

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE "DR. TAHAR MOULAY SAÏDA"

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER

SPECIALITE : Biologie

OPTION : Microbiologie appliquée

Thème :

**Contribution à l'étude du statut mycorhizien de *Medicago sativa L.* en zone aride (Naâma)**

PRESENTÉ PAR:

Aguis Hayat

Soutenue le : 29/10/2017

Membres du jury :

|                  |                           |                     |                             |
|------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|
| <b>Président</b> | : Mr Terras Mohamed       | Maitre conférence A | Université Dr. Moulay Tahar |
| <b>Examineur</b> | : Mr Berroukche Abdelkrim | Maitre conférence A | Université Dr. Moulay Tahar |
| <b>Encadreur</b> | : Mm Fares Soria          | Maitre assistant A  | Université Dr. Moulay Tahar |

**Année Universitaire : 2016-2017**

## **Remerciements**

*Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui ma a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Je voudrais présenter mes remerciements à mon encadreur Mm **Fares Soria**, Maitre assistante à l'université Dr. Moulay Tahar de Saida.*

*Je voudrais également lui témoigner mon profonde gratitude pour sa gentillesse, son aide et le temps qu'elle ma a consacré durant toute la période du travail.*

*Je tiens à remercier **D' Terras Mohamed**, Maître de conférences à l'université Dr. Moulay Tahar de Saida, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.*

*Mes vifs remerciements vont également à **D'Berroukche Abdelkrim**, Maitre de conférences à l'université Dr. Moulay Tahar de Saida pour l'intérêt qu'ils portent à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.*

*Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *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 mes chères sœurs : Chahra, Faiza, Amel, Ikram.*

*Je ne peux pas oublier mes très chères amies, Nour El Houda, Zoubida, Karima pour leurs soutiens et leurs sacrifices.*

*Hayat Aguis.*

## Résumé

Dans le but d'application des biofertilisants à base de mycorhize pour le développement durable.

Notre étude ont été menée pour estimer le taux de colonisation mycorhizienne arbusculaire naturelle de *Medicago sativa L.* provenant d'un site localisé dans une zone aride de l'Ouest Algérien (Naâma) et pour isoler les spores des champignons mycorhiziens à arbuscules indigènes du sol rhizosphérique de *Medicago sativa* en essayant de les identifier morphologiquement.

Dans la première partie de l'étude, trois plantes de *Medicago sativa L.* récoltées pour chaque stade ; (stade sans floraison, stade de floraison, stade de formation de gousse) ont été estimées selon un barème de notations de la colonisation endomycorhizienne. Les examens microscopiques de ses racines ont révélé la présence des champignons mycorhiziens à arbuscules, des taux de colonisation élevés pour tous les stades.

Dans la deuxième partie de l'étude, des plantes de maïs ont été utilisées comme plante-piège pour obtenir des spores de champignon mycorhizien à arbuscules sain pour l'identification morphologique. Les résultats ont montré que la plupart des racines observées ont été fortement mycorhizés par les champignons mycorhiziens à arbuscules à des taux élevé 90% comparée aux racines des plantes témoins qui ne présentent aucune colonisation fongique. Ainsi que l'isolement des spores révèlent différents morphotypes avec une densité très réduite.

**Mots clés :** biofertilisants, mycorhize, *Medicago sativa L.*, zone aride, champignon mycorhizien à arbuscules, rhizosphérique, endomycorhizienne, maïs.

## Abstract

For the purpose of applying biofertilizers based on mycorrhiza for sustainable development.

Our study was conducted to estimate the natural colonization rate of *Medicago sativa L.* from a site located in an arid zone of western Algeria (Naâma) and to isolate spores of native arbuscular mycorrhiza fungi from the rhizosphere soil of *Medicago sativa L.* by trying to identify them morphologically.

In the first part of the study, three *Medicago sativa L.* plants harvested for each stage; (stage without flowering, stage of flowering, stage of formation of pod) were estimated according to a scale of notations of the colonization endomycorrhizal. Microscopic examination of its roots revealed the presence of arbuscular mycorrhiza fungi, high colonization rates for all stages.

In the second part of the study, maize plants were used as a trap plant to obtain arbuscular mycorrhiza fungi spores for morphological identification. The results showed that most of the observed roots were strongly mycorrhized by the arbuscular mycorrhiza fungi at high levels 90% compared to the roots of the control plants which showed no fungal colonization. As well as the isolation of the spores reveal different morphotypes with a much reduced density.

**Keywords:** biofertilizers, mycorrhiza , *Medicago sativa L.*, arid zone, arbuscular mycorrhiza fungi, rhizosphere, endomycorrhizal, maize.

## ملخص

لغرض تطبيق الأسمدة الحيوية باستخدام الفطريات الجذرية من أجل التنمية المستدامة .  
قد أجريت دراستنا لتقدير معدل الاستعمار الطبيعي لنبتة الفصة من موقع في منطقة قاحلة من  
غرب الجزائر (النعام) وعزل الابواغ الأصلية من تربة نبتة الفصة من خلال محاولة التعرف عليها  
شكليا.

في الجزء الأول من دراستنا، ثلاث نباتات من نوع الفصة حصدت لكل مرحلة (مرحلة بدون  
أزهار، مرحلة مزهرة، مرحلة تكوين القرون) تم تقديرها وفقا لمقياس من رموز الاستعمار إندوميكوريز.  
كشف الفحص المجهرى لجذوره وجود الفطريات الجذرية، وارتفاع معدلات الاستعمار في جميع  
المراحل.

في الجزء الثاني من الدراسة، تم استخدام نباتات الذرة كنبات فح للحصول على ابواغ الفطريات  
سليمة لتحديد الهوية المورفولوجية. أظهرت النتائج أن معظم الجذور التي تمت ملاحظتها كانت تحتوي  
على الكثير من الفطريات بنسبة 90%، بالمقارنة مع جذور النباتات الشاهدة التي لم تظهر أي استعمار  
فطري. كما ان عزل الابواغ اظهر انواع مختلفة مع كثافة منخفضة.

الكلمات الرئيسية: الأسمدة الحيوية؛ فطريات جذرية؛ الفصة؛ منطقة قاحلة؛ التربة؛ إندوميكوريز

الذرة.

# Table de matiere

**Remerciement**

**Dédicace**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction ..... 1**

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

I.1 Symbiose mycorhizienne..... 5

I.1.1 Principaux types de la symbiose mycorhizienne..... 5

I.1.1.1 Ectomycorhizes (ECM)..... 7

I.1.1.2. Endomycorhize..... 8

I.2. Symbiose mycorhizienne à arbuscules..... 8

I.2.1. Partenaires de la symbiose mycorhizienne à arbuscules..... 9

I.2.1.1. plante hôte..... 9

I.2.1.2. Champignon ..... 10

I.2.1.2.1. Taxonomie et phylogénie des CMA actuelle..... 10

I.2.1.2.2. Ecologie et distribution géographique des CMA ..... 12

I.2.1.2.3. Structure des champignons mycorhiziens à arbuscules..... 13

I.2.1.2.3.1. Spores ..... 13

I.2.1.2.3.2 Arbuscules ..... 14

I.2.1.2.3.3 Vésicules ..... 15

I.2.1.2.3.4 Hyphes..... 16

I.2.1.2.3.5 Cellules auxiliaires ..... 17

I.2.1.2.4. Morphologie des champignons mycorhiziens à arbuscules..... 17

I.2.1.3. Spécificité d'hôte..... 18

I.2.1.4. Etablissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules..... 19

I.2.1.4.1. Phase a-symbiotique ..... 19

I.2.1.4.1.1 Germination de la spore et ramification de l'hyphe germinative 19

I.2.1.4.2. Phase pré-symbiotique ..... 20

|  |    |
|--|----|
| I.2.1.4.3. Phase symbiotique .....                                 | 22 |
| I.2.1.4.3.1 Développement d'appressorium ou hyphopodium.....       | 22 |
| I.2.1.4.3.2 Pénétration du champignon mycorhizen à arbuscules..... | 23 |
| I.2.1.4.3.3 Développement intra-racinaire.....                     | 23 |
| I.2.1.4.3.4 Développement extra-radiculaire.....                   | 24 |
| I.2.1.5. Importance de la symbiose mycohyzienne à arbuscules.....  | 24 |
| I.2.1.5.1 Rôle nutritif des CMA vis à vis des plantes.....         | 25 |
| I.2.1.5.1.1 Apport en phosphore.....                               | 25 |
| I.2.1.5.1.2 Apport en Azote.....                                   | 26 |
| I.2.1.5.1.3 Apport en d'oligo-éléments.....                        | 26 |
| I.2.1.5.1.4 Apport en eau.....                                     | 27 |
| I.2.1.5.2. Rôle nutritif des plantes vis à vis des CMA.....        | 27 |
| I.2.1.5.2.1 Apport en carbone .....                                | 27 |
| I.2.1.5.3. Rôle protecteur des CMA vis à vis des plantes.....      | 28 |
| I.2.1.5.3.1 Résistance aux stress biotiques et abiotiques.....     | 28 |
| I.2.1.5.3.1.1. Protection des agents pathogènes.....               | 28 |
| I.2.1.5.3.1.2.Stress hydrique.....                                 | 29 |
| I.2.1.5.3.1.3Stress salin.....                                     | 30 |
| I.2.1.5.3.1.4 Pollution.....                                       | 31 |
| I.2.1.5.4. Autres bénéfiques apportés par les CMA.....             | 32 |
| I.2.1.5.4.1 Effet sur la structure du sol.....                     | 32 |
| I.2.1.5.4.2. Production d'hormones.....                            | 32 |
| I.2.1.6.Technologies de production d'inoculum mycorhizien.....     | 33 |
| I.2.1.6.1 Inoculum mycorhizien .....                               | 33 |
| I.2.1.6.2 Méthodes de production .....                             | 33 |
| I.2.1.6.3 Etapes de production d'inoculum mycorhizien .....        | 34 |
| I.2.1.6.4 Qualité des inoculums .....                              | 34 |
| I.2.1.6.5 Production industrielle d'inoculant mycorhizien.....     | 35 |
| I.3 Présentation de la plante d'intérêt .....                      | 35 |
| I.3.1. Medicago sativa L.....                                      | 35 |
| I.3.2. Origine et répartition.....                                 | 36 |
| I.3.3. Systématique.....   | 36 |
| I.3.4. Description morphologique .....                             | 37 |
| I.3.5. Cycle de développement .....                                | 38 |

|   |    |
|---|----|
| I.3.6. Intérêt et utilisation .....                                 | 39 |
| I.3.6.1. Rôle agronomique.....                                      | 39 |
| I.3.6.2. Rôle écologique .....                                      | 40 |
| I.3.6.3. Rôle économique.....                                       | 40 |
| I.3.6.4. Rôle nutritionnelle .....                                  | 40 |
| I.3.6.5. Intérêt et utilisation industriel et biotechnologique..... | 41 |

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

|  |    |
|--|----|
| II.1. Matériel .....   | 43 |
| II.1.1. Matériel végétal.....  | 43 |
| II.1.2. Sol.....   | 43 |
| II.2. Méthodologie suivie pour l'étude des mycorhizes .....  | 43 |
| II.2.1 Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes ..... | 43 |
| II.2.1.1 Echantillonnage .....   | 43 |
| II.2.1.2 Lavage.....   | 44 |
| II.2.1.3 Eclaircissement et coloration des racines .....   | 44 |
| II.2.1.4 Montage et observation des racines .....  | 45 |
| II.2.1.5 Estimation de la colonisation MA naturelle des racines .....                                  | 46 |
| II.2.2 Protocole d'isolement des spores des CMA .....  | 47 |
| II.2.2.1 Piégeage des endomycorhizes .....   | 47 |
| II.2.2.2 Extraction des spores .....   | 49 |
| II.2.2.3 Dénombrement des spores .....   | 50 |
| II.2.2.4 Caractérisation morphologique des spores.....   | 50 |
| II.3 Traitement des données.....   | 52 |

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

|   |           |
|---|-----------|
| III.1. Estimation de la colonisation MA naturelle des racines.....          | 54        |
| III.2. Piégeage des endomycorhizes .....                                    | 57        |
| III.3 Dénombrement des spores CMA.....                                      | 64        |
| III.4 Diversité spécifique et répartition des CMA dans le site d'étude..... | 64        |
| <b>Conclusion générale et perspectives .....</b>                            | <b>68</b> |

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Liste de figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Schéma montrant la différence entre les ectomycorhizes et les endomycorhizes des racines des plantes (Bonfante et Genre, 2010).....   | 08 |
| <b>Figure 2</b> : Phylogénie actuelle des Glomeromycota, tirée de (Redecker <i>et al.</i> , 2013)..   | 11 |
| <b>Figure 3</b> : Représentation schématique d'une MA (Fortin <i>et al.</i> , 2008).....  | 13 |
| <b>Figure 4</b> : Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe.....   | 14 |
| <b>Figure 5</b> : Arbuscule fongique de <i>Glomus</i> .....   | 15 |
| <b>Figure 6</b> : 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) citée dans (Garbaye, 2013).....  | 15 |
| <b>Figure 7</b> : Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans (Garbaye, 2013).....  | 16 |
| <b>Figure 8</b> : Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005).....  | 17 |
| <b>Figure 9</b> : Représentation schématique des trois principaux types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhize arbusculaire (Garbaye, 2013).....   | 18 |
| <b>Figure 10</b> : Résumé schématique du processus de la colonisation MA des racines (Bonfante et Genre, 2010).....   | 22 |
| <b>Figure 11</b> : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'échange des principaux nutriments entre le CMA et sa plante hôte (Romas <i>et al.</i> , 2011).....  | 28 |
| <b>Figure 12</b> : Aspect de <i>Medicago sativa L.</i> .....  | 36 |
| <b>Figure 13</b> : Morphologie de la luzerne <i>Medicago sativa L.</i> (Childers, 2008).....  | 38 |
| <b>Figure 14</b> : (A) Séquence de germination des graines, développement des plantules et développement des tiges secondaires chez la luzerne. (B) Séquence des ramifications des tiges secondaires et tertiaires de la luzerne. (C) Schéma illustrant le développement des tiges (Teuber et Brick, 1988)..... | 39 |
| <b>Figure 15</b> : Rinçage des racines.....   | 44 |
| <b>Figure 16</b> : Protocole d'éclaircissement et coloration des racines de <i>Medicago sativa L.</i>   |    |
| <b>Figure 17</b> : Montage des racines.....   | 45 |
| <b>Figure 18</b> : Barème de notations de la colonisation endomycorhizienne et de la richesse en arbuscules (Trouvelot <i>et al.</i> , 1986).....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 19</b> : Dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton (1992) et walker (1992).....  | 47 |
| <b>Figure 20</b> : Protocole d'extraction des spores de CMA.....  | 48 |
| <b>Figure 21</b> : Caractéristiques morphologiques d'un grand nombre de Glomeromycota des classes jusqu'aux genres (Oehl <i>et al.</i> , 2011)..... | 50 |
| <b>Figure 22</b> : Structures mycorhiziennes arbusculaires observées dans les racines de <i>Medicago sativa</i> L.....                              | 51 |
| <b>Figure 23</b> : Comparaison de taux de colonisation MA naturelle de <i>Medicago sativa</i> L...56  |    |
| <b>Figure 24</b> : Plantes de maïs après 42 jours de culture. ....  | 57 |
| <b>Figure 25</b> : Aspect des hyphes extra-et intra-racinaire de CMA du maïs.....   | 58 |
| <b>Figure 26</b> : Aspect des arbuscules des CMA à l'intérieur des racines de maïs.....   | 59 |
| <b>Figure 27</b> : Aspect des spores et des vésicules des CMA à l'intérieur des racines de maïs...61  |    |
| <b>Figure 28</b> : Aspect de racine non mycozhiée. ....   | 62 |
| <b>Figure 29</b> : Aspect des cellules auxiliaires. ....  | 62 |
| <b>Figure 30</b> : Comparaison de taux de colonisation MA de maïs inoculé avec RM.....  | 63 |
| <b>Figure 31</b> : Variations de la moyenne de la hauteur de maïs inoculé avec RM. ....   | 63 |
| <b>Figure 32</b> : Différents morphotypes des spores isolées de la rhizosphère de maïs.....   | 65 |
| <b>Figure 33</b> : Caractéristiques morphologiques des spores de CMA (Brundrett <i>et al.</i> , 1994).  |    |

## **Liste des tableaux**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques des huit types de symbiose mycorhizienne (Garbaye, 2013)..... | 06 |
|--|----|

## Liste des abréviations

**ABA** : Acide abscisique.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**APP** : Appareil de pré-pénétration.

**C** : Carbone.

**Ca<sup>+2</sup>** : Ion de calcium.

**CMA** : Champignons Mycorhiziens à arbuscules

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone.

