

Allélopathie, élément clé de la régénération des forêts méditerranéennes ?

1. contexte de la recherche

L'allélopathie, processus par lequel les composés produits par une plante peuvent interférer avec les plantes et/ ou les microorganismes environnants, est un facteur très controversé dans l'étude des interactions biotiques mais d'une grande importance dans la structure des communautés végétales (Barto et al., 2011). Les connaissances sur les interactions allélopathiques sont actuellement moins avancées en milieu forestier que dans des systèmes comparativement plus simples, comme les systèmes agricoles dans lesquels elles ont été mises en évidence initialement (Galet et Pélissier, 1997). Cependant, des interactions allélopathiques dans des écosystèmes forestiers ont pu être démontrées (Gallet et Pélissier, 1997 ; Vandermaast et al., 2002). Les effets allélopathiques de certains arbres de la canopée sur des semis d'autres arbres et de plantes de sous-bois peuvent avoir des effets directs sur le renouvellement des forêts (Mallik, 2008). De même, des espèces de sous-bois présentent des propriétés allélopathiques qui peuvent avoir des effets sur la régénération des arbres et sur la biodiversité associée. Ce sont souvent des difficultés de régénération rencontrées en forêt qui ont conduit à l'hypothèse de l'implication de processus allélopathiques : des études ont donc recherché chez les espèces du sous-bois des substances susceptibles de limiter l'installation des semis ligneux. Ces études n'ont que très rarement pris comme modèle des espèces méditerranéennes.

De plus, les microorganismes du sol, capables d'interagir avec les allélochimiques libérés dans le système, vont jouer un rôle-clé dans l'expression du potentiel allélopathique. Parmi ces microorganismes, les champignons mycorhiziens occupent une place à part car ils peuvent modifier la sensibilité d'un végétal à des substances allélopathiques (Gallet et Pélissier, 1997). De nombreuses plantes dépendent de la symbiose avec ces champignons mycorhiziens pour leur croissance et leur développement, les champignons mycorhiziens pouvant améliorer la nutrition de leurs hôtes et participer aux interactions entre les plantes ou entre plantes et microorganismes (pathogènes) (Mallik, 2008).

La chênaie pubescente, formation forestière dominante en Région PACA, présente localement des signes de dépérissements. Les observations locales permettent de montrer qu'il existe des semis de chêne mais que ceux-ci ne se développent pas. La régénération des chênes méditerranéens a toujours été considérée comme problématique et jusqu'à présent aucune explication particulière n'a été privilégiée (Li et Romane, 1997). Dans le sous-bois de la chênaie pubescente, le sumac *Cotinus coggygria* Scop. est un arbuste qui présente un important cortège en métabolites secondaires : monoterpènes, composés phénoliques ou encore des tanins (Novaković et al., 2009) ce qui en fait une espèce susceptible jouer un rôle dans les interactions biotiques via des processus allélopathiques.

Dans ce projet, nous allons tester l'hypothèse selon laquelle les composés allélopathiques d'une espèce de sous-bois peut affecter la régénération d'une espèce forestière dominante par l'intermédiaire de leurs effets sur les champignons mycorhiziens. Les interactions tripartites plante source d'allélochimiques/champignons mycorhizien/plante cible pourraient expliquer des phénomènes de non régénération dont les causes ne sont toujours pas connues.

Le modèle utilisé dans cette étude sera celui de la chênaie pubescente et de son sous-bois dominé par *Cotinus coggygria*.

Ce projet associe les compétences complémentaires de l'équipe Diversité fonctionnelle des molécules à l'écosystème (DFME) de l'IMBE pour son expertise dans l'étude de l'implication du métabolisme secondaire des végétaux dans les processus fonctionnels des écosystèmes méditerranéens, de l'équipe Développement Métrologiques et Chimie des Milieux (DMCM) du Laboratoire Chimie de l'Environnement (LCE) pour le développement de kits microplaques pour l'analyse des composés polyphénoliques et de l'équipe Ecosystèmes Méditerranéens et Risques (EMAX) de l'IRSTEA pour l'étude du renouvellement et de la restauration des peuplements méditerranéens.

