

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université «Dr. MOULAY Taher» de Saida

Faculté des sciences

Département de biologie



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme du Master en biologie

Spécialité: Biologie

Option: **BIOTECHNOLOGIE VEGETALE**

Valeur biotechnologique du taux de colonisation de la mycorhize arbusculaire naturelle de *medicago sativa* a différents stades en zone aride (cas de Naama).

Présenter par :

M^{ELLE}. **SADLI HANNOUNA**

M^M. **MILOUDI FATIMA**

Soutenue publiquement, le 25- sep -2018 devant le jury composé de :

Mr . NASRELLAH YAHIA Maitre de conférences « A » Université de Saida Président

Mr .HENNI MOSTAPHA Maitre de conférences « B » Université de Saida

Examineur

Mr. **MILOUD AOUISSAT** Maitre de conférences « A » Université de Saida

Encadreur

Année universitaire: 2017/2018

Remerciements

Vous avez profondément reconnu envers tous ceux qui se sont intéressés de près ou de loin à mon travail et tous ceux qui m'ont porté conseil et m'ont permis de mener à terme ce travail.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Madame **Fares Soria**, magister en biotechnologie à l'université saïda pour avoir dirigé ce mémoire. Je la remercie infiniment pour la confiance et le respect qu'il m'a toujours accordé et pour les idées qui m'ont beaucoup aidé à progresser. Sa haute compétence, sa patience, ses qualités humaines, ses conseils judicieux ont été pour moi une source inestimable de réconfort et d'encouragements pour mener à terme ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie profondément Mr. **Miloud Aouissat**, et Mm. **Fares Soria** pour leurs nombreuses orientations durant la préparation de ce travail.

J'exprime mon profond respect à monsieur **Nasrellah Yahia Maître de conférence « A » à de l'université de Saïda** qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury, et leur aimable collaboration.

Je remercie également **Mr HENNI MOSTAPHA Maître de conférence « A » à l'université de Saïda**, d'avoir accepté de participer à ce jury, en sa qualité d'examineur. Qu'il trouve ici mon profond respect. Ma grande sympathie et lui souhaite la réussite dans ses projets.

Et j'exprime aussi ma gratitude à tous les professeurs de notre spécialité conservation de la biodiversité steppique et saharienne.

J'adresse également ma sincère reconnaissance à toute la direction du département de biologie spécialement l'équipe de laboratoire de université de Saïda.

En fin Je remercie mes collègues de promotion de master 2018 et leur souhaite la réussite.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin.

J'en oublie certainement et je vous prie de bien vouloir m'en excuser

Dédicace

Tout d'abord je prie Dieu de m'avoir donné la force et le courage de terminer mes études. Je dédie ce modeste travail

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder la santé, le bonheur et une longue vie.

*Je dédie ce mémoire à Ma belle-mère **MERIEME***

*Je dédie ce mémoire à mes chères soeurs : SARA OMAIMA MARWA
KHLOUDE CHAIMAA HANAA*

*Je dédie ce mémoire à Mes tantes KHADIJA MAMA AMINA BADRA
KHADIJA*

*Je ne peux pas oublier mes très chères amies, ASMA SOMIYA
Une spéciale dédicace à mon mari et L'homme de ma vie MOSTAPHA*

pour leurs soutiens et leurs sacrifices.

FATIMA

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.

Mes chers parents : *FATNA et MOKHTAR* pour tous leurs efforts, leur soutien sans faille, leur amour et leurs encouragements. Je voudrais leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde affectation.

Mes sœurs, *CHAHRA ,LYLIA,HOURIA* et mon frère *MOHAMED,ABD EL KADER ,ZAKI*.

Mon grand-père *Ali*, HENNOUNA , KHADIJA ,YOUNIS.

Mes cousines ,*IMANE ,ASMAA ,REKIA ,HAFSA,FATIHA*,

Mes tantes TALYA, *FATIMA ,MOKHTARIA , MALIKA* .

Mes oncles, Mes cousins Sans Exception

Toutes la famille SADLI, MALLEL .

Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde

"Rien de grand ne se fait sans passion"

HENNOUNA

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
I. Généralités sur la symbiose mycorhizienne	5
I.1. symbiose mycorhizienne :	5
I.2. Historique	6
1.3. Les différents types de symbiose mycorhizienne	6
1.3.1 Les ectomycorhizes	7
1.3.2. Les endomycorhizes	8
1.3.3 Les ectendomycorhizes	9
1.4 La symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA)	10
1.4.1. Les Partenaires de la symbiose mycorhizienne à arbuscules	11
1.4 .1.1 Le partenaire végétal	11
1.4 .1.1.2 Systématique de medicago sativa	11
1.4 .1.1.3 Morphologie de Medicago sativa	12
1.4 .1.1.4 Importance de La luzerne	12
1.4 .1.2 Le partenaire fongique	14
1.4 .1.2.1 Le Champignon mycorhizien à arbuscule (CMA)	14
1.4 .1.2.2 Structure des champignons mycorhiziens à arbuscule	17
1.4 .1.2.3 Taxonomie des champignons endomycorhiziens	22
➤ la classification des glomérromycètes :	23
1.4 .1.2.4 Etablissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire	26
I.3.1.3.1 La phase a-symbiotique	26
I.3.1.3.2 La phase pré-symbiotique	27
I.3.1.3.3 La phase symbiotique	28
1.4 .1.2.5 Échange des nutriments	30
1.4 .1.2.5.1 Nutrition phosphatée	30
1.4 .1.2.5.2 Nutrition azotée	31
1.4 .1.2.5.3 Absorption des autres éléments minéraux	32
1.4 .1.2.6 Intérêt des mycorhizes	33

1.4.1.2.7 Résistance aux stress biotiques et abiotiques	36
1.4.1.3.1 Inoculum mycorhizien	37
1.4.1.3.2 Type d'inoculum	37
1.4.1.3.3 Etapes de production d'inoculum mycorhizien	38
1.4.1.3.4 Qualité des inoculums	38
Chapitre II. Matériel et méthode	39
II.1 matériel végétal	
II.2.1 Etude des mycorhizes	41
II.2.1.1 Echantillonnage	41
II.2.1.2 Lavage	41
II.2.1.3 Eclaircissement et coloration des racines	42
II.2.1.4 Montage et observation des racines	42
II.2.2 Estimation de la mycorhization MA naturelle des racines	43
II.2.3 II.2.3 Piégeage des endomycorhizes	44
II.2.4 Extraction des spores	45
II.2.5.1 Caractérisation de tri morphologique des spores	46
II.2.6 Analyse des données :	46
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Estimation de la colonisation MA naturelle des racines	49
III.2. Piégeage des endomycorhizes	51
III.3 Dénombrement des spores (CMA)	54
III.4 Diversité spécifique et répartition des CMA dans le site d'étude	55
Conclusion	56.

Liste des Abréviations:

APP : appareil de pré-pénétration

Ar : Arbuscule

CMA : champignons mycorhiziens à arbuscules

°C : degré celsius

ECM : Ectomycorhize

FAA : 8 volume : Formaldéhyde ; 1 volume : acide acétique ; 1volume : alcoole

gm : gramme

He : Hyphes extra radiculaire

Hi : Hyphes intracellulaire

Hir : Hyphe intercellulaire

HR : Réseau de Hartig

L: litre

MA : mycorhize à arbuscule / mycorhizienne à arbuscule

Mg : Milli gramme

Min: Minute

MyER : Mycélium extra-racinaire

MyIR : Mycélium intra-racinaire

My: Mycélium

m²: Mètre carrée

Rh : Réseau

Sp : Spore

Tg : Tétra gamme

V : Vésicule

% : Pourcentage

Symb : symbiot

Sb : sol brut non stérilisé

TL : témoin avec eaux de lavages

TS : témoin stérile

KOH : la potasse

F % : Fréquence de la colonisation mycorhizienne

M % : Intensité de la colonisation du cortex racinaire

m % : Intensité de la colonisation développée dans la partie mycorhizée du système racinaire

A % : Teneur arbusculaire de la colonisation ramené au système racinaire entier

a % : Teneur arbusculaire de la colonisation dans la partie mycorhizée du système racinaire

MPN : Most Probable Number°

C : degré Celsius.

nm :nanomètre.

h : heure.

min : minute.

µl : microlitre.

l : litre.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

m : mètre.

cm : centimètre.

µm : micromètre.

g : gramme.

mg : milligramme.

kg : kilogramme.

N° : Numéro.

pH : Le potentiel Hydrogène.

Introduction:

Le sol est essentiellement une ressource non renouvelable avec des taux de dégradation potentiellement rapides et des processus de formation et de régénération extrêmement lents. La quantité de terre, et donc de sol disponible, pour la production alimentaire par personne est limitée. Lorsque le sol est dégradé, sa capacité globale à remplir ses fonctions est réduite.

Les bactéries, champignons, protozoaires et autres organismes du sol jouent un rôle essentiel dans le maintien des propriétés physiques et biochimiques nécessaires pour la fertilité des sols ainsi que la régulation du cycle hydrologique (Lévêque et Mounolou 2001).

Les réductions de la biodiversité du sol rendent les sols plus vulnérables à d'autres processus de dégradation. Par conséquent, la biodiversité du sol est souvent utilisée comme indicateur global de l'état de santé du sol (CCE 2002).

Cependant, pour augmenter la croissance et le rendement, les agricultures pratiquent une agriculture conventionnelle ont souvent recours aux engrais phosphatés (Grant *et al.*, 2005 ; Hijri *et al.*, 2006).

L'apport de ces engrais ont provoqué une raréfaction, voire une élimination de certaines micro-organismes bénéfiques de la plupart des sols cultivés ce qui a contribué à la perte de productivité de ces sols.

Vu le rôle fondamental joué par les micro-organismes telluriques dans la fertilité et la durabilité des sols, une alternative de maintien d'augmentation de leur biomasse devient une nécessité de nos jours. Cette stratégie doit viser essentiellement à réduire considérablement l'apport d'engrais chimiques de synthèse et de pesticides. De ce fait, le recours à une agriculture raisonnée paraît être la meilleure solution. L'exploitation des nouveaux outils biologiques ouvre des perspectives d'innovation et d'amélioration des systèmes de culture conduisant à minimiser les risques de pollution de l'environnement (sol, eau et air) et de contamination des aliments.

Parmi ces outils biologiques, l'utilisation des biofertilisants est proposée pour améliorer les rendements des cultures tout en assurant une meilleure durabilité des systèmes de culture (Ohyama, 2006). Les biofertilisants sont basés sur des interactions biologiques bénéfiques et des processus naturels: parmi ces interactions, les microorganismes symbiotes du sol, comme les mycorhizes (du grec *mikos*, champignon, et *rhiza*, racine), jouent un rôle important sur le développement de la plante (Lopez, 2005). Décrites pour la première fois par Frank en 1885, elles font référence, comme leur nom l'indique, à des associations existantes entre champignons du sol et racines de plantes.

Depuis leur découverte, les champignons mycorhiziens ont fait l'objet d'importantes recherches dans le but de connaître leur fonctionnement, tant au niveau fondamentale qu'au niveau appliqué (Smith et Read, 1997 ; Selosse, 2001).

Les mycorhizes arbusculaires (MA) jouent un rôle considérable dans l'amélioration de la nutrition du végétal, notamment en phosphore. Karagiannidis et Hadjisavva-Zinoviadi, 1998 ont montré que certaines espèces de mycorhizes peuvent augmenter la biomasse de plantes cultivées jusqu'à 11,6 fois et leur rendement 5,4 fois en comparaison avec des plantes non-inoculées. D'autre part, elles permettent de réduire la contamination environnementale par leur capacité à capter les nutriments du sol, provoquant une diminution de l'usage de

Introduction

fertilisants chimiques tout en garantissant de bons rendements (Dodd & al., 1987; Joner y Johansen, 2000).

Bien que l'avantage principal apporté par les mycorhizes soit nutritionnel, des effets non nutritionnels sont également observés. En effet, les MA se comportent comme des bioprotecteurs en renforçant les défenses naturelles de la plante contre les bactéries et champignons phytopathogènes (Van Vuuren *et al.*, 2010). Ainsi que ce type de symbiose est connu par sa capacité de fournir un meilleur accès aux éléments nutritifs du sol aidant ainsi les plantes à mieux résister aux stress environnementaux (sécheresse, salinité...) de façon naturelle (Smith et Read, 2008). Au-delà de ces effets bénéfiques sur le développement et la santé des plantes, le réseau mycélien extra-radicalaire qui se développe dans le sol favorise la rétention de ses agrégats, en stabilisant ainsi sa structure et sa qualité. De ce fait, les mycorhizes MA peuvent aussi être considérées comme des biostabilisants (Jeffries *et al.*, 2003; Gianinazzi *et al.*, 2010). En plus, les mycorhizes arbusculaires peuvent être utilisés comme des outils curatifs dans le traitement biologique des sols pollués, il s'agit de la phytoremédiation assistée par les CMA. (Bert *et al.*, 2012).

Par ailleurs dans les zones arides, où les sols sont souvent pauvres en éléments nutritifs et où la période sèche peut se prolonger pendant plusieurs mois, la croissance des plantes dépend fortement de la symbiose mycorhizienne.

De même en Algérie, le déficit chronique en lait et en viande est dû essentiellement à une mauvaise alimentation du troupeau, tant sur le plan quantitatif que qualitatif (Laouar et abdelguerfi, 2006). Nous attirons l'attention sur la famille botanique des légumineuses. La plus part des légumineuses herbacées forment des relations symbiotiques avec les champignons MA (Zaidi *et al.*, 2003). Ainsi que les légumineuses fourragères représentent une source d'alimentation riche en protéines, fibres et énergie. Elles sont à la base de la production de lait et de viande (Russelle, 2001).

Pour répondre à ces problèmes il est impératif de définir une stratégie afin d'assurer la sécurité alimentaire qui devrait favoriser l'exploitation des mycorhizes en production végétale sur le territoire national à travers l'apport d'inoculum tout en protégeant un fourrage de bon qualité.

La luzerne l'une des plus importantes espèces de légumineuses utilisées dans l'agriculture. Sa haute qualité nutritionnelle et son rendement végétatif fait d'elle un fourrage d'excellence, assurant ainsi une sécurité alimentaire et sanitaire, comme c'est un atout environnement et écologique considérable (Mauriera, 2004 ; Waligora, 2010).

D'autre part, il est conseillé d'utiliser des inocula composés de souches mycorhiziennes autochtones vu leur meilleure adaptation aux conditions édaphiques locales ; c'est la raison pour laquelle nous a permis d'étudier le statut mycorhizien de *Medicago sativa* L. cultivée en zone aride (Naâma).

Introduction

De ce fait l'objectif de notre travail est :

- Estimation de taux de colonisation MA naturelle de *Medicago sativa L* à différentes stades de leur cycle de vie ; (stade sans floraison, stade floraison, stade de gousse).
- Isolement des spores des CMA indigène du sol rhizosphérique de *Medicago sativa L* en essayant de les identifier morphologiquement.
- Le but est de trouver le meilleur compromis entre fertilisation biologique à base de champignons mycorrhizogènes et fertilisation chimique tout en maintenant de bons rendements dans une optique de réduction des apports chimiques et de préservation de l'environnement.

I. Généralités sur la symbiose mycorhizienne :

I.1. symbiose mycorhizienne :

Le terme **mycorhize** a été créé par Frank en 1885, pour désigner les relations symbiotiques entre les plantes et les champignons. Par la suite des définitions plus larges ont été données à cette union (par exemple Hawksworth *et al.*, 1995).

Les mycorhizes sont désormais considérées différer principalement des autres associations plantes-champignons parce qu'elles sont des associations intimes avec une interface spécialisée où les échanges des matières se produisent entre les cellules vivantes (Nehls *et al.*, 2001; Pfeffer *et al.*, 2001). Une nouvelle définition plus large, de mycorhizes qui embrasse toute la diversité des mycorhizes tout en excluant toutes les autres associations plantes-champignons. Les mycorhizes constituent des partenaires essentiels dans la relation sol– plantes– microorganismes. En effet, certaines espèces végétales ne peuvent croître normalement sans leur symbiote fongique dont elles sont fortement dépendantes et avec qui elles ont co-évolué (Jenos, 1980 ; Brundrett, 1991 ; Gobat *et al.*, 2003). Toute plante contenant un champignon peut être désignée comme un «hôte», indépendamment du fait que l'association est bénéfique ou pas. De nombreux termes **symbiote, associé, mycobionte, habitant...** peuvent être utilisés pour désigner des champignons mycorhiziens dans les plantes et afin d'éviter toute confusion, le terme **endophyte** n'est pas employé pour ces derniers (Brundrett, 2004). Par ailleurs le terme neutre de «**colonisation**» pour décrire l'activité de champignon mycorhizien, est préférable à l'infection (Brundrett *et al.*, 1996; Smith et Read, 1997). De même, selon Baker (1978) «**potentiel d'inoculum**» devrait être utilisé pour désigner l'activité fongique dans le sol, plutôt que l'infectiosité, comme c'est le cas avec d'autres champignons du sol. La présence des mycorhizes entraîne l'apparition de nouveaux compartiments biologiques dans la rhizosphère. En modifiant la physiologie de la plante et donc la sécrétion des exsudats racinaires, les mycorhizes induisent des modifications significatives dans la structure des communautés bactériennes au voisinage de ces racines: le terme **mycorhizosphère** a été utilisé pour désigner ce volume de sol sous influence des mycorhizes et l'**hyphosphère** désigne le sol conditionné par le réseau d'hyphes mycéliens des champignons mycorhiziens (Rambelli, 1973 ; Linderman, 1988).

I.2. Historique :

Selon Morton *et al.* (1995), ce type de symbiose est apparu il y a 250 millions d'années. La première classification des champignons endomycorhizogènes a été proposée par Gerdemann et Trappe (1974) basée essentiellement sur les phénotypes des spores. Cinq genres ont été distingués : *Endogone*, *Glomus*, *Sclerosystis*, *Acaulospora* et *Gigaspora*. Ensuite, une révision de la famille des endogonacées a été réalisée par ces mêmes auteurs qui ont caractérisé 44 espèces au sein de 7 genres. Parmi elles, beaucoup de taxons ont été redéfinis, 2 genres (*Acaulospora*, *Gigaspora*) et 12 nouvelles espèces ont été décrits. En 1979, Ames et Schneider mettaient en évidence le nouveau genre *Entrophospora* dans la famille des Endogonaceae, avec *E. infrequens*, espèce qui était préalablement classée dans le genre *Glomus* sous le nom de *G. infrequens* (Hall, 1977). Walker et Sanders (1986) ont distingué deux genres, *Gigaspora* et *Scutellospora*. Enfin, en 1990, Morton et Benny ont classé les champignons symbiotiques appartenant à l'ordre des Glomales dans deux sousordres, Glomineae et Gigasporineae. Redecker *et al.* (2000).