**DLUO** : Date Limite d'Utilisation Optimale.

**ECM** : Ectomycorhize.

**ETM** : Eléments traces métalliques

**FAA** : Formaldéhyde acide acétique.

**Fru** : fructose

**G** : Gramme.

**Glu** : Glucose.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**L** : Litre.

**K<sup>+</sup>** : Ion de potassium.

**KOH** : Hydroxyde de potassium.

**MA** : Mycorhize à Arbuscule/ mycorhizienne à arbuscule.

**MST** : Transporteurs de monosaccharide

**Myc** : Facteurs Mycorhiziens.

**N** : Azote.

**P** : Phosphore.

**pH** : Potentiel hydrogène.

**PO<sub>4</sub>** : Phosphate.

**Pth1** : Transporteurs de phosphore inorganique.

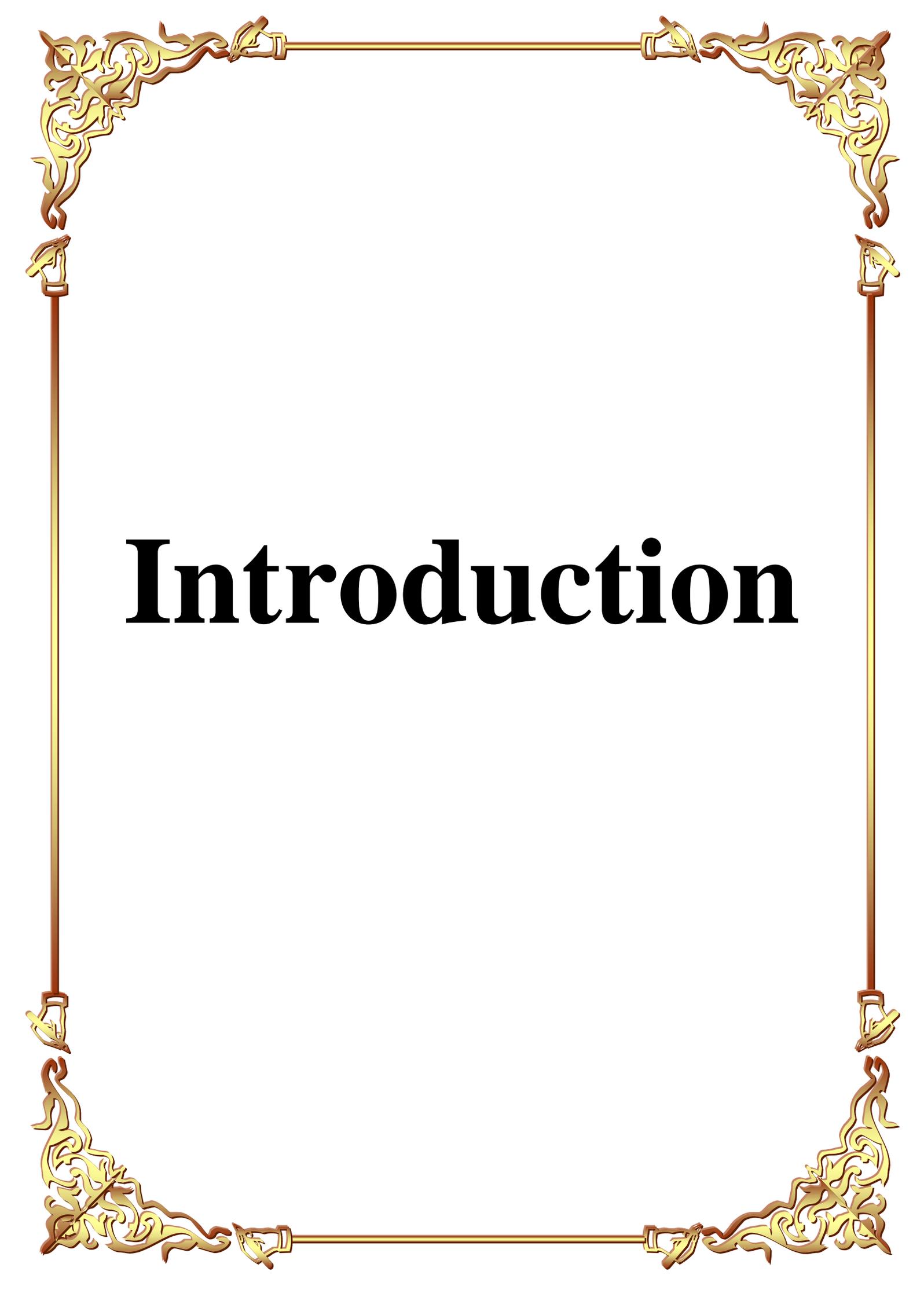
**spp**: Sous espèce au pluriel.

**SYM** : Gène de la symbiose

**Tr/mn** : Tours par minute

**µm** : Micromètre.

**%** : Pourcentage.



# Introduction

# Introduction

---

## 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,

## Introduction

---

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 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-radicaire 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 ans 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.

## Introduction

---

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)

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'excellences, 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).

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.



# **Chapitre I Synthèse bibliographique**

### I.1. Symbiose mycorhizienne

Il existe une multitude d'interactions entre les plantes et leur environnement biotique et abiotique depuis l'émergence de celles-ci (Simon, *et al.*, 1993 ; Brundrett, 2002). Les plantes ont adopté des stratégies en relation avec leur survie, leur évolution et leur pouvoir d'adaptation. Parmi celles-ci, les systèmes racinaires ont établi des relations, avec des microorganismes telluriques (Simon *et al.*, 1993).

Parmi ces microorganismes, les champignons du sol, les Basidiomycètes, Ascomycètes et Gloméromycètes sont les trois seuls groupes de champignons connus qui ont la possibilité de mettre en place des symbioses via leur association avec les racines des plantes (Garbaye, 2013).

Plus que 90 % des végétaux vivent de façons symbiotiques (Bonfante et Anca, 2009). Toutefois, il existe des plantes non mycotrophes, c'est le cas des Brassicacées, des Chénopodiacées, des polygonacées (Garbaye, 2013).

Le terme de symbiose se définit ici comme une relation entre deux organismes hétérospecifics qui se traduit par des effets bénéfiques aussi bien pour l'un que pour l'autre (De Barry, 1879 cité par Wipf, 2013). Cette association, ou symbiose, se nomme mycorhize.

Le mycorhize, (du grec 'mukês' pour champignon et 'rhiza' pour racine) association symbiotique d'un champignon mycorhizien avec les racines d'une plante (Pierart, 2012), c'est-à-dire en association intime, durable et à bénéfice mutuel (Garbaye, 2013).

Le principe fondement physiologique de cette symbiose est un partage bidirectionnel d'éléments nutritifs. la plante fournit au champignon des composés carbonés produit par la photosynthèse (Hopkins, 2003 ; Smith et Read, 2008 ; Hodge *et al.*, 2010 ) en retour, les champignons aident les plantes à puiser des éléments nutritifs dans le sol et à s'adapter au milieu (Fortin *et al.*, 2011) Outre son apport nutritionnel, les CMA jouent également un rôle crucial dans le développement des propriétés du sol et la santé de l'ensemble de l'écosystème (Garg et Chandel, 2010).

#### I.1.1 Principaux types de la symbiose mycorhizienne

Suivant leurs caractères écologiques, morphologiques, physiologiques et l'espèce végétal et fongique (Delian *et al.*, 2011), ces associations symbiotique sont récemment classées en huit types de mycorhizes : les mycorhizes à arbuscules (MA), les ectomycorhize (ECM), les ectendomycorhize, les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïde, éricoïdes et orchidoïdes, les pseudomycorhizes (Tab. 1) (Garbaye, 2013).

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

Tableau 3. Tableau récapitulatif des caractéristiques morphologiques des huit types de symbiose mycorhizienne décrits dans le texte.

| Types de symbiose mycorhizienne             | Groupes de plantes concernés                                     | Groupes de champignons dominants | Présence d'un manteau fongique | Morphologie du mycélium externe                                | Présence d'un réseau de Hartig | Colonisation intracellulaire        |
|---|--|----------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| Ectomycorhizes                              | Certains Gymnospermes et Angiospermes                            | Ascomycètes et Basidiomycètes    | Oui                            | Très diverse : filaments isolés, mèches, cordons, rhizomorphes | Oui                            | Non                                 |
| Ectendomycorhizes                           | Certains Pinacées (Gymnospermes)                                 | Ascomycètes                      | Facultatif                     | Filaments isolés   | Oui                            | Oui (filaments ramifiés)            |
| Mycorhizes arbutoïdes                       | Éricacées (tribus des <i>Arbutoideae</i> et <i>Pyroloideae</i> ) | Basidiomycètes                   | Facultatif                     | Filaments isolés ou mèches                                     | Oui                            | Oui (spires)                        |
| Mycorhizes monotropoïdes                    | Éricacées (tribu des <i>Monotropoideae</i> )                     | Basidiomycètes                   | Oui                            | Filaments isolés ou mèches                                     | Oui                            | Oui (doigts)                        |
| Mycorhizes orchidoïdes                      | Toutes les orchidées   | Basidiomycètes                   | Non                            | Filaments isolés   | Non                            | Oui (pelotons)                      |
| Mycorhizes éricoides                        | Autres Éricacées et certaines Bryophytes                         | Ascomycètes                      | Non                            | Filaments isolés   | Non                            | Oui (pelotons)                      |
| Pseudomycorhizes à endophyte brun cloisonné | Tous les groupes de plantes terrestres                           | Ascomycètes                      | Non                            | Filaments isolés   | Non                            | Oui                                 |
| Endomycorhizes arbusculaires                | Presque tous les groupes de plantes terrestres                   | Gloméromycètes                   | Non                            | Filaments isolés   | Non                            | Oui (arbuscules, spires, vésicules) |

Parmi les symbioses mycorhiziennes existantes, les ectomycorhizes et les mycorhizes à arbuscules sont les plus abondantes les plus répandues.

### I.1.1.1 Ectomycorhizes (ECM)

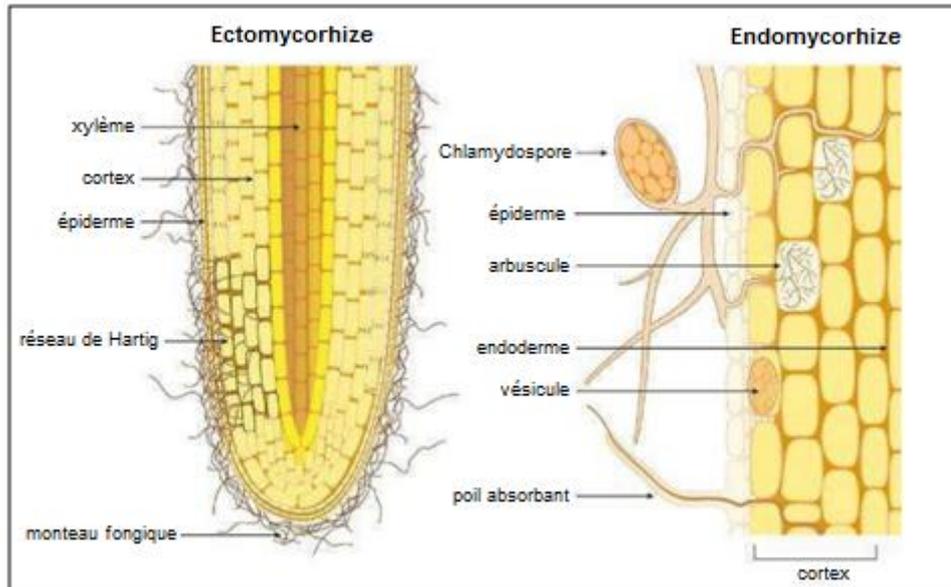
Ils existe environ 6000 espèces de plantes à ectomycorhizes (Rinaldi *et al.*, 2008 ; Brundrett, 2009 ; Tedersoo *et al.*, 2010) ; ces plantes appartiennent aux angiospermes (environ 6500 espèces), Gymnospermes (285 espèces) (Smith et Read, 2008 ; Vander Heijden *et al.*, 2008 ; Matsuda *et al.*, 2009 ; Brundrett, 2009). Les ectomycorhizes, bien qu'elles ne concernent que 3% des taxons végétaux, revêtent une importance particulière car les concernées (Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Nothofagaceae, Dipterocarpaceae, Myrtaceae, Sarcolaenaceae, Asteropeiaceae, Salicaceae, Tilliaceae, etc.) composent la plupart des forêts tempérées, méditerranéennes ou boréales ainsi que certaines forêts tropicales (Mille et Louppe, 2015).

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). La diversité des champignons ectomycorhiziens serait moins importante dans les régions tropicales que dans les régions tempérées (Tedersoo et Nara, 2010). Toutefois, ce constat serait sous-estimé, car les enquêtes restent encore relativement rares et de nombreuses espèces fongiques n'ont pas encore été identifiées dans les régions tropicales (Rivière *et al.*, 2007 ; Peay *et al.*, 2009).

Le degré de spécificité varie; certaines espèces de champignons sont spécifiques à une seule espèce d'hôte, tandis que d'autres peuvent former des ECM avec une large gamme de plantes (Allen, 1992).

Chez Les ectomycorhizes (du grec *ektos* : à l'extérieur), la racine mycorhizée, elle présente la morphologie d'une racine courte, renflée, ramifiée, ou même peu prendre la forme d'un racème (grappe) (Dexheimer, 1997 ; Fortin *et al.*, 2008). Où les champignons se développent essentiellement autour de la racine, en formant un manchon mycélien (le manteau) à partir duquel se développent des hyphes qui s'insèrent entre les cellules corticales de la racine pour former (le réseau de Hartig) (Fortin *et al.*, 2008). Le réseau s'étend jusqu'au cylindre central ou reste aux premières assises cellulaires (Dexheimer, 1997), dans lequel le mycélium ne se développe pas dans les cellules hôte (Fortin *et al.*, 2008). La plupart des champignons ectomycorhiziens se reproduisent par voie sexuée lorsque les conditions sont

favorables, les hyphes dicaryotiques donnent naissance à des fructifères (carpophores épigés ou hypogés) (Fig. 1) (Kernaghan, 2005).



**Figure 1** : Schéma montrant la différence entre les ectomycorhizes et les endomycorhizes des racines des plantes (Bonfante et Genre, 2010).

### I.1.1.2 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 (Fig. 1) (Smith et Read, 2008).

Une étude détaillée sur MA sera présentée dans la section suivante du fait qu'elles ont fait l'objet de notre travail.

## I.2 Symbiose mycorhizienne à arbuscules

Les mycorhizes à arbuscules sont les plus primitives et les plus répandues dans les écosystèmes naturels et cultivés (Tedersoo *et al.*, 2010), existe probablement depuis 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000 ; Schübler *et al.*, 2001).

Cette association fût appelée « mycorhize à vésicule et à arbuscule » vu la présence des vésicules et des arbuscules. Actuellement, il est rapporté que certaines associations avec les Glomeromycota ne forment pas de vésicules. Récemment, la terminologie « association mycorhizienne à arbuscule » est utilisée pour décrire la symbiose endomycorhizienne (Delian *et al.*, 2011).

