### 4. Contexte socio-environnemental de l'étude

Ces études montrent l'importance des forêts, des sols forestiers et des microorganismes associés, dans le cycle du carbone. Il est donc nécessaire de prendre en compte la gestion sylvicole dans le maintien de l'équilibre de ces écosystèmes. Or, dans le contexte du changement global, les politiques actuelles ont pour objectif de limiter l'utilisation d'énergies fossiles au profit des énergies renouvelables, provenant du bois par exemple. Certaines instances publiques, comme l'ADEME (Agence Nationale de la Transition Ecologique), financent des projets dont le but est de favoriser l'utilisation de la biomasse forestière tout en respectant une gestion durable. Un de ces projets d'étude vise à exploiter les rémanents forestiers, qui habituellement restaient au sol, en les broyant afin de les utiliser comme énergie pour le bois de chauffage par exemple (« pellets »). Seulement, ces pratiques de retrait des rémanents forestiers impactent la fertilité des sols forestiers et leur fonctionnement biologique, comme illustré dans des dispositifs expérimentaux en France (Maillard et al., 2019). Plus largement, ce type de gestion entraîne dans les sols une diminution des stocks de carbone, mais aussi une diminution de la quantité d'éléments nutritifs (azote et phosphore, par exemple), une acidification des sols ou encore une diminution de la croissance des arbres (Achat et al., 2015).

Un projet d'étude mené par Akroume et al., (2017) a pour but d'étudier l'impact du retrait des rémanents forestiers sur le sol. Pour ce faire, un réseau MOS (Matières Organiques du Sol) a été créé à partir d'un partenariat entre INRAE et l'Office Nationale des Forêts (ONF). Le réseau MOS est un réseau de 12 placettes expérimentales. Il a été mis en place entre 2013 et 2014 dans différentes forêts françaises (hêtraies et chênaies) et il a pour but d'évaluer à court, moyen et long terme l'effet de l'exportation intensive de la biomasse forestière sur le fonctionnement des écosystèmes forestiers de plaine (Akroume et al., 2017).

Comme nous l'avons déjà indiqué, l'exploitation des rémanents forestiers impacte les fonctions microbiennes du sol. En particulier, les activités enzymatiques impliquées dans l'assimilation de l'azote et du phosphate diminuent dans les sols pour lesquels la MO végétale en surface est retirée (Maillard et al., 2019). De plus, les communautés microbiennes sont également impactées par cette gestion sylvicole intensive : l'abondance des bactéries copiotrophes

diminuent, au profit des communautés bactériennes oligotrophes qui elles, augmentent (Maillard et al., 2018). Le retrait des rémanents forestiers induit également une augmentation de la proportion des champignons ectomychoriziens (ECM) et des levures au dépend des champignons saprotrophes (Maillard et al., 2018).

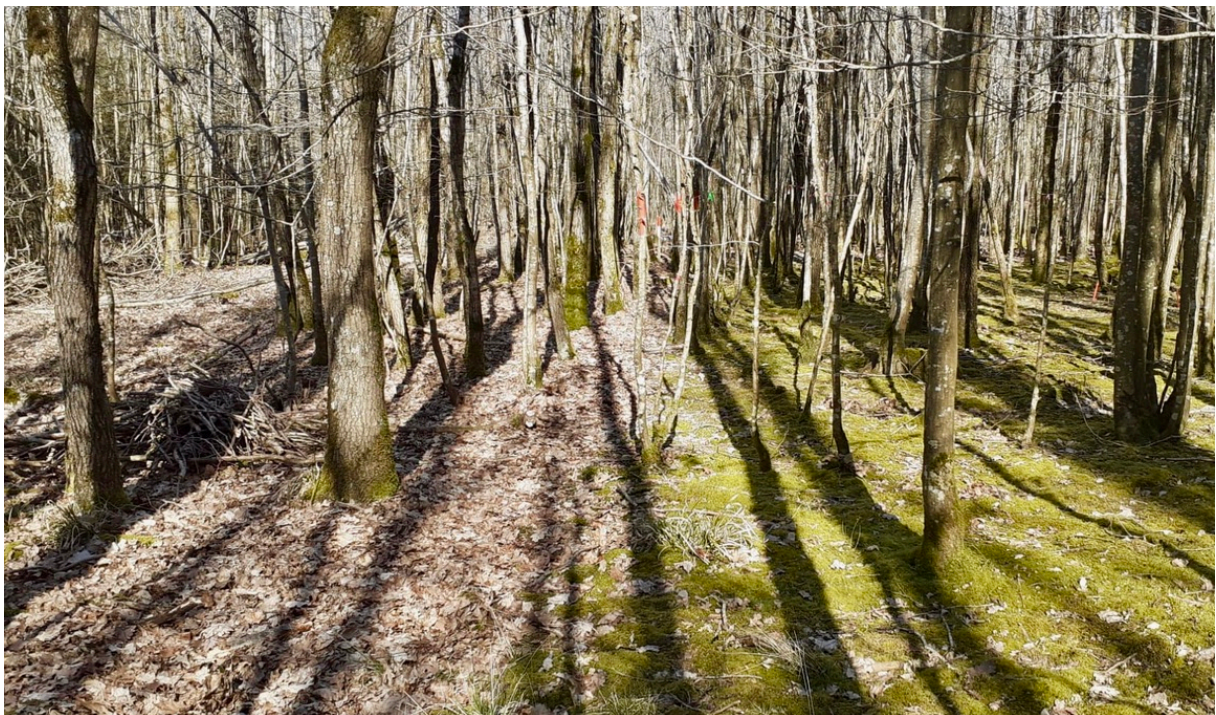
Dans ces études, l'exploitation intensive des rémanents forestiers a donc un impact sur certaines propriétés physico-chimiques du sol, mais plus particulièrement, et précocement, sur les communautés microbiennes, en termes de composition et de fonctions associées. Si ces changements peuvent être directement attribués à l'absence de matière organique d'origine végétale dans le traitement extrême, nous n'avons pas d'information sur l'évolution i) de la MO microbienne, en particulier fongique (en lien avec un potentiel déclin des champignons saprotrophes) et ii) de la diversité fonctionnelle microbienne potentiellement associée à la décomposition de la MO fongique (nécromasse). Il serait alors intéressant de caractériser d'avantage l'effet de ce changement de pratique sylvicole et son impact sur le stockage du carbone fongique, et plus largement de la nécromasse fongique, dans les sols forestiers.

#### 5. Description du projet d'étude

La nécromasse fongique étant une composante importante majoritaire de la matière organique des sols forestiers, il est essentiel de caractériser les microorganismes et les mécanismes impliqués autant dans sa formation que sa décomposition. Ces études permettraient alors de mieux appréhender les cycles du carbone et des nutriments dans les sols, notamment dans un contexte de changements des pratiques sylvicoles pour étudier l'impact de ces changements sur le bon fonctionnement de l'écosystème forestier. De plus, de récentes données indiqueraient que la notion d'homéostasie en écologie stœchiométrique ne soit pas toujours applicable, en particulier pour les champignons (résultats du laboratoire, Rimet, 2022). Alors que celle-ci est définie comme la capacité d'un organisme à conserver une composition chimique constante malgré la variation de la disponibilité de ses ressources, les ratio C/N des carpophores de certaines espèces de champignons ECM semblent significativement évoluer consécutivement à une forte exportation de biomasse (Buée et Rimet, communications personnelles). Ainsi, la qualité biogéochimique de la nécromasse microbienne ayant probablement un impact sur sa dégradation, il est important de caractériser sa composition stœchiométrique (C, N, P), sa teneur en mélanine ainsi que les communautés microbiennes associées à cette nécromasse au cours du processus de décomposition.

Le projet DYNAMOMIES (DYNAmique de la Matière Organique MicrobiennE dans les Sols forestiers), dont cette étude fait partie a pour objectif d'analyser la dynamique de décomposition de la matière organique microbienne, et plus particulièrement la nécromasse fongique. Pour cela, différentes approches vont permettre d'étudier l'impact de la composition chimique de la nécromasse fongique (teneurs en mélanine et ratios C/N/P) sur sa dégradation et sur la dynamique des communautés microbiennes décomposeurs de cette nécromasse (metabarcoding). Les acteurs de la décomposition de la nécromasse fongique seront identifiés par la méthode DNA-SIP.

Ce projet permettra également d'évaluer l'impact de l'exportation des rémanents forestiers sur les activités microbiennes du sol, en travaillant au sein du réseau MOS (Akroume et al., 2017), dans la forêt domaniale de Champenoux (France). La dégradation de la nécromasse fongique sera comparée entre un sol forestier associé à une gestion sylvicole conventionnelle et un sol de forêt soumise à l'exportation de ses rémanents et litières (Figure 3).



**Figure 3** : Placettes du réseau MOS dans la forêt domaniale de Champenoux, 54280, France

A gauche : gestion conventionnelle de la forêt ; A droite : retrait des litières et rémanents forestiers tous les ans en hiver

Image : Elsa Hilaire

Ce projet a différents objectifs :

- Mesurer les effets de la qualité de la matière organique fongique (nécromasse) (teneur en mélanine, ratios C/N et C/P) sur sa dynamique de décomposition

- Identifier la succession des microorganismes (richesse et diversité) impliqués dans la décomposition de la matière organique fongique (nécromasse) au cours du temps
- Évaluer les conséquences de l'exportation de biomasse végétale (rémanents forestiers) sur le fonctionnement des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition de la matière organique fongique.

## Matériels et méthodes

### 1. Site d'étude et plan d'expérience

Les expérimentations ont été réalisées dans la forêt domaniale (FD) de Champenoux (France, 54280), sur deux placettes faisant partie d'un réseau d'expérimentation appelé réseau MOS (Matière Organique des Sols) (Akroume et al., 2017) (Coordonnées Lambert93 : dirN=6852020.9 dirE=945689.4 280).

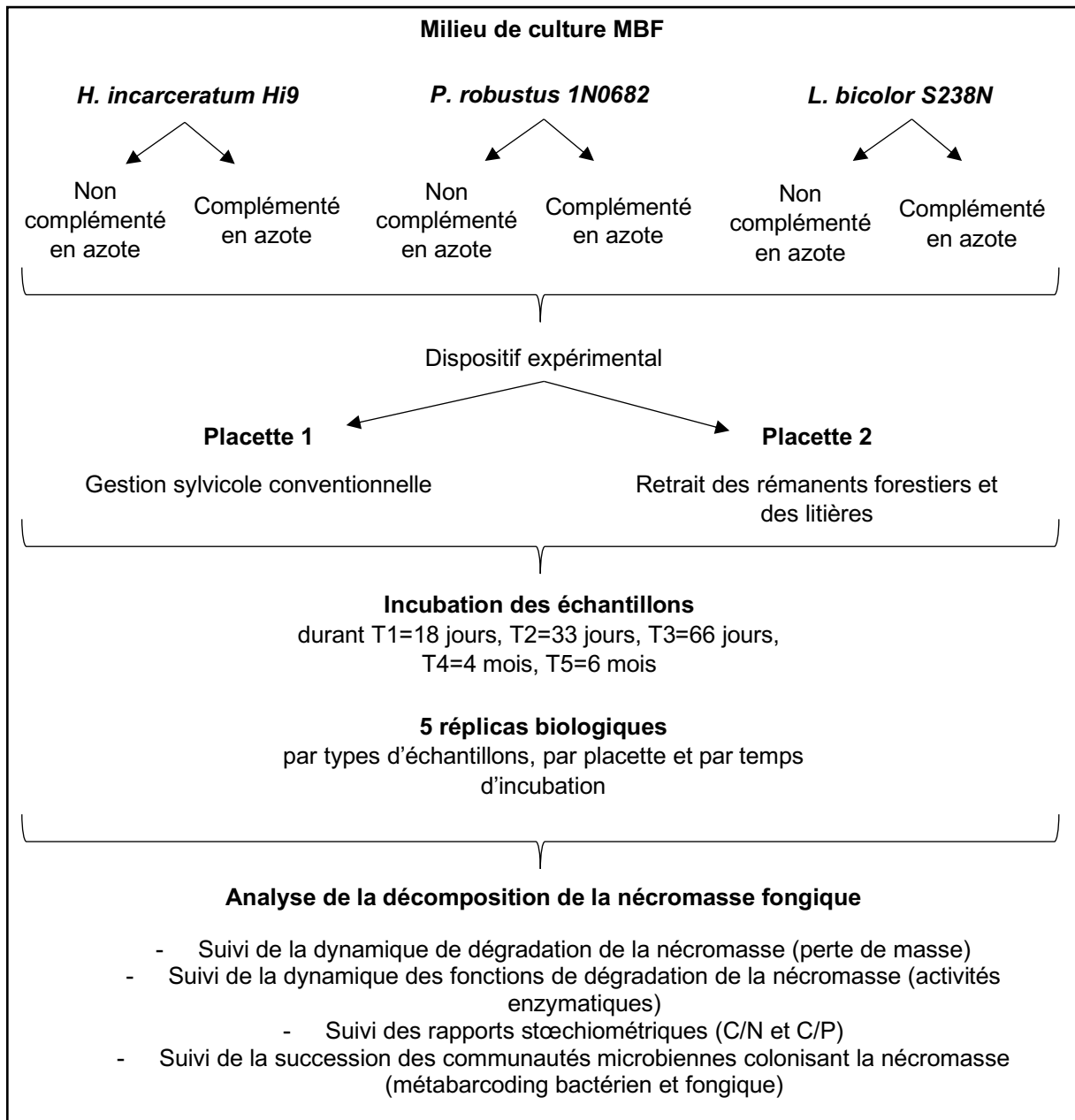
Le réseau MOS est un réseau de placettes expérimentales, mis en place entre 2013 et 2014 dans douze forêts françaises (hêtraies et chênaies) et qui a pour but d'évaluer à court, moyen et long terme l'effet de l'exportation intensive de biomasse forestière sur le fonctionnement des écosystèmes forestiers de plaine. Deux placettes seront étudiées, correspondant à deux gestions sylvicoles différentes :