I.3. Les différents types de symbiose mycorhizienne :

D'après la morphologie de l'organe résultant de l'association plante / symbiote fongique, différents types de mycorhizes sont distingués ; les endomycorhizes (forme endotrophe) et les ectomycorhizes (forme ectotrophe). Un troisième type de mycorhize pourrait être défini, «l'Ectendomycorhizes». Il s'agit d'une structure intermédiaire entre les deux premiers (Founoune, 2001). Les mycorhizes à arbuscules, les mycorhizes orchidoïdes et les ectomycorhizes sont les plus fréquentes et les plus étudiées. Les mycorhizes à arbuscules sont les plus primitives et les plus répandues dans les écosystèmes naturels et cultivés (Tedersoo *et al.*, 2010) (fig.1). Les mycorhizes à arbuscules seraient à l'origine des autres types de symbiose mycorhizienne et coïncideraient avec celle des végétaux terrestres il y a 450 millions d'années (Wang et Qiu, 2006).

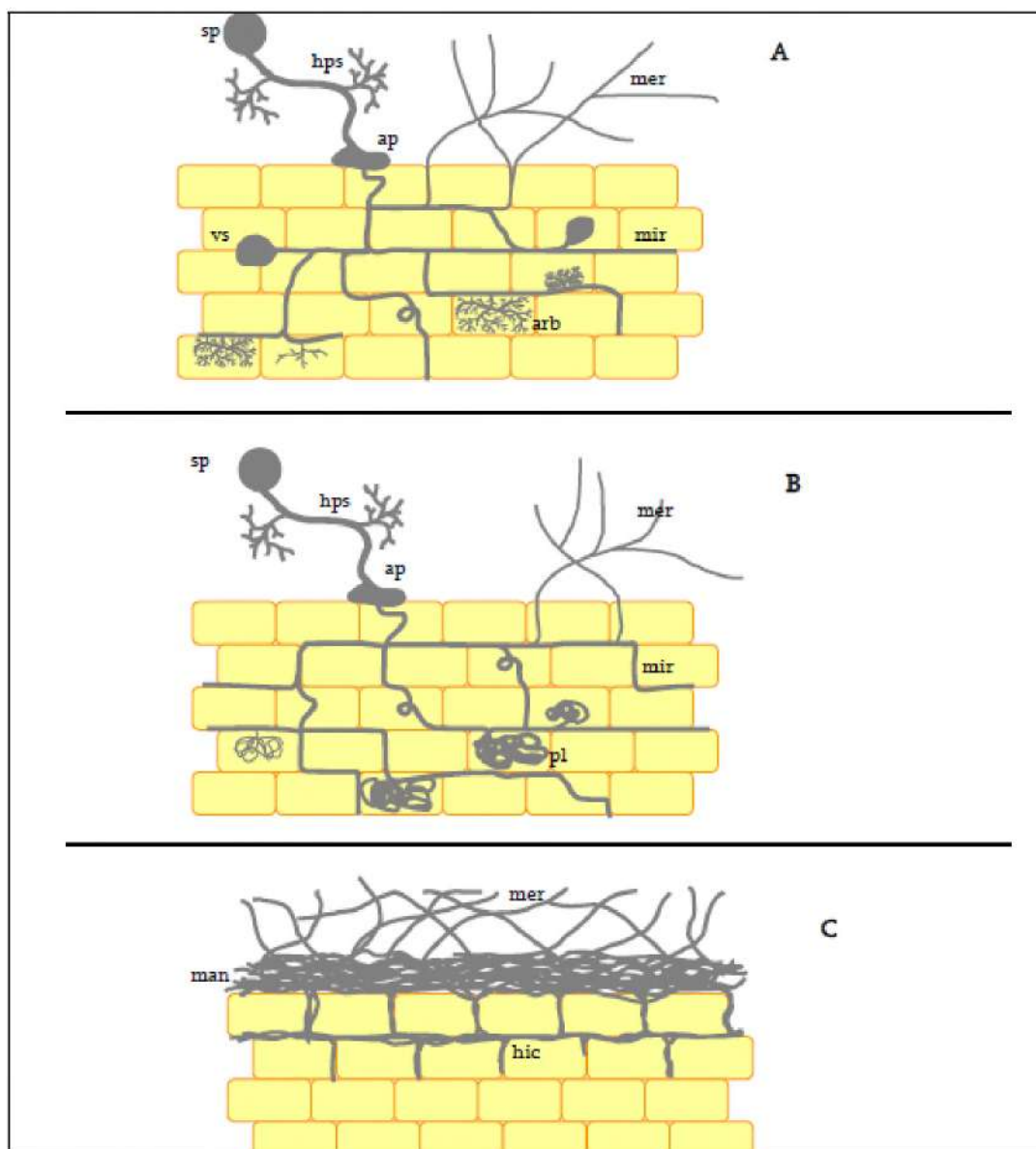


Figure 1 : Les différents types de symbioses mycorhiziennes : schémas d'une coupe longitudinale de racines mycorhizées.

A, La symbiose mycorhizienne à arbuscules ; **B**, La symbiose mycorhizienne des Ericoïdes ; **C**, La symbiose ectomycorhizienne

(**ap**: appressorium ; **arb** : arbuscule ; **hic**: hyphes intercellulaires ; **man**: manchon fongique ; **hps**: hyphes pré-symbiotiques ; **mer**: mycélium extra-radiculaire ; **mir**: mycélium intraradiculaire ; **pl**: peloton ; **sp**: spore ; **vs**: vésicule).

1.3.1. Les ectomycorhizes :

Les ectomycorhizes (Du grec *ektos* : à l'extérieur) Ne pénètrent pas les cellules de la plante hôte. Ils sont caractérisés par la présence de trois Structures (Bonfante, 2001, Parniske, 2008) Tout d'abord, le manteau fongique, qui se forme autour des racines et permet l'échange bidirectionnel des éléments minéraux, des composés carbonés et de l'eau. Ensuite, le réseau de Hartig, qui se développe à partir du manteau et forme un labyrinthe d'hyphes entre les cellules corticales ; il est aussi impliqué dans l'échange de nutriments et d'eau. La troisième structure est le mycélium extra racinaire qui forme des connections avec le sol et les sporocarpes. (Peterson *et al*, 2004, Smith & Read, 2008). (fig.2) (fig.3). Elles constituent le deuxième groupe de mycorhizes les plus fréquemment rencontrées.

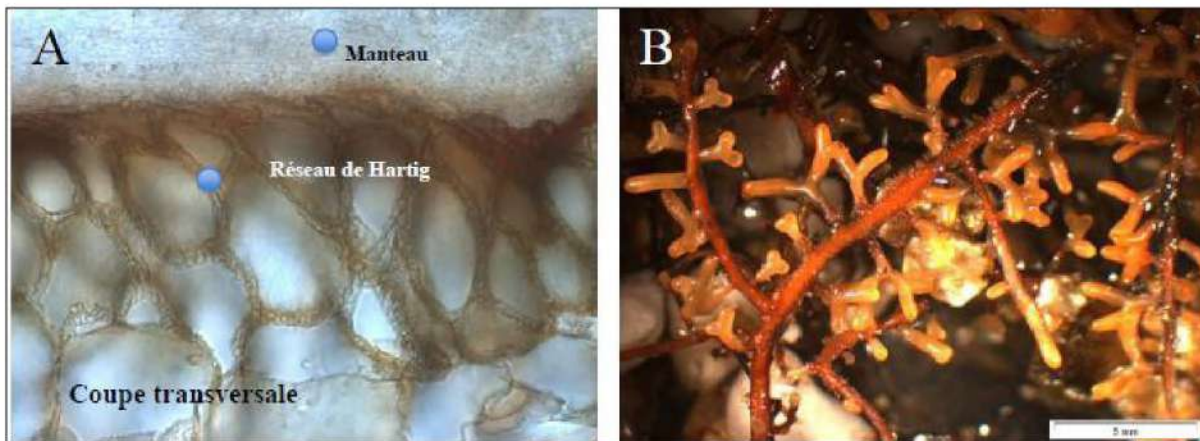


Figure 2 : Ectomycorhize. A : coupe transversale. B : morphotype d'endomycorhize (photo Yves prin).

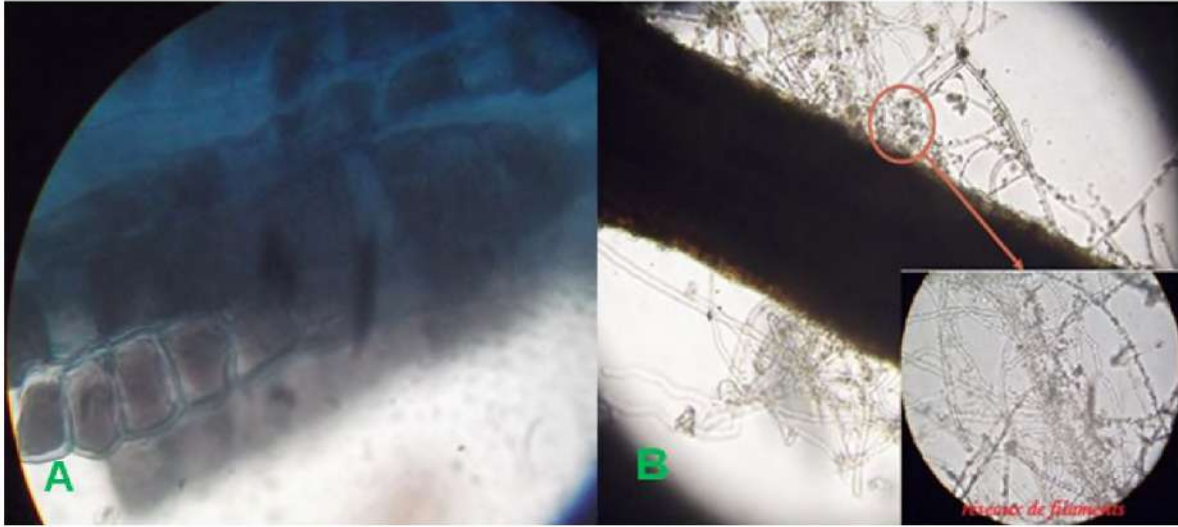


Figure 3: structure caractéristique par les champignons ectomycorhizes et ectendomycorhizes pour les racines du figuier (photos FARES Soria en 2015).

Figure A : aspect morphologique d'un réseau de Hartig (HR) entre les cellules corticales.

Figure B : structure d'un réseau de filament qui représente un manteau fongique externe.

Il est généralement estimé que 6 000 espèces de plantes terrestres présentent un statut ectotrophe (Taylor et Alexander, 2005 ; Tedersoo *et al.*, 2010). Les espèces de plantes ectotrophes sont des gymnospermes et surtout des angiospermes. Les arbres sont majoritairement impliqués dans cette symbiose qui intéresse également des arbustes, des lianes et des herbacées. Les arbres sont représentés principalement dans les familles ou sous familles des *Betulaceae*, *Caesalpinioideae*, *Dipterocarpaceae*, *Fagaceae*, *Myrtaceae*, *Papilionoideae* et *Pinaceae*. En général, les arbres ectotrophes dominent la strate arborée des forêts boréales et tempérées de l'hémisphère nord, des forêts tempérées et subtropicales de l'hémisphère sud, des forêts à *Dipterocarpaceae* en Asie du Sud-Est et à *Caesalpinioideae* (tribu des *Amherstieae*) en Afrique tropicale.

La diversité des champignons ectomycorhiziens est estimée entre 20 000 à 25 000 espèces (0,5 à 0,7 % de la diversité fongique totale). Ces symbiotes fongiques appartiennent majoritairement à des Basidiomycètes et Ascomycètes et plus rarement à des *Gloméromycètes* (Taylor et Alexander, 2005 ; Tedersoo *et al.*, 2010).

1.3.2. Les endomycorhizes :

Endomycorhize (du grec endon : à l'intérieur) sont caractérisées par l'absence de manchon mycélien externe et par la pénétration des hyphes fongiques dans les cellules corticales. On rencontre : les endomycorhizes éricoïdes et les endomycorhizes d'orchidées, qui forment des pelotons d'hyphes intracellulaires, et les endomycorhizes à arbuscules qui colonisent l'intérieur des cellules sous forme d'arbuscules (Smith et Read, 2008) et les endomycorhizes des Cistacees où les pénétrations endocellulaires ont une forme coralloïde.

Compte tenu de l'objet de cette étude, les mycorhizes à arbuscule sera présenté en détail dans la section suivante.

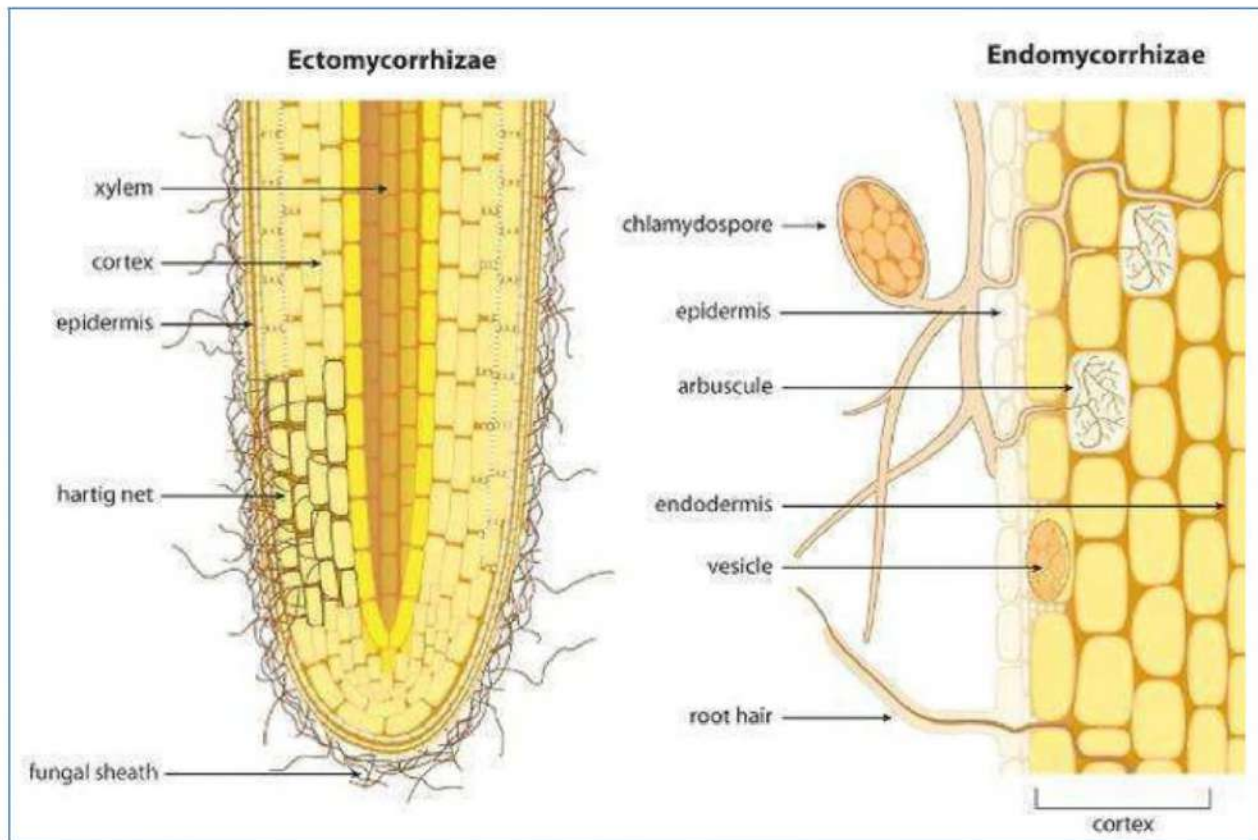


Figure 4 : Schéma montrant la différence entre les ectomycorhizes et endomycorhizes des racines des plantes (Bonfante et Genre.2010).

1.3.3 Les ectendomycorhizes :

Ces mycorhizes ont une structure intermédiaire entre celles des ectomycorhizes et des endomycorhizes. Comme les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes possèdent un réseau mycélien intercellulaire et un manteau (celui-ci est généralement peu épais). Comme dans le cas des endomycorhizes, les hyphes franchissent les parois des cellules-hôtes. Les ectendomycorhizes sont principalement produites par des champignons basidiomycètes. Les ectendomycorhizes ont d'abord été considérées comme des infections d'importance mineure chez les conifères, apparaissant en l'absence de champignons ectomycorhiziens. En fait, ce type d'interaction est mutualiste et correspond souvent à une colonisation mycorhizienne précoce des plantules (Smith and Read, 1997).

1.4 La symbiose mycorhizienne à arbuscules (MA) :

La symbiose mycorhizienne est donc une union intime entre les racines de la plupart des arbres, arbustes, plantes herbacées et des champignons microscopiques (Plenchette, 1991). Le terme symbiose implique que les deux partenaires tirent un bénéfice de cette association (Read, 1999). Ainsi, la plante fournit généralement au champignon des hydrates de carbone photosynthétisés (Zhu et Miller, 2003), alors que ce dernier fournit un apport en eau et en éléments minéraux par une augmentation de la surface d'absorption (Selosse, 2001). Ces champignons sont ainsi des symbiotes obligatoires des plantes vascularisées (Bago *et al.*, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998; Requena *et al.*, 2007).

1.4.1. Les Partenaires de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

1.4 .1.1 Le partenaire végétal :

La symbiose mycorhizienne à arbuscules a été observée pour la quasi-totalité des plantes chez lesquelles elle a été recherchée. Ainsi des plantes appartenant aux angiospermes, aux ptéridophytes, certaines gymnospermes, et même les gamétophytes de certaines plantes inférieures (lycopodes et mousses) sont capables de mycorhizer.

1.4 .1.1.1 Données sur *Medicago sativa* L. (la luzerne):

La luzerne (*Medicago sativa* L) est une des plantes fourragères les plus répandues sur tous les continents ,au total la luzerne représente dans le monde près de 32 millions d'hectares dont 14 millions en Amérique du nord ou elle est le mieux représentée pour de 600000 hectares en France (Mathieu,2003)

Son nom scientifique dérive de Médéa (Médicago) une ville algérienne, ancienne ville de nord de l'Afrique, alors que *sativa* signifie cultivée et son nom vulgaire provient du mot arabe *alfasassat* qui signifie « père de tous les aliments » (Marinoff et al ,2005)

1.4 .1.1.2 Systématique de *medicago sativa* :

La luzerne est une légumineuse appartenant à la famille des fabacées d'après Quezel et Santa (1992), l'espèce est classée comme suit :

✓ Embranchement :	spermaphytes
✓ Sous- Embranchement :	angiospermes.
✓ Classe :	dicotylédones.
✓ Sous- classe :	dialypétales.
✓ Ordre :	rosales.
✓ Famille :	fabacées.
✓ Sous-famille :	papilionacées.
✓ Tribu :	trifoliées.
✓ Genre :	<i>Medicago</i> .
✓ Espèce :	<i>Medicago sativa</i> L.