Les mycorhizes à arbuscules se caractérisent par l'absence du manteau fongique autour de la racine. Au contact de la cellule racinaire, l'hyphe forme un appressorium. Le mycélium pénètre dans les cellules racinaires, franchit les parois et repousse le plasmalemme des cellules hôtes sans le traverser. Les hyphes passent ensuite de cellule à cellule en direction apicale et progressent également dans les espaces intercellulaires. Dans les cellules corticales, le champignon développe des arbuscules et dans la plupart des cas, des vésicules (Fig. 1) (Fortin *et al.*, 2008).

## **I.2.1 Partenaires de la symbiose mycorhizienne à arbuscules**

### **I.2.1.1. Plante hôte**

La symbiose MA est observée chez 92% des plantes étudiées (Wang et Qiu, 2006 ; Brundrett, 2009) appartenant aux angiospermes, aux ptéridophytes, certaines gymnospermes et même les gamétophytes de certaines plantes inférieures (lycopodes et mousses) (Smith et Read, 1997).

Zhang *et al.*, (2007) ont rapporté que de nombreuses espèces de mousses pouvaient être colonisées dans leur partie chlorophyllienne par des CMA. Cependant, en l'absence de données fonctionnelles d'échanges de nutriments, Davey *et al.*, (2006) suggèrent que le champignon se comporte plutôt comme saprophyte.

En revanche, 18% des plantes ont perdu ou supprimé leur faculté symbiotique probablement à cause des coûts de la symbiose qui dépasse leur capacité. Parmi 336 familles des angiospermes 53 ne sont pas mycorhizés et 40 autres ont un statut mycorhizien variable (Brundrett, 2009 ; Druva-Lusite et Levinsh, 2010). On distingue deux groupes de plantes non mycorhizées, le premier comprend des plantes des habitats perturbés riche en phosphore, par exemple : Amarantacées, Brassicacées, Caryophyllacées, Chénopodiacées, Polygonacées et Urticacées (Harley et Harley, 1987 ; Francis et Read, 1994 ; Olsson et Tyler, 2004). L'autre groupe comprend les plantes qui dominent les sols pauvres en phosphore et qui ont des racines spécialisées (racines protéoïdes, dauciformes). Ce groupe inclut les familles des Cypéracées, Haémodoracées, Protéacées et Restionacées (Tester *et al.*, 1987 ; Brundrett et Abbott, 1991 ; Watt et Evans, 1999 ; Shane et Lamber, 2005 ; Shane *et al.*, 2006) . En outre, des familles non mycorhizées peuvent comprendre certaines espèces mycorhizées telles que *Hakea verrucosa* de la famille des protéacées et *Costularia nervosa* de la famille des cypéracées (Boulte et Lambers, 2005 ; Lagrange *et al.*, 2011). Similairement, certaines espèces non mycorhizées (Brundrett et Abbott, 1991) ou même des genres sont inclut des familles mycorhizées (Lambers *et al.*, 2013b).

### I.2.1.2 Champignon

#### I.2.1.2.1 Taxonomie et phylogénie des CMA actuelle

Selon l'historique approfondi de la taxonomie et de la systématique des Glomeromycota (Stürmer, 2012), l'évolution de taxonomie et la phylogénie des CMA peut se décrire en quatre phases :

- La première est une période descriptive (1845 à 1974) est caractérisée par une description de la formation des espèces à sporocarpes et la proposition d'une classification de ces champignons,
- la seconde est basée sur la morphologie (1975-1989).
- La troisième est cladistique, à savoir fondée sur la mise en place d'outils moléculaires alliés aux méthodes morphologiques (1990-2000).
- Enfin, la quatrième est phylogénétique (2001-actuel) car s'appuyant uniquement sur des techniques moléculaires et informatiques.

Après de nombreux changements de la classification des Glomeromycota ces dernières années (Oehl *et al.*, 2008 ; Morton et Msiska, 2010 ; Schüßler et Walker, 2010 ; Oehl *et al.*, 2011a ; Oehl *et al.*, 2011b ; Oehl *et al.*, 2011c), la classification la plus récente prend en compte les aspects de phylogénie moléculaire et de morphologie (Redecker *et al.*, 2013).

Ces symbiotes fongiques sont actuellement classés dans le phylum des Glomeromycota le phylum des Glomeromycota fait mention d'environ 240 espèces décrites à ce jour, réparties en quatre ordres, onze familles et vingt-cinq genre (Fig. 2) (Redecker *et al.*, 2013).

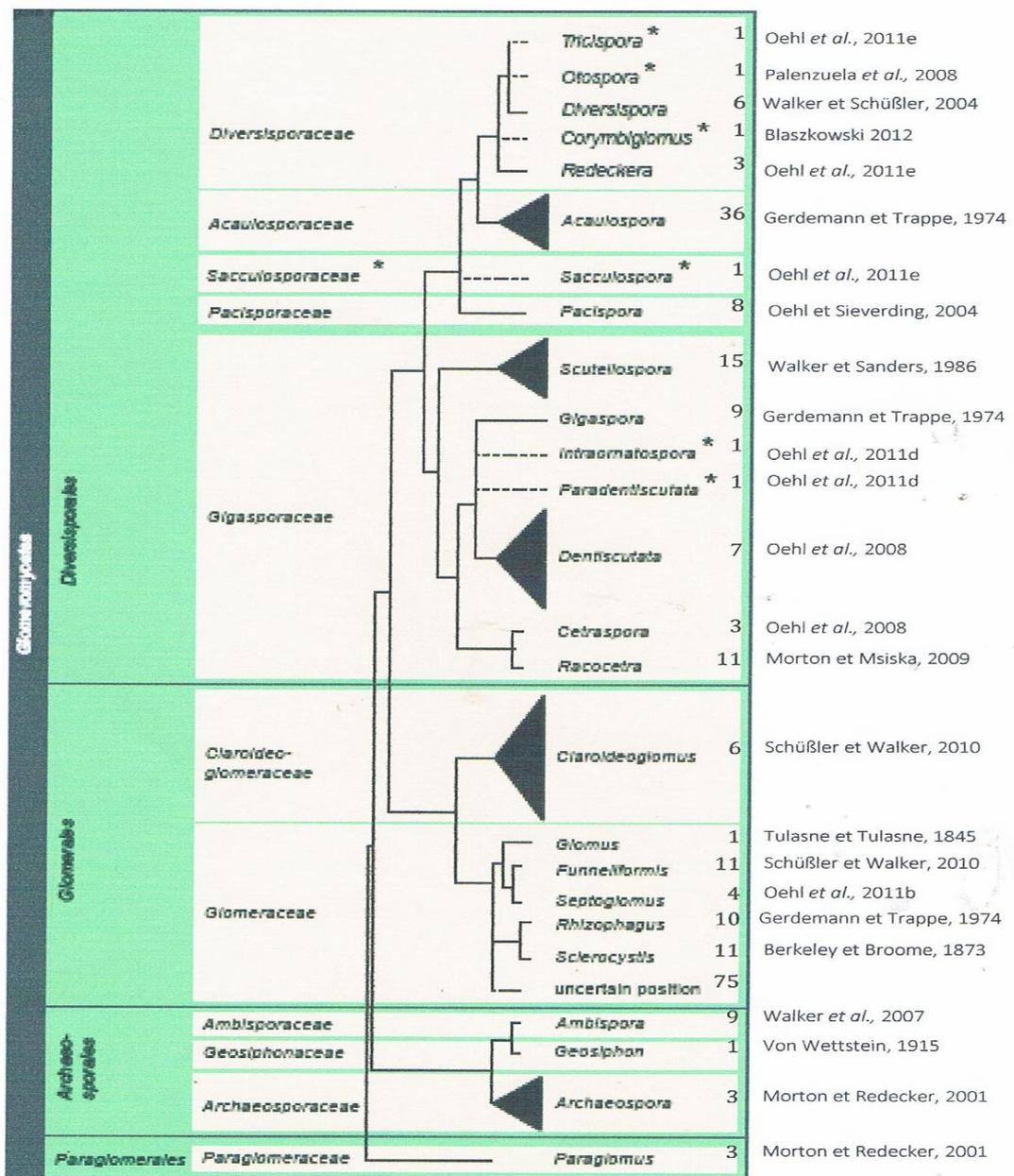
L'ordre des Paraglomerales (Schüßler *et al.*, 2001) compte une famille comprenant un seul genre : Paraglomus (Morton et Redecker, 2001b). Ce genre serait le clade qui a divergé en premier selon les études phylogénétiques basées sur l'ADN ribosomal (Redecker et Raab, 2006). Les trois espèces de référence décrites à ce jour forment des spores de petites tailles.

L'ordre des Archaeosporales (Walker *et al.*, 2007) comprend trois familles, incluant chacune un seul genre qui sont nommés : Archaeospora, Ambispora et Geosiphon. Au total, cet ordre présente environ une dizaine d'espèces décrites.

Les deux ordres les plus fournis en espèces décrites sont les Diversisporales et des Glomerales.

L'ordre des Diversisporales (Walker et Schüßler, 2004) est peut être le plus complexe puisqu'il regroupe cinq familles différentes. Trois d'entre elles, Acaulosporaceae,

Pacisporaceae et « Sacculosporaceae », ne contiennent qu'un genre chacune tandis que les deux familles restantes, Diversisporaceae et Gigasporaceae, en présentent un nombre incertain, comme le montre les astérisques de la (Fig. 2). Parmi les cinq genres de la famille des Diversisporaceae, seuls deux s'appuient sur des données moléculaires : les *Redeckera* comptant environ Trois espèces et les *Diversispora* environ une dizaine. La famille des Gigasporaceae, quant à elle, est composée de sept genres totalisant 35 espèces. Outre, les deux genres qui ont une position incertaine (lignes pointillées dans la Fig. 2) les cinq autres se nomment : les *Scutellospora*, les *Gigaspora*, les *Dentiscutata*, les *Cetraspora* et les *Racocetra*.



**Figure 2 :** Phylogénie actuelle des Glomeromycota, tirée de (Redecker *et al.*, 2013).

Les traits pointillés indiquent une position phylogénétique incertaine. Les astérisques, quant à eux, soulignent les genres pour lesquels il manque des données mais qui n'ont pas été remaniés. Le nombre d'espèces décrites par genre ainsi que les auteurs ayant décrit ces genres pour la première fois sont indiqués à droite.

L'ordre des Glomerales (Morton et Benny, 1990) comprend deux familles, les Claroideoglomeraceae et les Glomeraceae. La première présente un seul genre qui correspond à environ six espèces ; tandis que la deuxième famille comporte une centaine d'espèces réparties en au moins six genres (Fig. 2). Ces deux familles ont longtemps été confondues au sein des Glomeraceae puisque ce n'est que récemment que les Claroideoglomeraceae ont été séparés des Glomeraceae (Schüßler et Walker, 2010) .

#### **I.2.1.2.2. Ecologie et distribution géographique des CMA**

On les trouve dans de nombreux environnements et leur succès écologique reflète une forte diversité des capacités génétiques et physiologiques des champignons endophytes (Bonfante et Anca, 2009).

Le champignon mycorhizien étant peu spécifique, il n'existe aucun site naturel où il y a absence d'endomycorhizes sauf dans des zones tourbeuses, des dunes récentes et des dépôts morainiques (dépôts de sable, de cailloux et d'argile). La diversité et la distribution des CMA résultent des processus écologique temporaires agissant sur les communautés végétales et fongiques, la température, le pH et le niveau de P dans le sol ainsi que le génotype des plantes constituent des facteurs limitant la distribution des espèces de CMA tels que *Glomus sp.* et *d'Acaulospora leavis* (Johnson *et al.*, 2004).

L'intervention de l'homme peut aussi aboutir à la création de zones dépourvues d'inoculum endomycorhizien, c'est le cas d'exploitation minière et des déblais de toutes sortes. Il semblerait également que les landes à callunes soient dépourvues de mycorhizes. (Le Tacon *et al.*, 1999).

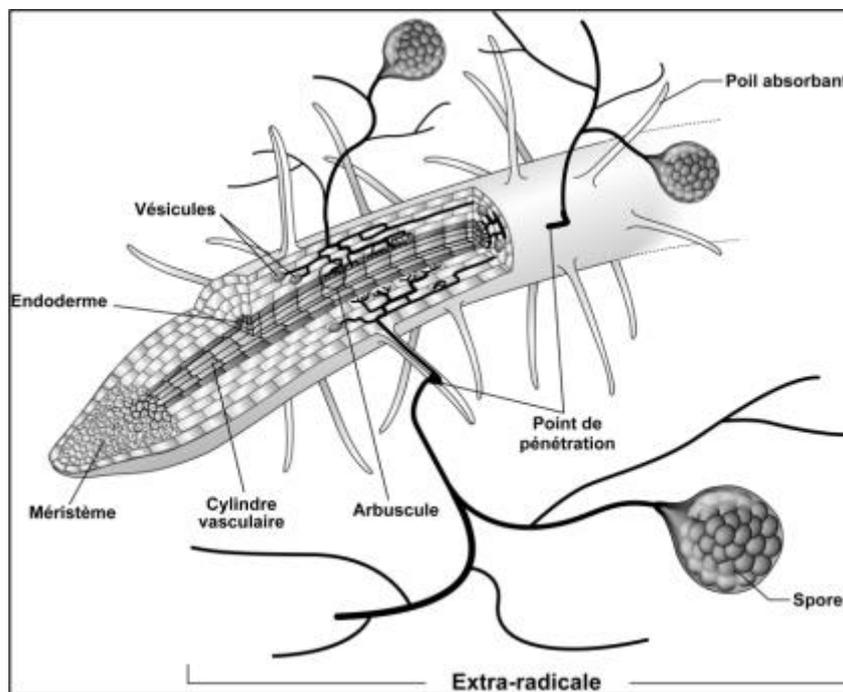
La connaissance de l'écologie des CMA est fondamentale pour comprendre la coexistence des différentes espèces, l'exploration par ces champignons des ressources disponibles en nutriments et leur reproduction ( Pringle et Bever, 2002 ; Hart et Klironomos, 2002)

Les glomérormycètes (anciennement appelées Glomales) et ne peuvent être cultivés axéniquement. Ce sont des mycosymbiotes obligatoires dont le cycle biologique dans le sol repose entièrement sur la présence de racines vivantes de la plante hôte (Fortin *et al.*, 2008),

qui leur fournit les éléments carbonés indispensables à leur développement (Smith et Read, 2008). À ce jour, aucune forme de reproduction sexuée n'a encore été décrite. Ils se propagent d'une façon végétative principalement via la formation de grosses spores généralement sphériques de 40 à 500  $\mu\text{m}$  de diamètre comportant quelques milliers de noyaux (Fortin *et al.*, 2008). Par conséquent les spores sont considérées comme asexuées (Smith et Read, 2008)

### I.2.1.2.3. Structure des champignons mycorhizens à arbuscules

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) (Fig. 3). Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre.



**Figure 3** : Représentation schématique d'une MA (Fortin *et al.*, 2008).

#### I.2.1.2.3.1 Spores

Les spores constituent la principale structure anatomique qui sert à la détermination morphologique des espèces de CMA (Koffi *et al.*, 2009).

Les spores des glomérromycètes sont en nombre variable dans le sol. Elles sont produites dans le sol sur le mycélium externe des endomycorhize arbusculaires, à l'extrémité des hyphes, et sont dispersées par les mouvements de particules de terre dus au vent et au ruissellement, mais elles sont aussi activement transportées par les petits animaux du sol (surtout les invertébrés comme les vers de terre ou les larves d'insectes). Par conséquent, La

spore sert d'organes de dispersion et conservation dans le sol (Garbaye, 2013) qui peut rester en dormance durant de longues périodes (Smith et Read, 2008).