- **Placette 1** – "sol témoin" : gestion sylvicole conventionnelle, laissant sur place les rémanents (résidus de coupe) après exploitation (coupe d'éclaircie)
- **Placette 2** – "sol nu" : retrait des rémanents forestiers et des litières tous les ans, en hiver. Ce mode de gestion n'a pas de réalité sylvicole actuelle mais permet d'observer rapidement des réactions extrêmes de l'écosystème (points de basculement)

La décomposition de la nécromasse fongique a été étudiée dans deux expériences distinctes :

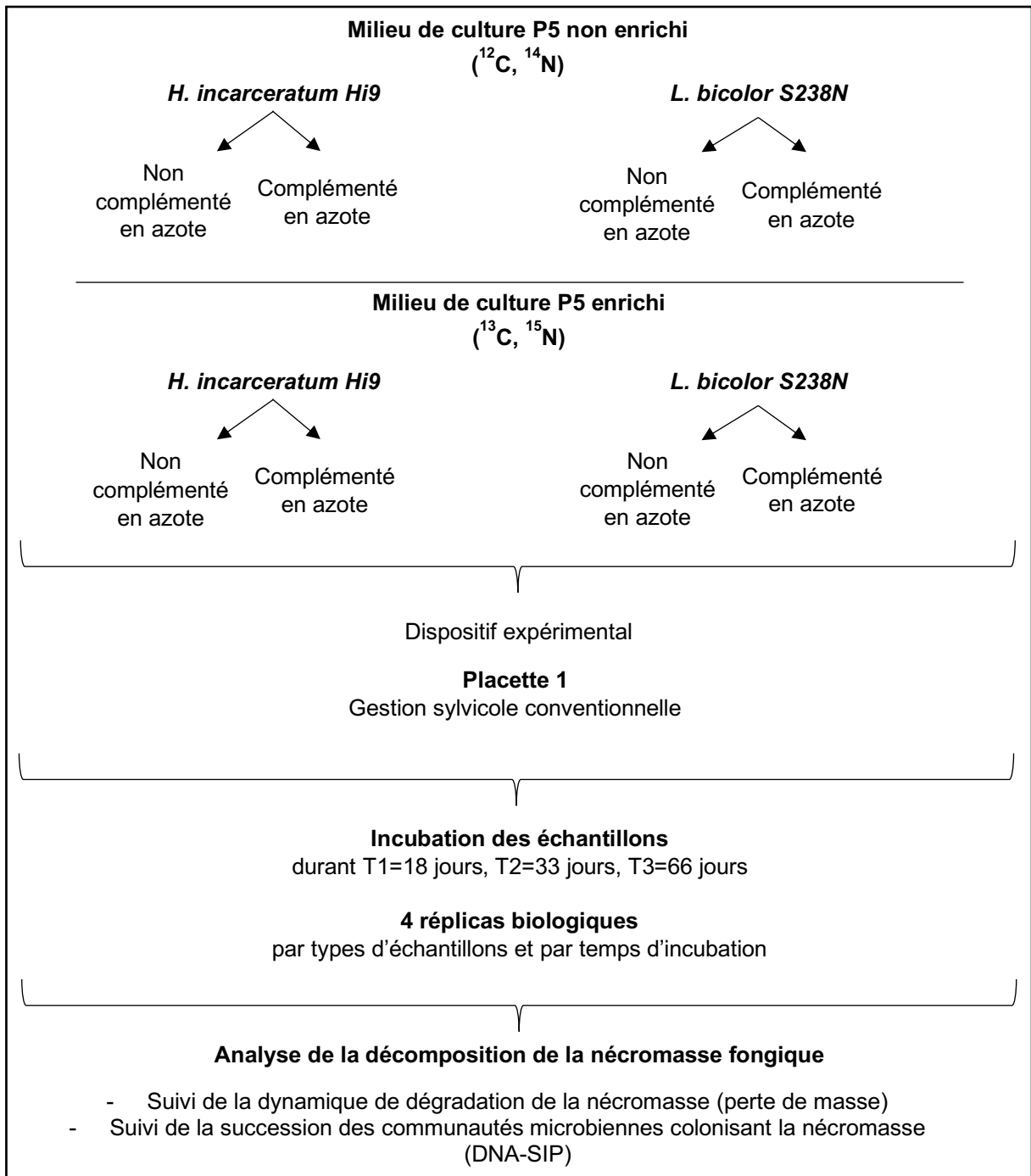
- **Expérience 1** (Figure 4) : la biomasse fongique est produite en milieu riche, avec une complémentation ou non en azote en fin de culture liquide (pulse). Après rinçage et séchage, la nécromasse est incubée sur les deux placettes d'étude. La décomposition de cette nécromasse sera mesurée au cours du temps, dans les deux types de gestion sylvicole, en étudiant plusieurs paramètres : analyse de la qualité de la nécromasse fongique (mélanisation et stœchiométrie C, N, P) et la dynamique de colonisation des communautés microbiennes (richesse, diversité et structure) sur la nécromasse fongique
- **Expérience 2** (Figure 5) : la biomasse fongique est produite dans un milieu liquide enrichi ou non en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ . La nécromasse est incubée uniquement sur la placette 1 (gestion conventionnelle). La décomposition de la nécromasse fongique sera étudiée par DNA-SIP pour identifier les organismes responsables de la dégradation de la nécromasse.





**Figure 4** : Dispositif de l'expérience 1

La biomasse fongique est produite en milieu MBF liquide, complémenté ou non en azote. La nécromasse est ensuite conditionnée en mesh-bags puis enterrée sur deux placettes en parallèle. Après différents temps d'incubation, la nécromasse est récoltée et analysée afin de caractériser sa décomposition.



**Figure 5** : Dispositif de l'expérience 2

La biomasse fongique est produite en milieu P5 liquide enrichi ou non, complé­menté ou non en azote. La nécromasse est ensuite conditionnée en mesh-bags puis enterrée dans le sol de la placette 1 (gestion sylvicole conventionnelle). Après différents temps d'incubation, la nécromasse est récoltée et analysée afin de caractériser sa décomposition.

## 2. Matériel biologique, production de la nécromasse fongique et dosage de la mélanine

### **Sélection du matériel biologique**

Trois espèces fongiques ont été utilisées pour la production de biomasse (nécromasse) fongique en conditions contrôlées et stériles : *Hysterangium incarcerationum* Hi9 (mycélium gris clair à noir), *Phellinus robustus* 1N0682 (mycélium brun), *Laccaria bicolor* S238N (mycélium blanc). Ces souches fongiques ont été sélectionnées pour obtenir une gamme de concentration en mélanine en se basant sur la pigmentation du mycélium. Ces souches sont issues du laboratoire d'accueil (mycothèque de l'UMR IAM, INRAE Grand-Est, Champenoux).

### **Production de la biomasse fongique**

La biomasse est produite à partir de "plugs" de mycélium prélevés sur des cultures pures en milieu solide MBF et cultivés dans trois milieux de culture liquide différents :

- Expérience 1 : milieu de culture MBF (composition du milieu en annexe 1)
- Expérience 2 : milieu P5 non enrichi et milieu P5\* enrichi (source de carbone  $^{13}\text{C}$  et source d'azote  $^{15}\text{N}$ ) (composition du milieu en annexe 2). Dans cette expérience, seules les biomasses de *L. bicolor* et *H. incarcerationum* seront produites.

Le milieu P5\* contient du glucose comme unique source de carbone dont le premier atome  $^{12}\text{C}$  est remplacé par un atome  $^{13}\text{C}$  (D-Glucose, 1- $^{13}\text{C}$  99%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), et la source d'azote est du sulfate d'ammonium totalement enrichi  $^{15}\text{N}$ . Le milieu P5 contient du D-glucose  $^{12}\text{C}$  comme unique source de C, et du sulfate d'ammonium  $^{14}\text{N}$  comme unique source de N.

Les cultures sont incubées à 20°C, dans l'obscurité et sous agitation pendant deux mois.

### **Modification de la stœchiométrie de la biomasse fongique**

En fin de culture, des solutions concentrées en azote (2 g.L<sup>-1</sup> Glucose D+, 500 mg.L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sont ajoutées à la moitié des cultures de chaque expérience pour créer un déséquilibre stœchiométrique C/N. Une semaine après ce « pulse de N », le mycélium est filtré et lavé (eau distillée stérile) à l'aide d'une pompe Büchner équipée de filtres en cellulose. Le matériel fongique est séché à l'étuve à 40°C durant 36 heures.

## Dosage de la mélanine dans le matériel initial

Le dosage de la mélanine est réalisé à l'aide d'un protocole adapté de Fernandez & Koide, 2014. La nécromasse fongique est broyée à l'aide d'un broyeur et de billes en acier.

La mélanine est extraite par hydrolyse acide du mycélium dans une solution de HCl 6M pendant 10 jours. Les résidus d'hydrolyse sont filtrés, rincés à l'eau distillée, et séchés à 40°C durant 48h.

Les concentrations initiales en mélanine des trois espèces fongiques sont mesurées à l'aide d'un dosage colorimétrique basé sur la liaison d'un colorant (Azure A) à la mélanine, extraite préalablement. La différence d'absorbance entre la solution aqueuse d'Azure A initiale et cette solution en présence de mélanine est mesurée à une longueur d'onde de 610 nm (réduction de la coloration inversement proportionnelle à la concentration de mélanine). Le taux de mélanine est quantifié en se basant sur une courbe étalon (équation de la courbe :  $A_{610\text{ nm}} = 0,2604 \times \text{masse de mélanine en mg}^{-0,595}$ ). Elle est réalisée à partir du dosage de la mélanine pure, extraite de *Cenococcum geophilum*, champignon fortement mélanisé (Siletti et al., 2017).

### 3. Mise en place du dispositif expérimental

Les différents types de nécromasse fongique sont broyés et conditionnés dans des sacs en nylon (mesh-bags) d'une porosité de 50 µm de diamètre.

Pour l'expérience 1, 100 mg de nécromasse sont placés dans les mesh-bags.

Pour l'expérience 2, 50 mg de nécromasse sont placés dans les mesh-bags.

Des mesh-bags témoins sont réalisés en y déposant 100 mg de perlite stérile. Ces témoins permettront de comparer l'effet de la présence de matière organique sur la colonisation microbienne et les activités enzymatiques produites.

Les mesh-bags sont délicatement enterrés sur le site d'étude à une profondeur de 5 cm, en réalisant une fente verticale dans le sol à l'aide d'une petite bêche, puis la fente est refermée par pression du pied.

Dans l'expérience 1, la nécromasse est enterrée dans les placettes 1 et 2 au sein du réseau MOS de la FD de Champenoux. Les échantillons sont récoltés après différents temps d'incubation dans le sol forestier : 15 jours, 1 mois, 2 mois, 4 mois et 6 mois. Les prélèvements à 4 et 6 mois n'ont pas encore été réalisés.

Pour l'expérience 2, la nécromasse est enterrée uniquement dans la placette 1 (gestion sylvicole conventionnelle). Les échantillons sont récoltés après 15 jours, 1 mois et 2 mois.

#### 4. Suivi et mesures des indicateurs de la décomposition fongique

##### **Perte de masse**

Le taux de décomposition des différentes nécromasses fongiques est mesuré après chaque temps d'incubation en calculant la perte de masse entre la masse sèche avant enterrement et la masse sèche après prélèvement.

##### **Dosage stœchiométrique au cours de la dégradation**

Les quantités de carbone et d'azote dans les échantillons ont été quantifiés sur des aliquots de mycélium préalablement broyé (1 à 1,2 mg par échantillon) à l'aide d'un analyseur élémentaire CHN (Carlo Erba NA2100, Thermo Quest CE International, Milan, Italie) au sein du LIEC par Michaël Danger. Les ratios C/N sont exprimés en ratios molaires. Les analyses de P n'ont pas encore été réalisées.

##### **Activités enzymatiques**

L'activité microbienne associée à la dégradation de la nécromasse fongique est étudiée à travers l'expression d'activités enzymatiques. L'activité de différentes enzymes extracellulaires est mesurée par fluorescence et colorimétrie en adaptant le protocole de Mathieu et al., (2013) : phosphatase acide, leucine-aminopeptidase, laccase (activités oxydases), xylosidase, beta-glucosidase, glucuronidase, cellobiohydrolase, N-acetyl-beta-d-glucosaminidase (exo-chitinase).

Les analyses enzymatiques sont réalisées dans l'expérience 1 à partir de 20 mg de matière fraîche, sous-échantillonnés dans les mesh-bags après prélèvement. Ce matériel est incubé dans 1,2 mL d'eau stérile durant 1h30, sous agitation afin d'obtenir un surnageant contenant les potentielles enzymes de dégradation. Pour chaque enzyme étudiée, 100 µL de surnageant sont incubés dans 50 µL de tampon acétate pH 5,0 (ou tampon Tris-HCl pH 8,0 pour la leucine-aminopeptidase) et 50 µL de substrat enzymatique couplé à des fluorochromes (méthylumbelliférone ou aminométhylcoumarine; Sigma Aldrich Chemicals; Lyon, France). Pour l'activité laccase, mesurée par colorimétrie, 100 µL de surnageant et 100 µL d'une solution de substrat enzymatique 2,9-azibonis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS, Sigma Aldrich Chemicals; Lyon, France) sont mélangés et l'activité enzymatique est mesurée par absorbance à 415 nm. Le tout est incubé sous agitation, durant 20 min pour les activités phosphatase et beta-glucosidase, 40 min pour les activités exo-chitinase, glucuronidase,

xylosidase et cellobiohydrolase, 60 min pour l'activité laccase, et 70 min pour l'activité leucine-aminopeptidase.