2. Objectifs de la demande et suite prévue pour le projet

L'objectif de la présente demande est de regrouper les compétences de l'IMBE, du LCE et l'IRSTEA afin de déterminer si *C. coggygia*, qui pousse par tâches en sous-bois de la chênaie pubescente, est susceptible d'avoir un effet sur la régénération du chêne pubescent au travers de processus allélopathiques et par l'intermédiaire des champignons mycorhiziens. Le nombre important d'analyses à effectuer sur site et en laboratoire justifie également la mise au point concomitante d'une technique alternative de dosage des composés polyphénoliques.

Les objectifs de la présente demande se déclinent en quatre volets :

1. Expérimentation testant l'impact de *C. coggygia* sur les champignons mycorhiziens pouvant s'associer au chêne pubescent.
2. Isolement et identification de composés majoritaires (dérivés de l'alcool vanillique) de *C. coggygia*.
3. Développement d'une méthode spécifique de détermination des dérivés de l'alcool vanillique.
4. Comptage et suivi des semis de chêne pubescent dans des chênaies en différents contextes de sous-bois liés à la présence de *C. coggygia*.

Le site de l'O₃HP, localisé dans les Alpes de Haute-Provence sur la commune de Saint-Michel l'Observatoire, sera le site source de nos expérimentations. C'est un site privilégié de tout premier plan pour étudier la mise en cause des processus allélopathiques dans la régénération naturelle dans le cadre de la dynamique végétale en milieu forestier en prenant pour modèle *Quercus pubescens* et *Cotinus coggygia*.

Ce projet est aussi motivé par le constat que les tentatives d'application de l'allélopathie en milieu forestier restent rares et dispersées voire même absentes en milieu méditerranéen. Le manque de connaissances des mécanismes sous-jacents, ainsi que des obstacles techniques expliquent cette situation. L'importante superficie de la forêt de chêne pubescent, avec plus de 200000 ha en région PACA, présente un enjeu important dans le secteur socio-économique comme en environnement. Nous souhaitons, à plus long terme, être en mesure de pouvoir organiser un workshop autour de thème de l'implication de l'allélopathie dans la régénération forestière et réunissant les différents acteurs de ce domaine (IRSTEA, ONF, CRPF...).

La suite de cette étude préliminaire ayant pour but de mettre en évidence des interactions biotiques tripartites plante source d'allélochimiques/champignons mycorhiziens/plante cible, sera d'approfondir les mécanismes sous-jacents à cette interaction complexe. Pour cela, nous associerons (i) des chimistes capables de synthétiser des molécules identifiées dans le *C. coggygia* et pouvant avoir une activité biologique sur les champignons mycorhiziens et de développer des méthodes analytiques spécifiques de ces composés, (ii) des microbiologistes pouvant décrire le rôle et les réactions des champignons mycorhiziens se trouvant à l'interface plante source/plante cible (iii) des écophysiologistes pouvant décrire les mécanismes physiologiques impliqués dans la réaction du végétal, (iv) des écologues capables de transposer tous les processus décrits dans le fonctionnement et la régénération des chênaies méditerranéennes. Ce programme fera l'objet d'une réponse conjointe à l'appel d'offre EC2CO volet Bioeffect de l'INSU ou à l'appel d'offre ANR blanche ou plus spécifique en fonction des appels proposés (Ecologie chimique).

3. Réalisations prévues, plan financier succinct, description courte du mode d'interaction prévu entre les équipes

3.1 Réalisations prévues

1. Expérimentation testant l'impact de *C. coggygia* sur les champignons mycorhiziens pouvant s'associer au chêne pubescent.

Dans une étude préliminaire, nous nous sommes intéressés à la germination de chêne pubescent sous l'effet d'un apport de macérâts de feuilles de *C. coggygia* riches en métabolites secondaires. Cet apport a fortement limité le développement racinaire du chêne (résultats présentés en communication au 12^{ème} European Ecological Federation Congress en septembre 2011).