Elles Atteignent des dimensions imposantes de 40 à plus de 500  $\mu\text{m}$ . Ces spores possèdent également des parois ou enveloppes extrêmement épaisse (2-35  $\mu\text{m}$ ) qui les protègent contre les stress environnementaux (Fig. 4) (Garbaye, 2013).



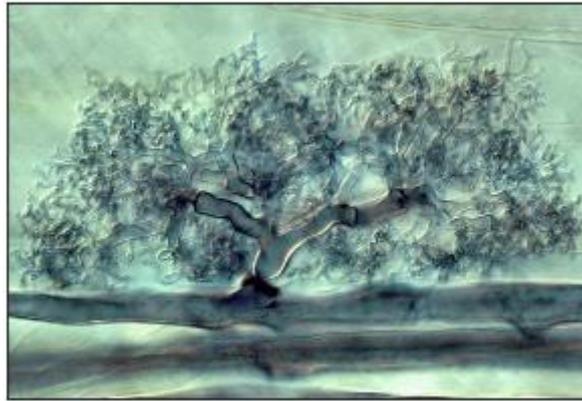
**Figure 4 :** Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe.  
(<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens>)

#### I.2.1.2.3.2 Arbuscules

L'arbuscule c'est une ramification latérale des hyphes fongiques dans les cellules du cortex racinaire (Guissou, 2001), leur taille varie de 2  $\mu\text{m}$  à 6  $\mu\text{m}$  (Dexheimer, 1997), jusqu'au moins d'un micro de diamètre (Fig. 5) (Brundrett, 1999).

L'arbuscule est intracellulaire mais pas intra-cytoplasmique puisqu'il se met en place entre la membrane plasmique et la paroi de la cellule végétale sans altérer l'intégrité de cette dernière. Cette structure, reliée aux hyphes, est donc un indicateur de l'activité symbiotique. La forme exacte des arbuscules varie selon le genre du CMA (Smith et Read, 2008).

L'arbuscule augmente la surface de contact entre les symbiose, cette interface arbusculaire représente le site d'échange des nutriments (Guether *et al.*, 2009). Leur début de formation est approximativement 2 jours après pénétration du champignon dans la racine et leur moyenne de vie peut atteindre quelque jours (2 à 15 jours) (Harley, 1986 ; Brundrett *et al.*, 1999).



**Figure 5 :** Arbuscule fongique de *Glomus*.

(De Mark Brundrett : <http://mycorrhizas.info/resource.html>)

#### **I.2.1.2.3.. Vésicules**

Ce sont des petits sacs à paroi épaisse, intra- ou intercellulaires, de forme variable (sphérique, allongées, lobées ou épousant la forme interne d'une cellule) et contenant un grand nombre de noyaux et gouttes de lipides (Fig. 6). La fonction de ces vésicules n'est pas connue, mais l'accumulation de réserve en carbone sous forme de lipide suggère fortement un rôle de conservation et dissémination du champignon après la mort de la racine. Cependant, les espèces de Gloméromycètes appartenant aux genres *Gigaspora* et *Scutellospora* ne forment jamais de vésicules elles portent à la place des cellules auxiliaires sur le mycélium extra-racinaire (Garbaye, 2013).

D'ailleurs, ce sont des propagules infectives (Declerck *et al.*, 1998) car elles possèdent une des propriétés analogue à celles des spores c'est pour quoi on utilise le terme « propagule » pour désigner à la fois les spores, les vésicules, les fragments de racine contenant des vésicules puisque toutes ces structures servent à propager l'espèce (Garbaye, 2013).



**Figure 6 :** 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) citée dans (Garbaye, 2013).

#### I.2.1.2.3.4 Hyphes

D'un point de vue morphologique, les hyphes des CMA sont coenocytiques (hyphes dépourvus de septa) (Reinhardt, 2007). La plupart des noyaux bougent ainsi librement dans les hyphes bien que certains situés en position latérale semblent immobiles (Bago *et al.*, 1999). Les hyphes intra-radiculaires sont reliés aux arbuscules et se prolongent de façon extra-radiculaire dans le sol. Elles se propagent dans le sol créant ainsi un réseau mycélien qui peut atteindre des longueurs importantes allant jusqu'à plusieurs dizaines de mètres par gramme de sol (Leake *et al.*, 2004). La capacité des différents CMA à former ces réseaux mycéliens peut différer (Voets *et al.*, 2006). Les CMA étant des biotrophes obligatoires, l'exploration du sol par le réseau mycélien participe à la survie du champignon car cela leur permet de rencontrer d'autres plantes hôtes. De plus, le réseau mycélien absorbe les éléments nutritifs du sol (azote, phosphore notamment) agissant comme une extension du système racinaire des plantes dans le sol (Fig. 7) (Newman et Reddell, 1987). En fonction de leur activité principale, on peut distinguer plusieurs types d'hyphes extra-racinaires :

- Les hyphes d'absorption, très ramifiées et minces, elles prélèvent les molécules du sol.
- Les hyphes conductrices ayant un diamètre plus important et un cytoplasme peu abondant.
- Les hyphes d'infection qui peuvent coloniser de nouvelles racines.
- Les hyphes sporogènes qui donneront naissance aux spores (Gavériaux, 2012).



**Figure 7 :** Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans (Garbaye, 2013).

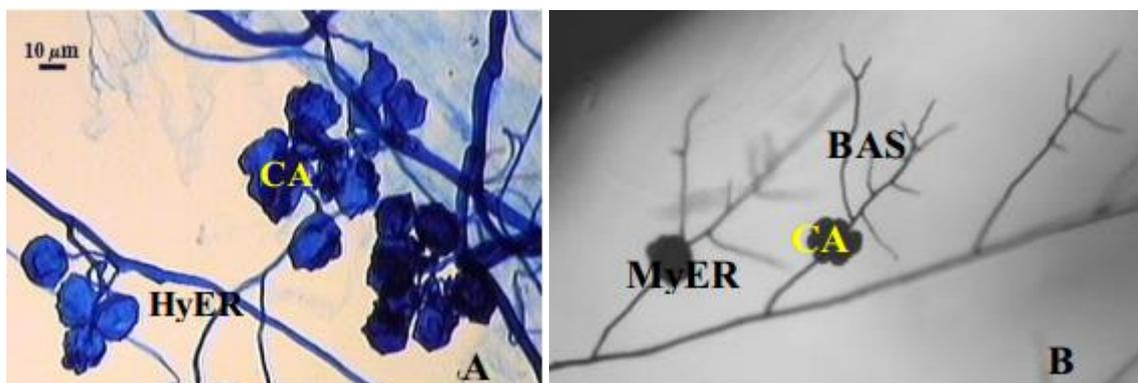
### I.2.1.2.3.5 Cellules auxiliaires

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  $\mu\text{m}$  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.



**Figure 8** : Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005).

**A** : morphologie des cellules auxiliaires attachées aux hyphes extra-racinaires (HyER).

**B** : Développement des cellules auxiliaires de *Gi. margarita* sur tronc des (BAS).

### I.2.1.2.4. Morphologie des champignons mycorhiziens à arbuscules

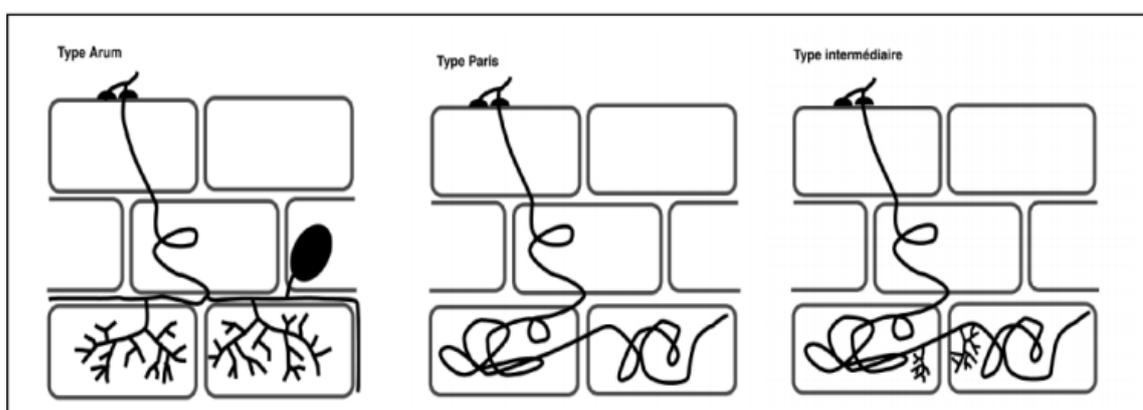
Les mycorhizes à arbuscules développent deux types morphologiques de colonisation décrits pour la première fois par Gallaud en 1905, qu'il a nommé type *Arum* et type *Paris* (Garbaye, 2013). Cependant elles sont abandonnées et considérées beaucoup plus tard par d'autres auteurs.

L'expression de type morphologie de la symbiose est contrôlée par le génome de la plante hôte (Smith et Smith, 1997) et le génome fongique (Cavagnaro *et al.*, 2001).

Dans le type *Arum*, le filament mycélien se ramifie et s'étend rapidement dans la direction longitudinale de la racine en progressant entre les assises cellulaires. Il émet des branches latérales qui pénètrent dans les cellules en traversant la paroi cellulosique et s'y ramifient très densément, en repoussant et invaginant la membrane. C'est le résultat de cette hyper-ramification, qui ressemble à un petit arbre (*arduscule*) (Fig. 9).

Dans le type *paris*, 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 (Fig. 9) (Garbaye.2013 ; Declerck, 2014).

Ces deux formes peuvent coexister dans une même plante et des formes intermédiaires entre ces deux formes sont également observées (Dickson, 2005 ; revue de Dickson *et al.*, 2007).



**Figure 9 :** Représentation schématique des trois principaux types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhize arbusculaire (Garbaye, 2013).

### I.2.1.3 Spécificité d'hôte

La symbiose mycorhizienne à arbuscules ne présente pas, au contraire d'autres endosymbioses, une spécificité d'hôte nette. Une plante donnée peut être mycorhizée par différentes espèces de champignons n'appartenant pas obligatoirement au même genre. De la même façon, une espèce de champignon est généralement capable de mycorhizer une grande variété de plantes n'appartenant pas au même taxon. De plus, il a été montré qu'un même individu fongique est capable de mycorhizer simultanément deux plantes adjacentes d'espèces différentes (Newman *et al.*, 1994).

L'absence de spécificité stricte peut s'expliquer par le caractère obligatoire de la symbiose pour ces champignons. Pour assurer sa multiplication, l'individu est contraint d'établir une relation symbiotique avec les plantes de son environnement immédiat, ce qui favorise un large spectre d'hôte. Il a été suggéré que l'hétérogénéité des matériels génétiques des champignons mycorhiziens soit l'un des facteurs assurant le large spectre d'hôte à ces

organismes, en permettant une diversité dans les systèmes de reconnaissance et de signalisation entre partenaires (Reinhardt, 2007).

D'autre part, la spécificité entre les partenaires de la symbiose est déterminée par plusieurs facteurs. En effet, les espèces végétales diffèrent dans la dépendance à la symbiose MA, certaines plantes ont des mycotrophes facultatives, tandis que d'autres sont des mycotrophes obligatoires. Récemment, le statut mycorhizien a été lié à la distribution et à la productivité des plantes (Van der Heijden *et al.*, 2008 ; Hempel *et al.*, 2013). Hausmann *et al.*, 2009 ont rapporté que les CMA peuvent être influencés à petite échelle par la communauté végétale locale et la plante voisine de la plante focale peut altérer les communautés CMA.

#### **I.2.1.4 Etablissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules**

La mise en place de la symbiose MA peut être envisagée comme une séquence programmée de changements phénotypiques, correspondant à des événements de reconnaissance distincts qui conduisent les deux partenaires, plante hôte et symbiote fongique, à un degré élevé d'intégration morphologique et physiologique (Garg et Chandel, 2010).

- Les étapes de la formation du mycorhize à arbuscules

L'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules commence par la colonisation d'une racine compatible avec les hyphes germinatives produites par les propagules de CMA (spores asexuées, racines déjà mycorhizées, ou des vésicules) (Strullu *et al.*, 1997 ; Genre *et al.*, 2005 ; Requena *et al.*, 2007).

##### **I.2.1.4.1 Phase a-symbiotique**

###### **I.2.1.4.1.1 Germination de la spore et ramification de l'hyphes germinative**

Les spores de CMA persistent dans le sol et peuvent germer spontanément, indépendamment des signaux d'origine végétale (Garg et Chandel, 2010) sous l'effet de facteurs environnementaux (Genre *et al.*, 2005), mais leur développement est limité (Akiyama *et al.*, 2005). En effet, les CMA ont perdu cette capacité de produire des mycéliums extensifs et à compléter leur cycle de vie, sans établir une symbiose fonctionnelle avec une plante hôte (Fig. 10) (Giovannetti *et al.*, 2002 ; Requena *et al.*, 2007).

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 CO<sub>2</sub>, 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 rétractation du protoplasme et réallocation des ressources en attendant de meilleures conditions (Logi *et al.*, 1998).

L'arrêt de la germination avant l'épuisement complet des ressources serait une stratégie pour augmenter les chances de rencontre avec une racine hôte appropriée et la coloniser (Bago *et al.*, 2000). Cependant, les spores des CMA sont capables de germer à nouveau et entrer à nouveau en dormance de nombreuses fois si des signaux racinaires ne sont pas perçus par le CMA. Par exemple, les spores de *Gigaspora margarita* sont capables d'alterner dormance et germination jusqu'à plus de 10 fois (Koske, 1981).

#### **I.2.1.4.3 Phase pré-symbiotique**

Au contraire, si le CMA perçoit une racine hôte à proximité, l'hyphe germinative se ramifie de manière importante dans le sol, des signaux seront envoyés par les deux organismes et le champignon passe alors au stade pré-symbiotique (Buée *et al.*, 2000).

La phase dite pré-symbiotique, est la reconnaissance et la rencontre entre un champignon et une racine compatible c'est à dire susceptibles de contacter l'association (Garbaye, 2013).

Cette phase est caractérisée par la croissance fongique, l'augmentation de l'activité physiologique et une ramification abondante d'hyphe, qui joue un rôle dans le développement des appressoria dans la symbiose MA (Fig. 10) (Garg et Chandel, 2010).

La symbiose est initiée par la communication à travers des signaux diffus dans le sol entre les deux partenaires, leur permettant d'être informé de leur présence respective avant contact physique entre les symbiotes (revue de Bonfante et Genre, 2010).

Il a été démontré que le champignon et la plante commencent à se reconnaître mutuellement longtemps avant que les premières structures de colonisation sur l'épiderme racinaire apparaissent (Requena *et al.*, 2007).