1.4 .1.1.3 Morphologie de *Medicago sativa* :

Medicago sativa est une plante vivace, capable de vivre plus de 30 ans si les conditions sont favorables (Munro et Small,1998)

Etude bibliographique

La plante a des tiges dressées et ascendante, très ramifiées, et peut atteindre plus de 80 cm de haut. Les feuilles sont trifoliées, pétiolées, dentées et mucronnées au sommet, ordinairement glabre. Les folioles, de forme assez variées, sont toujours plus ou moins obovalis et finement dentées au sommet. La foliole centrale pétiolée, les stipules oblongues dentées, larges à la base se terminent par une longue pointe. Le fruit est une graine de 2.5 mm de long réniforme ; la courbe convexe est régulière, la courbe concave plus ou moins sinueuse (Lapeyronie, 1982) la racine sont pivotantes à fasciculées. L'inflorescence porte dix à trente en grappe. Les fleurs sont violettes, parfois jaunes ou blanches souvent bigarrées de bleus, de vert ou de jaunes. Les gousses sont plus ou moins spiralées, contenant de deux à dix graines. Les graines sont de 2 à 2.5 mm de long. Réniformes, Arrondies ou ovoïdes, de jaune olive à brun, suivant l'âge ou les conditions de récolte (ACTA, 1984 ; Prosperi, Guy et al., 1995).

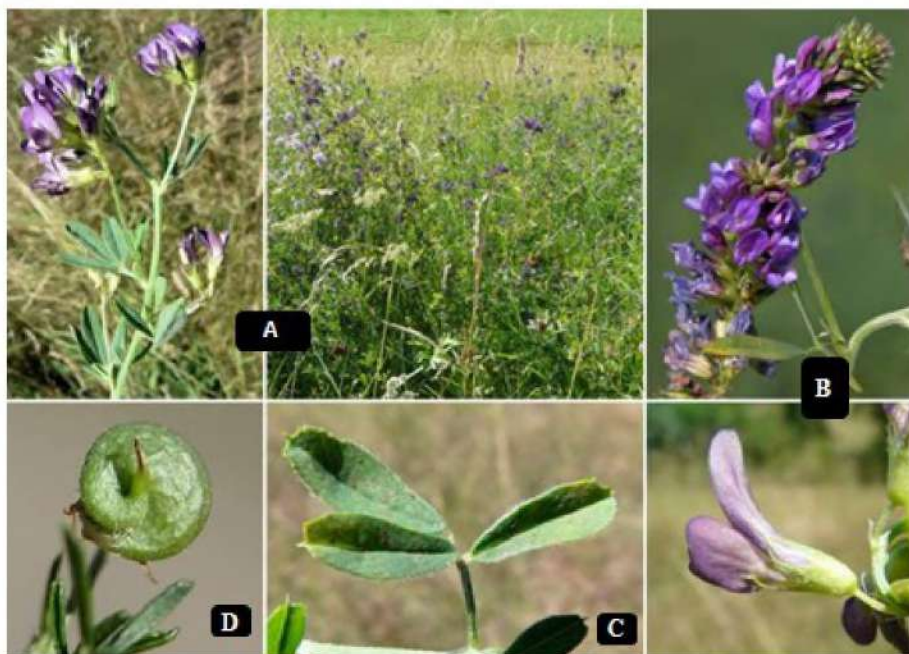




Figure 6: Morphologie de la luzerne pérenne (*Medicago sativa L.*) (ACTA, 1984).

1.4 .1.2 Le partenaire fongique

1.4 .1.2.1 Le Champignon mycorhizien à arbuscule (CMA)

Parmi les associations endomycorhiziennes, ce sont les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui sont de loin les plus répandues à la surface du globe. Ils se sont adaptés à de nombreux environnements et différentes plantes hôtes. Ils peuvent former des associations mutualistes avec les racines fines d'environ 80 % de toutes les plantes terrestres (Smith et Read, 1997) ligneuses, herbacées, les mousses, fougères, gymnospermes et angiospermes plusieurs conifères et la majorité des plantes à fleurs, mono et dicotylédones.

Le champignon mycorhizien à arbuscule forme plusieurs structures à l'intérieur des racines, principalement des arbuscules, des vésicules des spores et des hyphes non spécialisés (Tommerup, 1984).

Le terme arbuscule réfère à une structure microscopique unique que développent ces champignons dans les cellules corticales des racines. Chez ce type de mycorhize, le champignon ne cherche pas à envelopper les cellules de l'hôte, comme chez les ectomycorhizes, mais y pénètre de façon subtile sans trop en perturber les structures (fig.7). A partir de ce point d'ancrage dans la racine, le champignon mycorhizien à arbuscule développe dans le sol une phase dite extraradiculaire, qui s'étend en un réseau mycélien et envahit le sol adjacent, dans toutes les directions. Ce mycélium de très fine dimension offre une surface considérable de contact avec le sol. On estime que la surface des mycéliums arbusculaires, sous un mètre carré d'un sol de prairie est d'environ 90 m² et que dans un pot d'un litre ou pousse un seul plant de poireau, le mycélium peut atteindre jusqu'à un kilomètre, envahissant les moindres interstices du substrat (Fortin et al, 2008).

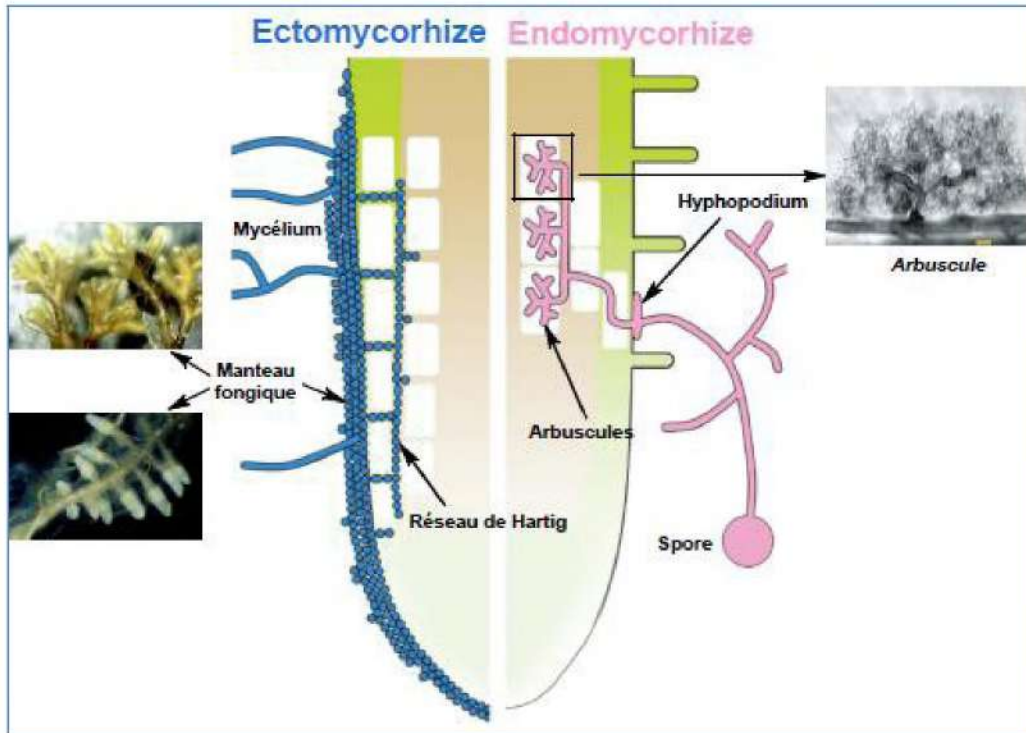


Figure 7: Structure de colonisation des champignons ectomycorhiziens (en bleu) et endomycorhizes à arbuscules (en rose) (Bonfante et al, 2010).

Les CMA représentent le type le plus commun de mycorhize ils constituent 5 à 50% de la biomasse microbienne des sols (Olsson *et al.*, 1999). Les associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules (VA) doivent leur nom aux structures fongiques résultant des hyphes intracellulaires qui se ramifient intensément à l'intérieur des cellules du cortex racinaire pour former des structures appelées arbuscules. Ces hyphes peuvent former des vésicules (Bonfante-Fasolo, 1984). (fig8)

Les arbuscules sont le lieu de contact et d'échanges d'éléments entre les deux partenaires et les vésicules constitueraient des organes de stockage. Des hyphes extraradiculaires se développent aussi sur plusieurs centimètres à l'extérieur de la racine, explorant le sol alentour, et pouvant porter une multitude de spores. Ces spores constituent l'organe de reproduction et de dissémination typique des champignons MA, elles peuvent contenir des centaines de noyaux qui ne possèdent pas forcément le même matériel génétique. La génétique des *Glomeromycètes* est néanmoins très mal connue et, même si le débat reste encore ouvert, ils sont supposés être asexués (Pawlowska et Taylor, 2004 ; Rosendhal, 2008).

Cette symbiose aurait joué un rôle important lors de la colonisation de terres émergées par les plantes vasculaires (Selosse, 2000). L'intérêt de la symbiose MA pour les plantes, le champignon se développe dans les racines mais aussi au niveau extra-racinaire dans le sol.

Il existe malgré tout plusieurs familles de plantes incapables de réaliser cette symbiose, dont certaines s'engagent dans d'autres relations symbiotiques et d'autres sont totalement non mycotrophes. En dehors de ces exceptions, les plantes sont donc normalement en interaction avec un champignon MA, la condition non mycorhizée restant inhabituelle (Smith & Smith, 2011).

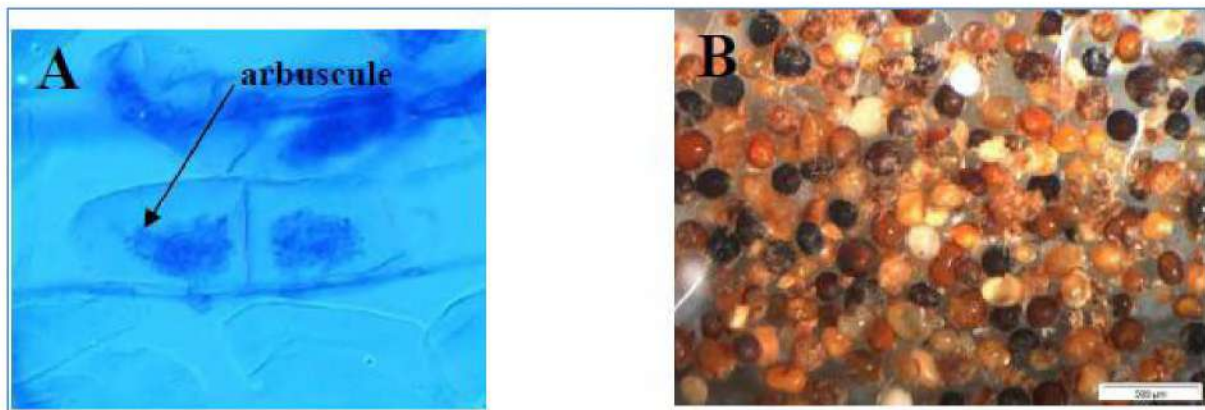


Figure 8 : Mycorhize à arbuscule. A : arbuscules. B : spores (photo Yves Prin)

1.4 .1.2.2 Structure des champignons mycorhiziens à arbuscule

Au cours de leur cycle de vie, les CMA forment donc des structures différentes (des arbuscules, des vésicules, des cellules auxiliaires, mycélium interne / externe) et des spores (Morton, 1990). Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre.

➤ Spore

La spore sert d'organe de stockage et de propagation des CMA. Elle germe et donne naissance à des filaments mycéliens. Lorsque les hyphes entre en contact avec une jeune racine, ils forment un appressorium, entre et se propage rapidement, il se différencie à l'intérieur des racines en arbuscules et dans certains cas en vésicules. La figure 9 ci-dessous illustre quelques genres de spores d'AMF.



Figure 9 : présentation de quelques genres de spores d'AMF observés au microscope optique.

➤ **Arbuscule**

L'arbuscule est l'unité au niveau de laquelle se produisent les échanges entre l'hôte et le champignon. C'est une ramification latérale des hyphes fongiques dans les cellules du cortex racinaire où le champignon pénètre et croît à l'intérieur. La membrane de la cellule hôte s'invagine et enveloppe le champignon, ce nouveau compartiment fournit un contact direct entre le champignon et la plante (Fig.10).

Selon Gallaud dans les premières observations de 1905 révélaient deux types entrainés d'organisation des endomycorhizes arbusculaires nommés *Paris* et *Arum* ; dans le type *Arum* le filament mycélien se ramifie s'étend rapidement dans la direction longitudinale de la racine en progressant entre les assises cellulaires (Figure 10 à droite). Dans le type *Paris* le filament mycélien ne chemine pas entre les cellules : il passe de l'une à l'autre en traversant les parois et s'enroule sur lui-même en faisant plusieurs spires à l'intérieur de chaque cellule (Figure 10 à gauche). Il existe aussi une forme intermédiaire présente la forme de progression des champignons de cellules comme dans le type *Paris* avec des spires intracellulaire et certain de ces spire portent de petits arbuscules comme le type *Arum* (Figure 10 au milieu).

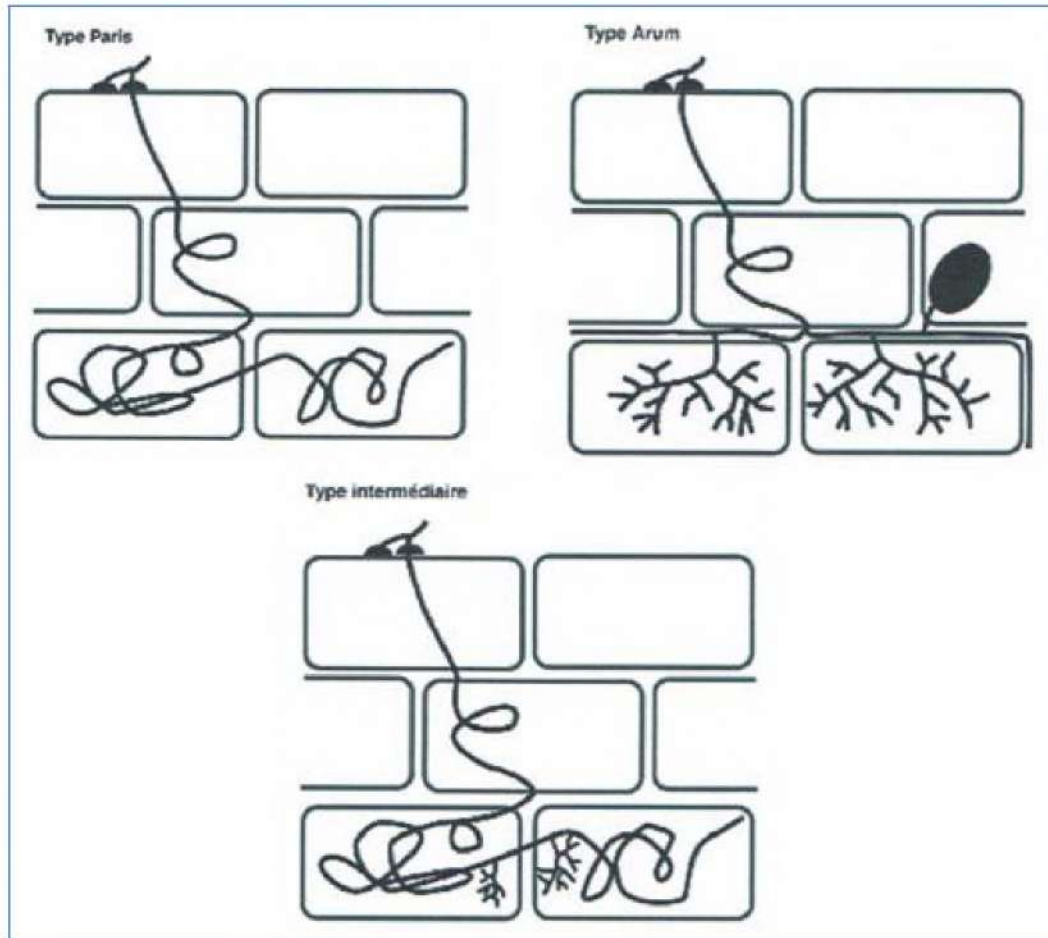


Figure 10: Représentation schématique des trois principaux types de colonisation endomycorhizienne arbusculaires.

➤ **Vésicule**

La vésicule est une structure de stockage à paroi fine, à contenu lipidique et apparaît généralement dans les espaces intercellulaires (Harley et Smith, 1983 ; Bonfante-Fasolo, 1984) (fig.9).

➤ **Cellules auxiliaires**

Chez les *Gigaspora*, *Pcispora* et *Scutellospora* (Blaszkowski *et al.*, 2006), le mycélium extra-matriciel forme des cellules auxiliaires (AC) (formes globulaires regroupées en grappe, attachées aux hyphes extra-matriciels et souvent ornementées) (Fig. 8). En culture monoxénique, les jeunes cellules contiennent des gouttelettes lipidique tandis que les vieilles apparaissent vides (de Souza et Declerck, 2004). Gerdemann et Trappe (1974) ont suggéré

que ces cellules étaient des organes de stockage temporaire. Les cellules auxiliaires sont formées lors des ramifications d'hyphes extra-matriciels ; chaque ramification génère plusieurs branches qui forment à leur tour des structures sphériques regroupées en masses dont chacune contient 2 à 20 sphères mesurant 12 à 39 μm de diamètre.

Les cellules auxiliaires sont riches en noyaux, en organites et en lipides (Bonfante et Perotto, 1995) ; leur surface est lisse chez *Scutellospora sp.* Et rugueuse chez *Gigaspora sp.* Derlerck *et al.*, (2004) ont observé en culture monoxénique, une croissance des hyphes à partir des cellules auxiliaires chez *S. reticulata*, ils ont suggéré que les longs fragments de mycélium intacts portant plusieurs cellules auxiliaires peuvent induire une symbiose.

➤ **Hyphe extraradiculaire**

L'hyphe extraradiculaire produit par le champignon mycorhizien à arbuscule est un des organes de propagation et peut coloniser une plante autre que la plante dont ils sont issus.