La mesure de la fluorescence permet de connaître la quantité de fluorochrome libérée suite à l'hydrolyse du substrat enzymatique. Ainsi, la mesure de fluorescence est rapportée à des valeurs standards de fluorescence des fluorochromes obtenus à l'aide de courbes de calibration. Les activités enzymatiques sont exprimées en pmol de substrat transformé, par mg de nécromasse, par minute (pmol/mg/min).

5. Etude des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition par des méthodes de biologie moléculaire.

**Expérience 1**

Les communautés microbiennes présentes sur la nécromasse fongique issue de l'expérience 1 sont analysées par séquençage Illumina MiSeq (Plateforme de séquençage PGTB de Bordeaux). Des extractions d'ADN sont réalisées à partir de la nécromasse fongique récoltée aux différents temps de prélèvement (n=60 échantillons par temps de prélèvement). Les ADN sont extraits à l'aide du DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), selon les instructions du fabricant (Annexe 3), puis dosés par Nanodrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, ThermoScientific). Des PCR sont ensuite réalisées sur les ADN dilués au 1/10 (dans de l'eau ultrapure stérile) afin d'obtenir une concentration d'ADN de 5 ng/µl avant PCR. Les amorces utilisées (799F/1115R, Redford et al., 2010) permettent d'amplifier la région V5-V6 de l'ADN 16S bactérien (316 pb) afin d'identifier les bactéries colonisant la nécromasse fongique et potentiellement impliquées dans sa dégradation. Pour le séquençage MiSeq, des séquences universelles sont ajoutées aux amorces lors de la synthèse chimique (Eurofins) (Tableau 1). Une première PCR est réalisée au laboratoire avec ces amorces « rallongées » selon le programme suivant : 5 min à 94°C, 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 52°C, 1 min à 72°C et une élongation finale de 10 min à 72°C. Une deuxième PCR, réalisée par la plateforme de séquençage PGTB, permet l'hybridation des adaptateurs et des index de séquençage pour l'identification *in silico* ultérieure des échantillons.

**Tableau 1** : Amorces PCR « rallongées » utilisées pour le séquençage Illumina MiSeq

En vert : séquence universelle de l'étiquette moléculaire ; en noir : séquence de l'amorce

Amorce	Séquence 5' -> 3'
799F-MiSeq	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACMGGATTAGATACCKG
1115R-MiSeq	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGGTTGCGCTCGTTG

## Expérience 2 : DNA Stable Isotope Probing

Ces expérimentations ont été réalisées au sein du LIEC, à la Faculté des Sciences et Technologies de Vandœuvre-lès-Nancy, sous la responsabilité d'Aurélié Cébron.

Pour identifier les organismes activement impliqués dans la décomposition de la nécromasse fongique, nous avons utilisé la méthode de DNA-SIP (Neufeld et al., 2007). Elle permet d'identifier les microorganismes ayant assimilé les éléments enrichis issus de la nécromasse fongique de l'expérience 2 en ciblant leur ADN, enrichi (lourd) en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ , pour les analyses. A l'aide du kit d'extraction DNeasy Plant MiniKit (Qiagen), l'ADN environnemental – ADNe – (en particulier microbien) est extrait à partir de la matrice fongique, partiellement décomposée, qui avait été cultivée sur milieu P5 ou P5\*. L'ADNe est ensuite dosé par Nanodrop. Puis, une étape de séparation des ADN enrichis (lourds) et non enrichis est réalisée sur un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl) : après une étape d'ultracentrifugation, l'ADN enrichi plus lourd se retrouvera en bas du gradient alors que l'ADN non enrichi se retrouvera dans la zone supérieure du gradient. Le gradient est formé en mélangeant une solution de CsCl avec un Gradient Buffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M KCl et 1 mM EDTA) et l'ADN de concentration comprise entre 3 et 5 ng/ $\mu\text{L}$ . La densité finale de CsCl est de 1,7251 g/mL. Ce mélange est déposé dans des tubes d'ultracentrifugation pour créer le gradient de densité et séparer l'ADN. Une ultracentrifugation est réalisée à 177 000 g, durant 40 h.

Les tubes d'ultracentrifugation sont ensuite divisés en 12 fractions de 400 $\mu\text{L}$  dans des tubes Eppendorfs stériles : la première fraction correspondant au bas du tube (forte densité) et la fraction 12 correspondant au haut du tube (faible densité). L'ADN enrichi est généralement présent dans les fractions 6, 7, 8, et l'ADN non enrichi est généralement présent dans les fractions 9, 10 et 11. La densité de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un réfractomètre pour vérifier si le gradient de densité s'est correctement formé. Les ADN sont ensuite précipités pour éliminer la solution de CsCl et le Gradient Buffer. Ils sont ensuite re-suspendus dans 30  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure Dnase et RNase free. A l'aide des amorces 968F (5'-AACGCGAAG AACCTTAC-3') et 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Felske et al., 1998) ciblant la région 16S de l'ADN bactérien, une qPCR est réalisée (selon le protocole de Cébron et al., 2008) sur les ADN de ces douze fractions afin d'identifier celles contenant l'ADN enrichi et l'ADN non enrichi. La comparaison des résultats de qPCR entre la nécromasse issue du milieu P5 enrichi et la nécromasse issue du milieu P5 non enrichi permet théoriquement d'identifier les fractions où l'ADN enrichi est présent (l'ADN issu d'une nécromasse non enrichie n'étant pas présent dans les fractions où l'ADN enrichi peut l'être). Les fractions identifiées comme contenant l'ADN (marqué ou non) sont séquencées par la méthode Illumina MiSeq (Plateforme de séquençage PGTB de Bordeaux) comme décrit précédemment (expérience 1).

## **Analyses statistiques**

Les différents tests statistiques ont été réalisés à l'aide de l'outil informatique R. Les tests utilisés seront indiqués dans les résultats en légende de chaque figure, par soucis de compréhension.

En amont, une correction de Bonferroni est appliquée aux tests réalisés afin d'identifier de potentiels faux-positifs.



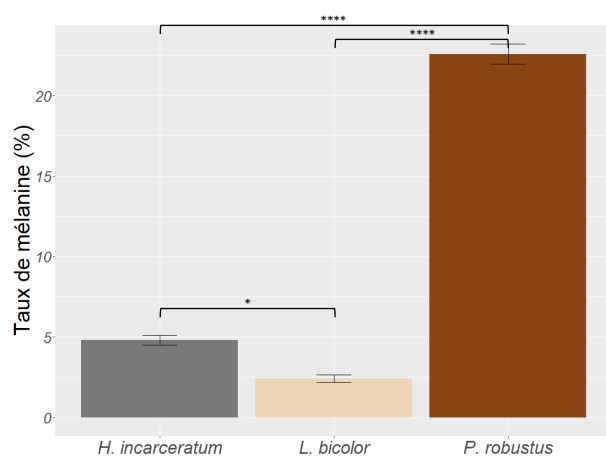
## Résultats

1. Impact de la qualité du mycélium (teneur en mélanine et C/N) sur la dynamique de décomposition des nécromasses de *H. incarceratum*, *L. bicolor* et *P. robustus* dans un sol forestier en gestion conventionnelle

### Impact de la mélanisation du mycélium fongique sur sa dégradation dans un sol forestier en gestion conventionnelle

La dynamique de décomposition est étudiée dans des conditions témoins, c'est-à-dire : i) expérience réalisée sur le site MOS en gestion conventionnelle et ii) sans enrichissement en azote des cultures fongiques destinées à la production de la nécromasse fongique.

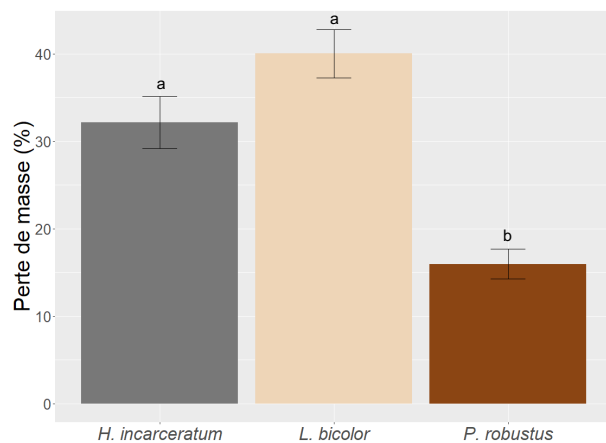
Les résultats du dosage de la mélanine montrent, qu'au terme de la production de mycélium en culture liquide, *L. bicolor* contient 2,41% de mélanine, *H. incarceratum* en contient 4,80% et *P. robustus* en contient 22,59% (Figure 6). Ces résultats illustrent des quantités de mélanine significativement différentes entre les trois souches. *P. robustus* est donc le champignon le plus mélanisé. A l'inverse, les taux de mélanisation de *L. bicolor* et *H. incarceratum* sont donc relativement faibles. De manière étonnante, *H. incarceratum*, malgré sa pigmentation grise à noire, ne contient que peu de mélanine par rapport à *P. robustus* qui a une pigmentation brune. Le taux de mélanisation de *L. bicolor* et *H. incarceratum* est relativement faible. La pigmentation des hyphes fongiques ne serait donc pas un indicateur suffisant pour déterminer des catégories, même qualitatives, de mélanisation.



**Figure 6** : Pourcentage de mélanisation des masses sèches de *H. incarceratum*, *L. bicolor* et *P. robustus*

ANOVA, n=3, \* : p<0,05; \*\*\*\* : p<0,0001

In situ, la dégradation de la nécromasse de *H. incarceratum* n'est pas significativement différente de celle de *L. bicolor* (Figure 7). Ces deux souches fongiques ont des taux de mélanisation relativement faibles et beaucoup moins élevés que celui de *P. robustus*. Par ailleurs, la pigmentation de *H. incarceratum* était variable. Ce dernier était pigmenté en noir lors de la culture en milieu MBF mais dépigmenté, donc blanc, en culture dans le milieu P5 (résultats non présentés). Ainsi, seuls les résultats de la dégradation de *L. bicolor* (matrice faiblement mélanisée) et *P. robustus* (matrice fortement mélanisée) seront présentés. Les résultats de dégradation de la nécromasse de *H. incarceratum* (perte de masse au cours du temps et activités enzymatiques microbiennes potentiellement impliquées dans la dégradation) sont disponibles en annexe 4.

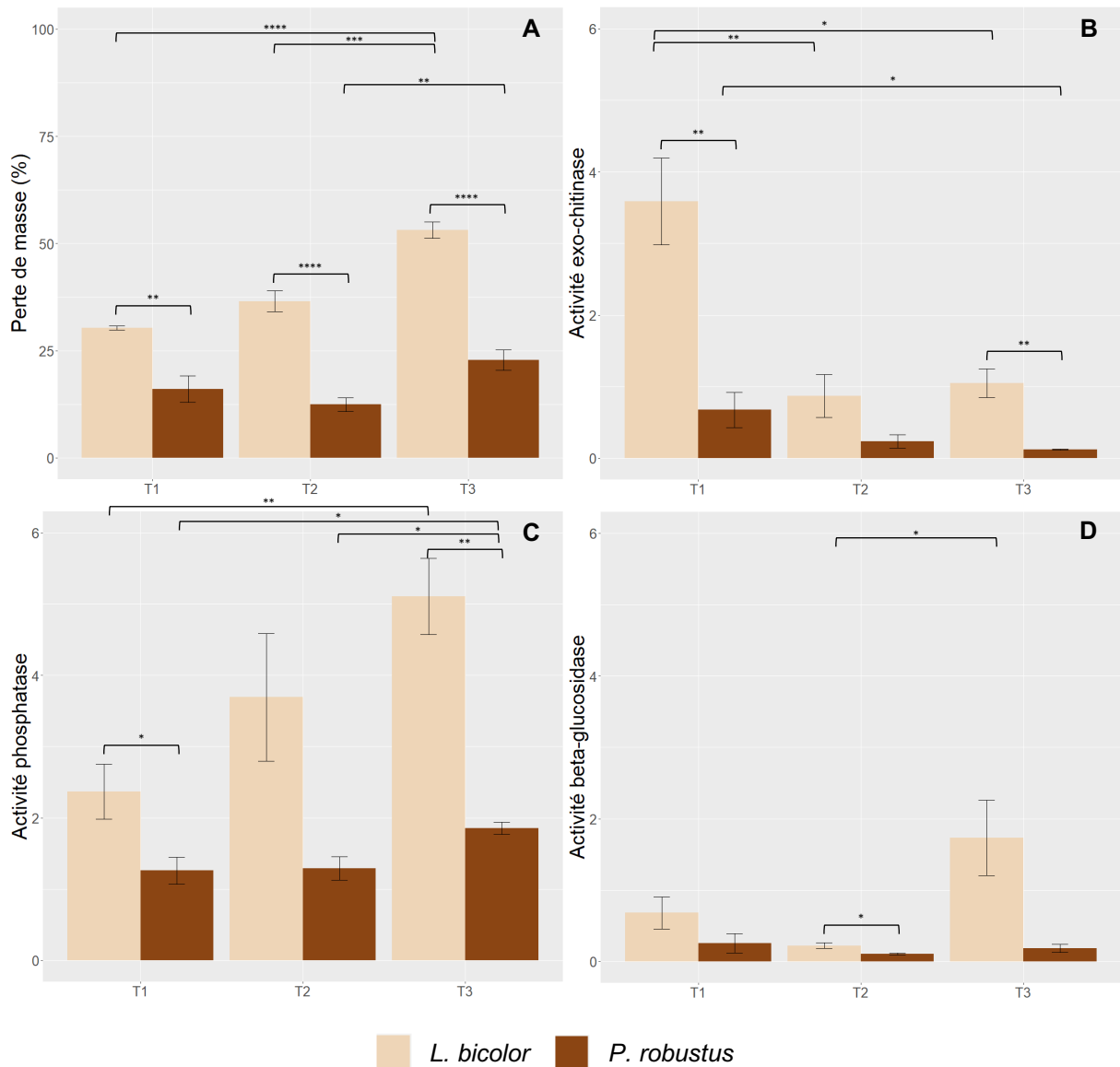


**Figure 7** : Perte de masse des trois types de nécromasse fongique (*H. incarceratum*, *L. bicolor*, *P. robustus*), entre les trois temps d'incubation dans la placette 1 (gestion forestière conventionnelle)

Kruskal-Wallis, n=15, b : p<0,001

Tout au long de l'expérience, la perte de masse (Figure 7) et les activités enzymatiques (Figure 8) sont beaucoup plus faibles pour la matrice de *P. robustus* que pour celle de *L. bicolor*. En effet, la perte de masse est au moins deux fois moins importante pour *P. robustus* que pour *L. bicolor*.