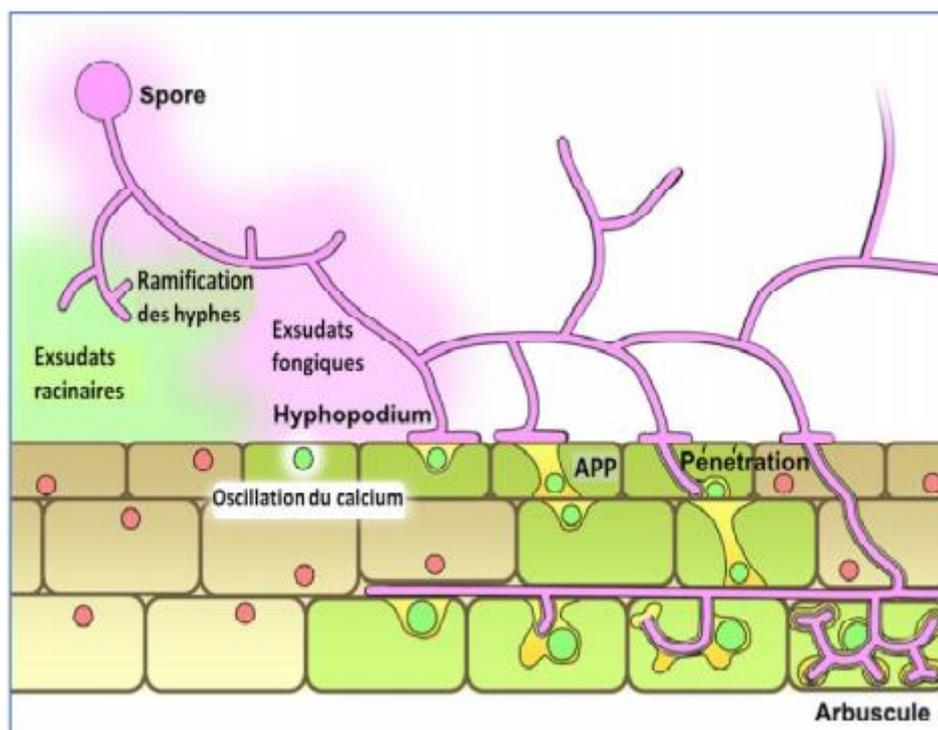
C'est le champignon qui réagit le premier de façon visible au niveau de son développement.(Garbaye, 2013). Cette réaction est déclenchée par la perception d'un signal émis en permanence par la racine sous la forme de molécules spécifiques à la plante comme des strigolactones, des hormones végétales et leurs précurseurs, des bêtaïnes ou encore et surtout des flavonoïdes. (Gavériaux, 2012 ; Garbaye, 2013). Toutes ces substances activent

chez le CMA l'expression du gène *Myc* puis de facteurs *Myc* (facteurs mycorhiziens). Ces facteurs *Myc* qui activent la voie de signalisation symbiotique dans la racine (Kosuta *et al.*, 2003), dénommée *SYM* (symbiosis pathway) allant de la paroi cellulaire jusqu'au noyau (Oldroyd et Downie, 2006 ; revue de Genre, 2012). Cette voie semble être impliquée dans le contrôle de l'établissement de la symbiose, en particulier juste avant le contact entre les deux symbiotes et les premières étapes de la colonisation. D'ailleurs, la mutation d'un de ces gènes bloque la colonisation fongique au niveau des cellules épidermiques et sous épidermiques (Fig. 10) (revue de Bonfante et Genre, 2010).

Les CMA sont capables de générer un nombre de molécules activant différentes voies de signalisation (revue de Bonfante et Genre, 2010) induisant différentes réponses chez la plante.

La localisation nucléaire de tous les éléments en aval de la « *SYM pathway* » suggère que le signal est rapidement traduit dans le noyau. Ces deux gènes sont connus pour leur propriété régulatrice de la symbiose mycorhizienne (Saito *et al.*, 2007). *MtDMI1* et *MtDMI2* chez *Medicago sativa*, sont tous deux essentiels pour le début des oscillations calciques dans le noyau et le cytoplasme périnucléaire via les tunnels et les transporteurs de  $Ca^{2+}$  (Oldroyd et Downie, 2006 ; Kosuta *et al.*, 2008) dont  $Ca^{2+}$  pourrait jouer le rôle de 2nd messenger (Fig. 10) (Requena *et al.*, 2007).

La transduction du signal conduit à l'activation d'une réponse transcriptionnelle et cellulaire conduisant des déformations dans les cellules de l'hôte pour l'établissement de la symbiose, ainsi que la croissance des hyphes colonisant les racines (Stevenin, 2011 ; Garbaye, 2013) et provoque l'accumulation des glucides dans les cellules corticales des racines serait une préparation essentielle à la colonisation future. En effet, ces glucides seront ensuite apportés au CMA (revue de Genre, 2012).



**Figure 10 :** Résumé schématique du processus de la colonisation MA des racines (Bonfante et Genre, 2010).

*Le dialogue moléculaire entre la plante et le champignon active une réponse cellulaire et transcriptionnelle (cellules et noyaux verts). L'adhésion d'hyphopodium sur la surface racinaire induit la formation d'APP (en jaune) dans la cellule épidermique adjacente à l'hyphopodium. A travers ce tube, l'hyphe colonise les cellules jusqu'au cortex interne. Ici, des hyphes intercellulaires peuvent se développer. Du même mécanisme, les hyphes colonisent les cellules corticales où ils se différencient en arbuscules.*

### **I.2.1.4.3 Phase symbiotique**

#### **I.2.1.4.3.1 Développement d'appressorium ou hyphopodium**

Suite aux échanges intenses réalisés par les deux symbiotes (revue de Genre *et al.*, 2005). Une spore de champignon germe, le mycélium croît en direction de la racine, et lorsque le champignon perçoit la présence d'une plante hôte, il manifeste une réaction typique de ramification intense des hyphes appelée « branching » (Gavériaux, 2012). Les hyphes adhèrent ensuite aux parois externes des cellules de la racine, formant un hyphopodium (Gavériaux, 2012 ; Garbaye, 2013). Il s'agit d'un renflement de l'hyphe qui permet un contact étroit entre la cellule fongique et les cellules épidermiques de la racine. (Genre, *et al.*, 2005), qui se forme environ 36h après le contact avec les cellules épidermiques (Dalpé *et al.*, 2005b). Par la suite, la croissance fongique s'arrête environ 4 à 6h durant lesquelles les cellules végétales et fongiques se préparent à la colonisation (Fig. 10) (revue de Genre *et al.*, 2005).

Il est probable que d'autres signaux tels que des signaux thigmotropiques de la surface de la plante ou des métabolites secondaires produits dans des plantes après la perception du champignon, soient nécessaires pour la formation de l'appressorium et la progression de la symbiose (Requena *et al.*, 2007).

#### **I.2.1.4.3.2 Pénétration du champignon mycorrhizen à arbuscules**

L'appressorium est le site de la pénétration fongique dans la racine de l'hôte (Garg et Chandel, 2010). cette pénétration se fait par une pression mécanique mais aussi par production des enzymes hydrolytiques qui dégradent la paroi cellulaire de la plante hôte (Gollotte *et al.*, 2009) (comme les hémicelluloses et les pectines qui vont détruire la cellulose les constituants ces dernières) (Gavériaux, 2012 ; Garbaye, 2013). La production d'exo et d'endoglucanases, xyloglucanases et enzymes pectolytiques y compris poly galacturonases a été démontrée dans divers travaux (Garcia-Garrido et Ocampo, 2002). A ce stade Les cellules de la plante vont produire un appareil de pré-pénétration (APP) qui conduit la pénétration de l'hyphe à travers la cellule, jusqu'au cortex ou cylindre central (Parniske, 2008). Lors de la formation de cet APP, les noyaux des cellules épidermiques migrent tout d'abord très près de l'appressorium et en se déplaçant, laissent derrière eux un agrégat de microtubules, de microfilaments d'actines et de réticulum endoplasmique qui croît dans la cellule et permet de contrôler l'entrée du CMA dans la cellule (Fig. 10) (revue de Song et Kong, 2012).

#### **I.2.1.4.3.3 Développement intra-racinaire**

Une fois le CMA pénètre dans la racine, les hyphes vont ensuite progresser de manière intra- et intercellulaire jusqu'aux cellules du cortex racinaire (Reinhardt, 2007). À l'intérieur de la cellule, les hyphes se ramifient par dichotomie en donnant des hyphes ayant un diamètre de plus en plus petit ; à partir d'un hyphe initial de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, les dernières ramifications peuvent atteindre moins de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. L'ensemble de ces ramifications prend une forme de petit arbre : les arbuscules, lieux des échanges symbiotiques, qui donnent le nom à ces champignons (Gavériaux, 2012 ; Garbaye, 2013), suite à la colonisation de la cellule hôte par les arbuscules, l'architecture de la cellule hôte subit des changements remarquables (Fig. 10) (Garg et Chandel, 2010).

Au bout de deux jours l'arbuscule est bien développé dans le compartiment apoplastique de la cellule cortical (Smith and Read, 2008). La durée de vie des arbuscules est de quelques jours ; après quoi ils dégèrent, sans léser la cellule hôte. L'initiation, le développement et la disparition de l'arbuscule dure de quatre à quinze jours (Smith et Read, 2008). Le

développement des arbuscules est au moins partiellement sous le contrôle du programme génétique de l'hôte (Garg et Chandel, 2010).

Certaines espèces de CMA forment des vésicules après la résorption des arbuscules. (Smith and Read, 2008). Où les hyphes commencent à se renfler à certains endroits de leur parcours ou à leur extrémité pour donner des espaces de stockage qui permettront la mise en réserve de diverses substances : lipides (corps gras), tri-acylglycérol (TAG)... et de glycolipides (Dodd *et al.*, 2000) et des organites qui leur permettent d'avoir une croissance autonome (Timonen *et al.*, 2001). Par conséquent, elles constituent une structure de stockage et de reproduction (Declerck, 2014, Peterson et al, 2004).

En revanche Certaines espèces de CMA forment des cellules auxiliaires, Ces structures ne se rencontrent que dans le sous-ordre des Gigasporinae leur surface est épineuse dans le genre Gigaspora, presque lisse dans le genre Scutellospora ; elles se forment sur les hyphes extra-racinaires sporogènes au moment de la sporulation, parfois sur les hyphes germinatives avant l'entrée dans les racines. Leur durée de vie est courte et leur rôle n'est pas encore connu avec précision mais on pense qu'elles fourniraient des molécules carbonées (Gavériaux, 2012).

#### **I.3.2.1.3.4 Développement extra-radiculaire**

A partir de mycorhize les hyphes de développent très rapidement et intensivement dans le sol, constituant la phase extra-matricielle (Bécard et Fortin, 2008).

Cette phase qui constitue la mycorhizosphère joue un rôle primordial dans la symbiose. En effet, en se propageant et en colonisant un grand volume de sol, le mycélium extra racinaire acquiert des nutriment inaccessibles aux racines et les transfère vers les cellules hôtes (Fortin *et al.*, 2008). Cette phase permet aussi une colonisation de nouvelles racines de la même plante hôtes ou d'autres plantes voisines. Dans certaines conditions, chez la plupart des espèces de CMA de nouvelles spores sont formées ce qui boucle le cycle de leur développement. Cependant chez quelque espèce les spores formées sont intra-radiculaires.

La phase extra-matricielle contribue aussi à la stabilité du sol en agglomérant les particules du sol, probablement par l'intermédiaire de glycoprotéines telle que la glomaline sécrétée par les hyphes fongique. Cette protéine contribue directement au pool de la matière organique du sol (Purin et Rillig, 2007).

#### **I.2.1.5 Importance de la symbiose mycohizienne à arbuscules**

La multitude des services bénéfiques directs et indirects qu'ils rendent peut être classée en deux catégories : un rôle nutritif et un rôle protecteur.

### I.2.1.5.1 Rôle nutritif des CMA vis à vis des plantes

La symbiose MA améliore principalement la nutrition des plantes hôtes (Miller *et al.*, 1986 ; Arafat et Chaoxingb, 2011 ; Smith et Smith, 2012 ; Habibzadeh, 2015). Les hyphes extra-racinaires des CMA peuvent fournir à la plante hôte jusqu'à 80% du phosphate, 25% d'azote 10% du potassium, 25% du zinc et 60% du cuivre, en échange, ils reçoivent 20% du carbone de plante hôte (Marschner et Dell, 1994 ; Parniske, 2008). L'échange des nutriments est réalisé dans des sites spécifiques dans l'interface de la plante et du champignon grâce à des systèmes  $H^+$ -ATPase de la membrane plasmique de la plante et du champignon, des transporteurs du phosphate et des canaux ioniques (Fig. 11). Les systèmes  $H^+$ -ATPase de la membrane (de la plante et du champignon) extrudent des protons dans l'interface plante/champignon, créant un gradient électrochimique qui dynamise le transport secondaire de phosphate inorganique, d'ammonium ( $NH_4^+$ ), de nitrate ( $NO_3^-$ ), de potassium ( $K^+$ ), de plusieurs anions, de saccharose, de glucose (Glu) et de fructose (Fru) (Ramos *et al.*, 2011). De plus, l'oscillation du  $Ca^{2+}$  et les changements du pH induisent une dépolarisation membranaire durant l'échange des ions (Fig. 11).

#### I.2.1.5.1.1 Apport en phosphore

Le phosphore est un composé essentiel du vivant. Il se retrouve notamment dans les acides nucléiques et les protéines. Par conséquent, c'est un élément génétique, énergétique et plastique de la matière vivante. Dans le monde agricole, le phosphore joue un rôle physiologique à plusieurs niveaux. Il favorise la croissance de la plante, son action étant conjuguée à celle de l'azote, le développement des racines, la rigidité des tissus, la reproduction et la qualité des produits végétaux. Dans le sol, le phosphore est lié à la matière organique et à la fraction minérale du sol : les ions phosphates sont retenus dans les colloïdes ou souvent immobilisés sous forme de phosphate de fer ou d'aluminium (Gavériaux, 2012). Seule une infime partie se trouve sous forme d'ions orthophosphates ( $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ ), unique forme assimilable par les racines des plantes, dans la solution du sol. La concentration en phosphore de la solution du sol est faible, de l'ordre de 0.2 mg de P/L (UNIFA, 2016).

Durant la symbiose, le mouvement du P commence par son absorption à partir de la solution du sol par des transporteurs situés dans le mycélium extra-racinaire (Guether *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2010) sous forme de phosphate inorganique est polymérisé sous forme de polyphosphate et transporté *via* la vacuole jusqu'au mycélium intra-racinaire où il est dégradé

par des phosphatases spécifiques du CMA en libérant le phosphate inorganique interface plante/champignon (Fig. 11). L'absorption de ce phosphate par la plante implique également des transporteurs spécifiques de la famille de Pht 1 (Karandashov et Bucher, 2005 ; Javot *et al.*, 2007b ; Guether *et al.*, 2009 ; Ramos *et al.*, 2011).

#### **I.2.1.5.1.2 Apport en Azote**

Ainsi, le champignon joue-t-il un rôle important dans la nutrition azotée des plantes (Smith *et al.*, 2010). Alors que les plantes absorbent préférentiellement l'azote du sol sous la forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) et plus faiblement sous forme d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), c'est sous sa forme inorganique, ( $\text{NH}_4^+$ ), que l'azote est préférentiellement puisé du sol par le CMA. Ce phénomène serait partiellement expliqué par le coût énergétique important pour la transformation de nitrate en ammonium par le CMA (cf. Marzluf, 1997 dans Casieri *et al.*, 2013).

L'azote est absorbé par mycélium extra-racinaire sous forme de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et incorporé aux composés organiques par le glutamine synthétase (Cruz *et al.*, 2009).

L'arginine synthétisée à partir de la glutamine produite et chargée dans des vacuoles, transportée à travers le mycélium intra-racinaire et dégradée pour augmenter la concentration de l'urée. En présence d'uréase active, l'urée est transformée en  $\text{NH}_4^+$  et en  $\text{CO}_2$  (Cruz *et al.*, 2009). Enfin, l'azote est transféré à la racine sous forme de  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 11) (Bago *et al.*, 2001 ; Govindarajulu *et al.*, 2005 ; Cruz *et al.*, 2007).

le squelette carboné issu de l'hydrolyse de l'arginine soit réintégré dans le pool de carbone du CMA (Govindarajulu *et al.*, 2005 ; Cruz *et al.*, 2007).

#### **I.2.1.5.1.3 Apport en d'oligo-éléments**

Le transfert des oligo-éléments à la plante par le CMA est beaucoup moins étudié que le transfert du P ou de l'N. Ces oligo-éléments jouent cependant des rôles dans des activités enzymatiques intervenant dans la photosynthèse, la respiration oxydative, la protection contre les radicaux libres ou encore la biosynthèse des lipides (Fraústro Da Silva et Williams, 2001). Il est connu que le CMA permet une meilleure absorption d'oligo-éléments peu mobiles dans les sols, tels que le cuivre (Cu), le Zn, le Fe, le manganèse (Mn) et le cobalt (Co). D'autres éléments tels que, le calcium, potassium (Li *et al.*, 1991), le soufre (Casieri *et al.*, 2013), le zinc ou encore le fer, sont mieux assimilés par la plante grâce au champignon (Smith et Read, 2008). Cependant, les mécanismes d'absorption par les CMA restent méconnus bien que

leurs transferts vers la plante aient été prouvés, comme c'est le cas du potassium (Marschner et Dell, 1994).