En 2012, nous souhaitons donc approfondir ces premiers résultats en étudiant l'impact de *C. coggygia* sur l'association symbiotique chêne pubescent / champignons mycorhiziens et, en conséquence, sur le développement du chêne. Pour cela nous allons :

- mettre en culture de chênes mycorhizés de 1 an ;
- récolter des feuilles de *C. coggygia* nécessaires aux macérations (ce mode d'extraction est privilégié afin de se rapprocher de lixiviats naturels qui sont constitués du liquide résiduel provenant de la percolation de l'eau à travers le végétal) ;
- mesurer des paramètres déterminant l'impact des macérations de *C. coggygia* sur les la croissance et les traits fonctionnels du chêne pubescent : dimensions, surface foliaire ; ratio foliaire masse/surface ; specific root length ; biomasse des différents compartiments aériens et souterrains, teneur en N ;
- mesurer des paramètres déterminant l'impact des macérations de *C. coggygia* sur les champignons mycorhiziens pouvant s'associer au chêne pubescent : taux de colonisation mycorhizienne (comptage des ectomycorhizes), biomasse des champignons mycorhiziens (ergostérol), détermination génétiques des champignons associés.

2. Isolement et identification du dérivé de l'alcool vanillique de *C. coggygia*.

Notre étude préliminaire a montré la présence importante d'un composé inconnu (jamais décrit jusqu'à présent). Nous souhaitons procéder à l'isolement et à l'identification de cette molécule, dérivé de l'alcool vanillique. Une fois isolée, nous pourrions tester son activité biologique à la fois sur l'association symbiotique chêne pubescent / champignons mycorhiziens et sur le développement du chêne. Nous procéderons à :

- l'extraction au solvant des feuilles de *C. coggygia* ;
- l'isolement du composé sur colonne chromatographique silice ;
- la caractérisation chimique du composé (RMN, composition chimique, masse moléculaire, rayons X si cristallisation possible) ;
- les tests biologiques sur champignons mycorhiziens (ectomycorhizes prélevées sur les chênes et mises en culture).

3- Développement d'une méthode spécifique de détermination des dérivés de l'alcool vanillique.

Les alcools sont connus pour être très réactifs aux composés halogénés pour former des hydracides halogénés. Le choix judicieux du composé halogéné (a priori un composé bromé) combiné à la structure chimique particulière de l'alcool vanillique va permettre de former un composé fluorescent dans un domaine spectral qui n'est pas « occupé » par les autres molécules organiques du milieu étudié. Ce dosage, par dérivation, devrait permettre d'atteindre un seuil de sélectivité et de sensibilité important permettant de développer un kit d'analyse rapide pour quantifier la somme des dérivés de l'alcool vanillique.

4- Comptage et suivi des semis de chêne pubescent dans des chênaies en différents contextes de sous-bois. Ce suivi se fera dans des zones sans *C. coggygia* en comparaison de zones où il

est présent ; dans le cas de la présence de *C. coggygria*, nous mesurerons la quantité de litière présente, la quantité de composés allélopathiques et la biomasse des champignons mycorhiziens présents dans le sol. Pour les composés allélopathiques dérivés de l'alcool vanillique nous utiliserons le kit développé en collaboration avec le LCE (cf 3.1.3).

L'évaluation de la quantité de champignons mycorhiziens présents dans le sol et pouvant s'associer au chêne pubescent sera conduite en semant des glands dans des sols prélevés dans le sous-bois de chêne en présence ou absence de *C. coggygria*. Après trois mois de croissance du chêne, le taux de colonisation en ectomycorhize sera mesuré pour chaque lot de jeunes chênes.

3.2 Mode d'interaction prévu entre les équipes

Le projet présenté ici nécessite des compétences dans les domaines de l'écologie des interactions, l'écologie forestière et la chimie. Les interactions entre les trois équipes impliquées permettront de mener à bien et de développer l'écologie chimique dans le cadre d'ECCOREV.