De plus, la dégradation des mycéliums augmente au cours du temps. Pour *L. bicolor*, la perte de masse est d'environ 30% après 18 et 33 jours, et de 53% à partir de 66 jours d'incubation dans le sol forestier (Figure 8A). La perte de masse de *P. robustus* est d'environ 15% après 18 et 33 jours et de 23% après 66 jours (Figure 8A). Pour les deux types de matrice fongique, la différence de perte de masse entre 18 et 33 jours d'incubation dans le sol n'est pas significative.



**Figure 8** : Dynamique de décomposition de la nécromasse fongique de *L. bicolor* et *P. robustus* non complétement en azote, après incubation dans le sol forestier avec une gestion conventionnelle

A : Perte de masse (%), B : Activité exo-chitinase (pmol/mg/min), C : Activité phosphatase (pmol/mg/min), D : Activité beta-glucosidase (pmol/mg/min)

T1 = 18 jours ; T2 = 33 jours ; T3 = 66 jours

Effet du temps d'incubation sur la dynamique de dégradation : ANOVA, n=5

Effet de l'espèce fongique sur la dégradation : t-Student, n=5

\* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p \leq 0,0001$

L'étude des activités enzymatiques microbiennes révèle que le niveau d'expression des enzymes impliquées dans la dégradation des polymères constituant les parois cellulaires végétales est extrêmement faible tout au long de l'expérience (cellobiohydrolase, xylosidase et glucuronidase). L'expression des activités laccase et leucine-aminopeptidase reste également très faible, voire nulle, au cours de cette cinétique de dégradation. Ainsi, sur les huit tests enzymatiques effectués, seules 3 enzymes présentaient un niveau d'expression mesurable et exploitable au regard du phénomène de décomposition étudié : la  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (exo-chitinase), la phosphatase et la beta-glucosidase. Seule l'expression de ces trois enzymes seront présentées ici. Pour les autres, les résultats sont disponibles en annexe 5.

Au cours de la décomposition de la nécromasse de *L. bicolor*, l'activité exo-chitinase était relativement importante à 18 jours d'incubation (3,59 pmol/mg/min), puis diminuait fortement et significativement à partir de 33 jours (environ 1 pmol/mg/min). Pour *P. robustus*, l'activité exo-chitinase était relativement faible à 18 jours, et diminuait progressivement jusqu'à devenir presque nulle à 66 jours (Figure 8B).

Pour la matrice de *L. bicolor*, l'activité phosphatase est à 2,37 pmol/mg/min à 18 jours, et s'élève progressivement jusqu'à 5,11 pmol/mg/min à 66 jours (Figure 8C). Ainsi, l'activité phosphatase a doublé entre 18 et 66 jours. Sur la matrice *P. robustus*, cette activité augmente très légèrement, mais significativement, au cours du temps (Figure 8C), passant de 1,26 pmol/mg/min après 18 jours de décomposition, à 1,85 pmol/mg/min à 66 jours d'incubation dans le sol. Cependant, l'activité phosphatase est significativement plus faible dans la nécromasse de *P. robustus* que dans celle de *L. bicolor* (au moins 50% de différence entre les deux matrices).

Enfin, l'activité beta-glucosidase reste relativement faible pour les deux matrices fongiques, pour les trois temps d'étude, sauf à 66 jours pour *L. bicolor* (Figure 8D).

### **Impact d'un déséquilibre stœchiométrique du mycélium sur sa dégradation en gestion forestière conventionnelle**

Pour cette expérience, une solution concentrée en azote a été ajoutée à la fin de la culture fongique. Le but de cette étude est d'analyser l'impact d'un déséquilibre stœchiométrique (réduction du C/N) sur la cinétique de dégradation de la nécromasse fongique.

Des analyses préliminaires de la stœchiométrie des mycéliums fongiques (T0) indiquent que le pulse d'azote en fin de culture a permis de réduire le C/N dans la nécromasse de *H. incarcerationum* et *P. robustus* (Tableau 2). En revanche, ce pulse n'a pas eu d'effet sur le

pourcentage d'azote (et le C/N) dans les hyphes de *L. bicolor*. Par contre, cette espèce est la plus riche en azote quelques soient les conditions (Tableau 2).

Après 15 jours d'incubation dans le sol forestier, la proportion d'azote de la nécromasse de *H. incarceratum* et *L. bicolor* a tendance à diminuer alors que la proportion de carbone a tendance à augmenter (Tableau 2).

Après incubation dans le sol de la placette 2 (retrait des rémanents forestiers et des litières), la proportion d'azote a tendance à diminuer plus fortement qu'avec une gestion sylvicole conventionnelle (placette 1), sauf pour *L. bicolor* (Tableau 2).

**Tableau 2** : Dosage de l'azote et du carbone moléculaire et rapports C/N dans la nécromasse fongique à T0 (nécromasse initiale, non dégradée) et T1 (après 15 jours d'incubation dans le sol forestier)

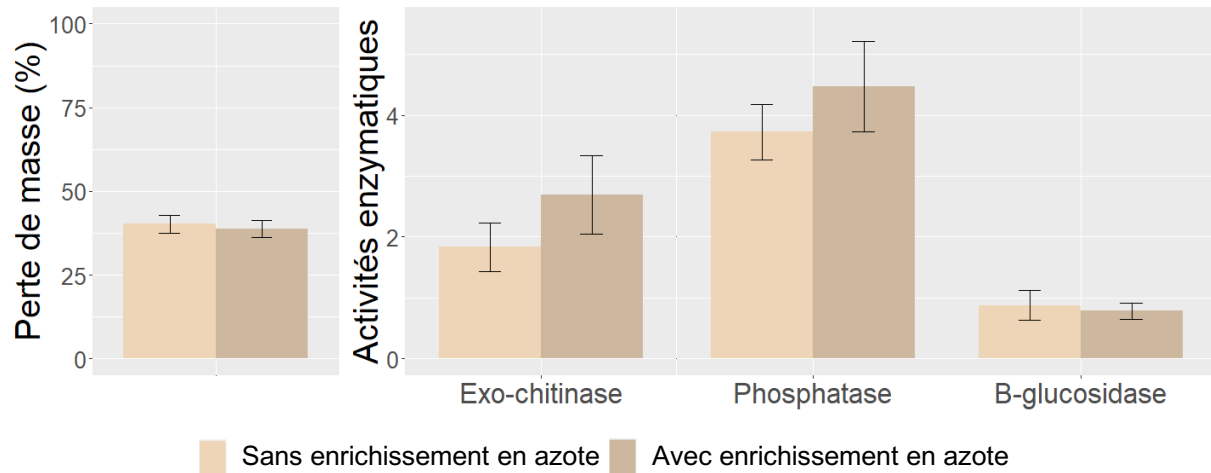
Placette 1 : gestion forestière conventionnelle ; Placette 2 : retrait des rémanents forestiers et des litières

Espèce	Ajout d'azote	Temps de dégradation	Placette	%N	%C	C/N
<i>H. incarceratum</i>	Non	T0	/	2,2	42,12	22,75
<i>H. incarceratum</i>	Oui	T0	/	3,5	42,39	14,13
<i>H. incarceratum</i>	Non	T1	Placette 1	1,4	44,14	23,26
<i>H. incarceratum</i>	Oui	T1	Placette 1	1,4	44,19	37,82
<i>H. incarceratum</i>	Non	T1	Placette 2	1,2	44,76	43,68
<i>H. incarceratum</i>	Oui	T1	Placette 2	1,0	46,12	51,84
<i>L. bicolor</i>	Non	T0	/	4	42,87	12,5
<i>L. bicolor</i>	Oui	T0	/	4	43,39	12,62
<i>L. bicolor</i>	Non	T1	Placette 1	2,8	44,36	18,45
<i>L. bicolor</i>	Oui	T1	Placette 1	2,9	44,98	18,54
<i>L. bicolor</i>	Non	T1	Placette 2	3,7	45,55	14,60
<i>L. bicolor</i>	Oui	T1	Placette 2	3,1	44,25	17,18
<i>P. robustus</i>	Non	T0	/	2,7	45,47	20,02
<i>P. robustus</i>	Oui	T0	/	3,5	45,58	15,06
<i>P. robustus</i>	Non	T1	Placette 1	3,5	47,80	15,95
<i>P. robustus</i>	Oui	T1	Placette 1	3,0	47,67	18,31
<i>P. robustus</i>	Non	T1	Placette 2	2,9	48,03	19,73
<i>P. robustus</i>	Oui	T1	Placette 2	2,6	48,07	21,81

Les résultats de perte de masse et d'activités enzymatiques ont été comparés à la condition témoin pour laquelle les champignons ont été cultivés dans des conditions standards et incubés dans le sol forestier avec une gestion sylvicole conventionnelle. Afin de se focaliser sur l'effet du pulse d'azote sur la dégradation de la nécromasse fongique, les résultats de chaque analyse sont moyennés entre les trois temps de prélèvement.

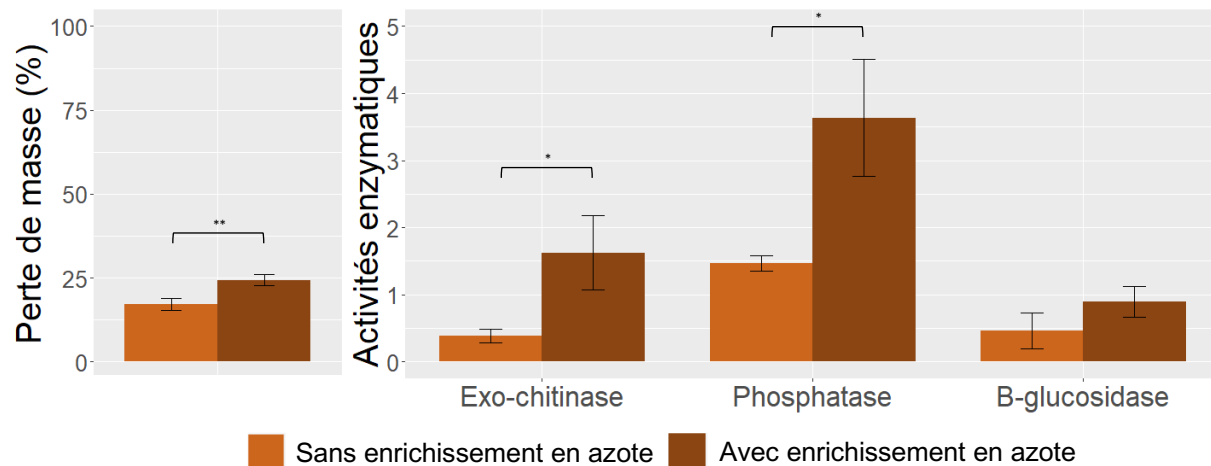
Pour la nécromasse de *L. bicolor*, la perte de masse et les activités enzymatiques ne sont pas différentes de la condition témoin (sans enrichissement en azote) (Figure 9). En revanche, la dégradation de la nécromasse de *P. robustus* a été augmentée par rapport à la condition

témoin (Figure 10). En effet, la perte de masse a augmenté de 7% et les activités enzymatiques exo-chitinase et phosphatase ont respectivement triplé et doublé.