#### **I.2.1.5.1.4 Apport en eau**

l'amélioration de la nutrition hydrique des plantes est prouvée via cette matrice extracellulaire 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 (Fortin *et al.*, 2008).

les CMA jouent un rôle direct dans l'acquisition de l'eau chez les plantes puisque des gènes codant pour des aquaporines, protéines membranaires des cellules formant des canaux perméables aux molécules d'eau, ont été récemment détectés dans le génome de l'espèce fongique *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013). De plus, il a été prouvé que l'expression de gènes de certaines aquaporines de plantes est modifiée lorsque la symbiose mycorhizienne à arbuscules est en place (Krajinski *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013).

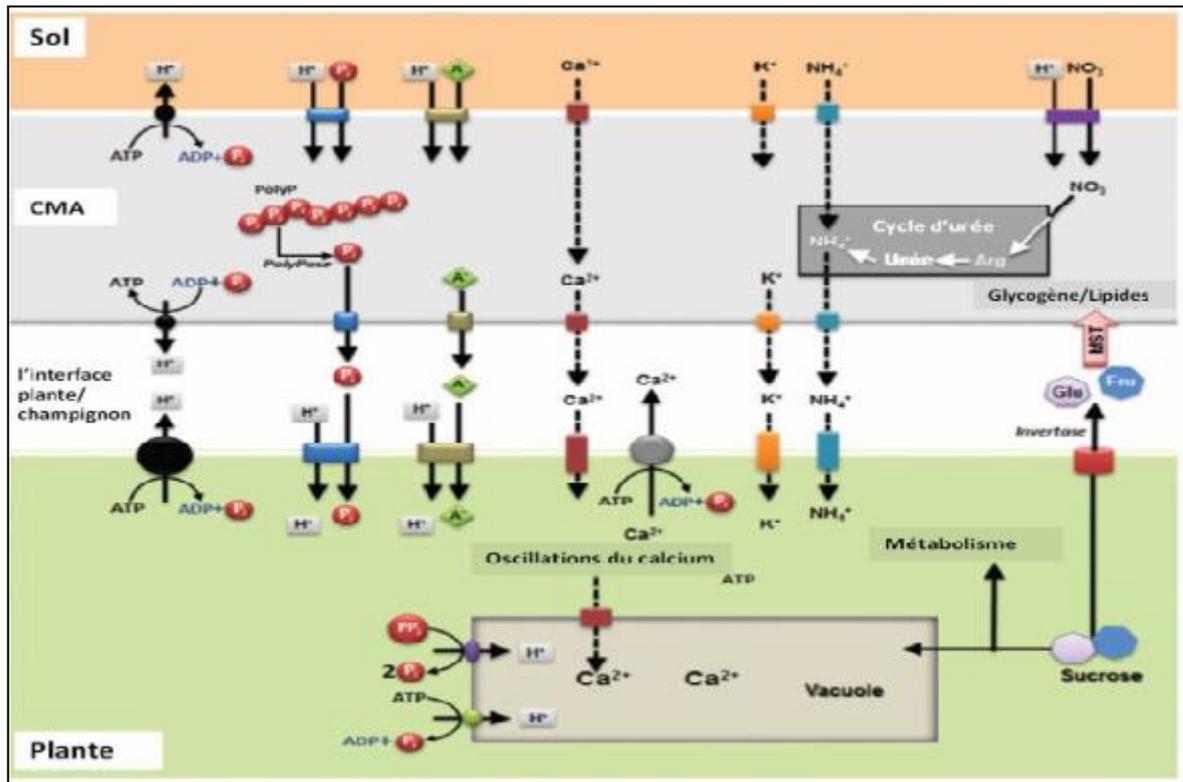
#### **I.2.1.5.2 Rôle nutritif des plantes vis à vis des CMA**

##### **I.2.1.5.2.1 Apport en carbone**

Le champignon, biotrophe obligatoire (Smith et Read, 2008), profite des ressources carbonées synthétisées par la plante via la photosynthèse qui sont indispensables à son métabolisme, à son cycle de développement et à sa fructification (Bolan, 1991 ; Finlay, 2008).

Les composés carbonés sécrétés par la plante sont fortement majoritaires et peuvent représenter entre 5 et 20% des photosynthétats produits par celle-ci. Ils peuvent être dérivés du métabolisme primaire (acides aminés, acides organiques, carbohydrates, CO<sub>2</sub>) et du métabolisme secondaire (plus de 100 000 molécules ont été décrites dans la littérature) (Bais *et al.*, 2004).

Le carbone synthétisé par la plante et libéré dans l'interface plante/champignon sous forme de saccharose qui est hydrolysé, probablement par invertase (Schaarschmidt *et al.*, 2006), en fructose et glucose qui sont transportés vers les cellules fongiques à travers des transporteurs de monosaccharides (Fig. 11) (Ramos *et al.*, 2011).



**Figure 11** : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'échange des principaux nutriments entre le CMA et sa plante hôte (Romano *et al.*, 2011).

### I.2.1.5.3 Rôle protecteur des CMA vis à vis des plantes

#### I.2.1.5.3.1 Résistance aux stress biotiques et abiotiques

Le CMA contribue au maintien et au fonctionnement de l'écosystème en effet, la mycorhize arbusculaire augmente la production et la survie des plantes dans des conditions de stress biotiques et abiotique (Ruiz-Lozano, 2003 ; Augé, 2001 ; Cho *et al.*, 2006 ; Cornet et Diem, 1982 ; Sturmer, 1998 ; Tao et Zhiwei, 2005).

Le stress abiotique tel que la sécheresse, les extrêmes températures, la salinité partagent un composant osmotique commun le déficit en eau pour les plantes (Porcel *et al.*, 2006).

##### I.2.1.5.3.1.1 Protection des agents pathogènes

Un autre avantage conféré aux plantes hôtes par la mycorhization est une protection contre les pathogènes, principalement contre les champignons et les nématodes qui attaquent les racines des plantes (Dalpé, 2005 ; Dalpé, 2006 ; Fortin et autres, 2008 ; Helgason et Fitter, 2005).

Plusieurs mécanismes expliquent ce phénomène. Premièrement, les avantages nutritionnels qu'offre la mycorhization permettent aux plantes hôtes d'être plus vigoureuses et de mieux résister aux attaques des pathogènes (Dalpé, 2006). Deuxièmement, il a été démontré que l'infection des racines de la plante hôtes par les champignons mycorhiziens

préconditionne la plante à faire face aux attaques de pathogènes et d'autres organismes nuisibles comme les brouteurs. En effet, la mycorhization entraîne la plante dans un état actif d'immunisation qui lui permet d'être plus efficace dans ses réponses aux attaques des pathogènes (Ismail et Hijri, 2012 ; Jung *et al.*, 2012). Finalement, il a aussi été montré que certains champignons mycorhiziens, comme *Glomus irregulare*, peuvent contrôler la croissance des champignons pathogènes et réduire leur production de mycotoxine (Ismail *et al.*, 2013).

Il semblerait aussi que les champignons mycorhiziens protègent la plante hôte contre les pathogènes. En entraînant une compétition directe avec ces derniers pour les ressources énergétiques et pour les sites d'infection. À eux seuls, les hyphes du champignon mycorhizien peuvent constituer jusqu'à 80% de la biomasse microbienne du sol. Ainsi, les hyphes qui colonisent les racines satureraient le milieu et laisseraient peu de sites potentiels pour l'infection par des pathogènes (Daplé, 2006 ; Helgason et fitter, 2005). Toutefois, ce dernier élément reste toujours une hypothèse qui ne fait pas consensus au sein de la communauté scientifique.

Il est à noter que le pouvoir protecteur de la mycorhize contre les pathogènes a ses limites et dépend de plusieurs facteurs comme la plante, le champignon mycorhizien et la virulence du pathogène. Les conditions environnementales (sol, humidité, température, etc .) influencent aussi la capacité de la mycorhize à protéger la plante hôte contre les pathogènes (Daplé, 2006).

#### **I.2.1.5.3.1.2 Stress hydrique**

En effet, le mycélium pouvant explorer un volume de sol beaucoup plus important que les racines et ayant accès à un réservoir hydrique plus important, il peut ainsi aider au maintien de l'équilibre hydrique et minéral de la plante. La tolérance des plantes mycorhizées à la sécheresse serait donc attribuée à un ensemble de processus physiologiques dont une meilleure nutrition minérale (en particulier P et N) et hydrique, ce qui améliore la photosynthèse, la transpiration et accroît le développement de la plante (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995 ; revue de Augé, 2001). La colonisation mycorhizienne induit également l'augmentation de la conductivité hydraulique de la plante hôte dans des conditions de stress osmotique et une meilleure régulation des niveaux de l'acide abscissique et par conséquent un meilleur taux de transpiration (Sánchez-Blanco *et al.*, 2004 ; Aroca *et al.*, 2007, 2008). Ces améliorations semblent être liées à l'atténuation du stress oxydant, se traduisant par la production d'enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase et guaiacolperoxydase) et d'anti-

oxydants non enzymatiques (ascorbate et glutathion) (Wu et Zou, 2008 ; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010).

La plante hôte résisterait semble-t-il au stress hydrique, par un signal déclenché par le champignon symbiotique permettant une fermeture plus rapide des stomates de sa partie aérienne (Fortin *et al.*, 2008).

#### **I.2.1.5.3.1.3 Stress salin**

La salinité élevée (en NaCl,  $\text{NaCO}_3^-$ ,  $\text{NaSO}_4^{2-}$  ou sels de magnésium) dans les sols peut affecter l'établissement, la croissance et le développement des plantes ainsi que d'importants métabolismes, tels que les métabolismes lipidiques et énergétiques. Il en résulte des effets délétères provoquant d'énormes pertes au niveau de la productivité (Ramoliya *et al.*, 2004 ; Evelin *et al.*, 2009). D'après la revue de Porcel *et al.*, (2012), les plantes se développant sur un sol salin sont sujettes à trois stress physiologiques distincts. Premièrement, les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  perturbent la structure des enzymes et d'autres macromolécules, induisent des dommages sur les organites cellulaires, perturbent la photosynthèse et la respiration, inhibent la synthèse protéique et induisent des déficiences ioniques (Juniper et Abbott, 1993 ; Apse et Blumwald, 2002 ; Pitman et Läuchli, 2002). Deuxièmement, les plantes exposées à de fortes concentrations salines peuvent subir un stress hydrique puisque l'eau assimilable par les plantes diminue du fait des fortes concentrations en sel dans les sols (Augé, 2001). D'autre part, les plantes doivent maintenir un potentiel osmotique interne bas afin d'éviter que l'eau ne parte dans le sol par les racines. Enfin, la salinité produit également un déséquilibre nutritif dans la plante causé par des chutes dans l'absorption et/ou le transport des nutriments jusqu'aux parties aériennes (Marschner, 1995 ; Adiku *et al.*, 2001).

La protection apportée par la colonisation mycorhizienne à la plante contre le stress induit par le NaCl proviendrait de la combinaison d'une meilleure nutrition de la plante résultant d'une augmentation et/ou d'une meilleure sélection dans le prélèvement des nutriments, l'accumulation de composés osmorégulateurs, une importante conductance stomatique, une meilleure transpiration, une augmentation de l'activité photosynthétique ou encore une limitation de la déshydratation des feuilles (Cantrell et Linderman, 2001 ; Feng *et al.*, 2002 ; Aroca *et al.*, 2006 ; Porcel *et al.*, 2006 ; Sheng *et al.*, 2008). Cependant, l'effet positif sur le développement de la plante dépend des espèces de CMA étudiés (Marulanda *et al.*, 2003, 2007 ; Wu *et al.*, 2007 ; revue de Porcel *et al.*, 2012).

Par ailleurs, en condition de stress salin, il semble que l'accumulation de  $K^+$  par les plantes mycorhizées (Hanway et Heidel, 1952 ; Ojala et al., 1983; Mohammad *et al.*, 2003 ; Giri *et al.*, 2007) aide au maintien d'un ratio K/Na élevé, prévenant ainsi la perturbation de nombreux processus enzymatiques et l'inhibition de la synthèse protéique (revue de Porcel *et al.*, 2012).

De plus, en cas de salinité élevée, il a été démontré que les plantes mycorhizées accumulaient plus de proline (molécule d'ajustement osmotique), de bêtaïne et des sucres solubles que les plantes non-mycorhizées (Jindal *et al.*, 1993 ; Porcel et Ruiz-Lozano, 2004 ; Al-Garni, 2006; Sharifi *et al.*, 2007). Ces molécules sont connues pour protéger les structures subcellulaires, pour maintenir les activités enzymatiques et limiter les dommages oxydants induits par les radicaux libres en cas de stress salin (Yokoi *et al.*, 2002). Enfin, il a été suggéré que la symbiose mycorhizienne à arbuscules diminuerait le stress salin chez les plantes en augmentant l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase, l'ascorbate-peroxydase et les activités peroxydasiques. Ces enzymes permettent la dégradation des ERO et par conséquent, limitent l'induction de dommages membranaires (Alguacil *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2007 ; Zhong *et al.*, 2007).

#### **I.2.1.5.3.1.4 Pollution**

La contamination des sols en divers polluants, dont les ETM, constitue un autre stress abiotique qui peut être atténué par la symbiose MA. Les mycorhizes à arbuscules favorisent en effet la croissance des plantes sur des sols contaminés par les métaux lourds (Leyval, 2005).

Éléments traces métalliques (ETM) peuvent résulter des activités humaines (Schachtschabel *et al.*, 1992) ou être présents de façon naturelle (gisements miniers) (Jung et Thornton, 1996 ; Rodríguez *et al.*, 2009). Certains métaux sont nécessaires aux organismes et considérés comme des micronutriments, comme le Zn, le Cu ou le Co, Se, Mo, à de faibles concentrations. En revanche, l'accumulation de fortes concentrations de ces composés est très toxique puisqu'ils peuvent altérer le niveau d'autres nutriments et induire la production de radicaux libres (Gutteridge et Halliwell, 1989). De plus, d'autres métaux sont toxiques même à de faibles concentrations. que sont Cd, Pb, Hg, As, Ni, Cr, Se, le mercure et l'arsenic (Bourelle et Berthelin, 1998)

Les mécanismes intervenant dans la survie des organismes symbiotiques mycorhiziens se développant sur des milieux contaminés par les ETM et la protection apportée par la colonisation symbiotique ont été répertoriés par Hildebrandt (2007), González-Guerrero *et al.*,

(2009) et Ferrol *et al.*, (2009). Tout d'abord, un meilleur apport nutritif apporté par le CMA pourrait aider à la croissance des plantes parallèlement à une diminution de la concentration en métaux dans les parties aériennes (Heggo *et al.*, 1990 ; Lee et George, 2005). D'autre part, dans les racines mycorhizées, il a été démontré que les métaux étaient préférentiellement accumulés dans les structures fongiques, préservant ainsi les tissus végétaux (Weiersbye *et al.*, 1999 ; Rivera-Beccerril *et al.*, 2002). En effet, le Zn, le Cu et le Cd sont accumulés dans la paroi et dans des granules dans le cytoplasme des champignons alors que leur cytoplasme lui-même contient peu de métaux (González-Guerrero *et al.*, 2008). De plus, les vacuoles et les parois fongiques pourraient servir de compartiment de séquestration pour ces ETM (Turnau, 1998 ; Weiersbye *et al.*, 1999; González-Guerrero *et al.*, 2008).