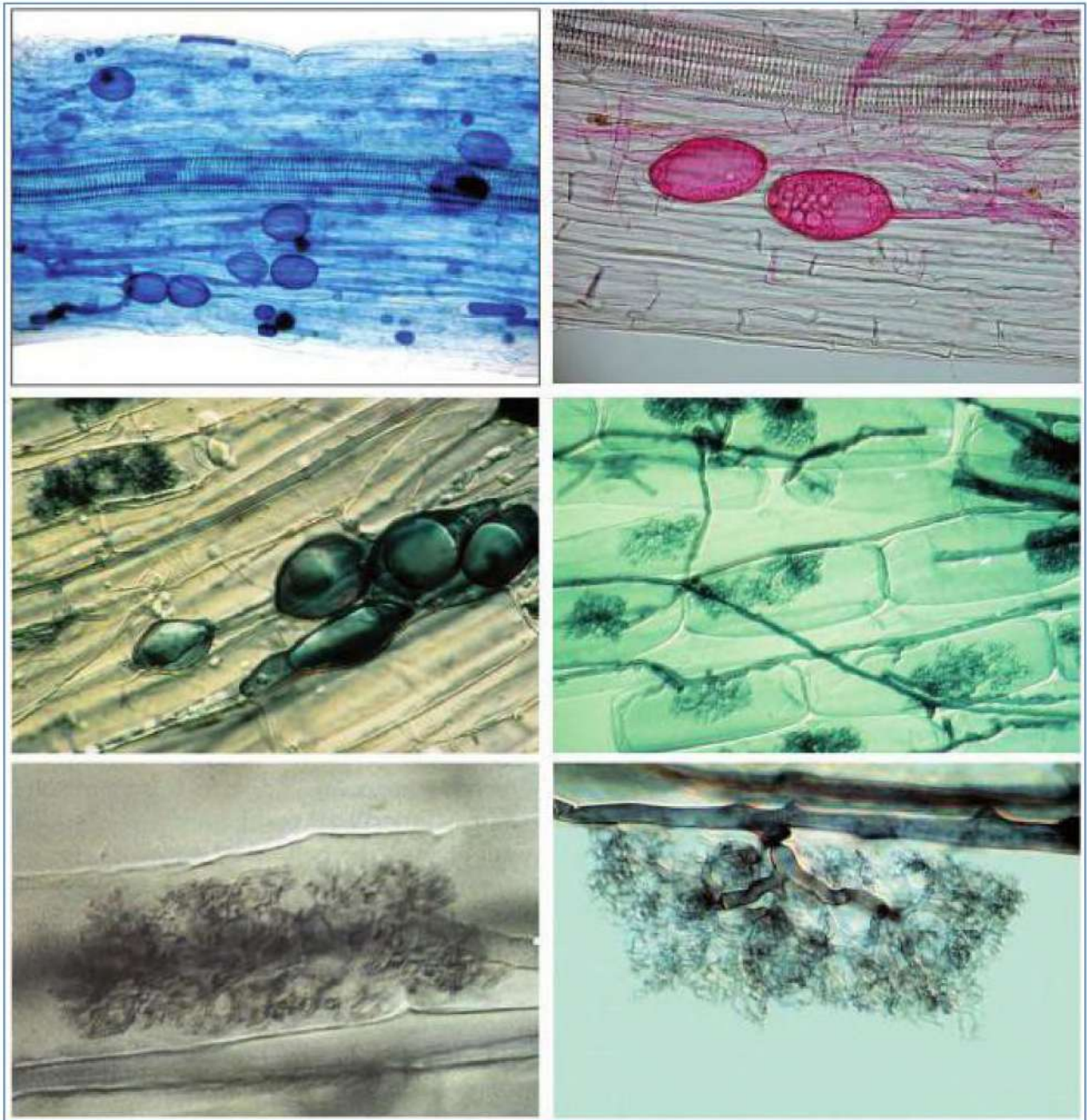


Figure11 : Structures caractéristiques des champignons mycorhizes.

En haut à gauche : racine endomycorhizée dans laquelle les structure fongiques symbiotiques ont été colorées en bleu ; on voit des vésicules, de gros hyphes longitudinaux (surtout en bas de la photo) et des arbuscules sous forme de petits nuages flous ; la bande striée au centre de la racine est le faisceau des vaisseaux qui conduisent la sève (photo Yolande Daplé). **En haut à droite** : mycélium de Gloméromycète portant des vésicules terminales qui contiennent des globules lipidiques (photo in Peterson et al., 2006). **Au milieu à gauche** : vésicules (en bas à droite de la photo) et un arbuscule (en haut à gauche) ; on voit aussi des hyphes longitudinaux (photo reproduite avec l'aimable autorisation de Mark Brundrett). **Au milieu à droite** : hyphes portant des arbuscules ; chaque arbuscules occupe une cellule du cortex racinaire (photo Mark Brundrett). **Photo du bas** : vue à fort grossissement de deux arbuscules de forme différente (photo à gauche : Paola Bonfante, in Bonfante, Perroto, 1995, à droite : photo reproduite avec l'aimable autorisation de Mark Brundrett).

1.4 .1.2.3 Taxonomie des champignons endomycorhiziens :

La taxonomie des CMA a d'abord été construite par morpho typage des spores, en tenant compte à la fois des similitudes structurales entre les spores mais aussi des caractères ayant une importance phylogénétique (Morton et Benny, 1990).

Les études morphologiques et phylogénétiques récentes ont permis de regrouper toutes les espèces mycorhiziennes à arbuscules en un nouvel embranchement, les Glomeromycota, répartis en 4 ordres composant 10 familles et 15 genres et environ 200 espèces. Le tout est associé à environ 225 000 espèces végétales terrestres. L'arbre phylogénétique suivant montre les taxons supérieurs au sein de la classe Gloméromycète.

Ordre	Glomales			
Sous-ordre	Gigasporinae	Glomineae		
Famille	Glomaceae	Gigasporaceae	Acaulosporaceae	
Genres	<i>Glomus</i> <i>Sclerocystis</i>	<i>Gigaspora</i> <i>Scutellospora</i>	<i>Acaulospora</i> <i>Entrophospora</i>	Spores se forment latéralement après la migration du cytoplasme d'une cellule mère Possède des azygosspores à paroi épaisse
Caractéristiques	Les chlamydospores portés par un mince hyph, présence d'un septum Les chlamydospores se développent dans les sporocarpes	Spores portés par un suspenseur bulboux		

Figure 12 : principaux genres de champignons formant des endomycorhizes AM (Redeker et al.2000 ; Duhoux et Nicol, 2004)

➤ la classification des gloméromycètes :

Les *Gloméromycètes* sont composés de quatre ordres : les *Glomérales* (*Glomus* groupes A et B), les *Paraglomérales* (*Paraglomus*), les *Archéosporales* (*Archeospora*, *Ambispora* et *Geosiphon*) et les *Diversisporales* (*Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora* et *Diversispora*) (classification selon Schüßler *et al.*, 2001). On dénombre aujourd'hui environ 150 espèces, une estimation qui pourrait s'avérer largement en dessous de la réalité en raison de la difficulté de délimiter clairement les espèces chez ces organismes (Smith & Read, 2008). Le phylum *Glomérormycota* une grande diversité morphologique, notamment au niveau des spores qui sont de taille, couleur et forme très variables selon les espèces.

Au niveau phylogénétique, les analyses moléculaires permettent aujourd'hui d'affiner la classification des champignons MA. Dernièrement, la communauté scientifique a même été amenée à changer les noms de différents champignons mycorhiziens dont le champignon modèle *Glomus intraradices* (DAOM197198), qui a été reclassé en 2009 sous le nom de *Glomus*

Etude bibliographie

irregularis (Stockinger *et al.*, 2009). Plus récemment, Walker et Schüßler ont proposé pour cette espèce le nom de *Rhizophagus irregularis* (Schüßler & Walker, 2010 ; Krüger *et al.*, 2012). Cette dernière appellation reprise dernièrement par plusieurs auteurs (Labidi *et al.*, 2012 ; Pérez-Tienda *et al.*, 2012 ; Lauressergues *et al.*, 2012 ; Liao *et al.*, 2012...), sera utilisée dans ce manuscrit à travers l'écriture *R. irregularis*.

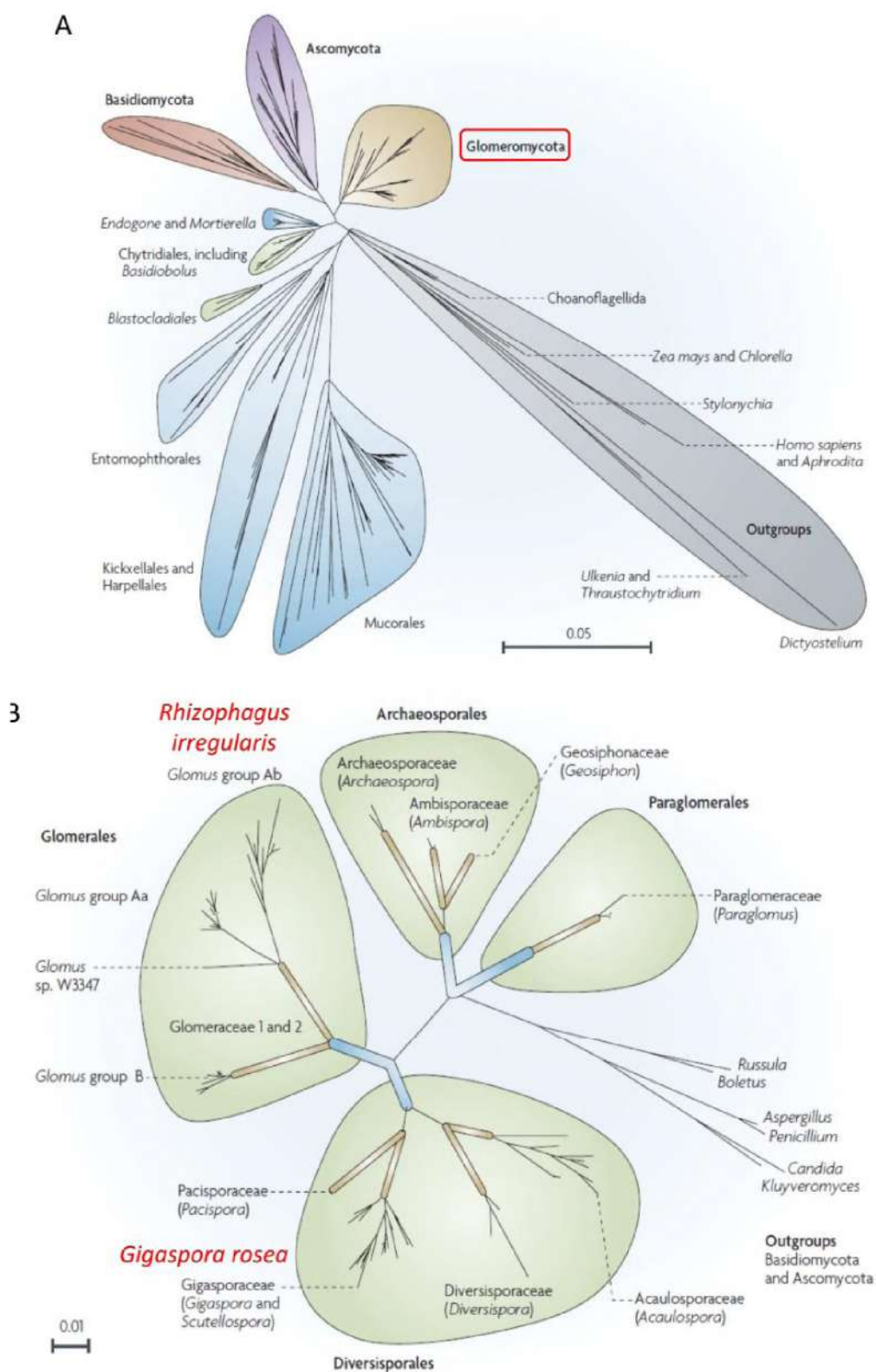


Figure 13: phylogénie des glomérormycètes (adapté d'après pariske,2008)

A : arbre phylogénétique des différentes lignées de champignons, on retrouve les *Gloméromycètes* (entourés en rouge), les *Ascomycètes* (violet), les *Basidiomycètes*, les *Chytridiomycètes* (vert) et les *Zygomycètes* (bleu).

B : arbre phylogénétique des 4 ordres de *Gloméromycètes*. Les deux champignons utilisés dans cette thèse sont rajoutés en rouge : *Rhizophagus irregularis* (ex *Glomus intraradices*) et *Gigaspora rosea* appartiennent à deux ordres différents.

1.4 .1.2.4 Etablissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire:

L'établissement de la symbiose MA commence par la colonisation d'une racine compatible par les hyphes produites par les propagules de champignons MA (spores asexuées ou racines déjà mycorhizées). La mise en place de cette association symbiotique à partir de spores se déroule en trois phases (fig.14)

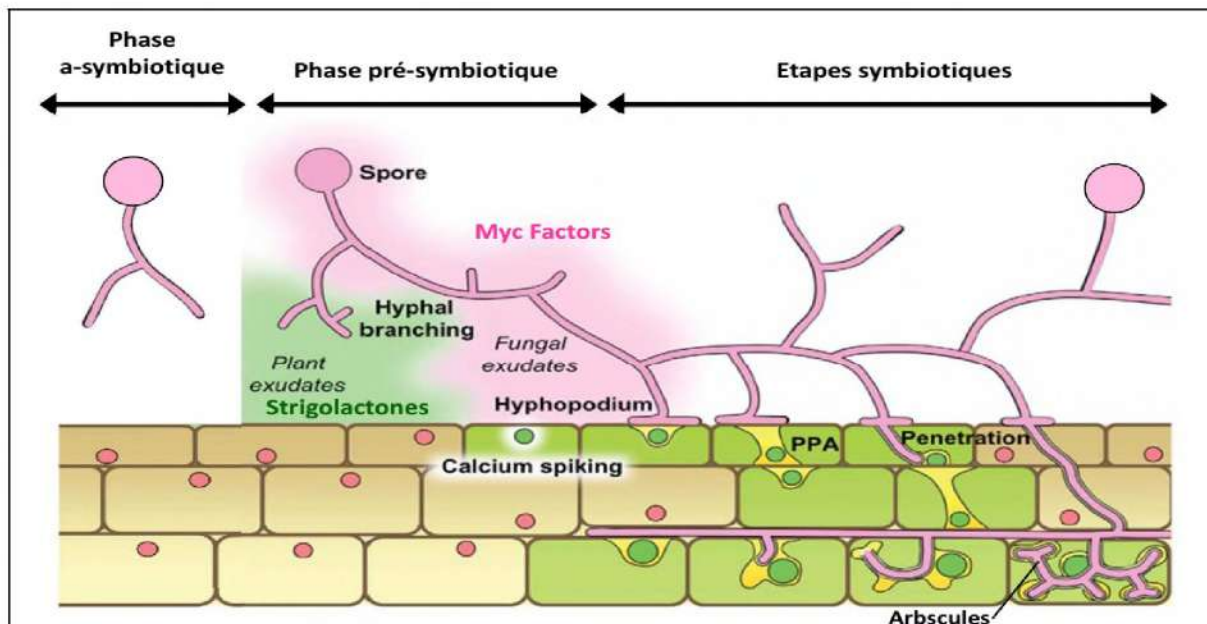


Figure 14: schéma des différents étapes de colonisation des champignons MA (adapté d'après Bonfante et Genre 2010).

I.3.1.3.1 La phase a-symbiotique

La spore va germer et former un tube germinatif qui va se développer et entrer en contact avec la racine pour former l'appressorium ou hyphopodium (Parniske, 2008, Peterson *et al*, 2004). Il est important de remarquer que d'autres sources de propagules sont possibles, comme les fragments de racines mycorhizées et les vésicules (Porcel *et al*, 2011).

Les spores des CMA germent dans des conditions appropriées durant 2 à 3 semaines, pendant lesquelles les hyphes germinatifs se développent. De nombreux facteurs influent sur la germination de la spore: la teneur en CO₂, le pH dont l'optimum de germination va dépendre d'une espèce à l'autre; la température du sol qui doit être comprise entre environ 10 et 30°C pour un optimum de germination; l'humidité du sol; les nutriments plus ou moins présents et assimilables; la présence de plantes hôtes/non hôtes et/ou de microorganismes pouvant activer ou inhiber la germination (revue de Giovannetti et al., 2010).

Si l'hyphe ne rencontre pas de racine après 2 à 4 semaines de croissance le champignon ne peut pas se développer et compléter son cycle de vie. Dans ce cas, les spores peuvent se remettre en dormance après rétraction du protoplasme et réallocation des ressources en attendant de meilleures conditions (Logi et al., 1998).

I.3.1.3.2 La phase pré-symbiotique

Lors du stade pré-symbiotique, c'est un dialogue chimique entre le champignon et la racine compatible qui permet la rencontre des deux partenaires. Des exsudats racinaires (« branching factor ») de la plante hôte induisent la germination des spores, la croissance et la ramification de l'hyphe (Buée et al., 2000), ce qui augmente les chances du champignon d'entrer en contact avec une racine. Ce composé induisant la ramification de l'hyphe a été isolée et identifié par Akiyama et al. (2005) comme étant une strigolactone, mais ce n'est pas 20

le seul composé induisant cette réaction, les flavonoïdes peuvent aussi avoir des effets sur la croissance du champignon même si cet effet est variable selon le couple plante-champignon (Scervino et al., 2005). Par contre, ces signaux chimiques ne semblent pas concerner la formation des appressorium qui serait plutôt liée à un signal thigmotropique (induit par le contact). En effet, la seule présence physique de cellules épidermiques suffit à la formation d'appressorium (Nagahashi et Douds, 1997).

I.3.1.3.3 La phase symbiotique

Dans la cellule épidermique située sous l'hyphopode, un appareil de perpénétration (PPA) est mis en place qui correspond à un réarrangement polarisé du cytoplasme et du cytosquelette. Il permet la formation d'un pont apoplasmique endocellulaire à travers lequel le champignon va se développer pour traverser les différentes couches cellulaires jusqu'aux cellules corticales (Genre *et al.*, 2005 ; 2008).

Après la formation de l'appressorium, une ouverture de l'épiderme de la racine, régulée par le gène LjSYM15, permet le passage de l'hyphe qui peut alors progresser à travers les cellules du cortex externe (régulé par les gènes LjSYM4 et LjSYMK) (Parniske, 2004). Une fois l'épiderme traversé, les hyphes fongiques se développent à l'intérieur de la racine. On différencie alors quatre types d'hyphes intra-radiculaires : (1) les hyphes intracellulaires qui forment généralement des boucles et traversent les cellules des différentes couches du cortex ; (2) les hyphes intercellulaires qui croissent entre les cellules et envahissent rapidement la racine ; (3) les hyphes intra- ou intercellulaires hypertrophiés qui forment des vésicules riches en lipides et en cytoplasme ; et (4) les hyphes intracellulaires très ramifiés, les arbuscules (Wilcox, 1996). Après ce passage intracellulaire dans les couches superficielles du cortex, le champignon sort des cellules et passe par l'apoplaste au niveau du cortex interne et peut proliférer le long de l'axe longitudinal de la racine. L'hyphe forme alors des embranchements qui pénètrent dans les cellules du cortex interne et forment des arbuscules, sous le contrôle des gènes LjSYM15 et PsSYM36 (Parniske, 2004 ; Figure 9) les Arbuscules sont entourés d'une membrane plasmique péri-arbusculaire séparant le champignon du cytoplasme végétal. Les arbuscules ont une durée de vie limitée (en moyenne 8,5 jours). Ils atteignent une taille maximale dans la cellule puis rentrent en sénescence et le champignon peut être complètement éliminé de la cellule végétale qui revient à son état initial (Javot *et al.*, 2007a).

Etude bibliographie

Le processus de formation des arbuscules est un processus dynamique, ces structures sont transitoires (une semaine au maximum), leur formation et leur dégénérescence sont continuées au cours de la symbiose. De plus, il semble que la dégradation de l'arbuscule requière une participation active de la cellule corticale.

La formation des arbuscules dans les cellules corticales entraîne plusieurs modifications de l'organisation de la cellule hôte telles que :

- 1) Une fragmentation de la vacuole
- 2) La disparition des amyloplastes.
- 3) L'augmentation du nombre d'appareils de Golgi.
- 4) L'augmentation de la taille et le déplacement en position centrale du noyau.
- 5) Et surtout l'invagination de la cellule.