**Figure 9** : Effet de l'ajout d'azote sur la perte de masse in situ (gestion conventionnelle) de *L. bicolor* et les activités enzymatiques associées

t-Student, n=15



**Figure 10** : Effet de l'ajout d'azote sur la perte de masse in situ (gestion conventionnelle) de *P. robustus* et les activités enzymatiques associées

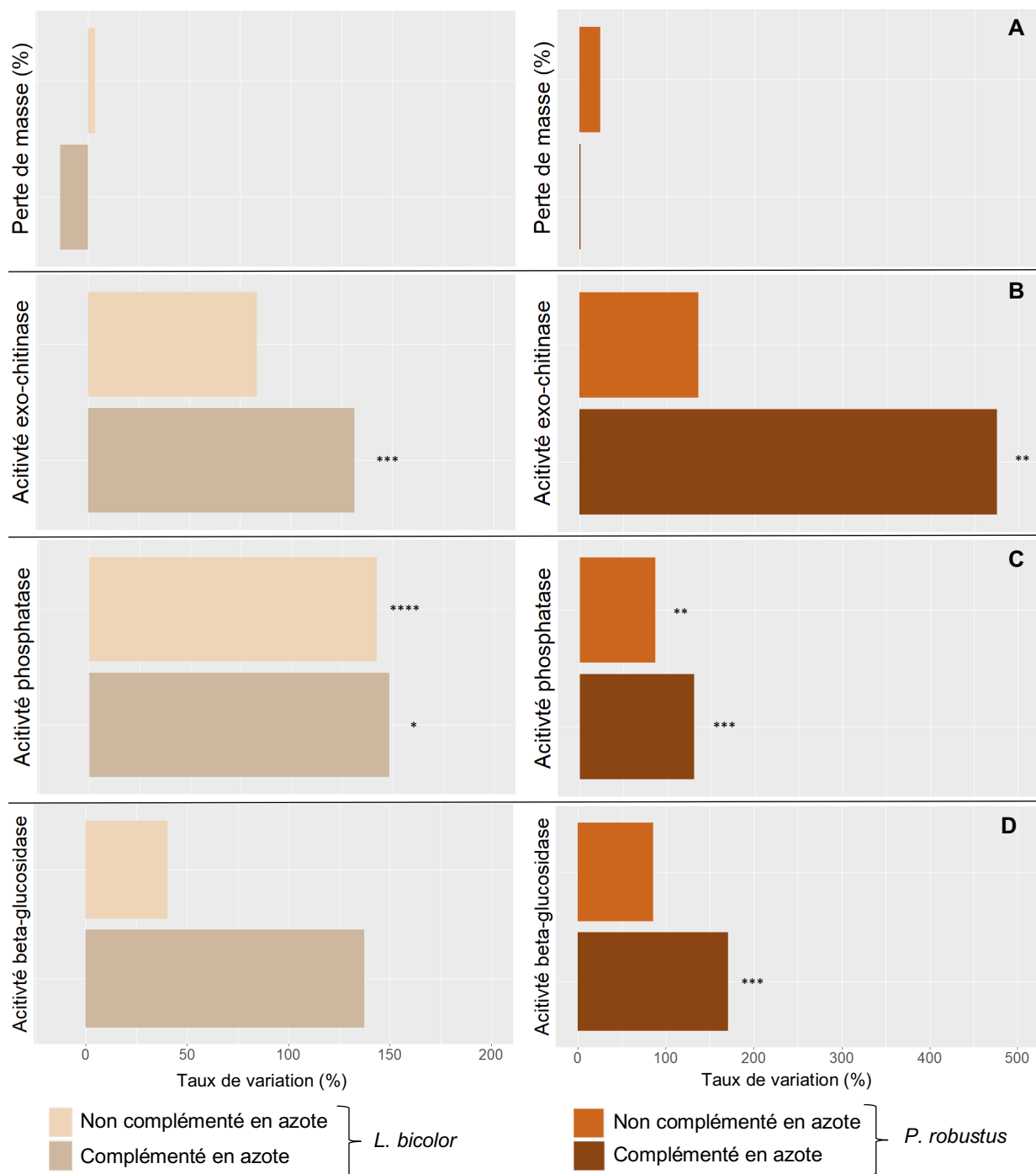
t-Student, n=15, \* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$

2. Conséquence de l'exportation des litières et de rémanents forestiers sur la dynamique de dégradation de la nécromasse fongique de *L. bicolor* et *P. robustus*

Ici, la dynamique de décomposition est étudiée en incubant la nécromasse fongique sur la placette 2, où les rémanents forestiers et les litières ont été retirés. La nécromasse fongique a également été complétée ou non en azote (pulse final). Le taux de variation entre la dynamique de dégradation en condition témoin (gestion sylvicole conventionnelle et sans enrichissement en azote) et la dynamique de dégradation dans le sol avec un retrait des rémanents forestiers est analysée.

Pour les deux espèces fongiques, il n'y a pas de différence significative entre les deux placettes d'études pour la perte de masse (indicatrice de la décomposition de la nécromasse fongique), avec ou sans pulse d'azote (Figure 11A).

Concernant les indicateurs enzymatiques de la décomposition, seule l'activité phosphatase augmente significativement pour les deux nécromasses fongiques non complétées en azote (Figure 11C). Même si cela n'est pas significatif, les activités exo-chitinase et beta-glucosidase ont tendance à augmenter également (Figure 11A et C).



**Figure 11** : Impact de l'exportation des rémanents forestiers et des litières sur la dynamique de dégradation de *L. bicolor* et *P. robustus*

Le taux de variation de la dynamique de perte de masse est représenté entre la condition témoin (gestion sylvicole conventionnelle et nécromasse non complémentée en azote) et la condition avec le retrait des rémanents forestiers.

A : Taux de variation de la dynamique de dégradation de *L. bicolor* ; B : Taux de variation de la dynamique de dégradation de *P. robustus*

Wilcoxon,  $n=15$ , \* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p \leq 0,0001$



### 3. DNA Stable Isotope Probing : résultats techniques

La méthode de DNA-SIP est utilisée dans l'expérience 2, sur une matrice fongique ayant été cultivée dans un milieu P5 avec un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  ou non, et incubée dans la placette 1 (gestion forestière conventionnelle). Les résultats présentés sont ceux du premier temps d'incubation de la nécromasse fongique (15 jours).

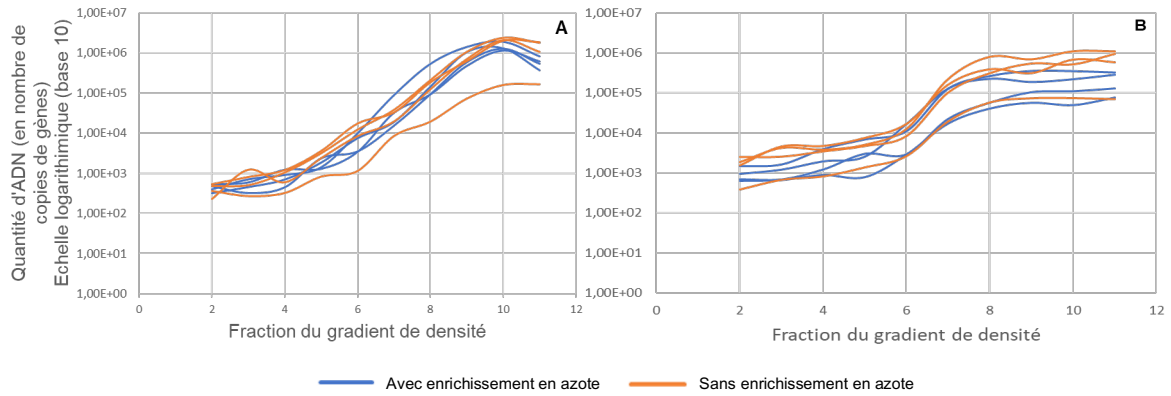
Dans l'attente des résultats du séquençage Miseq ciblant les bactéries et les champignons ayant colonisé la nécromasse, des résultats techniques de la méthode DNA-SIP sont présentés ici. Ces résultats ont permis de distinguer les ADN ayant potentiellement incorporé du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{15}\text{N}$  (provenant d'organismes dégradeurs de la nécromasse fongique, elle-même enrichie) des ADN constitués de  $^{12}\text{C}$  et  $^{14}\text{N}$  (provenant d'organismes présents sur la nécromasse fongique mais n'ayant pas incorporé des molécules provenant de la dégradation de la nécromasse fongique, car non-actifs dans ce processus).

Pour rappel, les ADN "lourds" (contenant du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{15}\text{N}$ ) sont séparés des ADN "légers" (constitués de  $^{12}\text{C}$  et  $^{14}\text{N}$ ) par un gradient de densité sur CsCl. Le gradient de densité est divisé en plusieurs fractions : les fractions à plus fortes densités doivent contenir l'ADN "lourd" plus dense, et les fractions de faible densité doivent contenir l'ADN "léger". La quantification des ADN dans les fractions est réalisée par qPCR. Et la localisation des ADN "lourds" se fait par comparaison avec la localisation des ADN "légers".

Pour l'ADN issu de la nécromasse enrichie en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ , la répartition de l'ADN au sein des fractions est relativement diffuse (Figure 12A). En revanche, pour l'ADN issu de la nécromasse non enrichie, deux plateaux de quantités d'ADN sont observés : un niveau de concentration de base dans les fractions à forte densité (fractions 2 à 6), et un deuxième plateau avec une forte concentration en ADN dans les fractions à faible densité (fractions 8 à 11) (Figure 12B). On remarque donc bien une différence de répartition de l'ADN en fonction de sa composition en élément lourd ou non.

La comparaison entre la répartition de l'ADN potentiellement enrichi et l'ADN non enrichi montre alors que l'ADN non enrichi serait situé à partir de la fraction 8, alors que l'ADN enrichi serait plutôt dans les fractions précédentes (des fractions 5 à 7).

Ainsi, les fractions 6-7 et les fractions 8-9 seront analysées par séquençage Miseq pour comparer la différence de composition microbienne correspondant aux espèces potentiellement capables de dégrader la nécromasse fongique (incorporation des éléments enrichis dans la structure de leur ADN) et les espèces qui n'assimilent pas les résidus de dégradation de la nécromasse fongique.



**Figure 12 :** Identification des fractions du gradient de densité contenant l'ADN enrichi ( $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ ) et des fractions contenant l'ADN non enrichi ( $^{12}\text{C}$  et  $^{14}\text{N}$ ), à partir de la nécromasse de *H. incarcerationum* complémentée ou non en azote

A : Quantification de l'ADN dans les fractions, à partir de la nécromasse cultivée sur milieu P5 enrichi (source de carbone  $^{13}\text{C}$  et source d'azote  $^{15}\text{N}$ ) ; B : Quantification de l'ADN dans les fractions, à partir de la nécromasse cultivée sur milieu P5 non enrichi (source de carbone  $^{12}\text{C}$  et source d'azote  $^{14}\text{N}$ )

Les différentes courbes orange et bleu correspondent aux 4 répliquas biologiques.

## Discussion

### Impact de la qualité biochimique du mycélium sur sa dégradation

En accord avec de précédentes études, nos résultats indiquent que la composition biochimique de la nécromasse fongique a un impact sur sa dégradation (Fernandez & Kennedy, 2018; Fernandez & Koide, 2014). En effet, la nécromasse de *P. robustus* (fortement mélanisée) est significativement moins dégradée que celle des deux autres espèces fongiques, pour lesquelles le taux de mélanisation est plus faible, et sensiblement identique entre les deux espèces. Par ailleurs, on remarque que la proportion d'azote des deux champignons pigmentés (*P. robustus* et *H. incarcerationum*) est similaire et plus faible que celle de *L. bicolor*. Or, la dégradation de *H. incarcerationum* est similaire à celle de la nécromasse de « bonne qualité » de *L. bicolor* (faible teneur en mélanine et forte teneur en azote). Etant donné le retard significatif observé pour la décomposition de la nécromasse fongique fortement mélanisée par rapport à celles des deux espèces peu mélanisées, il semble que le taux de mélanisation ait un effet beaucoup plus important sur la cinétique de décomposition de la nécromasse que la teneur en azote. La nécromasse de ces trois espèces fongiques a été obtenue en conditions contrôlées. Il n'est donc pas possible d'extrapoler les données de qualité de biomasse aux conditions environnementales. Une analyse in situ de la qualité de la biomasse fongique de différentes espèces, ou genres, à partir de capophores par exemple, serait très complémentaire de ces résultats préliminaires.

Fernandez & Kennedy, (2018) et (Beidler et al., (2020) ont également montré que le taux de mélanisation de la nécromasse avait un impact sur les communautés microbiennes la décomposant. L'analyse fonctionnelle des communautés microbiennes, au cours de la dégradation de la nécromasse fongique, indique une plus faible mobilisation de trois activités enzymatiques (exo-chitinase, phosphatase et beta-glucosidase) pour la nécromasse « récalcitrante » de *P. robustus*, par rapport à celles mesurées à partir de la nécromasse de *L. bicolor*. Cette corrélation positive entre le niveau d'expression de ces trois activités microbiennes et la cinétique de dégradation de la nécromasse suggère que ces trois activités enzymatiques, en particulier la N-acétyl- $\beta$ -d-glucosaminidase (exo-chitinase) et la phosphatase acide, seraient de potentiels indicateurs de la décomposition de la matière organique fongique. Les différences observées entre les deux catégories de nécromasse pourraient traduire i) une diminution de l'abondance des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de la MO récalcitrante, ii) des différences de composition microbienne (diversité fonctionnelle) entre les deux matrices ou iii) une régulation / inductibilité différentielle de ces enzymes, en lien avec la qualité biochimique des nécromasses. Les

analyses de métabarcoding devraient nous permettre de confirmer l'une ou plusieurs de ces hypothèses.

### **Dynamique de dégradation de la nécromasse fongique en gestion conventionnelle**

Entre 18 et 33 jours, la différence de perte de masse de la nécromasse dans le sol n'est pas significative. Différentes hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. i) Cette période d'incubation se situe entre fin mars et début avril, période à laquelle il y a eu peu de précipitations et les températures du sol étaient encore basses. Cette limitation en eau et les faibles températures ont pu affecter l'action des communautés microbiennes, en particulier leurs activités cataboliques, sur la décomposition de la nécromasse. ii) Lors de l'analyse des échantillons après 33 jours, des collemboles et des nématodes ont été observés sur la nécromasse, ainsi que des œufs. Cette colonisation, associée à celles de nombreux autres organismes microscopiques, peut également impacter les mesures de pertes de masse par une légère surestimation de la masse du mycélium encore présent dans les sacs de nylon (mesh-bags).

Par ailleurs, ces organismes de la micro- / mésofaune participent activement à la dégradation de la MO, qu'elle soit végétale ou microbienne (Rusek, 1998). Suite à leur développement, la dégradation de la nécromasse fongique sera donc accentuée, expliquant en partie la forte augmentation de la perte de nécromasse de *L. bicolor* à 66 jours. L'abondance relative de ces petits arthropodes et de ces vers sera étudiée par la suite par des méthodes de qPCR ciblées sur les régions de l'ADN ribosomique 18S, spécifique des organismes eucaryotes, avec des amorces ciblées sur l'ADN de nématodes (Geisen et al., 2018).

La dégradation de la nécromasse peut également être influencée par la porosité des mesh-bags utilisés pour incuber la nécromasse fongique dans le sol. En effet, avec une porosité de 50  $\mu\text{m}$ , la diversité des communautés microbiennes diminue par rapport à des mesh-bags de porosité de 1000  $\mu\text{m}$ . Ceci est vrai notamment pour la présence limitée de champignons associés aux racines comme les champignons ECM (Maillard et al., 2021). L'utilisation de mesh-bags d'une porosité de 50 $\mu\text{m}$  est donc une première étape de sélection des espèces colonisant la nécromasse fongique Cette étude se focalise donc sur l'action des organismes bactériens et fongiques, capables de passer au travers d'une porosité de 50  $\mu\text{m}$  (Maillard et al., 2021).