Les associations de plantes avec des CMA sont proposées comme une solution biologique potentielle pour améliorer la résistance des plantes à la toxicité des métaux et restaurer la fertilité des sols pollués par les métaux lourds (Vivas *et al.*, 2005).

#### **I.2.1.5.4 Autres bénéfiques apportés par des CMA**

##### **I.2.1.5.4 .1 Effet sur la structure du sol**

Les mycéliums ont la propriété d'excréter une glycoprotéine, la glomaline. Les champignons mycorhiziens qui sont très abondants dans certains sols peuvent en produire des quantités importantes, dont plusieurs études ont montré le rôle dans la stabilité structurale du sol. La glomaline agit comme une colle qui assemble les particules les plus fines du sol pour en faire des agrégats dont on connaît le rôle fondamental pour la fertilité des sols, en retenant l'eau et les éléments minéraux et en favorisant les échanges gazeux et l'aération (Fortin *et al.*, 2008).

La formation d'agrégats stables dans le sol peut être aussi attribuée au mycélium extra-racinaire des champignons produit par les racines mycorhizées et qui constitue un réseau tridimensionnel qui relie la plante au sol environnant (Roldan *et al.*, 1994 ; Jeffries et Barea, 2000). Cette stabilité du sol ainsi produite permet de lutter contre l'érosion, la perte de nutriments et de la matière organique par lixiviation, qui entraînent une baisse de productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

##### **I.2.1.5.4 .2 Production d'hormones**

Les racines colonisées par des CMA sont souvent plus épaisses et contiennent moins de poils absorbants. De tels changements dans la morphologie sont censés être sous le contrôle phytohormonal (Selvaraj, 2006). Le taux d'acide abscissique (ABA) augmente considérablement dans les racines des plantes mycorhizées (Danneberg *et al.*, 1992). En outre,

des composés phénoliques et des phytoalexines, qui sont supposés jouer un rôle dans la résistance aux maladies, se sont révélés être formée après colonisation mycorhizienne (Sylvia et Sinclair, 1983). Johansson *et al.*, (2004) ont montré l'influence des CMA sur l'augmentation et la stimulation du niveau des hormones de croissance.

#### **I.2.1.6 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).

##### **I.2.1.6.1 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).

##### **I.2.1.6.2 Méthodes de production**

Le mode de production diffère selon la famille de champignons, mais il s'agit d'inoculants endomycorhiziens pour la plupart.

• **Les champignons endomycorhiziens** : 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 co-cultiver le complexe « champignon-plante hôte ».

• **Les champignons ectomycorhiziens** : la production d'inoculums de champignons ectomycorhiziens se fait généralement en conditions axéniques, sans plante hôte, en culture liquide ou sur support solide

A ce jour, les deux technologies de production les plus utilisées sont :

▪ La méthode dite conventionnelle consistant à multiplier les champignons endomycorhiziens 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 (Haimet, 2013).

#### **I.2.1.6.3 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'inocula fongique (Duponnois *et al.*, 2013).

#### **I.2.1.6.4 Qualité des inoculums**

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

▪ 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.

La dose d'utilisation préconisée et la richesse en propagules sont liées. Le dénombrement de propagules par unité d'inoculum ne suffit toutefois pas pour évaluer la qualité d'un inoculum. Le critère de qualité le plus précis repose sur le dénombrement des propagules effectivement viables et infectieuses. Dans ce cas, une méthode utilisant un test biologique sur plante c'est à dire un test type MPN doit être réalisé. La durée de conservation (DLUO) ainsi que les conditions optimales de conservation de l'inoculum sont mentionnées sur l'emballage. La durée de conservation aura été définie en prenant en compte le nombre de propagules viables et infectieuses présentes dans l'inoculum en fin de vie. Ainsi, il est essentiel que l'utilisateur garde à l'esprit qu'un inoculum est un produit composé de microorganismes vivants et qu'il respecte les conditions d'utilisation et de stockage prescrites par le fournisseur (Haimet, 2013).

#### **I.2.1.6.5 Production industrielle d'inoculant mycorhizien**

Premier Tech Biotechnologies commercialise des produits avec mycorhizes sous la marque de commerce MYKE® PRO. Conçus pour les marchés horticole et agricole

Le procédé de production de mycorhizes développé par Premier Tech requiert un environnement strictement contrôlé et utilise des standards industriels de haute technologie. Ce qui résulte en des spores mycorhiziennes en suspension, exemptes de contaminant, qui sont utilisées pour formuler des produits de très haute qualité.

Les produits MYKE® PRO sont des inoculants mycorhiziens qui augmentent la croissance végétale, la résistance des plantes aux maladies et le rendement des productions agricoles et horticoles, tout en protégeant l'environnement. Chaque produit possède sa propre formulation adaptée aux applications spécifiques des différents types de cultures (annexe 1).

### **I.3 Présentation de la plante d'intérêt**

#### **I.3.1 Medicago sativa L.**

Selon Fournier (1961), Le nom scientifique du genre *Medicago* n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais au fait que la luzerne serait originaire de Médie (région allant du Nord-Ouest de l'Iran à l'Azerbaïdjan). Le nom anglais et espagnol 'alfalfa' proviendrait du nom arabe « al-fac-façah », qui signifie « le père des aliments » car il servait de fourrage aux chevaux. Quant au nom vernaculaire (Luzerne), il est emprunté à l'occitan « luserna », qui désigne aussi une partie lumière ou le ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante. Alors que le terme *sativa* signifie cultivée (Marinoff *et al.*, 2005).

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une espèce fourragère pérenne, considérée comme une espèce adaptée à la sécheresse (Lemaire, 2006). Cette plante est l'une des plus cultivées au monde, constitue un précieux aliment pour le bétail (Fig. 12) (Schoutteten, 2004).



**Figure 12 :** Aspect de *Medicago sativa* L. **A :** Plante de *M. sativa*. **B :** Fleurs de *M. sativa*. **C :** Feuilles de *M. sativa*. **D :** Gousses de *M. sativa*.

### I.3.2 Origine et répartition

Selon Waligora (2010) et Mauriès (2003), la culture de la luzerne est très ancienne, elle remonterait à plus de 9000 ans. Elle est originaire du sud-ouest de l'Asie dans les hauts plateaux des Caucase, Iran, Afghanistan et la Turquie d'où elle se serait répandue dans le monde entier.

Pour Lapeyronie (1982), les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides. Elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient). Elles ont ensuite envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents américains et australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (Delalande *et al.*, 2007).

### I.3.3 Systématique

Sous l'appellation luzerne cultivée, on classe deux espèces botaniques et leurs hybrides, *Medicago sativa* L., *Medicago falcata* et *Medicago media* (ou *Medicago varia* Mortyn) hybride entre les deux espèces précédentes (La pevronie, 1982 ; Mauriès, 2003).

*Medicago sativa*, provient des zones sèches des hauts plateaux iraniens. A l'inverse, *Medicago falcata* vient de la Sibérie, elle résiste au froid (Prosperi *et al.*, 1993 ; Mauriès, 1994).

Selon Small et Jomphe, 1989, la position systématique du genre *Medicago* est la suivante :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermatophytes
- Sous- embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous- classe : Rosidées
- Ordre : Fabales
- Famille : Fabaceae
- Sous-famille : Faboideae
- Tribus : Trifolieae
- Genre : *Medicago*
- Espèce : *Medicago sativa* L.

#### I.3.4 Description morphologique

La luzerne cultivée (*Medicago sativa*) est une plante de taille variant de 30 à 120 cm. Elle possède des tiges couchées, ascendantes à dressées, partant de la couronne. Les parties végétatives sont couvertes, à des différents degrés, avec de simples poils (Lesins et Lesins, 1979). Les feuilles sont trifoliées, pétiolées, dentées et mucronnées au sommet, ordinairement glabre (Baameur, 1998). Inflorescence en grappes de 10 à 30 fleurs violettes, par fois bleuâtre plus ou moins bigarrées. Le fruit est une gousse spiralée, contenant de 5 à 15 graines. La graine est de 2 à 2.5 mm de long de couleur jaune-or ou jaune-olive à brun suivant l'âge et les conditions de récolte. La racine pivotante descend jusqu'à 2 m ; plus ou moins fasciculée. Dans le type *sativa* le développement des racines secondaires des surfaces même en cas d'accident freinant le développement du pivot, reste très faible. Les nodosités en grappe sur les racines, ce sont des minuscules boules roses pâles qui fixent l'azote de l'air (Fig. 13) (ITDAS, 1993).

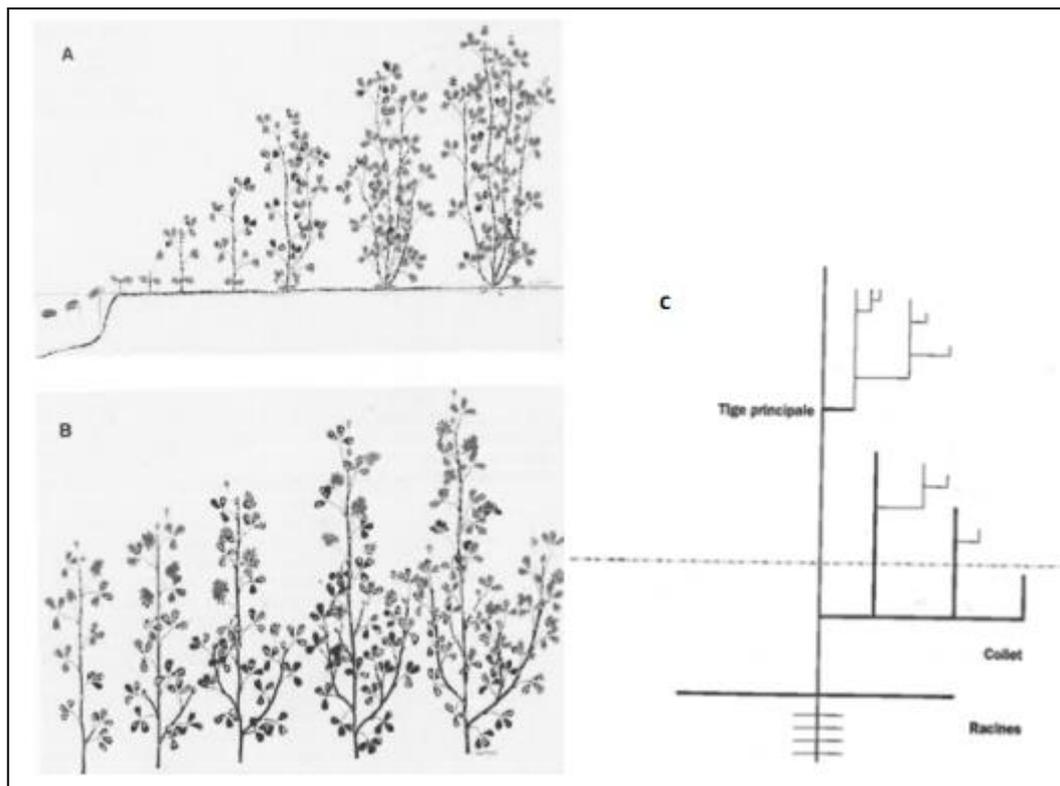


**Figure 13 :** Morphologie de la luzerne *Medicago sativa* L.(Childers, 2008).

1. Fleur, 2. Fleur épanouie, 3. Fleur ouverte, 4 et 5. Une pétale, 6. Une inflorescence en stade fructification, 7. Une gousse, 8. Une graine, 9. Coupe longitudinale d'une gaine.

### **I.3.5 Cycle de développement**

La luzerne est une dicotylédone, à la levée, émergent deux cotylédons. La première feuille est unifoliée, les suivantes sont trifoliées composées de trois folioles rattachées à la tige par un pétiole. Lors de son développement, la première tige grandit en produisant des feuilles alternées. Ensuite, une tige secondaire se développe au niveau du premier bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée. Par la suite et au niveau des cotylédons, deux autres tiges secondaires démarrent. L'émergence des tiges suit un ordre précis (Fig. 14), on distingue les tiges primaires, secondaires et tertiaires. Des grappes longuement pédonculées de fleurs poussent aux aisselles des feuilles et sont initiées entre le 6ème et le 14ème entre-nœud en fonction des conditions du milieu et de leur déterminisme génétique. En même temps, les racines se développent à partir du méristème apical de la radicule. A partir d'une racine pivotante principale, émergent les racines secondaires (Teuber et Brick, 1988).



**Figure 14 :** (A) Séquence de germination des graines, développement des plantules et développement des tiges secondaires chez la luzerne. (B) Séquence des ramifications des tiges secondaires et tertiaires de la luzerne. (C) Schéma illustrant le développement des tiges (Teuber et Brick, 1988).

En bonne conditions, la luzerne germe et lève parfaitement en 8 à 12 jours. Par ailleurs, le développement des parties aériennes de la plantes est plus important que celui des racines pendant la période qui suit la germination, puis la croissance s'équilibre à l'époque de la floraison tandis qu'à la maturité, se sont les racines qui l'emportent.

Toutefois, on sait que la proportion entre parties aériennes et racines est liée au facteur sol : dans un sol pauvre (sable), le développement des racines est toujours proportionnellement plus fort que dans un sol fertile (Villax, 1963).

### **I.3.6 Intérêt et utilisation**

#### **I.3.6.1 Rôle agronomique**

Parmi les légumineuses, la luzerne a vraiment bien mérité l'appellation de « reine des cultures fourragères », car elle fournit un fourrage riche en éléments nutritifs, en protéines, en matières azotées digestibles et en vitamines (Benabderrahim *et al.*, 2008).

Elle permet, non seulement d'économiser l'azote, mais encore elle en restitue à la culture suivante. Ainsi, selon Thiebeau *et al.*, (2001), la moyenne de production de deux ans

de luzerne est de 689 kg d'N/ha, que l'agriculture n'aura pas à apporter sous forme d'engrais minéral.

Cet azote est soustrait à l'environnement pour être transféré à l'alimentation animale par le biais de la culture de luzerne. Waligora (2010) rapport qu'une luzerne peut suffire, à elle seule à fertiliser tout un système cultural sans apport d'azote.

Cette particularité de pouvoir utiliser l'azote atmosphérique en plus de ses racines descendant à deux ou trois mètres de profondeur, assure l'amélioration des qualités physico-chimiques du sol (Thiebeau *et al.*, 2003). Elle mobilise fortement les nitrates du sol, limitant leur lessivage (Hnatyszyn et Guais, 1988) et empêche ainsi les mauvaises herbes de se développer (Abdelguerfi et Chebouti, 2012). Ainsi, d'après Robert *et al.*, (2010), la culture de la luzerne va laisser à la culture suivante un sol dont le stock de graines de mauvaises herbes sera réduit, limitant, ainsi, l'utilisation de produits phytosanitaires.

#### **I.3.6.2 Rôle écologique**

D'après Thiebeau *et al.*, (2001), le total de carbone fixé par la culture après deux années d'exploitation est de 16.0 t C/ha. Cette fixation de carbone et d'azote, permet de placer la luzerne comme une culture « dépolluante ».

Restant en place 26 à 38 mois la luzerne diminue fortement l'exposition des sols cultivés qu'elle occupe aux phénomènes d'érosion dus aux écoulements de surface des pluies ou aux vents (Robert *et al.*, 2010).

#### **I.3.6.3 Rôle économique**

La luzerne est qualifiée de plante « nitratophage », à cause de l'azote qu'elle prélève dans le sol, et dans l'atmosphère (Thiebeau *et al.*, 2001). Ces mêmes auteurs, rapportent que la luzerne exporte 2 à 3 t/ha/an de protéines, sans aucun apport d'engrais azoté de la part de l'agriculteur.

La luzerne affiche une plus grande régularité de rendement que ses partenaires et permet ainsi de sécuriser le rendement fourrager de l'exploitation. Sa production est assez bien étalée sur toute l'année, cette répartition présente l'avantage d'avoir du fourrage vert pendant l'été et de pouvoir réaliser moins de stocks dans certaines situations (Renault, 2003).