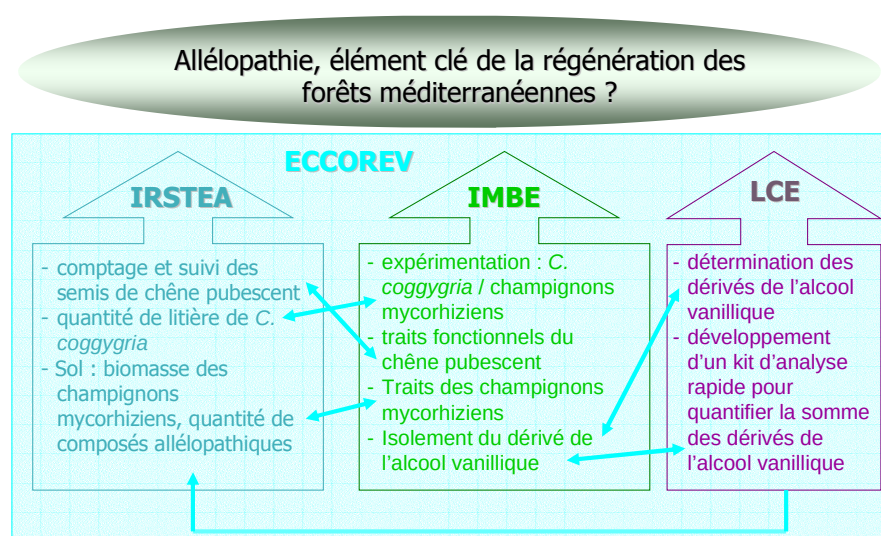


Figure 1 : implication de différentes équipes dans le projet

3.3 Plan financier succinct

IMBE	
Mise en place des expérimentations (chêne mycorhizés, pots, substrat...)	1000 €
identification des champignons mycorhiziens (analyse génétique)	300 €
Isolement du dérivé de l'alcool vanillique et analyses chimiques/tests biologiques	2000 €
Missions	300 €
Sous-Total	3600 €
LCE	
Réactifs chimiques de dérivation et standards analytiques	1500 €
Solvants, acides, bases	500 €
Sous-Total	2000 €
IRSTEA	
Mesures et analyses de la croissance et des traits fonctionnels de chêne pubescent	200 €
Missions	300 €
Sous-Total	500 €
TOTAL GLOBAL	6100 €

4. Description du consortium : liste des participants (avec leur statut et le pourcentage d'implication)

IMBE

- Anne Bousquet-Mélou (MC, coordination, 30%)
- Catherine Fernandez (PR, 10%)
- Lucie Miché (MC, 20%)
- Stéphane Greff (IE, 20%).
- Sylvie Dupouyet (AJT, 20%)

LCE

- Jean-Luc Boudenne (MC, HDR, coordination, 30%)
- Bruno Coulomb (MC, 10%)
- Laurent Vassalo (AI, 15%)

IRSTEA

- Bernard Prévosto (IR, 10%)
- Roland Estève (TR, 10%)

5. Court CV du porteur de chaque équipe incluant la liste de trois publications les plus pertinentes pour le projet.

IMBE

Anne Bousquet-Mélou est maître de conférences à l'Université d'Aix-Marseille dans l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie. Ses recherches sont axées sur l'étude des processus fonctionnels qui déterminent la dynamique successionale végétale des écosystèmes méditerranéens. Dans ce cadre, ses activités sont centrées sur l'importance du métabolisme secondaire des végétaux dans les processus fonctionnels : l'influence des paramètres environnementaux sur la production, le stockage et la libération des métabolites secondaires dans le milieu, l'impact de ces métabolites par le biais des processus allélopathiques sur les mécanismes de la succession et la biodiversité, l'utilisation de ces composés comme marqueurs de stress.

Activités et responsabilités scientifiques

- Responsable du programme : "Dépérissement de la lavande et du lavandin : mise en oeuvre d'un programme de recherches appliquées afin d'apporter des solutions de lutte aux producteurs." - CASDAR (Développement agricole et rural ; ministère de l'agriculture) pour la partie IMBE.
- Responsable du programme : "Conception et réalisation de chambres d'enfermement pour l'étude des échanges gazeux d'un végétal en déficit hydrique". CG13 – IMBE.
- Responsable du parcours plurisciences (ex licence pluridisciplinaire scientifique) depuis 2002.

Fernandez C., Lelong B., Vila B., Mévy J.P., Robles C., Greff S., Dupouyet S., Bousquet-Mélou A. 2006. Potential allelopathic effect of *Pinus halepensis* in the secondary succession: an experimental approach. *Chemoecology*, 16 (2): 97-105.