En lien avec la porosité du tissu en nylon, des tests préliminaires de lessivage ont été réalisés pour s'assurer que la nécromasse broyée ne puisse pas traverser le maillage et induire une perte de la biomasse mycélienne artéfactuelle.

Après 2 mois, la perte de masse de *L. bicolor* atteint plus de 50%, et celle de *P. robustus* atteint environ 25%. La dynamique de perte de masse sur le plus long terme reste encore à analyser pour confirmer i) une diminution dans la dégradation observée comme dans de précédentes études (Brabcová et al., 2016; Fernandez et al., 2019) et ii) le maintien de ces différences de perte de masse entre les deux types de nécromasse (« faible » qualité et « bonne » qualité).

Au début de la décomposition de la nécromasse, la plus forte activité enzymatique mesurée est une activité chitinolytique. Puis l'activité phosphatase augmente progressivement. Et enfin l'activité beta-glucosidase commence à augmenter après deux mois d'incubation *in situ*. Ces résultats montrent une réelle dynamique dans la mobilisation des fonctions microbiennes impliquées dans la dégradation de la nécromasse. Dans un premier temps, des organismes chitinolytiques vont dégrader la paroi fongique mobilisant ainsi du C et du N, puis le phosphate organique serait mobilisé dans un second temps. Enfin, les activités beta-glucosidase permettront d'assimiler des formes plus simples de carbone. Maillard et al., (2021) ont démontré que l'activité beta-glucosidase était la plus élevée après 6 mois de dégradation, nous pouvons donc nous attendre à une augmentation de cette activité lors des prochaines analyses à 4 et 6 mois.

Par ailleurs, certaines activités enzymatiques analysées ne sont pas exprimées, notamment les activités protéolytiques (leucine amino-peptidase). Ce potentiel indicateur des activités protéolytiques est peut-être exprimé dans des phases plus précoces de l'incubation. Sans surprise, les activités enzymatiques microbiennes impliquées dans la dégradation de la MO végétale (cellobiohydrolase, xylosidase et glucuronidase) ne sont pas exprimées dans la matrice mycélienne en décomposition. De plus, les analyses réalisées sur la perlite indiquent que très peu d'activités enzymatiques sont produites sur ce substrat (Annexe 6). L'expression des enzymes étudiées ici serait donc principalement inductible par le type de substrat sur lequel se trouvent les communautés microbiennes. L'ensemble de ces données confirme que les activités chitinolytiques, phosphatase et beta-glucosidase seraient de bons indicateurs de la dynamique de dégradation de la nécromasse fongique, sans être exclusivement liées à ce processus.

### **Conséquence de l'exportation des litières et des rémanents forestiers sur la dynamique de dégradation de la nécromasse fongique de *L. bicolor* et *P. robustus***

De manière générale et quelle que soit la qualité biochimique de la nécromasse fongique, les activités enzymatiques liées à la dégradation de celle-ci augmentent dans le sol de la placette 2 (retrait des rémanents forestiers et des litières). Les activités exo-chitinase et beta-

glucosidase ont tendance à augmenter sans que cela ne soit significatif. Cette tendance pourrait se confirmer avec les futurs prélèvements. Ces résultats sont surprenants car les travaux antérieurs de Maillard et al. (2019) ont montré que, après trois ans d'exportation de rémanents et litières, les activités enzymatiques dans le « sol nu », y compris la phosphatase acide et l'exo-chitinase, diminuaient lorsque la MO végétale était exportée. Après huit ans d'exportation de rémanents et litières, ces résultats semblent évoluer, voire s'inverser (Rimet, 2022 – communication personnelle). De plus, l'absence récurrente de MO végétale a pu provoquer une augmentation de la nécromasse fongique dans le sol nu, en lien avec la mortalité des champignons décomposeurs des litières et du bois mort, et des changements profonds dans la composition des communautés microbiennes du sol. Les différences observées entre les deux traitements sylvicoles dans nos sacs de nécromasse fongique pourraient donc s'expliquer par une spécialisation des microorganismes impliqués dans la dégradation de la MO fongique dans la placette « sol nu ».

En revanche, la perte de masse des deux types de nécromasses fongiques (*L. bicolor* et *P. robustus*) n'est pas impactée par le retrait des rémanents forestiers. Elle est similaire à la perte de masse dans le sol forestier avec une gestion conventionnelle. Or, avec l'augmentation des activités de dégradation de la nécromasse fongique, nous aurions pu nous attendre à une augmentation dans sa décomposition et consécutivement de sa perte de masse. Dans le traitement 2 (sol nu), l'absence de MO végétale en surface du sol pourrait conduire à la perte des organismes appartenant à la meso-microfaune et participant à la décomposition de la nécromasse. En effet, aucun collembole ou nématode n'a été observé sur la MO fongique incubée dans le sol forestier dépourvue de litière. Ainsi, l'avantage gagné par la stimulation des activités enzymatiques microbiennes dans le sol nu serait perdu (compensé) par une potentielle diminution de ces organismes fongivores. De futures analyses en qPCR ciblées pourraient contribuer à une meilleure interprétation de ces résultats. Dans la même veine, la diminution des champignons saprotrophes dans le sol nu (Maillard et al., 2018), semblent favoriser les champignons ECM, qui pourraient alors rentrer en compétition avec les bactéries ou champignons spécialistes de la décomposition de la nécromasse fongique. Leur source de carbone provenant directement de leur plante hôte, ils seraient avantagés pour mobiliser le N. Cette compétition se rapprocherait du Gadgil effect (Fernandez & Kennedy, 2016; Gadgil & Gadgil, 1971) et limiterait la perte de masse attendue dans la placette sol nu au regard du niveau d'expression des enzymes. Les analyses par métabarcoding des communautés microbiennes (champignons et bactéries) présentes sur les nécromasses permettront de valider ou non ces hypothèses.

Enfin, l'exploitation intensive de la MO végétale dans les écosystèmes forestiers induit une diminution de l'apport en azote dans les sols (Achat et al., 2015). Le milieu est alors carencé. Or, lorsque la nécromasse apportée dans le sol est enrichie en azote, les activités enzymatiques augmentent d'avantage que lorsque la nécromasse n'est pas enrichie en azote. L'augmentation des activités enzymatiques pourrait permettre aux communautés microbiennes de mobiliser plus d'azote organique pour pallier aux carences dans le sol.

## Conclusion

Ces résultats montrent que la dégradation de la MO microbienne dans les sols forestiers est dynamique et qu'il s'agit d'un phénomène complexe impliquant de nombreuses variables abiotiques et biotiques. La modification dans le temps des activités enzymatiques impliquées dans la décomposition reflète une succession dans les profils métaboliques des communautés microbiennes colonisant la nécromasse fongique. Cela montre une variation dans la disponibilité des ressources en fonction du taux de dégradation de la MO fongique. Les activités chitinase, phosphatase, et beta-glucosidase seraient de bons indicateurs du niveau de dégradation de la nécromasse fongique.

La qualité biochimique de la nécromasse fongique influence fortement sa dégradation, notamment la concentration en mélanine qui est le facteur impactant le plus négativement la vitesse de décomposition de la MO fongique. La mélanisation fongique serait un trait influençant le stockage du carbone dans les sols. Des perspectives intéressantes pourraient être visées en couplant les informations d'écologie des communautés avec un suivi de tels traits, soit mesurés *in situ*, soit extrapolés à partir des données génomiques (Romero-Olivares et al., 2021).

Le taux de dégradation de la nécromasse fongique ne semble pas impacté par le changement de pratique sylvicole étudié ici ; bien que contrairement à ce qui a pu être démontré dans les sols, les activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de la MO fongique augmentent.

## Bibliographie

- Achat, D. L., Deleuze, C., Landmann, G., Pousse, N., Ranger, J., & Augusto, L. (2015). Quantifying consequences of removing harvesting residues on forest soils and tree growth – A meta-analysis. *Forest Ecology and Management*, 348, 124-141. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.042>
- Akroume, E., Maillard, F., Bach, C., Hossann, C., Brechet, C., Angeli, N., Zeller, B., Saint-André, L., & Buée, M. (2019). First evidences that the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* mobilizes nitrogen and carbon from saprotrophic fungus necromass. *Environmental Microbiology*, 21(1), 197-208. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14440>
- Akroume, E., Zeller, B., Buée, M., Saint-André, L., Reichard, A., Gehin, C., & Cyrille, B. (2017). Le réseau MOS, un dispositif de suivi des effets des prélèvements de biomasse sur les sols et les peuplements forestiers. *RDV techniques n°54 - ONF*.
- Angst, G., Mueller, K. E., Nierop, K. G. J., & Simpson, M. J. (2021). Plant- or microbial-derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108189. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108189>
- Beidler, K. V., Phillips, R. P., Andrews, E., Maillard, F., Mushinski, R. M., & Kennedy, P. G. (2020). Substrate quality drives fungal necromass decay and decomposer community structure under contrasting vegetation types. *Journal of Ecology*, 108(5), 1845-1859. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13385>
- Brabcová, V., Nováková, M., Davidová, A., & Baldrian, P. (2016). Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytologist*, 210(4), 1369-1381. <https://doi.org/10.1111/nph.13849>
- Buckeridge, K. M., Creamer, C., & Whitaker, J. (2022). Deconstructing the microbial necromass continuum to inform soil carbon sequestration. *Functional Ecology*, 36(6), 1396-1410. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14014>
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *The New Phytologist*, 184(2), 449-456. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x>
- Butler, M. J., & Day, A. W. (1998). Fungal melanins : A review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(12), 1115-1136. <https://doi.org/10.1139/w98-119>
- Cébron, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., & Leyval, C. (2008). Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2), 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- Clemmensen, K. E., Bahr, A., Ovaskainen, O., Dahlberg, A., Ekblad, A., Wallander, H., Stenlid, J., Finlay, R. D., Wardle, D. A., & Lindahl, B. D. (2013). Roots and Associated Fungi Drive Long-Term Carbon Sequestration in Boreal Forest. *Science*, 339(6127), 1615-1618. <https://doi.org/10.1126/science.1231923>
- Cotrufo, M. F., Soong, J. L., Horton, A. J., Campbell, E. E., Haddix, M. L., Wall, D. H., & Parton, W. J. (2015). Formation of soil organic matter via biochemical and physical pathways of litter mass loss. *Nature Geoscience*, 8(10), 776-779. <https://doi.org/10.1038/ngeo2520>
- DeAngelis, K. M., Pold, G., Topçuoğlu, B. D., van Diepen, L. T. A., Varney, R. M., Blanchard, J. L., Melillo, J., & Frey, S. D. (2015). Long-term forest soil warming alters microbial communities in



temperate forest soils. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00104>

Drigo, B., Anderson, I. C., Kannangara, G. S. K., Cairney, J. W. G., & Johnson, D. (2012). Rapid incorporation of carbon from ectomycorrhizal mycelial necromass into soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 49, 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.02.003>

FAO. (2020). *La Situation Des Forêts Du Monde 2020*. <https://doi.org/10.4060/CA8642FR>

Felske, A., Akkermans, A. D., & De Vos, W. M. (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4581-4587. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4581-4587.1998>

Fernandez, C. W., Heckman, K., Kolka, R., & Kennedy, P. G. (2019). Melanin mitigates the accelerated decay of mycorrhizal necromass with peatland warming. *Ecology Letters*, 22(3), 498-505. <https://doi.org/10.1111/ele.13209>

Fernandez, C. W., & Kennedy, P. G. (2016). Revisiting the ‘Gadgil effect’: Do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? *New Phytologist*, 209(4), 1382-1394. <https://doi.org/10.1111/nph.13648>

Fernandez, C. W., & Kennedy, P. G. (2018). Melanization of mycorrhizal fungal necromass structures microbial decomposer communities. *Journal of Ecology*, 106(2), 468-479. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12920>

Fernandez, C. W., & Koide, R. T. (2014). Initial melanin and nitrogen concentrations control the decomposition of ectomycorrhizal fungal litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 77, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.026>

Gadgil, R. L., & Gadgil, P. D. (1971). Mycorrhiza and Litter Decomposition. *Nature*, 233(5315), 133-133. <https://doi.org/10.1038/233133a0>

Geisen, S., Snoek, L. B., ten Hooven, F. C., Duyts, H., Kostenko, O., Bloem, J., Martens, H., Quist, C. W., Helder, J. A., & van der Putten, W. H. (2018). Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6), 1366-1378. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12999>

Hu, Y., Zheng, Q., Zhang, S., Noll, L., & Wanek, W. (2018). Significant release and microbial utilization of amino sugars and d-amino acid enantiomers from microbial cell wall decomposition in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 123, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.024>

Liang, C., Amelung, W., Lehmann, J., & Kästner, M. (2019). Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter. *Global Change Biology*, 25(11), 3578-3590. <https://doi.org/10.1111/gcb.14781>

Maillard, F., Kennedy, P. G., Adamczyk, B., Heinonsalo, J., & Buée, M. (2021). Root presence modifies the long-term decomposition dynamics of fungal necromass and the associated microbial communities in a boreal forest. *Molecular Ecology*, 30(8), 1921-1935. <https://doi.org/10.1111/mec.15828>

Maillard, F., Leduc, V., Bach, C., Reichard, A., Fauchery, L., Saint-André, L., Zeller, B., & Buée, M. (2019). Soil microbial functions are affected by organic matter removal in temperate deciduous forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 133, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.015>

Maillard, F., Leduc, V., Morin, E., Auer, L., Bach, C., Reichard, A., Saint-André, L., Zeller, B., & Buée, M. (2018). *Rôle des communautés microbiennes dans la dégradation de la matière organique en forêt*

*dans un contexte d'exportation intense de biomasse.* Université de Lorraine.