Un grand nombre d'espèces de champignons MA comme *R. irregularis* produisent des structures de réserves lipidiques à l'intérieur des racines au niveau dans les cellules ou au niveau de l'apoplaste, ce sont des vésicules (Smith & Read, 2008).

Les vésicules se développent à partir des hyphes à l'intérieur de la cellule ou dans l'espace intercellulaire. Elles sont formées par des renflements des hyphes intra-racinaires et contiennent une haute teneur en lipides et noyaux. Par conséquent, elles constituent une structure de stockage et de reproduction (Declerck, 2014, Peterson *et al.*, 2004).

Hyphes donnent lieu aussi à la formation De spores qui constituent des structures de reproduction, de survie et dispersion (Declerck, 2014). Le cycle du champignon est complété lorsqu'il forme de nouvelles **spores** dans ce mycélium externe.

1.4 .1.2.5 Échange des nutriments :

Plante hôte au niveau des racines. Le principal avantage pour la plante est donc une meilleure nutrition hydrique et minérale en particulier en phosphate (pour revue : Smith & Read, 2008). Les plantes mycorhizées reçoivent du phosphate de la part du champignon et cela se traduit le plus souvent par une augmentation de la biomasse par rapport à des plantes non colonisées (l'effet est d'autant plus net que les plantes sont en condition de carence phosphatée), ceci s'accompagnant parfois de teneurs internes en phosphate supérieures chez les plantes mycorhizées. De plus, l'état mycorhizé fournit aussi à la plante une meilleure résistance aux stress abiotiques comme le stress hydrique, salin ou la présence de métaux lourds (exemples : Al-Karaki, 2000 ; Aroca *et al.*, 2007 ; Hildebrandt *et al.*, 2007) mais aussi aux stress biotiques. En effet, des plantes mycorhizées sont plus résistantes à certains pathogènes racinaires (Whipps, 2004) mais aussi foliaires (exemples : Liu *et al.*, 2007 ; Campos-Soriano *et al.*, 2011). L'association symbiotique entre les champignons MA et les plantes est dite mutualiste, c'est-à-dire que les deux partenaires tirent profit de l'interaction. Les champignons MA (biotrophes obligatoires) reçoivent de la plante des éléments carbonés issus de la photosynthèse. L'interaction représente donc un coût pour le partenaire végétal. La part de photosynthétats transférée au champignon est non négligeable puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20 % du carbone fixé lors de la photosynthèse, soit environ 5 milliards de tonnes de carbone par an (Bago *et al.*, 2000).

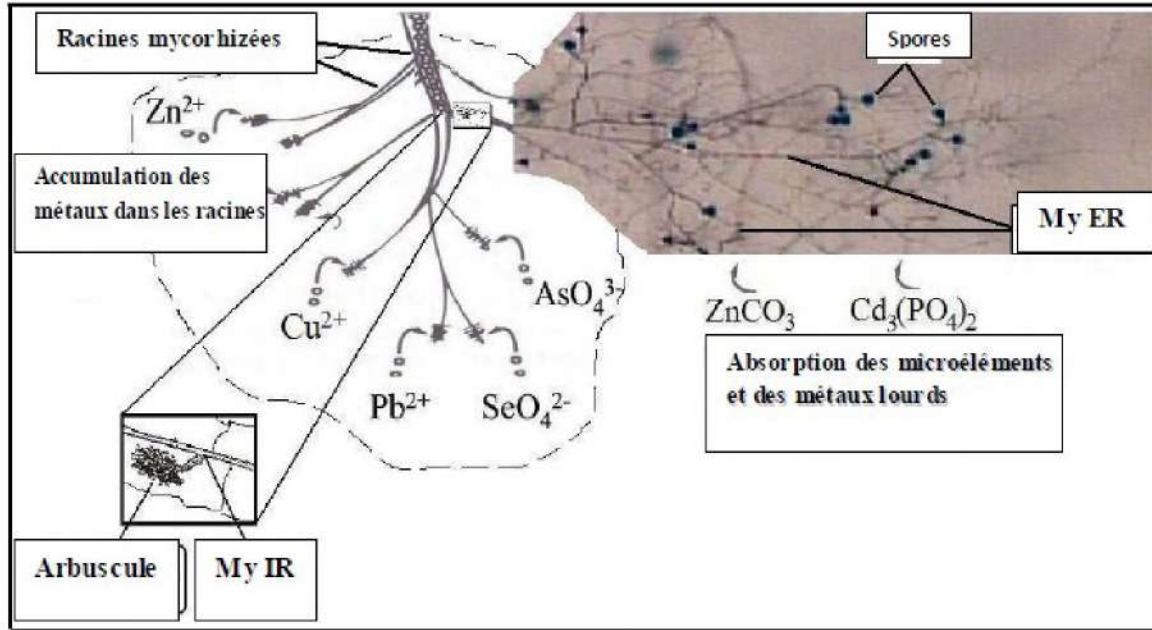


Figure 15 : Mécanisme d'absorption des minéraux et des métaux lourds par les CMA et leur translocation vers la plante (Giasson et al, 2008). MyIR : Mycélium intra-racinaire ; MyER : Mycélium extra-racinaire

1.4 .1.2.5.1 Nutrition phosphatée :

La symbiose endomycorhizienne a développé les mécanismes physiologiques et biochimiques capables d'améliorer la mobilisation du phosphore du sol (Smith et GianinazziPearson, 1988). L'augmentation de l'absorption du P par les plantes est expliquée par plusieurs mécanismes, entre autres, l'augmentation de la surface d'absorption racinaire de la plante grâce au réseau extramatriciel et par conséquent, une meilleure exploitation du phosphate du sol au delà de la zone d'épuisement de la racine (Plenchette, 1982). A l'aide des techniques cytochimiques, il a été possible de mettre en évidence diverses activités enzymatiques dont les activités ATPasiques du plasmalemmes du champignon et chez la plante hôte (Dexheimer, 1997). Les hyphes du champignon possèdent aussi des phosphatases (enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons organiques en libérant de l'orthophosphate) qui favorisent la libération du phosphore immobile dans le sol et permettent la minéralisation des sources organiques des phosphates (DeMars et Broner, 1995). Le phosphore ainsi mobilisé est facilement absorbé et transporté à travers l'hyphe aux arbuscules puis à la plante hôte.

1.4 .1.2.5.2 Nutrition azotée :

Les bienfaits de l'association endomycorhizienne ne sont pas limités à la seule nutrition phosphatée. Strullu (1991) signale que les CMA possèdent les équipements enzymatiques nécessaires à l'utilisation de l'ammonium et des nitrates. Azcon-Aguilar et Barea (1992) rapportent que l'association symbiotique peut améliorer la nutrition azotée. Mais ceci n'est pas général, car dans certains cas, l'analyse minérale des plantes mycorhizées ne montrent pas une amélioration significative. Ces résultats pourraient être liés au type de champignon utilisé ou être attribués à un phénomène de dilution du à la croissance plus rapide de la plante mycorhizée et surtout à une meilleure production de matière sèche aérienne (Guillemin *et al.*, 1995 ; Abbas, 1998).

1.4 .1.2.5.3 Absorption des autres éléments minéraux

Généralement, l'endomycorhization augmente aussi l'absorption d'autres éléments minéraux comme le K, Ca, Mg et certains oligo-éléments tels que le Zn, S, Cu, etc (Harley et Smith, 1983 ; Graham et Syvertsen, 1989 ; Oihabi *et al.*, 1993 ; Meddich *et al.*, 2000). Cet effet est lié à une meilleure exploitation du sol par le réseau extra matriciel.

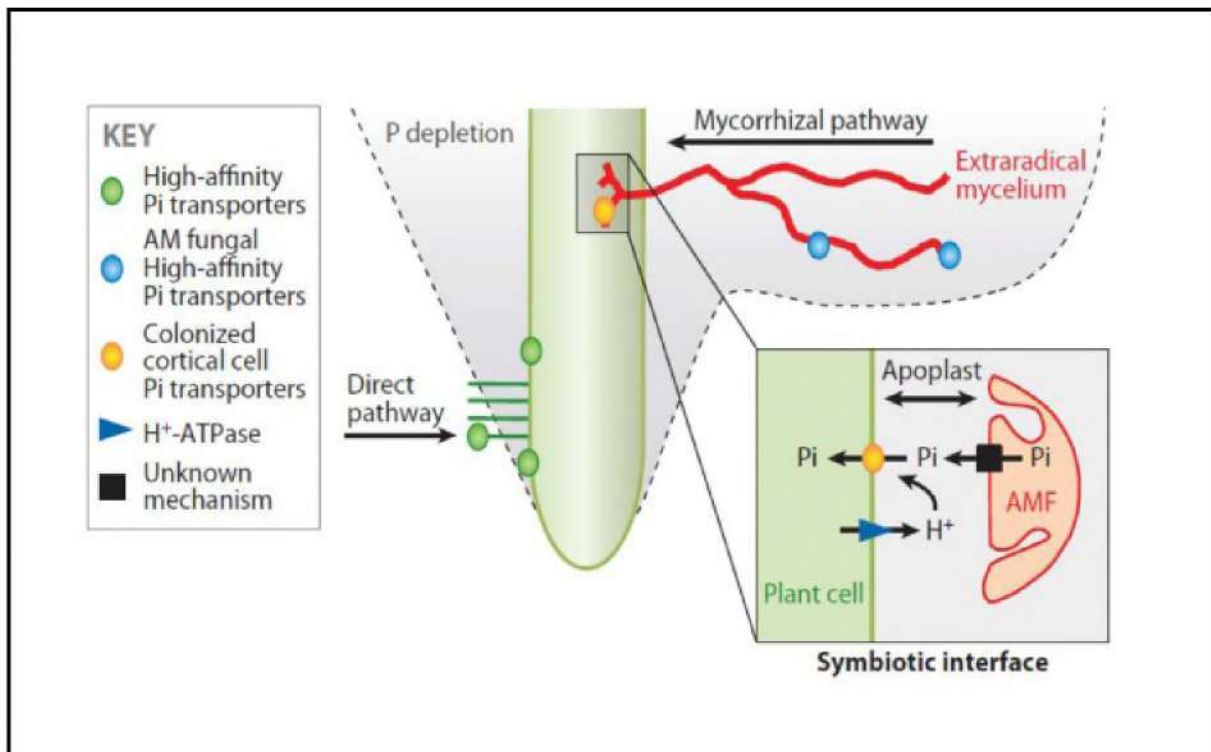


Figure16: Les différentes voies d'acquisition du pi chez les plantes mycorrhizées (Smith Smith, 2011)

1.4 .1.2.6 Intérêt des mycorhizes

La symbiose mycorhizienne est donc une union intime entre les racines de la plupart des arbres, arbustes, plantes herbacées et des champignons microscopiques (Plenchette, 1991) donc en fournissant des nutriments à la plante, les champignons MA ont un effet fertilisant, et un effet protecteur vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques, , et enfin ils jouent aussi un rôle dans la stabilité du sol. Sont généralement modifiées par la présence des différent type des mycorhizes , notons par ailleurs que les mycorhizes jouent un rôle de biofertilisants, Biorégulateurs, Biostabilisants et Bioprotecteurs.

✓ biofertilisants

Les mycorhizes jouent un rôle important dans l'absorption de l'eau et des nutriments par la plante (American Academy of Microbiology, 2013). En effet, ils stimulent la croissance de la plante par l'amélioration de sa nutrition et ceci en augmentant le volume du sol disponible pour l'absorption des nutriments qui se fait grâce aux mycéliums racinaires de ces champignons. Notamment ceux qui sont peu mobiles et qui sont présents en faible quantité dans la solution du sol tels que : le phosphore, le soufre, le potassium, le zinc, le calcium et le magnésium (Bouhired, 1984). D'après Plenchette (1982). La meilleure nutrition phosphatée des plantes mycorrhizées est la conséquence de 2 mécanismes : une exploitation du sol par les hyphes fongique qui s'étendent au-delà de la zone d'épuisement de la plante et une absorption intense près de la racine, due à la plus grande surface absorbante des hyphes fongiques.

Des travaux récents démontrent clairement que le mycélium fongique intervient en synergie avec les microorganismes du sol dans la décomposition de la matière organique, donnant ainsi accès à des éléments minéraux emprisonnés dans les résidus végétaux ou animaux (Fortin et al, 2008)

L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes est prouvée via cette matrice extra cellulaire qui explore un plus grand volume de sol (Smith et Read, 1997 ; Augé, 2001). En effet,

le fin mycélium des champignons peut aller puiser l'eau dans de petits interstices et agrégats du sol qui ne sont pas accessibles aux racines.

Plusieurs travaux ont montré aussi que l'inoculation des racines avec des MA permet d'augmenter la matière sèche ainsi que le rendement et l'acquisition d'azote et de phosphore, surtout pendant la phase de développement de la plante (Chalk et al., 2006; Kistner et Parniske, 2002; Smith et Read, 2008).

En effet, Les champignons mycorhiziens favorisent la coexistence entre plusieurs espèces végétales, améliorant ainsi la productivité et la biodiversité végétales dans ces écosystèmes (van der Heijden *et al.*, 1998 a, b ; Gobat *et al.*, 2003 ; Hart *et al.*, 2003 ; Silvertown, 2004 ; Sanon *et al.*, 2006 ; Kisa *et al.*, 2007).

✓ Biorégulateurs

La colonisation des racines par les champignons MA influe sur la croissance et le rendement des plantes (taille et productivité accrues), mais aussi leur développement (architecture des racines plus dichotomisée et floraison plus abondante) (Silvio Gianinazzi, 2012).

L'association mycorhizienne joue un rôle important dans la synthèse de composés complexes, comme les vitamines et les phytohormones (auxines, acide abscisique) (Barker et Tagu, 2000), qui sont des composés essentiels pour la formation des fleurs (Usha et al, 2005).

Les champignons mycorhiziens seraient aussi capables de sécréter des hormones pouvant induire des modifications chez la plante hôte au niveau de la morphologie : comme la différenciation intense des racines courtes en présence de champignon ectomycorhizogène.

De plus, les phytohormones produites par le champignon sont exportées vers la plante hôte et affectent la croissance du système racinaire, du tronc, des tiges et des feuilles.

✓ Bioprotecteurs :

Un effet protecteur pour la plante hôte, que ce soit face à des stress abiotiques ou biotiques. Les stress osmotiques (sécheresse et salinité) sont des stress abiotiques fréquemment rencontrés par les plantes et l'association avec les champignons MA permet de réduire les symptômes du stress en complément des mécanismes protecteurs intrinsèques de la plante (Ruiz-Lozano, 2003). La réponse des plantes mycorhizées en condition de sécheresse se traduit par de meilleurs taux de transpiration et de photosynthèse, une conductance stomatique et des teneurs en N et P dans les feuilles plus élevées et donc une meilleure croissance que les plantes non mycorhizées (Ruiz-Lozano et al., 1995). Parallèlement, La salinité peut perturber la capacité de colonisation, la germination de spores et la croissance des hyphes (Porcel *et al*, 2011). Ainsi, L'intensité de colonisation et l'abondance de vésicules et arbuscules sont réduits avec l'augmentation de sel, tout comme la réduction significative de la longueur des hyphes (Juniper & Abbott, 1993, Porcel *et al*, 2011).

Chez les plantes mycorhizées, les métaux lourds sont retenus dans le manteau fongique et ils ne parviennent à la racine de la plante qu'en quantités réduites. Ici, le mycorhize est comparable à un filtre (Egli et Brunner, 2002).

Par ailleurs, l'interaction des champignons MA avec les autres organismes du sol en font un agent protecteur vis-à-vis du stress biotique provoqué par les pathogènes. La symbiose MA protège la plante des dégâts causés aux racines par des nématodes (Elsen et al., 2003).

Les racines fines des arbres sont la proie de nombreux champignons pathogènes qui causent des nécroses perturbant l'absorption. Beaucoup de champignons symbiotiques, surtout ceux qui forment les ectomycorhizes, ont développé des mécanismes variés pour contrer les pathogènes : barrière physique constituée par le manteau des ectomycorhizes, appauvrissement du milieu en fer grâce à des sidérophores spécifiques ou production de substances toxiques (antibiotiques) (Stenström et al., 1997 in Drénou et al., 2006).

Il existe en plus de preuves que certains de ces champignons protègent leurs hôtes à l'égard des herbivores en produisant des toxines chimiques ou des préventives. Le plus souvent, le champignon synthétise des alcaloïdes qui protègent la plante. Les plantes synthétisent aussi toute une série d'alcaloïdes, dont beaucoup servent à leur défense. Un moyen de savoir si l'endophyte

améliore la santé de la plante hôte consiste à cultiver des parcelles de plantes avec et sans le même endophyte. Une expérience sur le ray-grass, *Lolium perenne*, a prouvé que la plante est plus résistante aux aphides parasites en présence d'un champignon endophyte, *Neotyphodium*

✓ Biostabilisants :

Un autre effet des champignons MA est leur action sur la structure du sol. Les hyphes fongiques ont la propriété d'agir sur la macroaggrégation des constituants du sol et donc sur la stabilité du sol (Tisdall et al., 1991). La stabilité des sols est très importante dans la lutte contre l'érosion, la perte des nutriments et de la matière organique par lixiviation, qui entraînent une baisse de la productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

1.4.1.2.7 Résistance aux stress biotiques et abiotiques :

Outre les effets nutritionnels, d'autres effets positifs des MA ont été rapportés, à savoir une résistance accrue des plantes endomycorhizées aux attaques de certains pathogènes telluriques tels que : *Fusarium*, *Phytophthora* et *Thielaviopsis* (Bagyaraj, 1984 ; AzconAguilar et Barea, 1992 ; Oihabi, 1991) et des nématodes (Morandi, 1987). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes de base à ces effets. En effet, les CMA n'interviennent pas directement sur le pathogène, mais plutôt en causant des changements dans les tissus de l'hôte notamment en développant la lignification des cellules, créant ainsi une barrière contre la pénétration des pathogènes (Schenck et Kellan, 1978). Une autre explication pourrait être trouvée au niveau de la compétitivité pour les sites d'infection : l'occupation en premier par les CMA des cellules hôtes empêcherait la pénétration du pathogène (Gianinazzi-Pearson et Diem, 1982). L'accumulation de certains composés du métabolisme secondaire, en particulier l'augmentation des teneurs en composés phénoliques (Krishna et Bagyaraj, 1984 ; Blal, 1989) et la production de phytoalexines (Morandi, 1989) observée chez les plantes endomycorhizées pourraient en être également responsables de l'inhibition des agents pathogènes.

1.4.1.2.8 Technologies de production d'inoculum mycorhizien :

Une production végétale de qualité sous-entend des produits finis de haute gamme et l'utilisation de technologies qui préservent au mieux l'environnement. Toute approche réaliste visant à réduire l'apport de pesticides et de fertilisants chimiques et à protéger les cultures et la qualité des sols mérite d'être exploitée (Smith et Read 1997).