Fernandez C., Voiriot S., Mévy J.P., Vila B., Ormeño E., Dupouyet S., Bousquet-Mélou A. 2008. Regeneration failure of *Pinus halepensis* Mill.: the role of autotoxicity and some abiotic environmental parameters. *Forest Ecology and Management*. 255(7): 2928-2936 (2.110).

Fernandez C., Monnier Y., Ormeño E., Baldy V., Greff S., Pasqualini V., Mévy J.P., Bousquet-Mélou A. 2009. Variations in allelochemical composition of leachates of different organs and maturity stages of *Pinus halepensis*. *J Chem. Ecol.* 35 (8): 970-979 (2.327).

LCE

Jean-Luc Boudenne est maître de conférences au Laboratoire Chimie de l'Environnement (LCE). Ses recherches sont axées sur le développement de méthodes analytiques alternatives (analyseur en ligne, kits microplaques) pour l'analyse sur site de composés métalliques et de groupements fonctionnels d'intérêt écologique et environnemental. Il a récemment pu développer un kit microplaque permettant le dosage des fonctions carboxyliques, thiols et amines dans des échantillons environnementaux.

Activités et responsabilités scientifiques

- Responsable de l'équipe de recherche « Développements Métrologiques et Chimie des Milieux (DMCM) du LCE
- Responsable de la spécialité « Gestion des Eaux et des Milieux aquatiques » du master SET
- Membre du Comité d'Experts de l'European Centre for Environment and Health de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), depuis 2011
- Membre du comité d'experts « Eaux » de l'Agence Nationale de la Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), depuis 2003
- Participation au projet ANR Emergence « CARBOTHOLIAMINE : Kit de mesure en microplaques et analyseur en ligne de composés carboxyliques, thiols et amines » - 2011-2012

Cannavo P., Dudal Y., Boudenne J.-L., Lafolie F.. 2004. Potential for fluorescence spectroscopy to assess the quality of soil water-extracted organic matter. *Soil Science*, 169 (10) : 688-696.

Palacio-Barco E., Robert-Peillard F., Boudenne J.-L., Coulomb B. 2010. On-line analysis of Volatile Fatty Acids in anaerobic treatment processes. *Analytica Chimica Acta*, 668 (1) : 74-79.

Robert-Peillard F., Palacio-Barco E., Coulomb B., Boudenne J.-L. 2012. Development of a fluorescence-based microplate method for the determination of Volatile Fatty Acids in anaerobically-digested sewage sludges. *Talanta*, 88 : 230-236.

6. Bibliographie.

Barto EK, Hilker M, Müller F, Mohny BK, Weidenhamer JD, et al. 2011. The Fungal Fast Lane: Common Mycorrhizal Networks Extend Bioactive Zones of Allelochemicals in Soils. *PLoS ONE* 6, (11) : e27195.

Gracia M., Retana J., Picó F.X. 2001. Seedling bank dynamics in managed holm oak (*Quercus ilex*) forests. *Ann. For. Sci.*, 58 : 843-852.

Gallet, C. & Pellissier, F. 1997. Phenolic compounds in natural solutions of a coniferous forest. *Journal of Chemical Ecology*, 23(10) : 2401-2412.

Gallet, C. et Pellissier, F. 2002. Interactions allélopathiques en milieu forestier. *Rev. For. Fr.*, LIV 6 : 567-575

LI J., Romane F. 1997. Effects of germination inhibition on the dynamics of *Quercus ilex* stands. *J. Veg. Sci*, 8 : 287-294.

Mallik A.U. 2008. Allelopathy in forested ecosystems. *Allelopathy In Sustainable Agriculture And Forestry*. Editor(s): Zeng, RS; Mallik, AU; Luo, SM : 363-386.

Novaković, M., Vučković, I., Janačković, P., Soković, M., Filipović, A., Tešević, V. and Milosavljević, S. 2007. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Cotinus coggygria* from Serbia. *J. Serb. Chem. Soc.*, 72 (11) 1045-1051.

Vandermaast, D.B., Van Lear, D.H., Clinton, B.D. 2002. American chestnut as an allelopath in the southern Appalachians. *Forest Ecology and Management*, 165 : 173-181.