Maillard, F., Schilling, J., Andrews, E., Schreiner, K. M., & Kennedy, P. (2020). Functional convergence in the decomposition of fungal necromass in soil and wood. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(2), fiz209. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz209>

Mathieu, Y., Gelhaye, E., Dumarçay, S., Gérardin, P., Harvengt, L., & Buée, M. (2013). Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. *Journal of Microbiological Methods*, *92*(2), 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.017>

Neufeld, J. D., Vohra, J., Dumont, M. G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M. W., & Murrell, J. C. (2007). DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols*, *2*(4), 860-866. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.109>

Pan, Y., Birdsey, R., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, P., Kurz, W., Phillips, O., Shvidenko, A., Lewis, S., Canadell, J., Ciais, P., Jackson, R., Pacala, S., McGuire, A., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., & Hayes, D. (2011). A Large and Persistent Carbon Sink in the World's Forests. *Science*, *333*, 988-993. <https://doi.org/10.1126/science.1201609>

Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., & Murrell, J. C. (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, *403*(6770), 646-649. <https://doi.org/10.1038/35001054>

Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, *12*(11), 2885-2893. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02258.x>

Rimet, H. (2022). *Evolution de la diversité fongique sous différentes essences forestières en réponse à l'exportation massive de biomasse et de matière organique.* Université de Lorraine.

Romero-Olivares, A. L., Morrison, E. W., Pringle, A., & Frey, S. D. (2021). Linking Genes to Traits in Fungi. *Microbial Ecology*, *82*(1), 145-155. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01687-x>

Rusek, J. (1998). Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodiversity & Conservation*, *7*(9), 1207-1219. <https://doi.org/10.1023/A:1008887817883>

Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2013). *Biogeochemistry—An analysis of Global Change.*

Siletti, C. E., Zeiner, C. A., & Bhatnagar, J. M. (2017). Distributions of fungal melanin across species and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *113*, 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.05.030>

Viotti, C., Bach, C., Maillard, F., Ziegler-Devin, I., Mieszkin, S., & Buée, M. (2021). Sapwood and heartwood affect differentially bacterial and fungal community structure and successional dynamics during *Quercus petraea* decomposition. *Environmental Microbiology*, *23*(10), 6177-6193. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15522>

## Annexes

### Annexe 1 : Composition du milieu MBF

Composants	Concentration pour 1L
Di-NH <sub>4</sub> tartarte	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,067 g
NaCl	0,025 g
Glucose D+	4,0 g
Saccharose	4,0 g
Extrait de malt	5,0 g
Casein hydrolysate	0,2 g
Extrait de levures	0,5 g
Thiamine-HCl	10 <sup>-4</sup> g
Kanieltra	1,0 µL

### Annexe 2 : Composition du milieu P5

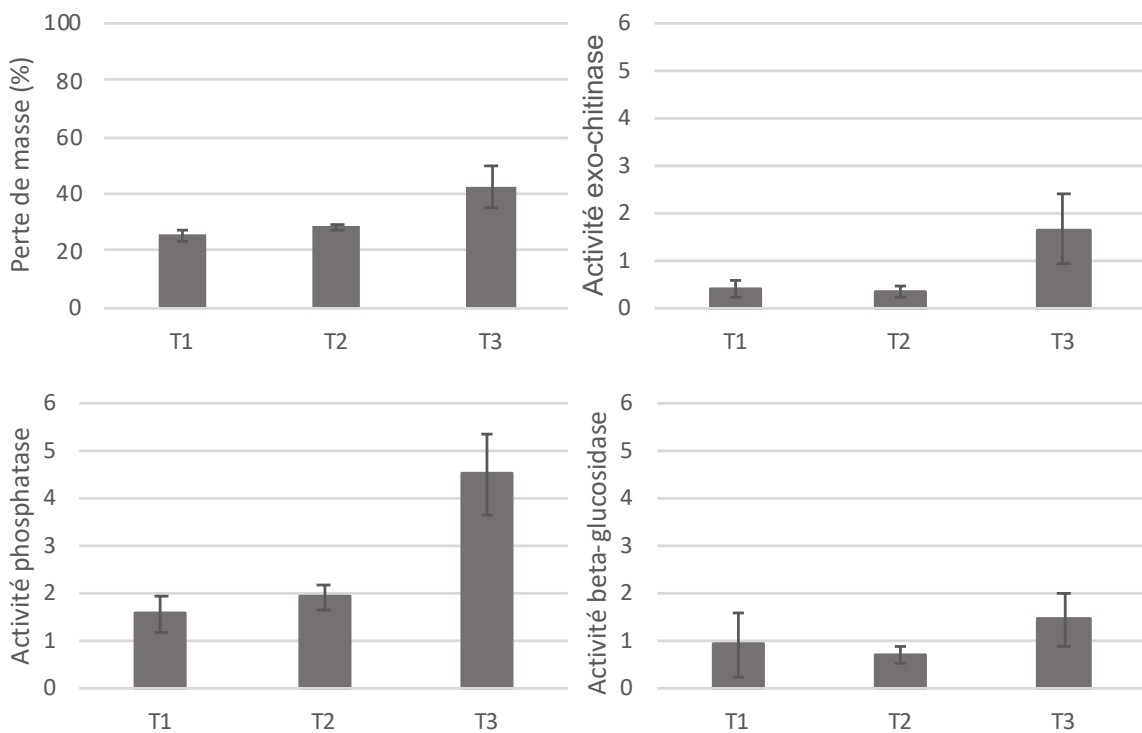
Composants	Concentration pour 1L
Ammonium sulfate (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (marqué ou non)	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Glucose D+ (marqué ou non)	10 g
Thiamine-HCl	1 mL
Kanieltra	1 mL

### Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

- Ajouter de l'éthanol 96% dans les tampons AW1 (38mL d'éthanol) et AW2 (40mL d'éthanol)
- Broyer 15 mg de nécromasse fongique à l'aide de 2 billes en Tungstène et d'un broyeur Restsch
- Ajouter 400 µL de tampon AP1 et vortexer
- Incuber 10 minutes à 65°C en agitant régulièrement
- Ajouter 130 µL de tampon P3. Mélanger et incuber 5 min dans la glace
- Centrifuger 5 min à 20 000 g
- Transférer le surnageant dans une colonne QiaShredder, placée dans un tube de collecte de 2 mL
- Centrifuger 2 min à 20 000 g
- Transférer le filtrat dans un nouveau tube en évitant le culot s'il y en a
- Ajouter 1,5 fois le volume de tampon AW1 et mélanger

- Transférer 650  $\mu$ L du mélange dans un colonne DNeasy Spin Column placée dans un tube de collecte de 2 mL
- Centrifuger 1 min à 6 000  $g$  et jeter le filtrat
- Répéter l'opération avec le mélange restant
- Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte de 2 mL
- Ajouter 500  $\mu$ L de tampon AW2 et centrifuger 1 min à 6000  $g$
- Jeter le filtrat
- Ajouter à nouveau 500  $\mu$ L de tampon AW2 et centrifuger 2 min à 20 000  $g$
- Retirer délicatement la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 mL
- Ajouter 100  $\mu$ L de tampon d'éluion AE
- Incuber 5 min à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 6 000  $g$
- Conserver les ADN à  $-20^{\circ}\text{C}$

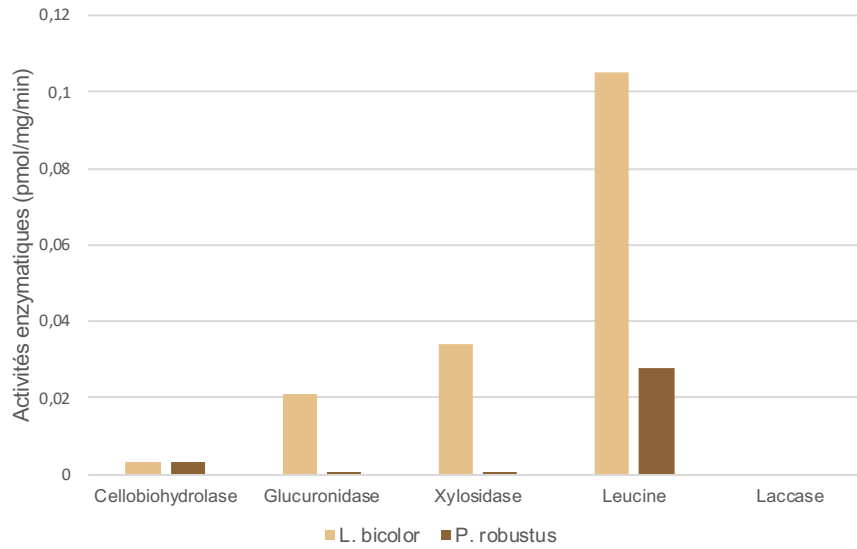
**Annexe 4 :** Pourcentage de perte de masse de la nécromasse de *H. incarcerationum* et activités enzymatiques associées pour chaque temps de prélèvement, dans la placette avec une gestion forestière conventionnelle et sans ajout d'azote



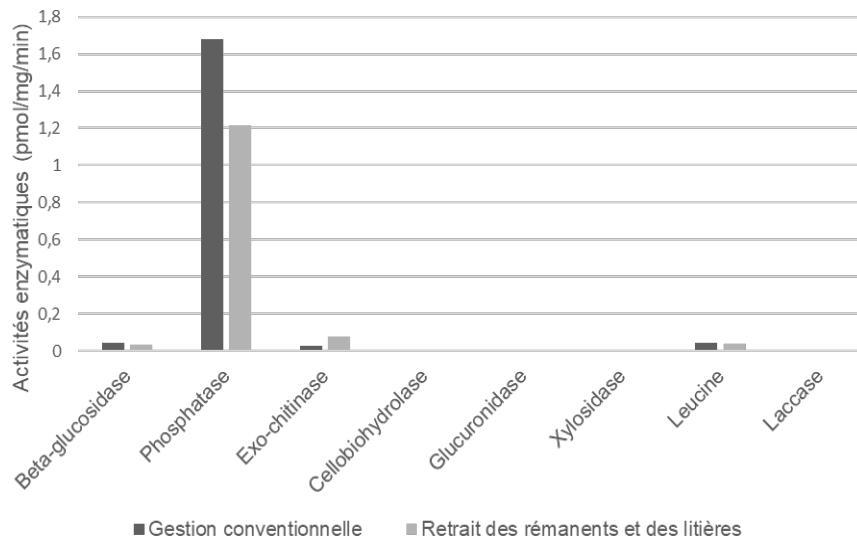
A : Perte de masse (%); B : Activité exo-chitinase (pmol/mg/min); C : Activité phosphatase (pmol/mg/min); D : Activité beta-glucosidase (pmol/mg/min)

T1 = 18 jours ; T2 = 33 jours ; T3 = 66 jours

**Annexe 5 :** Moyenne sur les 3 temps de prélèvement des activités enzymatiques étudiées dans la dynamique de dégradation de la nécromasse de *L. bicolor* et *P. robustus*, dans la placette avec une gestion conventionnelle et une nécromasse non complétement en azote



**Annexe 6 :** Activités enzymatiques à la surface d'un substrat de perlite après incubation dans un sol forestier avec une gestion conventionnelle ou sur un sol dépourvu de rémanents forestiers et de litière



## **Convention de stage**

**Convention de stage n° 88244 entre**

Nota : pour faciliter la lecture du document, les mots "stagiaire", "enseignant référent", "tuteur de stage", "représentant légal", et "étudiant" sont utilisés au masculin.

<b>1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT ou DE FORMATION</b>	<b>2 - L'ORGANISME D'ACCUEIL</b>
<p><b>Nom :</b> Université de Lorraine <b>Adresse :</b> CS 25233 54052 Nancy <b>Tél :</b> <b>Représenté par (signataire de la convention) :</b> Stéphane FLAMENT <b>Qualité du représentant :</b> Doyen de la Faculté des Sciences et Technologies <b>Composante/UFR :</b> MASTER MICROBIOLOGIE - M2 <b>Adresse (si différente de celle de l'établissement) :</b> Campus Aiguillettes - BP 70239 54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY CEDEX <b>Tél :</b> 03 72 74 51 39 <b>Mél :</b></p>	<p><b>Nom :</b> INRAE CENTRE DE RECHERCHE GRAND EST- NANCY <b>Adresse :</b> Route d'Amance 54280 CHAMPENOUX FRANCE <b>Représenté par (nom du signataire de la convention) :</b> Mme FOURNIER Meriem <b>Qualité du représentant :</b> Présidente du centre Grand-Est - Nancy <b>Service dans lequel le stage sera effectué :</b> UMR IAM 1136 <b>Tél :</b> 03 83 39 40 41 <b>Mél :</b> meriem.fournier@inrae.fr</p>

<b>3 - LE STAGIAIRE</b>
<p><b>Nom :</b> HILAIRE      <b>Prénom :</b> Elsa      <b>Sexe :</b> F      <b>Né(e) le :</b> 22/03/1999      <b>Numéro d'étudiant :</b> 31732426 <b>Adresse :</b> 6 bis rue de la Garenne 54670 CUSTINES FRANCE <b>Tél :</b> 0787960543      <b>Portable :</b> 0787960543      <b>Mél :</b> elsa.hilaire9@etu.univ-lorraine.fr <b>INTITULÉ DE LA FORMATION OU CURSUS SUIVI DANS L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET VOLUME HORAIRE (ANNUEL OU SEMESTRIEL) :</b> M2-Microbiologie (NANCY) (FI) <b>Nombre d'heures de formation :</b> Plus de 200 heures.</p>

<p><b>SUJET DE STAGE :</b> Rôle et diversité des communautés microbiennes impliquées dans la décomposition du mycélium (matière organique fongique) dans les sols forestiers <b>Dates :</b> du 17/01/2022 au 15/07/2022 <b>Correspondant à 882 heures de présence effective dans l'organisme d'accueil et représentant une durée totale de 5 mois 16 jour(s) et 0 heure(s)</b> <b>Commentaire :</b></p>
---

<b>Encadrement du stagiaire par l'établissement d'enseignement</b>	<b>Encadrement du stagiaire par l'organisme d'accueil</b>
<p><b>Nom et prénom de l'enseignant référent :</b> JORAND Frédéric <b>Tél :</b> +33 3 72 74 72 14 <b>Mél :</b> frederic.jorand@univ-lorraine.fr</p>	<p><b>Nom et prénom du tuteur de stage :</b> BUEE Marc <b>Fonction :</b> Directeur de Recherche <b>Tél :</b> 0383394072 <b>Mél :</b> marc.buee@inrae.fr</p>

<p>Caisse Primaire d'Assurance Maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile de l'étudiant sauf exception) :</p>
--



Vu le code de la santé publique notamment ses articles L. 3131-1 et suivants ;  
Vu le code de l'éducation, notamment ses articles L. 124-1 à L. 124-20, L. 612-11 et D. 124-1 à D. 124-9 ; D714-21 et suivants ;  
Vu le code de la sécurité sociale et notamment les articles L. 242-4-1, L. 412-8 et D. 242-2-1 ;  
Vu le code du travail et notamment ses articles L. 1221-13 et D. 1221-23 et suivants ;  
Vu le Décret n° 2020-1257 du 14 octobre 2020 déclarant l'état d'urgence sanitaire  
Vu le PROTOCOLE NATIONAL POUR ASSURER LA SANTÉ ET LA SÉCURITÉ DES SALARIÉS FACE À L'ÉPIDÉMIE DE COVID-19  
Vu la consultation de la Commission de la Formation et de la Vie Universitaire et l'avis du Conseil d'administration de l'établissement ;

Préalable :

**Stages en France :** Compte-tenu des circonstances exceptionnelles dues à la pandémie de Covid 19, il est entendu entre les parties qu'elles auront vérifié au préalable que les missions confiées au stagiaire se prêtent à un travail en présentiel et/ou à distance et qu'il dispose du matériel adéquat.