Une multitude de travaux ont clairement démontré l'intérêt scientifique et pratique des biofertilisants pour faire face à ces différentes contraintes. Les biofertilisants sont généralement préparés comme inoculants à base de support contenant des micro-organismes (Senoo et Narumi, 2006), telle que les champignons mycorhiziens de type arbusculaire (MA). L'application d'inoculants mycorhiziens commerciaux dans l'agriculture vise à entraîner une meilleure mycorhization des cultures par introduction d'une ou plusieurs souches étrangères de CMA qui ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des effets bénéfiques sur les plantes (augmentation de la nutrition, réduction des maladies, etc.). Les espèces qui sont couramment utilisées pour les inoculums commerciaux sont du genre des *Glomus*. Ces espèces sont naturellement très répandues dans les écosystèmes et ont comme avantage de coloniser une grande variété de plantes hôtes (Dalpé et Monreal, 2004 ; Fortin *et al.*, 2008).

1.4.1.3.1 Inoculum mycorhizien :

L'inoculum sous forme solide (granuleux ou poudreux) ou en suspension liquide pourra se composer de différents types de propagules : spores, mycélium fongique, fragments de racines mycorhizées. Un ou plusieurs types de propagules peuvent être formulés dans un même inoculum endomycorhizien. De plus, les inoculums de champignons ectomycorhiziens ou endomycorhiziens peuvent contenir une ou plusieurs espèces fongiques mélangées. Les produits multi-espèces sont plus proches des conditions naturelles car dans les écosystèmes il est rare de ne rencontrer qu'une seule espèce de champignon mycorhizien. La présence de plusieurs espèces fongiques permet à l'inoculum de répondre à une plus grande diversité de conditions de culture (Haimet, 2013).

1.4.1.3.2 Type d'inoculum :

Le mode de production diffère selon la famille de champignons :

a) **Les champignons ectomycorhiziens :**

la production d'inoculum de champignons ectomycorhiziens se fait généralement en conditions axéniques, sans plante hôte, en culture liquide ou sur support solide.

b) **Les champignons endomycorhizien :**

sont des symbiotes obligatoires strictes c'est-à-dire dépendants de la présence d'une plante hôte pour se développer et se multiplier. Le producteur d'inoculum est alors tenu de cocultiver le complexe « champignon-plante hôte ». A ce jour, les deux technologies de production les plus utilisées sont :

- la méthode dite conventionnelle consistant à multiplier les champignons endomycorhizien sur les racines d'une plante-hôte entière, cultivée en conditions contrôlées en serre ou en chambre de culture.
- la méthode « in vitro » consistant à multiplier le champignon endomycorhizien sur des racines cultivées sur milieu synthétique en conditions stériles (Marie-Line Haimet, 2013).

1.4.1.3.3 Etapes de production d'inoculum mycorhizien

Depuis, plusieurs techniques de mycorhization ont été développées et celle utilisant des champignons mycorhiziens seuls repose dorénavant sur les étapes suivantes :

- (i) isolement et purification de souches fongiques.
- (ii) sélection, en conditions contrôlées de souches fongiques performantes pour un paramètre donné (par exemple : effet de la souche sur la croissance de la plante hôte).
- (iii) multiplication de la souche en conditions axéniques et production d'inoculum fongique (Duponnois *et al.*, 2013).

1.4.1.3.4 Qualité des inoculums

Concernant la qualité des inoculums disponibles, plusieurs critères mentionnés sur l'emballage doivent être pris en compte :

Etude bibliographie

- la dose d'utilisation qui informe sur la dose minimale d'inoculum nécessaire pour garantir la mycorhization d'un plant ou d'une surface végétalisée.
- le nombre de propagules / unité de poids ou de volume du produit qui indique la richesse minimale de l'inoculum garantie par le fabricant.

II.1. Matériel :

❖ Matériel végétal :

La plante hôte utilisée est *Medicago sativa* L. (LUZERNE) ; Le choix de cette plante son été dicté par son utilisation importante en tant que plante fourrager pour l'alimentation du bétail ; et son étude entre dans le cadre de la valorisation de ressources fourragères dans les zones arides et semi-arides.

❖ sol :

Les échantillons de sol sont collectés de la rhizosphère du plant *Medicago sativa* présent dans la région de Nâama.

Les prélèvements de sol, d'au moins cinq plantes choisies au hasard, sont collectés à une distance de 50 cm et sur une profondeur de 0-20 cm et sont homogénéisés pour obtenir un échantillon représentatif pour chaque région puis aérés et conservés à température ambiante dans des sachets en plastique jusqu'à leur utilisation.

II.2. Méthodes :

II.2.1 Etude des mycorhizes :

Les différentes méthodologies utilisées pour observer les structures formées par les mycorhizes sont réalisée selon les phases suivantes : échantillonnage, lavage, éclaircissement et coloration des mycorhizes, le montage et l'observation.

II.2.1.1 Échantillonnage :

Les prélèvements sont réalisés sur une profondeur de 10 à 20 cm à proximité de la plante étudiée, prélèvement d'un bloc de terre avec une partie importante de son système racinaire qui contenant les racines fines qui seul nous intéressent, siège de l'association avec des mycorhizes, sont extrêmement fragile et leur séparation du sol doit être réalisée très délicatement.

II.2.1.2 Lavage :

Pour déloger facilement la terre des racines, celles-ci ont été trempée dans des bassines d'eau pendant 24h, puis elles ont été lavées sous un léger filet de l'eau de robinet et très délicatement frottées avec les doigts parce que les racines fines qui seule nous intéressent sont extrêmement fragiles.

A l'aide de ciseaux les racines fines ont été séparée de racine pivotante et versée dans un bocal pour moitié remplie d'eau ; puis agiter délicatement pendant quelques minutes, afin de les débarrasser de toute particule de terre.

Les racines fines doivent être maintenues en permanence dans l'eau ; en effet, ces dernières se dessèchent rapidement à l'air libre et elles doivent être maintenues dans l'eau ; en effet, ces derniers se dessèchent rapidement à l'air libre et elles doivent être conservés au réfrigérateur à + 4°C avant d'être observés directement ou traités ultérieurement.

II.2.1.3 Éclaircissement et coloration des racines :

pour mettre en évidence la présence de structures endomycorhiziennes, les racines fines ont été éclaircies et colorées selon la technique de Phillips et Hayman (1970) modifiée . Ainsi elles ont été placées dans des tubes à essai contenant la solution fixatrice FAA durant 30 minutes qui sert à la conservation des racines . Après plusieurs rinçages à l'eau courante. Elles ont été plongées dans une solution d'hydroxyde de potassium KOH à 10% et chauffer au bain-marie à 90°C pendant 1h afin de les vider de leur contenu cytoplasmique. Ensuite les racines ont été transférées dans une solution de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 10 % et chauffer au bain-marie à 90°C pendant 20 minutes pour les blanchir. Après plusieurs rinçages à l'eau courante, les fragments racinaires éclaircis ont été submergés d'acide lactique à 10% durant 10 minutes qui permet de neutraliser l'hydroxyde de potassium KOH restant. ENFIN les racines ont été transférées dans une solution de bleu de trypan de 1% et chauffer au bain-marie à 90°C pendant 1h qui permet la coloration de la chitine des parois du champignon. Les structures fongiques, tels que les arbuscules, les vésicules et le mycélium apparaissent en bleu. Les racines ont été à nouveau rinçées à l'eau courant, puis conservées dans des boîtes de pétri contenant de glycérol 60%.

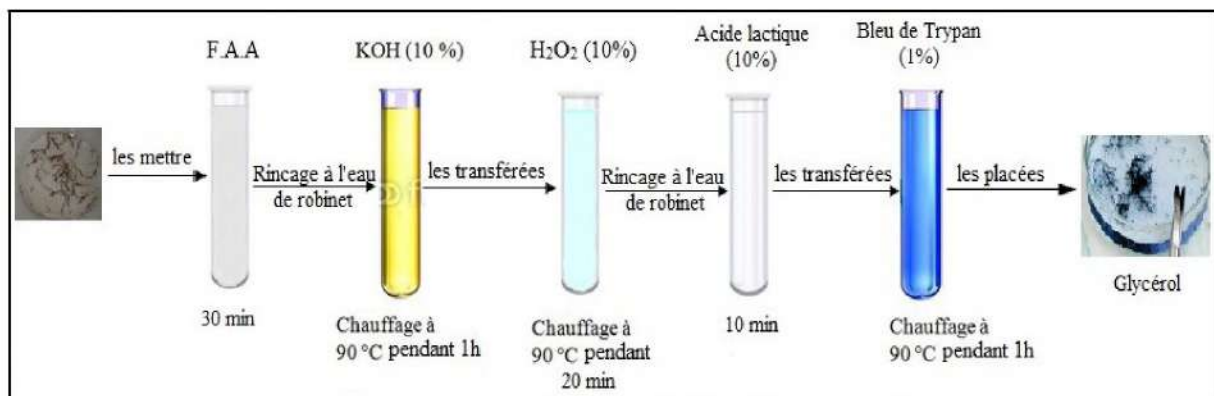


figure17: Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.

II.2.1.4 Montage et observation des racines :

Les racines traitées sont découpées en fragments d'environ un cm de longueur. vingt à trente fragments, en triplicata, choisis au hasard sont montés et écrasés entre lame et lamelle dans du glycérol en raison de 10 fragments par lame (chaque triplicata représente une plante). Puis observées au microscope photonique.

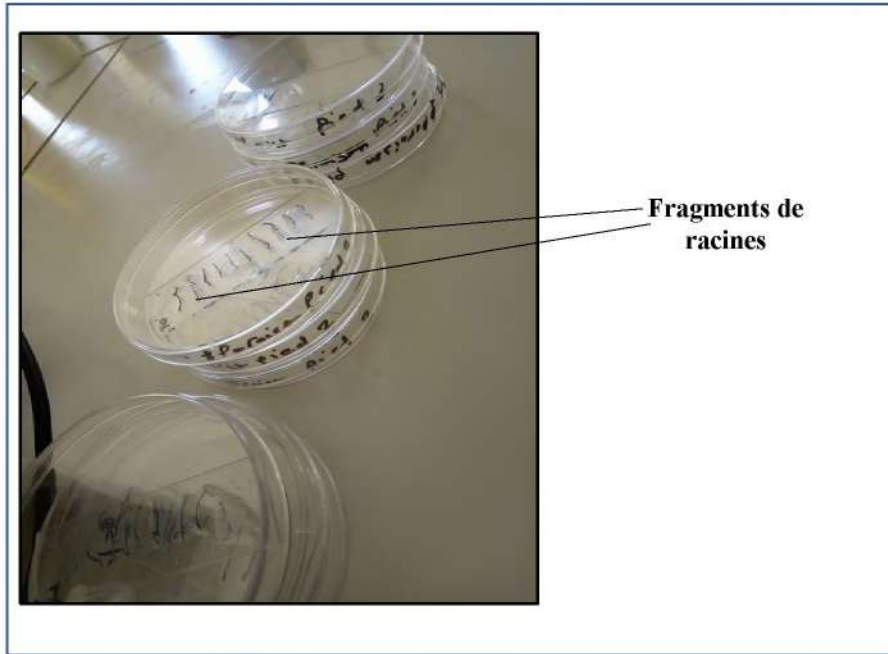


Figure 18 : Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'observation microscopique.

II.2.2 Estimation de la mycorhization MA naturelle des racines

les fragments sont observés au microscope photonique pour calculer les quatre paramètres de la colonisation MA (Trouvelot et al., 1986) :

- F : Fréquence de colonisation

$$F\% = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre des fragments totaux}) * 100.$$

M : Intensité de colonisation développée dans le système racinaire entier ;

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nombre des fragments totaux}).$$

n_5 = nombre de fragments notés 5 ; n_4 = nombre de fragments 4 etc.

a : Teneur arbusculaire de la colonisation dans la partie endomycorhisée du système racinaire :

$$a\% = (100m_3 + 50m_2 + 10m_1) / 100$$

$$m_3 = ((95n_5A_3 + 70n_4A_3 + 30n_3A_3 + 5n_2A_3 + n_1A_3) / (\text{nombre des fragments mycorhizés}) * 100 / m$$

$$\% m = M * (\text{nombre des fragments totaux}) / (\text{nombre des fragments mycorhizés})$$

A : Teneur arbusculaire de la colonisation ramenée au s

$$A\% = a * (M / 100).$$

II.2.3 Piégeage des endomycorhizes :

La méthode de piégeage de Morton (1992) et Walker (1992) est utilisée pour la mise en évidence de la diversité des CMA dans les sites d'étude. Elle consiste à cultiver une plante-piège dans un substrat pauvre en éléments nutritifs et utiliser comme inoculum le sol des sites contenant des propagules viable (spores, hyphes et fragments de mycorhize).

L'inoculum est constitué du sol rhizosphérique contenant des racines des plantes d'intérêt coupées en petits fragments et soigneusement mélangées avec ce sol.

Le substrat est constitué du sable autoclavé trois fois à 120°C pendant une heure pour éliminer tout risque de contamination par d'autres champignons. L'inoculum est mélangé (1:1 v /v) avec du substrat sableux autoclavé. Ce mélange est ensuite transféré dans des pots en plastique de 1 l de volume, préalablement lavés et désinfectés à l'eau de javel. Ils sont remplis à moitié avec du substrat sur lequel sont déposés 200g d'inoculum ; le tout est ensuite recouvert de substrat afin de limiter les risques de contamination. Deux répétitions sont réalisées pour chaque sol. Un témoin sans inoculum est réalisé dans les mêmes conditions avec seulement du substrat autoclavé afin de vérifier que les conditions de culture soit exemptes de contaminants MA.

La variété de maïs HYBRID PICO est utilisée comme plante piège. Les graines sont désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium 12°chl pendant 15 min et rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. Les graines désinfectées sont incubées à 25°C à l'obscurité, après trois jours, le semis est effectué à raison de trois plantules par **pot** qui sont ensuite fermés avec un couvercle perforé (Film alimentaire) pour l'émergence des jeunes plants (Fig.17).



Figure 19 ; Dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton (1992) et Walker (1992).

a : Plantules de maïs après trois jours de germination. **b :** Plantules de maïs transplantées.

Les pots sont arrosés quotidiennement avec de l'eau distillée stérilisée. La fertilisation n'est appliquée que lorsque les plantes montrent des signes de carence en phosphore ou en azote, en utilisant la solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938) (annexe1). Les pots sont déposés en chambre de culture contrôlée (une température de 25°C = 1 et une photopériode de 16 heures). Après 42 jours de culture, les plants de maïs sont dépotés, leur hauteur est mesurée, le système racinaire est utilisé pour l'estimation du taux de colonisation MA et le substrat de chaque sol est récolté, séché à température ambiante pour l'extraction et la caractérisation phénotypique des spores.

II.2.4 Extraction des spores

Elle est effectuée sur la base de la méthode de tamisage humide décrit par Gerdemann et Nicholson (1963). Nous avons procédé au délayage d'un échantillon de 100 g de sol sec, provenant des échantillons issus du piégeage et prélevés directement des sites d'études, Dans 1000 ml d'eau de robinet. Ce mélange sol-eau est agité pendant 1 minute puis laissé à décanté pendant 15 à 30 seconde. Le surnageant est filtré à travers trois tamis superposés à mailles décroissantes (500-125-45 μ m de diamètre).

Pour optimiser le rendement, cette étape de mise en suspension suivie de tamisage est répétée au moins trois fois. Les particules retenues par le tamis de 45 μ m uniquement sont recueillies dans des tubes de centrifugation remplis à 1/3 d'une solution de saccharose à 60% (p/v) afin de concentrer les spores et de réduire la présence des particules de sol et des fragments racinaires (Daniels et Skipper, 1982). Ces tubes sont soumis à une centrifugation à 1750 r/m pendant 5 minutes à 4°C. Le mélange sédiments-saccharose a été de nouveau centrifugé à 1750 r /m pendant 15 seconde. Les spores et les particules restées en suspension dans la solution de saccharose sont récupérées dans un tamis de 45 μ m d'ouverture de mailles puis rincées avec l'eau de robinet pour éliminer le saccharose et éviter les phénomènes de plasmolyse. Les extraits ainsi obtenus sont conservés à 4°C pour l'observation, Le comptage et tri morphologique des spores (fig.19).



Figure 20 : description des étapes d'extraction des spores.

II.2.5.1 Caractérisation de tri morphologique des spores :

Les spores sont extraites du sol issu du piégeage. Ces spores sont examinées sous une loupe binoculaire et la caractérisation morphologique est effectuée au microscope photonique MOTIC version 2,1 reliée à un ordinateur. Les morphotypes sont classifiés selon leurs caractéristiques morphologiques : couleur, forme, taille, bulbe suspenseur et nombre de membranes de séparation etc. La distinction et la description des espèces sont réalisées en se référant à la clé d'identification d'International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) (<http://www.invam.caf.wvu.edu/>).

II.2.6 Analyse des données :

Toutes les valeurs des différents tests représentent la moyenne de 3 pieds Les données sont calculées à l'aide du logiciel EXCEL 2010 et les graphiques sont réalisés également à l'aide du même logiciel.

l'eau de javel. Ils sont remplis à moitié avec du substrat sur lequel sont déposés 200g d'inoculum ; le tout est ensuite recouvert de substrat afin de limiter les risques de contamination. Deux répétitions sont réalisées pour chaque sol. Un témoin sans inoculum est réalisé dans les mêmes conditions avec seulement du substrat autoclavé afin de vérifier que les conditions de culture soit exemptes de contaminants MA.

La variété de maïs HYBRID PICO est utilisée comme plante piège. Les graines sont désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium 12°chl pendant 15 min et rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. Les graines désinfectées sont incubées à 25°C à l'obscurité, après trois jours, le semis est effectué à raison de trois plantules par pot qui sont ensuite fermés avec un couvercle perforé (Film alimentaire) pour l'émergence des jeunes plants (Fig.20).

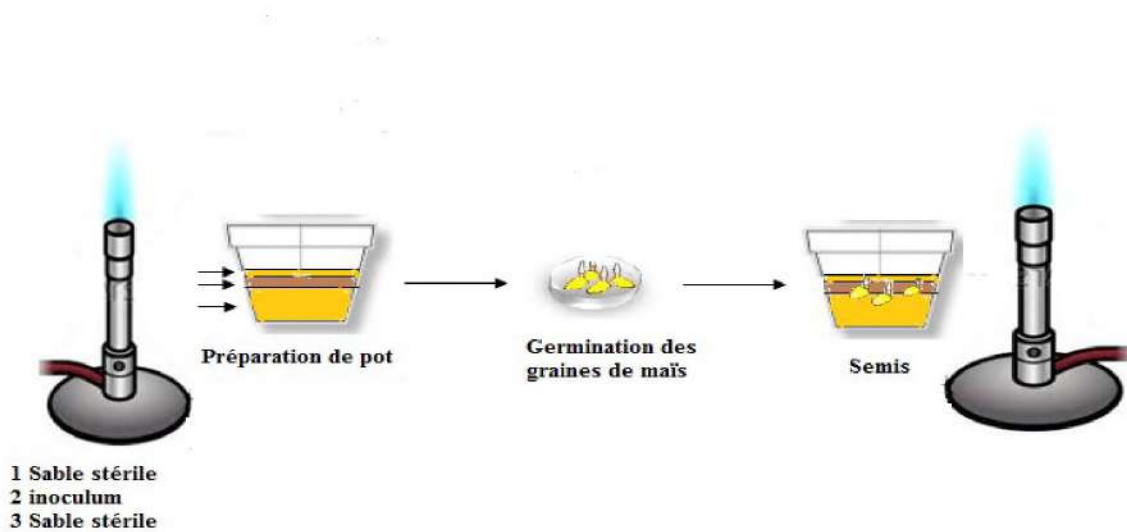


Figure 21: Dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton (1992) et Walker (1992).

a : Plantules de maïs après trois jours de germination. **b :** Plantules de maïs transplantées.

Références bibliographiques

- Gerdemann, J.W. & Trappe, J.M. (1974).** The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia memoir n° 5, The Mycological Society of America, 76 p.
- Ames, R.N. & Schneider, R.W. (1979).** Entrophospora, a new genus in the Endogonaceae. Mycotaxon 8: 347-352
- Hall, I.R. (1977).** Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. Transactions of British Mycological Research, 341-356.
- Redecker, D., Morton, J. B. & Bruns, T. D. (2000).** Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. Mycologia, 92 : 282-285
- Walker, C. & Sanders, F.E. (1986).** Taxonomic concepts in the endogonaceae. III: The separation of *Scutellospora* gen. Nov. From *Gigaspora* Gerd. & Trappe. Mycotaxon, XXXII 17: 169-182.
- Tedersoo, L. & Nara, K. (2010).** General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. New Phytologist, 185 : 351-354.
- Wang, B. & Qiu, Y-L. (2006).** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza, 16: 299-363.
- Bonfante, 2001.** At the Interface Between Mycorrhizal Fungi and Plants: the Structural Organization of Cell Wall, Plasma Membrane and Cytoskeleton. The Mycota. 9: 45-61
- Parniske M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology. 6:763-775.
- Peterson L, Massicotte H, Melville L. 2004.** Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. Ottawa, CA: NRC Research Press.
- Smith, S.E., Read. D.J. (2008).** Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. Academic Press. London, UK.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press.
- Taylor, A. F. S. & Alexander, I. (2005).** The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist, 19: 102-112.
- Tedersoo, L. & Nara, K. (2010).** General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. New Phytologist, 185 : 351-354.
- Smith, S.E., Read. D.J. (2008).** Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. Academic Press. London, UK.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press.
- Smith SE, Read DJ (1997),** Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press ; Harcourt Brace and Company Publishers, 605p.
- Bago, B., Pfeffer, P.E. and Shachar-Hill, Y. (2000)** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. Plant Physiology, 124 (3): 949-958.
- MATHIEU M. (2003)-** Luzerne, Edition France, 11p.

Munor D.B, Small E. 1998, Les legumes du Canada Fd. NRC Recherche Press. Othawa, Canada, 43P.

Lapeyronie, A., 1982, les productions fourragères méditerranéennes. Ed. G-P. Maisonneuve et Larousse. Paris, 425p.

ACTA, 1984, Fiche de l'Association de coordination technique Agricole, ACTA, 1984, Fiche N°402

Prosperi JM ; Guy P et Balfourier F, 1995, Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon, Ed. INRA et BRG, Paris, 219p.

Marble, V.L, 1993, Des fourrages pour proche-Orient : la luzerne Etude FAO. Production végétale et production des plantes 97/1, FAO, 237p.

Villax, J , 1993, La culture des plantes fourragères dans des régions méditerranéennes occidentales. INRA, Rabat, 38p.

Talamucci, P , 1994, Lucerne role in farming system, technical itineraries and managements for different uses in diverse physical and socio-economic environment. Dans: Eucarpia/FAO Midicago Meeting: Culture, Exploitation et Sélection de la Luzerne pérenne pour différentes utilisations, Lusignan (France) 4-8 septembre 1994. Publication FAO-REUR Technical Series, 36 : 6-17p.

Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. San Diego, USA

Fortin J.A., Plenchette C., Piché Y., 2008. Les Mycorhizes : La Nouvelle Révolution Verte. Ed. Multi mondes. Ed. Quae. 131p.

Olsson, P.A, Thingstrup, L., Jakobsen, L., Bååth, E. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biology and Biochemistry, 31 : 1879-1887.

Bonfante-Fasolo P (1984), Anatomy and morphology of VA mycorrhizae, In VA mycorrhiza, Powell, CL et Bagyaraj, DJ, CRC Press, Boca Raton, 5-33.

Harley JL, Smith S (1983), Mycorrhizal symbiosis, Academic Press, 1-32, New York.

Bonfante-Fasolo P (1984), Anatomy and morphology of VA mycorrhizae, In VA mycorrhiza, Powell, CL et Bagyaraj, DJ, CRC Press, Boca Raton, 5-33.

Bonfante P., Perotto S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130 : 3-21.

Morton J.B. and Benny J. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae,

Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd Edition. Clarendon Press, Oxford.

Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester. Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University.

Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüssler A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *The New phytologist* 193: 970–84.

Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, Debiante D, Rezgui S, Grandmougin-Ferjani A, LounèsHadj Sahraoui A. 2012. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO₃ stress. *Mycorrhiza* 22: 337–45.

Lauressergues D, Delaux P-M, Formey D, Lelandais-Brière C, Fort S, Cottaz S, Bécard G, Niebel A, Roux C, Combier J-P. 2012. The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant Journal* :for cell and molecular biology.

Liao J, Singh S, Hossain MS, Andersen SU, Ross L, Bonetta D, Zhou Y, Sato S, Tabata S, Stougaard J, *et al.* 2012. Negative regulation of CCaMK is essential for symbiotic infection. *The Plant Journal* : for cell and molecular biology.

Bonfante, P. and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1, 48.

Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. 6:763-775.

Peterson L, Massicotte H, Melville L. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. Ottawa, CA: NRC Research Press.

Parniske M, 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 414-421.

Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM. 2011. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32:181–200

Logi C, Sbrana C, Giovannetti M, 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3473-3479.

Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G, 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 693-698.

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H, 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.

Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A, 2005.

Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research* 109: 789-794.

Nagahashi G, Douds DD, 1997. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* 136: 299-304.

Genre A, Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal

Parniske M, 2004. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 414-421.

Javot H, Pumplin N, Harrison M. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* .30: 310–322

Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007b. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, cell & environment* 30: 310–22.

Smith, S.E., et Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Third edition Academic Press, Amsterdam. 787 pages.

Smith, S.E., Read. D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic Press. London, UK.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press

Declerck, 2014. Gestion intégrée du système sol/plante. Document non publié, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve

Bago, B., Pfeffer, P.E. and Shachar-Hill, Y. (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124 (3): 949-958

Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V., 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Plant Mol. Biol.*, 39: 221-244.

Plenchette C., Fortin J.A., Furlan V., 1982. Effect of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J Amer. Hort. Sci.*, 107: 535-538.

Dexheimer, 1997. Etude structurale et fonctionnelle entre le champignon et la plante hôte. *RFF*. XLIX, n°sp : 43-56.

DeMars B.D. and R. E.J. Broener, 1995. A simple method for observing VAM with suggestions for designing class activities. *J. of Biological Education*, 29 (3) : 209-214.

Strullu D.G., 1991. Les relations entre les plantes et les champignons. In : Les endomycorhizes des arbres et plantes cultivées. 3ème édition. Lavoisier.

Azcón-Aguilar C. and Barea J.M., 1992. Interactions between Mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: Allen M.F. (ed) *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall, New York, pp. 163-198

Abbas Y., 1998. Mycorrhizes à arbuscules de zones arides : biodiversité et rôle dans la tolérance du trèfle (*Trifolium alexandrinum*) au stress salin. Thèse de 3ème cycle, Université Cadi Ayyad, 112 p

Guillemin J.P., Gianninazzi S., Gianinazzi-Pearson V. and Marchal J., 1995. Influence des endomycorhizes à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de vitroplants d'Ananas dans un sol à forte salinité. *Fruits*, 50 : 333-341.

Harley J.L. and Smith S.E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Londres, 483p

Graham J.H. and Syvertsen J.P., 1989. Vesicular-arbuscular mycorrhizas increase chloride concentration in citrus seedlings. *New Phytol.*, 113 : 29-36.

Meddich A., Oihabi A., Abbas Y. and Bizid E. 2000. Rôles des champignons mycorhiziens à arbuscules des zones arides dans la résistance du trèfle (*Trifolium alexandrinum*) au déficit hydrique. *Agronomie* 20 : 283-295.

Plenchette C., Fortin J.A., Furlan V., 1982. Effect of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J Amer. Hort. Sci.*, 107: 535-538.

Fortin J. A., Plenchette C. and Piché Y., 2008. Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. MultiMonde Quac. (Eds.), Quebecs, 131 p.

Smith SE, Read DJ (1997), Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press ; Harcourt Brace and Company Publishers, 605p.

Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. 3–42.

Chalk, P.M., Souza, R.de F., Urquiaga, S., Alves, B.J.R., Boddey, R.M. 2006. The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2944-2951.

Kistner, C et Parniske, M. 2002. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science*, 7: 511-518.

Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. (2003). Le sol vivant, 2e Edition. Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne, 568 p.

Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheilig H, Ocampo JA, Godeas A, 2005. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research* 109: 789-794.

Sanon, A, Martin, P., Thioulouse, J., Plenchette, c., Spichiger, R., Lepage, M., Duponnois, R. (2006). Displacement of an herbaceous plant species community by Mycorrhizal and non mycorrhizal *Gmelina arborea*, an exotic tree, grown in a microcosm experiment. *Mycorrhiza*, 16: 125-132.

Ruiz-Lozano JM, Azcon R, Gomez M, 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 456-460.

Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM. 2011. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32:181–200

Egli S. & Brunner I., 2002. Les mycorhizes. Une fascinante biocénose en forêt. Institut fédéral de recherches wsl.<http://www.wsl.ch/Im/publications>. 8p.

Elsen A, Baimey H, Swennen R, De Waele D, 2003. Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil* 256: 303-313.

Bagyaraj D.J., 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In : VA Mycorrhiza (C.L. Powell, J.B. Bagyaraj, Eds.), pp. 131-154. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.

Azcón-Aguilar C. and Barea J.M., 1992. Interactions between Mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: Allen M.F. (ed) Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process. Chapman & Hall, New York, pp. 163-198

Oihabi A., 1991. Etude de l'influence des endomycorhizes à vésicules et arbuscules sur le Bayoud et la nutrition du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Etat. 92p.

Morandi D., 1987. VA Mycorrhizae, Nematodes, Phosphorus and Phytoalexins on Soybean. In : Mycorrhizae in the next decade, practical applications and research priorities (Sylvia D.M., Hung L.L., Graham J.H. Eds). Compte rendu du 7ème NACOM (North American Conference on Mycorrhizae). 212 p.

Schenck N.C and Kellan M.K., 1978. The influence of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae on disease development. Gainesville, Univ. Florida, bulletin technique n° 789: 16p

Gianinazzi-pearson V. and Diem H.G., 1982. Endomycorrhizae in the tropics. In : Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity (Dommergues Y.R. and Diem H.G. Eds), Martinus Nijhoff / Dr Junk W. Publishers. Pp. 209-251. The Hague Boston London.

Bagyaraj D.J., 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. In : VA Mycorrhiza (C.L. Powell, J.B. Bagyaraj, Eds.), pp. 131-154. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.

Blal B., 1989. Les endomycorhizes VA chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* jacq.): Rôle dans la régulation de la croissance et dans la nutrition minérale des jeunes plants de clones micropropagés. Thèse de Doctorat, Univ. de Bourgogne, Dijon

Morandi D., 1989. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and phytoalexin accumulation in soybean roots. *Plants Physiology and Biochemistry* 27 (5) : 697-701.

Smith S. E., Read D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego. 607.

Senoo K., Narumi I. 2006. Carrier materials. 41-49. in : Biofertilizer Manual. Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), Japan.

Dalpé Y. 2005. Les Mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection*. 86 : 53-59

- Dalpé Y.** 2006. Mycorhizes et bénéfices marginaux. *Québec Vert* : 8-9.
- Fortin J. A., Plenchette C., Piché Y.** 2008. Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. MultiMode Quae. (Eds.), Québec. 131.
- Fortin J. A., Plenchette C., et Piché Y.** 2008. Les mycorhizes : La nouvelle révolution verte. Québec, Edition MultiMondes. 138
- Hatimi A, Tahrouch S.** 2007. Caractérisations chimique, botanique et microbiologique du sol des dunes littorales du souss-Massa. *biomatec Echo*. 2 : 85-97.
- Gerdemann J. W., Trappe J. M.** 1974. The Endogonaceae in the Pacific North West. *Mycologia*
- Brundrett M (1991).** Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21 : 171-313. 52

- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. (2003).** Le sol vivant, 2e Edition. Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne, 568 p.
- Linderman RG. 1988.** Mycorrhizal Interaction with the Rhizosphere Microfora :The Mycorrhizosphere Effect. *Phytopathology* **78**: 366-371. 54
- Tedersoo, L. & Nara, K. (2010).** General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 185 : 351-354. 56
- Wang, B. & Qiu, Y-L. (2006).** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16: 299-363.
- Lopez C. (2005).** Identificación de micorrizas arbusculares en cultivos de mora (*Rubus Glaucus*), en diez localidades de seis municipios del departamento de Boyacá. Mémoire de licence en Biologie, Université Pédagogique et Technologique, Colombie.
- Dodd J. C., Boddington C. L., Rodriguez A., Gonzalez-Chavez C., Mansur L. 2000.** Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera : from, function and detection. *Plant Soil*. 226 : 131-151.
- Joner E.J. & Johansen A. (2000).** Phosphataseactivity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104, pp. 81-86.
- Smith, S.E., Read D. J. 2008.** Mycorrhizal symbiosis. Troisième édition, New York, Academic Press. 800.
- Smith SE, Read DJ, 2008.** Mycorrhizal symbiosis. 3rd edn. Academic Press. London.
- Van Vuuren DP., Bouwman AF. et Beusen AHW., 2010.** Phosphorus demand for the 1970-2100 period: a scenario analysis of resource depletion. *Global Environmental Change*, 20:428-439.
- Bert V., Lounes-hadj Sahraoui A., Leyval C., Fontaine J. & Ouvrard S. 2012.** Les phytotechnologies applique aux sites et sole pollues. ADEME /INERIS. Ed sciences.
- Laouar M. et Abdelguerfi A., 2006.** Variabilité de la production de gousses et des graines chez quelque populations spontanées de *Medicago Intextra*. *Options Méditerranéennes*. pp 111-117.
- Russelle M. 2001.** alfalfa. *Am .Sci.*7: 252-259.
- Lopez C. (2005).** Identificación de micorrizas arbusculares en cultivos de mora (*Rubus Glaucus*), en diez localidades de seis municipios del departamento de Boyacá. Mémoire de licence en Biologie, Université Pédagogique et Technologique, Colombie.
- Karagiannidis N. & Hadjisavva-Zinoviadi S. (1998).** The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutrient cycling in Agroecosystems*, 52, pp.1-7.
- Van Vuuren DP., Bouwman AF. et Beusen AHW., 2010.** Phosphorus demand for the 1970-2100 period: a scenario analysis of resource depletion. *Global Environmental Change*, 20:428-439.

Bert V., Lounes-hadj Sahraoui A., Leyval C., Fontaine J. & Ouvrard S. 2012. Les phytotechnologies applique aux sites et sole pollues. ADEME /INERIS. Ed sciences.

Zaidi A, Saghir Khan MD, Amil M D. 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganism on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Agronomy* 19 (1): 15-21.

Hayman D. S. 1970. Endogone spore numbers in soil vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatment. *Transactions of the British mycological Society*, 54, 53.

Tchameni, N., Omoloko, C., Nana, W. & Tchana, N. (2008). Effets des champignons mycorrhiziens et des flavonoïdes sur les phosphatases, la croissance et la valeur nutritionnelle de l'haricot vert. *Science and Engineering*, 9:20-28.

Gavériaux J.P., 2012. Les Glomeromycota – Mycorhizes VAM et Geosophon pyriformis (Kützing) Wettstein, *Bull. Soc. Mycol. Nord Fr.* 92 : 1-17

Boullard B., 1968. Les mycorhizes. (Eds.) Masson et Cie, Paris, France, 135 p.

Brundrett M. C., Abbott L. k., Jasper D. A., 1999. Glomalean fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness of isolation procedures. *Mycorrhiza*. 8 : 350-314.

Brundrett M C, Kendric B. 1990a. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytol.* 144 : 457-468.

Mullen R B, Schmidt S K. 1993. Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adonejis* : implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. *Oecologia*. 94 : 229-234.

Yawney W J, Schulzt R. 1990. Anatomy of a vesicular arbuscular endomycorrhizal symbiosis between Sugar maple *Acer Saccharum* Marsh and *Glomus etunicatum* Becher and Gerdemann. *New Phytol.* 114 : 47-57.

Gavériaux J.P., 2012. Les Glomeromycota – Mycorhizes VAM et Geosophon pyriformis (Kützing) Wettstein, *Bull. Soc. Mycol. Nord Fr.* 92 : 1-17.

Brundrett M. C., Abbott L. k., Jasper D. A., 1999. Glomalean fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness of isolation procedures. *Mycorrhiza*. 8 : 350-314.

- Hause, B. & Fester, T. (2005).** Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, 15:373-379.
- Harley J. L., 1986.** Mycorrhizal studies : past and future. *In* : Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. 1^{er} SEM. On mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (Eds.), I.N.R.A. Paris, France. 25-35.
- Harley J. L., Harley E. L. 1987.** A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist*. 105 : 1-102.
- Harrison M. J., 1999.** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.*, 50 : 361-89.
- Genre A. 2012.** Signaling and there-structuring of plant cell architecture in AM symbiosis. Dans: Perotto S., Baluska F. (eds) Signaling and communications in plant symbiosis, volume 10. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D.G. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*. 17: 3489-3499.
- Genre A., Ortu G., Bertholdo C., Martino E., Bonfante P. 2009.** Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 149: 1424-1434
- Smith S. E., Read D. J. 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, San Diego. 607.
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. and Walter, M. H. 2003.** Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J Chem Ecol*, 29, 1955-1979.
- Paszkowski U 2006.** A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 172: 35–46.
- Pumplin N, Harrison M J .2009.** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis, *Plant Physiol*. Preview
- strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. and Walter, M. H. 2003.** Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J Chem Ecol*, 29, 1955-1979.
- Walter M.H., Floß D.S., Hans J., Fester T., Strack D. 2007.** Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots : contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* 68: 130-138.
- Hirrel M C, Mehravarman H, Gerdemann J W. 1978.** Vesicular arbuscular mycorrhizae in the *Chenopodiaceae and cruiiferae* : do they occur ? *Can J Bot.* 56 : 2813-2817.
- Malloch D, Malloh B. 1981.** The mycorrhizal status of boreal plants : species from northeastern Ontario. *Can J Bot.* 59 : 2167-2172.