Les tuteurs vérifient la possibilité d'utilisation par les parties d'outils de communication adéquats.

Le stage ne pourra être réalisé en présentiel que dans le strict respect du protocole national pour assurer la santé et la sécurité des salariés en entreprise face à l'épidémie de Covid-19 et de toute disposition hygiène, sécurité et santé applicable à l'organisme d'accueil.

Il est entendu entre les parties qu'en cas de confinement total, le stage basculera automatiquement en stage à distance ou fera l'objet d'une suspension par avenant en cas d'impossibilité de stage à distance.

Les stages des étudiants des filières médicales et paramédicales font l'objet de dispositions spécifiques.

Une visite médicale sera automatiquement organisée pour tous les étudiants exposés à un risque pendant leur stage.

Contact de la médecine préventive : \_\_\_\_\_

**Stages à l'étranger :** Compte-tenu des circonstances exceptionnelles dues à la pandémie de Covid 19, il est entendu entre les parties qu'elles auront vérifié au préalable que :

- Si le stage a lieu en présentiel, une assurance spécifique rapatriement est contractée par le stagiaire pour le retour, en cas de confinement ou d'autres circonstances rendant impossible la poursuite du stage.

- Les missions confiées au stagiaire se prêtent à un travail en présentiel et/ou à distance et qu'il dispose du matériel adéquat.

Les tuteurs vérifient la possibilité d'utilisation par les parties d'outils de communication adéquats.

Le stage ne pourra être réalisé en présentiel que dans le strict respect de toute disposition hygiène, sécurité et santé applicable à l'organisme d'accueil.

Il est entendu entre les parties qu'en cas de confinement, le stage basculera automatiquement en stage à distance ou fera l'objet d'une suspension par avenant en cas d'impossibilité de stage à distance, en complément des modalités de rapatriement.

Le stagiaire s'engage sur l'honneur par la présente à se signaler avant son départ sur ARIANE : <https://pastel.diplomatie.gouv.fr/fildariane/dyn/public/login.html>

Le stagiaire atteint du Covid19 pendant son stage devra respecter les conditions prescrites dans le pays d'accueil, notamment en termes de quarantaine. L'établissement d'enseignement ne pourra pas être tenu de rapatrier le stagiaire.

Une visite médicale sera automatiquement organisée pour tous les étudiants exposés à un risque pendant leur stage.

Contact de la médecine préventive : \_\_\_\_\_

Contact en cas d'urgence : (autre que le stagiaire) : \_\_\_\_\_



## Article 1 - Objet de la convention

La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

## Article 2 - Objectif du stage

Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle le stagiaire acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.

Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.

### ACTIVITÉS CONFIÉES :

Stagiaire de Master - Jeune chercheur en formation

### Compétences à acquérir ou à développer :

Ecologie moléculaire, biologie moléculaire (extraction ADN, PCR, NGS, qPCR, DNA-SIP, ultracentrifugation, électrophorèse...) biochimie / enzymologie (dosage des biomolécules par HPLC, mesures fluorométrique d'activités enzymatiques ciblées), culture in vitro (microorganismes), analyses statistiques, traitement de données (logiciel R), rédaction de rapports d'activités, communication orale...

## Article 3 - Modalités du stage

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans le lieu désigné dans l'entête sera de **35.00** heures sur la base d'un **Temps Plein**.

Il est interdit de confier au stagiaire des tâches dangereuses pour sa santé ou sa sécurité.

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil ou dans le lieu désigné dans l'entête la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers : **déplacements occasionnels (essentiellement au CNRS Vandoeuvre, laboratoire du LIEC)**

## Article 4 - Accueil et encadrement du stagiaire

Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages.

Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.

MODALITÉS D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc..)

### **Entretiens réguliers avec l'encadrant direct**

Si les conditions sanitaires-le permettent : d'une part, le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions (les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement), d'autre part, l'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer, sauf pour les stages à l'étranger.

Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

## Article 5 - Gratification - Avantages

En France, lorsque la durée du stage est supérieure à 308 heures consécutives ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L4381-1 du code de la santé publique.

Le montant horaire de la gratification est fixé à 15% du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.

La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.

La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement, et le transport.

L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la durée est inférieure ou égale à deux mois.

En cas de suspension ou de résiliation de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.

La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du stagiaire dans le lieu indiqué.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à **3.90** euros Net par heure.

Modalités de versement de la gratification : **Virement bancaire**



### **Article 5 bis - STAGES EN FRANCE Accès aux droits des salariés - Avantages**

(Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.

Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.

Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.

L'organisme d'accueil s'engage à respecter toute directive sanitaire nationale ou sectorielle.

### **Article 5ter - STAGES EN FRANCE Accès aux droits des agents - Avantages**

(Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre son domicile et son lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.

Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.

Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.

AUTRES AVANTAGES ACCORDÉS (associés à l'article 5bis ou 5ter selon le statut public ou privé de l'organisme d'accueil) :

**Restaurant INRAE tarif stagiaire, bus TED gratuit entre Nancy Division de Fer et Champenoux**

### **Article 6 - Régime de protection sociale (maladie et accidents)**

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur. Il doit impérativement vérifier ses conditions de couverture maladie et fournir une attestation de couverture à son établissement d'enseignement au moment de la signature de la convention de stage et dans tous les cas avant le départ.

#### **6.1 - Gratification d'un montant maximum de 15% du plafond horaire de la Sécurité sociale - protection par la France (voir conditions article 6.4):**

La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale conformément aux termes de l'article R412-4 du code de la Sécurité sociale.

Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre de l'article L.412-8 2° du code de la Sécurité sociale.

En cas d'accident ou de maladie professionnelle survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2e de l'article L.412-8 du code de la sécurité sociale, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

#### **6.2 - Gratification supérieure à 15 % du plafond horaire de la Sécurité sociale : LE STAGIAIRE N'EST PAS COUVERT PAR LA FRANCE POUR LES STAGES A L'ETRANGER AVEC GRATIFICATION SUPERIEURE AU PLAFOND LEGAL**

Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15 % du plafond horaire de la Sécurité sociale.

L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants et de l'article R412-4 du code de la Sécurité sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

#### **6.3 - Protection maladie du stagiaire à l'étranger :**

##### **1) Protection issue du régime français**

- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par les étudiant(e)s de nationalité d'un pays membre de l'Union Européenne, l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).

- pour les stages effectués au Québec par les étudiants de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprise, 106 pour les stages en université) ;

Dans tous les autres cas de figure:

Les stagiaires qui engagent des frais de santé à l'étranger peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale Etudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français, des écarts importants peuvent exister. Il est donc fortement recommandé au stagiaire de souscrire une assurance maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...). Exception : si l'organisme d'accueil fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu des dispositions du droit local (voir 2 ci-dessous), alors le stagiaire peut choisir de bénéficier de cette protection Maladie locale. Avant d'effectuer un tel choix, il vérifiera l'étendue des garanties proposées.

##### **2) Protection issue de l'organisme d'accueil**

En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :

**OUI** (celle-ci s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français)

**NON** (la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français)

Si aucune case n'est cochée, le 6.3-1 s'applique.



#### **6.4 - Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger**

1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :

- être d'une durée au plus égale à 12 mois
- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays étranger
- se dérouler exclusivement dans l'organisme d'accueil partie à la présente convention
- se dérouler exclusivement dans le pays étranger cité.

Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.

2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.

3) La couverture concerne les accidents survenus :

- dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,
- sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
- sur le trajet aller-retour (début et fin de stage) du domicile du stagiaire situé sur le territoire français et le lieu de résidence à l'étranger,
- dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil et obligatoirement sur ordre de mission,

4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1) n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage par la présente convention à couvrir le stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.

5) Dans tous les cas :

- si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;
- si l'étudiant remplit des missions limitées en dehors de l'organisme d'accueil ou en dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

#### **Article 7 - Responsabilité et assurance**

L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.

Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant.

Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitte de la prime y afférente. Dans le cadre d'un stage à son domicile, l'étudiant qui utilise son propre matériel le déclare à son assureur et, le cas échéant, s'acquitte de la prime afférente.

#### **Article 8 - Discipline**

Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil. Le stagiaire s'engage à signaler tout dysfonctionnement en termes d'hygiène et de sécurité à son organisme d'accueil ET à son établissement d'enseignement supérieur.

Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.

En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

#### **Article 9 - Congés - Interruption du stage**

En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévues pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code du travail.

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.

NOMBRE DE JOURS DE CONGES AUTORISES / ou modalités des congés et autorisations d'absence durant le stage :

2,5 jours par mois de présence effective

Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courriel.

Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage. Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (924 heures).



## Article 10 - Devoir de réserve et confidentialité

Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.

Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.

Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

## Article 11 - Propriété intellectuelle

**En France**, conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.

Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

## Article 12 - Fin de stage - Rapport - Evaluation

1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale.

2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage. Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

3) Évaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent (ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définies en accord avec l'enseignant référent).

4) Modalités d'évaluation pédagogiques : Rapport de Stage, Rapport et soutenance

NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) : 30.00

5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

## Article 13 - Droit applicable - Tribunaux compétents

La présente convention est régie exclusivement par le droit français.

Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

FAIT À Champenoux le 03. 11. 21

**POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT**

Viseur du centre, par délégation, Stéphane FLAMENT

S. FLAMENT

**STAGIAIRE (ou son représentant légal le cas échéant)**

Elsa HILAIRE

**L'enseignant référent du stagiaire**

Frédéric JORAND

**POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL**

Meriem FOURNIER

**Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil**

Marc BUEE

Fiches à annexer à la convention : 1) Attestation de stage / 2) Fiche de stage à l'étranger (pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr - pour fiche pays voir site diplomatie.gouv.fr) / 3) Autres annexes (le cas échéant)

## Résumé

Dans les sols forestiers, la matière organique est constituée de débris végétaux mais aussi de la nécromasse de microorganismes et de la faune du sol, responsables de la décomposition des litières et du bois. La nécromasse fongique représente une fraction importante des apports et des stocks de carbone dans les sols forestiers. Sa composition biochimique, en particulier les teneurs en mélanine et en azote, influencerait sa dégradation. La décomposition de la nécromasse fongique a été étudiée pour trois espèces plus ou moins mélanisées, et avec des rapports C/N variables, en mesurant les pertes de masse, les activités enzymatiques microbiennes durant sa dégradation et en étudiant les communautés microbiennes par une approche de métabarcoding et DNA Stable Isotope Probing. L'effet de la gestion sylvicole a également été étudiée, comme variable supplémentaire. Au cours de la dégradation de la nécromasse, une succession des profils cataboliques microbiens a été mesurée et l'intensité des activités était positivement corrélée à la décomposition des mycéliums. La dégradation de la nécromasse fongique était négativement impactée par la quantité de mélanine dans les espèces fongiques. Une exploitation intensive des résidus forestiers induit une augmentation de la production d'enzymes potentiellement impliquées dans la décomposition de la MO fongique sans conséquence sur sa perte de masse.

**Mots-clés :** sols forestiers, matière organique fongique, mélanine, carbone, dynamique microbienne

## **Abstract**

In forest soils, organic matter is made up of plant litters but also of the necromass of microorganisms and soil fauna, responsible for the decomposition of litter and wood. Fungal necromass represents an important fraction of the carbon input and stock in forest soils. Its biochemical composition, in particular melanin and nitrogen contents, would influence its degradation. The decomposition of fungal necromass was studied for three species with varying degrees of melanization and variable C/N ratios, by measuring mass losses, microbial enzymatic activities during degradation and by studying microbial communities using a metabarcoding and DNA Stable Isotope Probing approach. The effect of silvicultural management was also studied. During necromass degradation, a succession of microbial catabolic profiles was measured, and the intensity of activities was positively correlated with mycelial decomposition. Fungal necromass degradation was negatively impacted by the amount of melanin in the fungal species. Intensive exploitation of forest litters induces an increase in the production of enzymes potentially involved in the decomposition of fungal OM without consequence on its mass loss.

**Keywords** : forest soils, fungal organic matter, melanin, carbon, microbial dynamics