Waligora C. 2010. Introduire la luzerne. De l'azote en quantités industrielles. Technique. *Cultivar-mars*. 42-45

Mauriera I. J., 2004. Alalfa (*Medicago sativa* spp. *Sativa*) population improvement : genetic diversity within and among *Medicago* species and trait. Associations within molecular
Mauriera I. J., 2004. Alalfa (*Medicago sativa* spp. *Sativa*) population improvement : genetic diversity within and among *Medicago* species and trait. Associations within molecular

Stutz J. C., Copeman R., Martin C. A., Morton J. B., 2000. Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of south-western Namibia. *African. Can. J. Bot.*, 78 : 237-245.

Zaidi A, Saghir Khan MD, Amil M D. 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganism on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Agronomy* 19 (1): 15-21.

Karaarslan E., Uyanöz R. 2011. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in some native plants grown on saline soils around the lake Tuz in Turkey and its relations with some physical and chemical properties of soil. *Sci Res Essays*. 6 : 4238- 4245.

Dickson S. 2005. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*. 163: 187-200.

Chiarello, N., Hickman, J.C. & Mooney, H.A. (1982). Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorus in a community of annual plants. *Science*, 217: 941-943.

Arvieu, J.C., Leprince, F. & Plassard, C. (2003). Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Annals of Forest Sciences*, 60: 815-821

Abbot L K, Robson D. 1982. The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and the selection of fungi for inoculation, *Australian Journal of Agricultural Research* : 33 389-408.

Gavériaux J.P., 2012. Les Glomeromycota – Mycorhizes VAM et *Geosiphon pyriformis* (Kützing) Wettstein, *Bull. Soc. Mycol. Nord Fr.* 92 : 1-17.

Gianinazzi-Pearson V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi : getting the roots of symbiosis. *Plant Cell*. 8 : 1871-1883.

Ramos A. C., Façanha A. R., Palma L. M., Okorokov L. A., Cruz Z M A., Silva A. G.,

Siqueira A. F., Bertolazi A. A., Canton G. C., Melo J., Santos W. O., Schimithberger V. M. B., Okorokova-façanha A. L. 2011. An outlook on ion signaling and ionome of the mycorrhizal symbiosis. *Braz J Plant Physiol.* 23 : 79-89.

Read D J. 1989. Mycorrhizas and nutrient cycling in sand dune ecosystems. *Proc Royal Soc. Edinburgh.* 96 : 89-110.

hatimi A, Tahrouch S. 2007. Caractérisations chimique, botanique et microbiologique du sol des dunes littorales du souss-Massa. *biomatec Echo.* 2 : 85-97.

Garbaye J. 2013. La symbiose mycorhizienne: Une association entre les plantes et les champignons. Éditions QUAE,

Declerck S. 2014. Gestion intégrée du système sol/plante. Document non publié, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve. *Memoirs.* 5: 1-76

Karagiannidis N. & Hadjisavva-Zinoviadi S. (1998). The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutrient cycling in Agroecosystems*, 52, pp.1-7

Bansal, M., Chamola, N., Sarwar, N. & Mukerji, K.G. (2000). Mycorrhizosphere: interaction between rhizosphere microflora and VAM fungi. In Mukerji KG, Chamola BP, Singh J (eds) *Mycorrhizal biology*. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, pp 143-152.

Plenchette C., 2005. Mycorrhizes et nutrition phosphatée des plantes. Journées Techniques Fruits et Légumes et Viticulture Biologique, 6-7 décembre, Beaune, pp. 103-109.

Plenchette C., Perrin R., 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Can. J. Bont.*, 67 : 112-115.

Smith, S.E., Read D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Troisième édition, New York, Academic Press. 800.

Smith SE, Read DJ, 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd edn. Academic Press. London.

Sieverding (1991). Vesicular Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany

Chaudhary VB, Lau MK, Johnson NC (2008). Macroecology of Microbes-Biogeography of the Glomeromycota. Varma A. (ed.). *Mycorrhiza*: 529-561.

Mohammad M. J., Malkawi H. I., Shibli R. 2003. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on growth and nutrient uptake of barley grown on soils with different levels of salts. *Journal of Plant Nutrition.* 26: 125-137.

Mohammad J, Rushdi Hamadw S, Issa Malkawi H. 2003. Population of arbuscular mycorrhizal fungi in semi-arid environment of Jordan as influenced by biotic and abiotic factors. *J. Arid. Envir* 53: 409–417.

Chaudhary VB, Lau MK, Johnson NC (2008). Macroecology of Microbes-Biogeography of the Glomeromycota. Varma A. (ed.). *Mycorrhiza*: 529-561.

Brundrett M. C., Abbott L. K. 1991. Roots of jarraf forest plants. I. Mycorrhizal association of shrubs and herbaceous plants. *Australian Journal of Botany.* 39 : 445-457.

Morton JB, Bentivenga SP, Wheeler WW. 1993. Germ plasma in the International Collection of Arbuscular and Vesicular–arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528.

Brundrett M. C., Abbott L. K. 1991. Roots of jarraf forest plants. I. Mycorrhizal association of shrubs and herbaceous plants. *Australian Journal of Botany*. 39 : 445-457.

Brundrett M. C., Abbott L. k., Jasper D. A., 1999. Glomalean fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness of isolation procedures. *Mycorrhiza*. 8 : 350-314.

Bouazza Marouf K, Ighilhariz Z, de Lajudie p, Duponnois R, Bekki A. 2015. Assessing The Native Arbuscular Mycorrhizal Symbioses To Rehabilitate A Degraded Coastal Sand Dune In Algeria. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 8 : 194-202.

Sites internet

Dalpé Y., Monreal M. 2004. Arbuscular mucorrhiza inoculum to support sustainable corpping systems. *In Plant Management Network. Crop Management*.
<<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/amfungi/>>.

Haimet M. L. 2013. Mycorhizes, Auxiliaires discrètes du jardinier : Mycorhizes: Diagnostic et inoculation. Jardins de France [en ligne]. Disponible sur Internet :
< <http://www.jardinsdefrance.org/la-collection/622-mycorhizes-auxiliaires-discretes-dujardinier/mycorhizes-diagnostic-et-inoculation> >.

Pierart A., 2012. Interactions entre mycorhization, nutrition en phosphore et adaptation de la plante à la toxicité du nickel sur substrat ultramafique. Vers une optimisation de la mycorhization d'*Alphitonia neocaledonica*. Mém. Ingénieur Gestion Durable du Végétal en Horticulture et Aménagement Paysager, Agrocampus Ouest Angers, Univ. Nouvelle Calédonie, 42 p. [Agricultural sciences, Archives ouvertes HAL <dumas-00745807>].

Schoutteten F. 2004. La luzerne. Fiche Technique. Agro-industrie. Champagne Ardenne, p5.
<[http : // nutrition-luzerne. Org](http://nutrition-luzerne.Org)>.

Stevenin A. 2011. Symbiose mycorhizienne : développement de nouvelles méthodes pour la synthèse de glycoconjugués bioactifs. Thèse, Université Paris Sud - Paris XI, 329 p. [Archives ouvertes HAL <https://tel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/737492/filename/VA2_STEVENIN_ARNAUD_23092011.pdf>].

Les annexes

Annexe 1

- **Préparation du milieu Eau gélosé 1%**

Agar Agar : 1g

Eau distillé 100ml (Ph 6,8 à 7)

- **La préparation** : Agitation jusqu'à l'homogénéisation de produit.

Ce milieu est autoclaves pendant 20 minutes à 120°C

Solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938)

Solutions mères	Ingrédients	Quantités (g/l)	Solution finale ml/l
A	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	236,15	5
B	KNO ₃	101,11	5
C	MgSO ₄	120,40	2
D	KH ₂ PO ₄	136,10	1
E	CaCl ₂ 2H ₂ O	183,73	1
F	Séquestrant de fer	25,00	4
Micro- éléments	H ₃ BO ₃ MnCl ₂ 4H ₂ O ZnCl ₂ CuCl ₂ 2H ₂ O Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,572 0,362 0,110 0,050 0,025	1

Ph 6,0 à 6,5

Annexe 2

Les annexes

Préparation des produits pour 250 ml : /2=12,5

FAA 1 volume de formaldéhyde 37° 25 ml 12,5

1 volume d'acide acétique glacial 25 ml

8 volumes d'alcool éthylique à 70° 140 ml

Éthanol de 96 %

Donc 140 ml (96 %) + eau = 200 ml (70°)

65g 100ml

KOH 10% on a KOH 85% ça veut dire que 15 est impure

29,4g 20g 100ml 2g 3, 52

10g 100ml 10g 1, 76

8,5g pur+1,5g impure 8, 5 1, 5 KOH (20%)

23, 52g 100ml

58, 8 250ml

H2O2 10% 11, 76 100ml

29, 4g 250ml

Acide lactique à 10% on a acide lactique 30% donc (1/3)

83,33 ml 1 volume d'acide + 2 volume d'eau

1 volume d'acide + 8 volumes d'eau 90% 10%

$V = 27,77 * 8 =$ VE = 222,22 ml eau

27,77= A lacique

Bleu de tripan dans lactophénol lactophénol 50/50 volume acide lactique et phénol

125 ml phénol + 125 ml acide lactique

250 ml lactophénol

+

0,25 g bleu de trypan

Les annexes

La solution de bleu de trypan

0,1% 0,1g 100ml

1% = 2,5% 0,25 250 ml

Préparation de saccharose 60g 100ml

Protocole de Coloration et observation des Mycorhize (d'après Vierheilig *et al.*, 1998. et adapté par Diane Rivaton)

Prélèvements des racines :

-Prendre l'aliquote de racine destinée à cette observation qui a été congelé dans un pilulier lors de la récolte

des plantes pièges et le faire décongeler en ajoutant de l'eau distillée à T°C ambiante

-A l'aide d'une pissette d'eau distillée, récupérez l'ensemble du contenu du pilulier et le versez dans un couvercle en verre

-A l'aide d'un scalpel, d'une pince et d'un couvercle en verre, découper les racines en tronçons de 2-3 cm environ

Coloration encre Shaeffer (Vierheilig *et al.*, 1998) dans les caissettes de coloration :

-Réglez le bain marie à 90°C

-Mettre dans le bain marie 1) le bocal de solution de KOH 10% et 2) le bocal de solution de coloration (5% encre Shaeffer et 5% acide acétique)

-Dans chacune des caissettes, mettre un échantillon de fragments de racines découpées à colorer, et attachez ensemble les différentes caissettes avec un fil de fer fin

-Quand les solutions dans les bocaux sont à 90°C, mettre les caissettes dans la solution de KOH et laissez incuber 10 min.

-Après ce temps, rincez les caissettes dans 1 bain d'eau distillée froide

-Placez ensuite les caissettes dans la solution de coloration (5% encre Shaeffer et 5% acide acétique), laissez incuber pendant un temps égal à l'incubation dans le KOH, soit 10 min.

-Une fois colorées, rincez à nouveau les caissettes dans 1 bain d'eau distillée froide,

-Puis, terminez par un dernier bain dans la solution de décoloration à 2% d'acide acétique pendant 24h

-Rincez ensuite dans un dernier bain d'eau distillée froide, puis monter entre lames et lamelles pour observation

Observation mycorhization :

Pour chacune des caissettes :

-Prélevez aléatoirement 30 fragments de racines colorés

-Positionnez 10 fragments par lames où ont été tracé 2 lignes distantes de 1 cm

-Pour l'observation, monter entre lames et lamelles dans une goutte d'eau glycinée (50%eau+50%glycérol) et

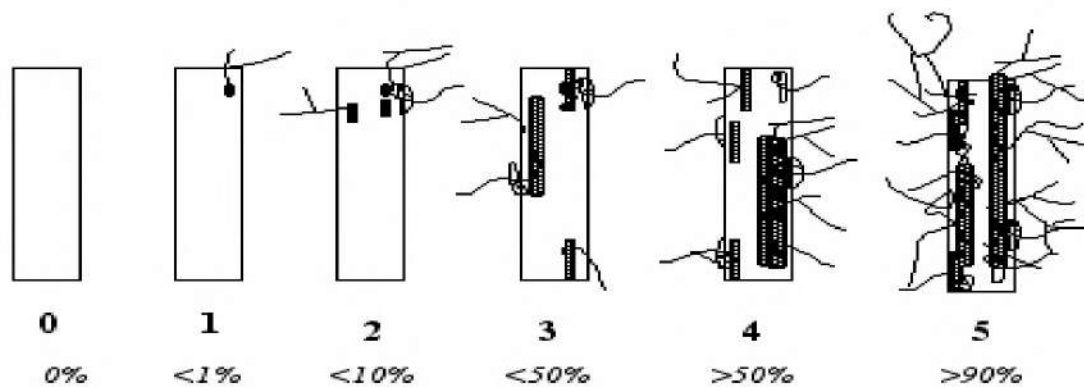
passer un trait de vernis transparent sur le contour pour une longue conservation observez sous microscope optique (X 100) pour compter les arbuscules et sous binoculaire (X 20) pour déterminer la

Les annexes

colonisation racinaire par les mycorhizes.

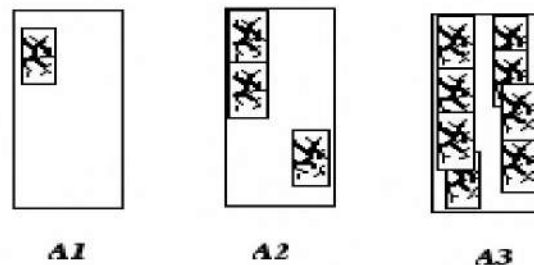
Annexe3

SCORING MYCORRHIZAL COLONIZATION IN CLASSES FROM 0 TO 5



SCORING ARBUSCULE ABUNDANCE

None : A0
Few arbuscules : A1
Frequent : A2
Abundant : A3



Annexe 3 : Echelle d'évolution de la présence des arbuscules.

Annexe4

Technique de calcul des paramètres définis par Trouvelot et al (1986)

Densité de colonisation du cortex

On observe au microscope 30 fragments racinaires d'environ 1 cm chacun traités selon la technique de Phillips et Hayman (1970). On attribue à chaque fragment une note de classe comprise entre 0 et 5 correspondant à l'estimation de la proportion de cortex colonisé par le symbiote mycorhizien :

0 : pas d'infection

1 : trace

2 : moins de 10 %

3 : de 11 à 50 %

4 : de 51 à 90 %

5 : plus de 90 %

Qualité arbusculaire :

La présence des arbuscules est notée simultanément en indiquant leur classe de fréquence de

A à A

0 % : pas d'arbuscule

10 % : A

50 % : A

100 % : A

Calculs des paramètres :

a. Fréquence de mycorhization (F) :

$$F\% = [(N - n_0) / N] \times 100$$

N : Nombre de fragments observés

n_0 : Nombre de fragments sans trace de mycorhization

b. Intensité de mycorhization (M)

$$M\% = (95 \times n_5) + (70 \times n_4) + (30 \times n_3) + (5 \times n_2 + n_1) / N$$

n_5, n_4, n_3, n_2 et n_1 sont les nombres de fragments notés 5, 4, 3, 2 et 1 respectivement.

c- Teneur en arbuscules de la partie mycorhisée (a) :

$$A\% = (100 \times m_A) + (50 \times m_A) + (10 \times m_A) / 100$$

m_A, m_A et m_A représentent le pourcentage de mycorhization de qualité arbusculaire donnée, calculées selon :

$$m_A = [(95 \times n_{5A}) + (70 \times n_{4A}) + (30 \times n_{3A}) + (5 \times n_{2A}) + n_{1A}] \times F / M(N - n_0)$$

$n_{5A}, n_{4A}, n_{3A}, n_{2A}$ et n_{1A} sont les nombres de fragments notés 5A, 4A, 3A, 2A, 1A respectivement.

d. Teneur en arbuscules du système racinaire (A)

$$A\% = a \times M / 100.$$

II.2.1.5 Estimation de la colonisation MA naturelle des racines

Le pourcentage de colonisation des racines est calculé selon la méthode de Trouvelot *et al.*, (1986). Cette méthode reflète autant que possible le potentiel et l'état d'activité de la symbiose.

Les fragments racinaires de *Medicago sativa* L. observés ont été notés dans un tableau (annexe 2), selon un barème de notations (Fig. 18), ce barème permet d'estimer rapidement le degré de colonisation mycorhizienne et la richesse en arbuscules.

Avec cette méthode cinq paramètres de la colonisation ont été calculés, à savoir :

➤ **Fréquence de la colonisation mycorhizienne (F%)** : qui reflète le degré de la colonisation du système racinaire.

➤ **Intensité de la colonisation mycorhizienne** : qui exprime la portion du cortex colonisée par rapport à l'ensemble du système racinaire.

M% : intensité de mycorhization relative

m % : intensité de mycorhization absolue

Les annexes

Avec n_5, n_4, n_3, n_2, n_1 sont les nombres de fragments respectivement notés dans les cinq classes d'infection marquant l'importance de la mycorhization à savoir :

5 = plus de 95% ; 4 = de 50% à 95% ; 3 = de 30% à 50% ; 2 = de 1% à 30% et 1 = 1% du cortex.

☞ **Intensité arbusculaire : a %** : Abondance en arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments racinaires.

Où mA_3, mA_2, mA_1 = % de m, classés A3, A2, A1, respectivement.

$F\% = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre des fragments totaux}) * 100$

$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nombre des fragments totaux})$

$m\% = M\% * (\text{nombre des fragments totaux} / \text{nombre des fragments mycorhizés})$

$a\% = (100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1) / 100$

	SF			F			G		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
F%		93.33%		100%	100%	96.66%	70%	66.66%	80%
M%		45.26%		25.43%	27%	50.03%	25.93%	5.96%	37.93 %
m%		48.49%		25.43%	27%	51.75%	37.04%	8.51%	54.18 %

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques des huit types de symbiose mycorhizienne (Garbaye, 2013)

Les annexes

-Récoltez les spores et observer sur boîte de pétri sous loupe binoculaire

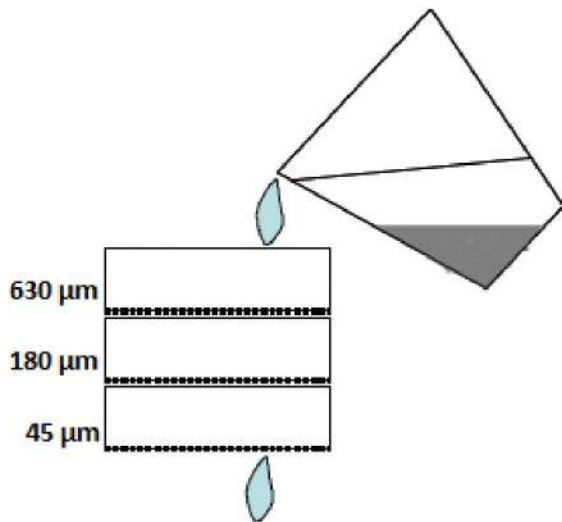


illustration schématique du tamisage par voie humide (adapte de gerdemann et nicholson, 1963)

Annexe 6

Les appareils utilisés

Les annexes



Un matériel utilisé pour l'éclaircissement des racines