#### **I.3.6.4 Rôle nutritionnelle**

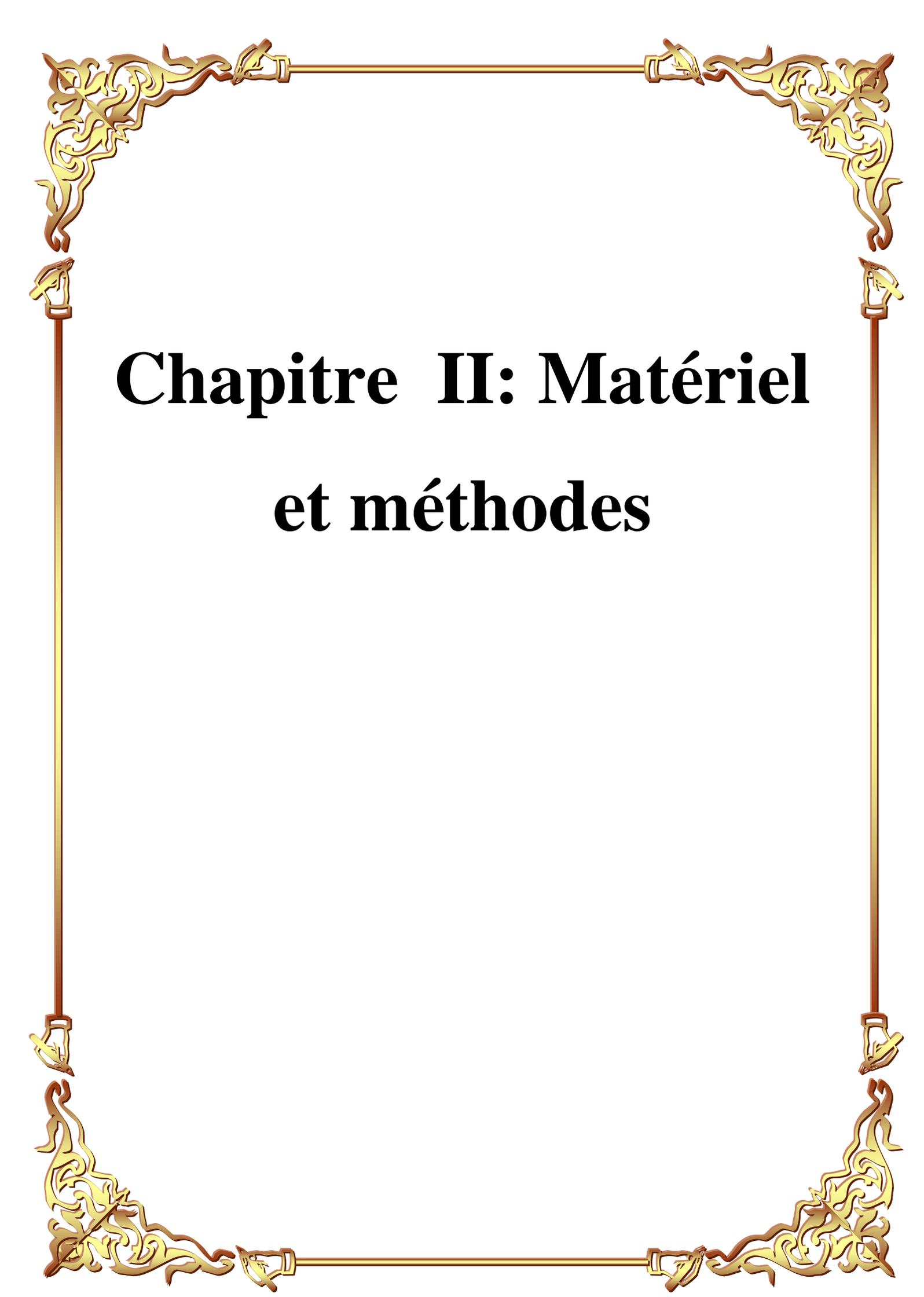
D'après Bourgeois Bach (2005), ce sont les Arabes, maîtres incontestés en matière d'élevage chevalin qui, les premiers, ont utilisé la luzerne pour augmenter la valeur nutritive de l'alimentation destinée à leur bêtes.

Des travaux réalisés par plusieurs auteurs ont mis en évidence un effet positif de la luzerne déshydratée sur la qualité des acides gras du lait. Ainsi, Mauriès (2001) a montré que l'incorporation de 3.6 Kg de luzerne déshydratée dans un ensilage de maïs améliore l'ingestion des animaux, le taux butyreux et la digestibilité de la ration totale. L'auteur a constaté une augmentation de l'ingestion de la matière sèche de 8 points sans pour autant aucun problème de météorisation ou autre trouble.

Dewhurst et Coulmier (2004) ont également montré que l'ajout à la ration d'extraits de luzerne permet une augmentation de l'ingéré total et de la production laitière et par ailleurs modifie le profil en acides gras du lait en favorisant la présence de produits bénéfiques pour la santé notamment l'acide oléique (C 18 :1), l'acide linoléique (C 18 :2) et l'acide linoléique (C 18 :3). De même, en étudiant l'influence de l'introduction de luzerne sur les performances zootechniques, Peyraud *et al.*, (1998), ainsi que Ballard (2009a) ; ont constaté une augmentation du taux butyreux et des teneurs en acides gras du lait.

#### **I.3.6.5 Intérêt et utilisation industriel et biotechnologique**

Concernant l'utilisation de plantes génétiquement modifiées, destinées à la recherche en laboratoire, la luzerne a une place privilégiée puisqu'il s'agit d'un modèle de choix dans l'obtention de molécules précises (domaine de la moléculaire). Industrie : La rubisco peut être favorablement utilisée dans la fabrication de cosmétiques, mais aussi de détergents. *Medicago sativa* est l'une des cultures lignocellulosiques sous études pour la production d'énergie renouvelable tel que le bioéthanol (Godin *et al.*, 2010). Alfalfa présente un potentiel élevé pour la production de bioéthanol en particulier pour son faible lien avec la fertilisation azotée et surtout sa grande diversité génétique par les enzymes impliquées dans la libération du glucose (Duceppe *et al.*, 2012).



# **Chapitre II: Matériel et méthodes**

**Chapitre II : Matériel et méthodes****II.1 Matériel**

Nous avons choisi un site localisé dans une zone aride de l'Ouest Algérien (Naâma).

**II.1.1 Matériel végétal**

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

**II.1.2 Sol**

Les échantillons de sol ont été collectés de la rhizosphère de la plante *Medicago sativa L.* ; Les prélèvements ont été réalisés sur une profondeur de 0-20 cm dans le sol et qui ont été conservés jusqu'à leur utilisation dans le protocole de piégeage. Parallèlement au sol rhizosphérique nous avons ramenés le sable pour la réalisation du même protocole.

**II.2 Méthodologie suivie pour l'étude des mycorhizes****II.2.1 Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes**

Les différentes méthodologies utilisées pour observer les structures formés par les MA sont réalisées selon les étapes suivantes :

**II.2.1.1 Echantillonnage**

Comme les racines peuvent être récoltées à tout moment de l'année pour l'estimation de la colonisation endomycorhizienne (Schenck, 1982), nous avons réalisé notre échantillonnage le mois de Mai en 2017. Afin de procéder à la récolte des racines ; les plantes de *Medicago sativa L.* ont été déterrées avec leur système racinaires, avec une bêche enfoncé profondément pour obtenir la plupart des parties basales des racines, puis les racines prélevées ont été conservées dans des sachets pour être transportées au laboratoire pour estimation de la colonisation MA naturelle des racines à différentes stades au cours de leur cycle de vie.

Le nombre de plantes prélevées : 3 plantes pour chaque stades ; (stade sans floraison, stade de floraison, stade de formation des gousses).

### II.2.1.2 Lavage

Pour déloger facilement la terre des racines, celles-ci ont été trempées 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 séparées de racine pivotante et versées 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 conservés au réfrigérateur à + 4°C avant d'être observés directement ou traités ultérieurement.

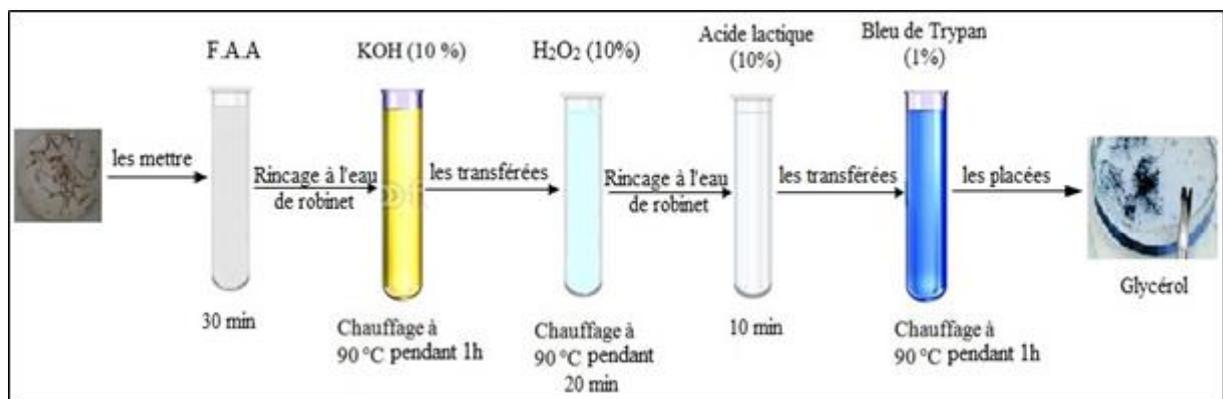


**Figure 15** : Rinçage des racines.

### II.2.1.3 Eclaircissement 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

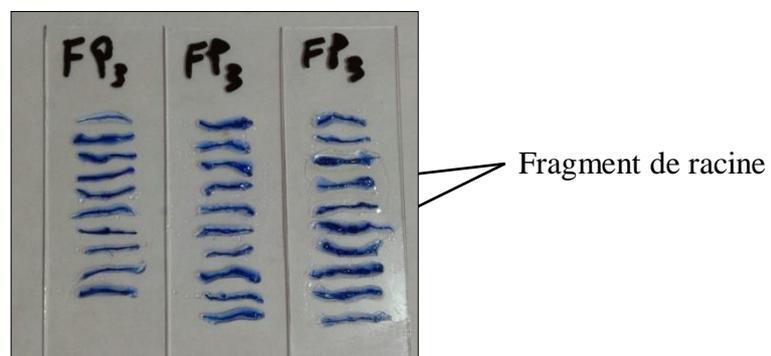
racines ont été transférées dans une solution de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  à 10 % et chauffer au bain-marie à  $90^\circ C$  pendant 20 minutes pour les blanchir. Après plusieurs rinçages à l'eau courante, les fragments racinaires éclaircis ont été submergés d'acide lactique à 10 % durant 10 minutes 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  $90^\circ C$  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 rincées à l'eau courante, puis conservées dans des boîtes de pétri contenant de glycérol 60 %.



**Figure 16** : Protocole d'éclaircissement et coloration des racines de *Medicago sativa L.*

#### II.2.1.4 Montage et observation des racines

Après la coloration, les racines de chaque plante (*Medicago sativa L.*) ont été découpées en fragments de 1 cm de longueur environ, et monté parallèlement à raison de 10 fragments par lame dans de glycérol, ce qui fait un total de 30 fragments par 3 lames, puis observées au microscope photonique à différents grossissements (Fig. 17).



**Figure 17** : Montage des racines.

### 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.

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

- **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

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

**m %** : intensité de mycorhization absolue

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

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.

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

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

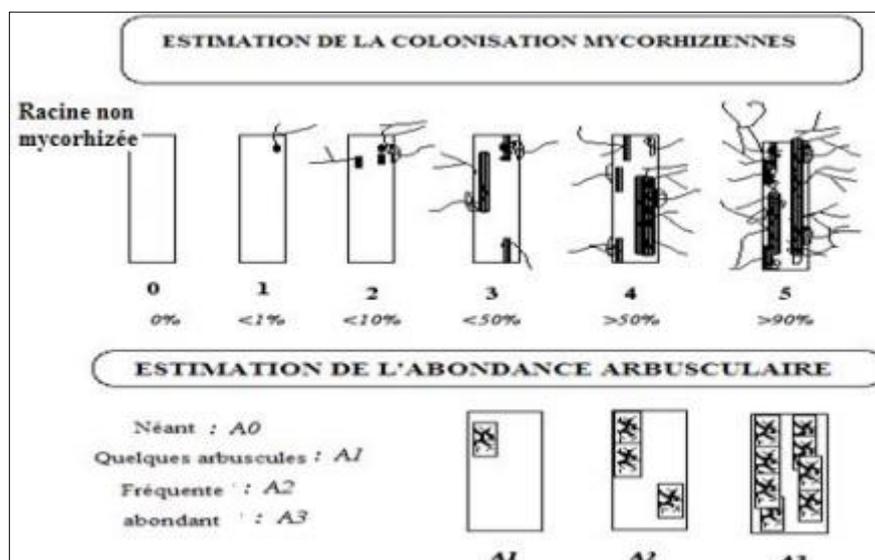
Avec :

$$mA3 = ((95n5A3 + 70n4A3 + 30n3A3 + 5n2A3 + n1A3) / \text{nombre des fragments mycorhizés}) * 100 / m$$

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

**A%:** Abondance en arbuscules dans le système racinaire.

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



**Figure 18 :** Barème de notations de la colonisation endomycorhizienne et de la richesse en arbuscules (Trouvelot *et al.*, 1986).

Selon Fischer *et al.*, (1994), une racine est considéré comme infectée par les CMA si au moins une des trois caractéristiques suivantes sont diagnostiquées : présence de vésicules, présence d'arbuscules, présence de mycélium a septé pénétrant dans la racine.

## II.2.2 Protocole d'isolement des spores des CMA

### II.2.2.1 Piégeage des endomycorhizes

La méthode adoptée pour le piégeage de MA est celle de Morton (1992) et Walker (1992), elle consiste à piéger les complexes endomycorhizes contenus dans l'échantillon de sol provenant de site d'étude, pour la mise en évidence de la diversité de CMA.

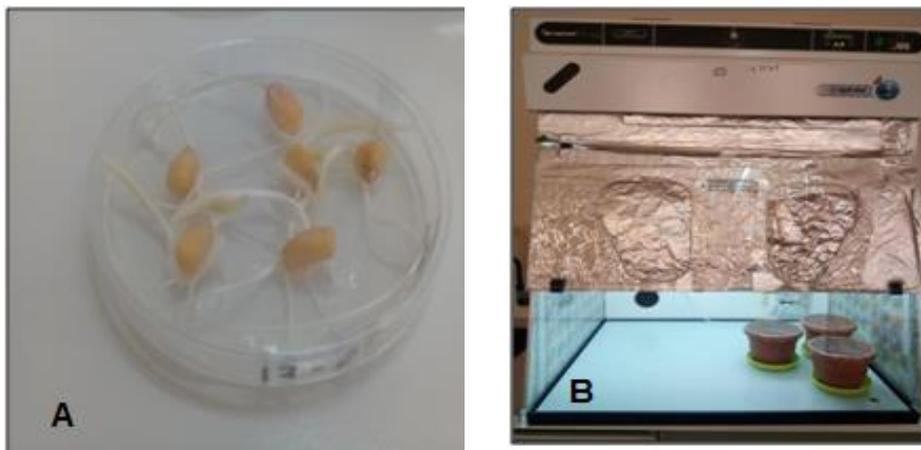
Il s'agit de cultiver une plante-piège mycotrophe en pot contenant de substrat et d'inoculum.

L'inoculum utilisé est constitué du sol rhizosphérique de la plantes d'intérêt (*Medicago sativa*) contenant des racines de la même plantes coupées en petits fragments et soigneusement mélangées avec ce sol.

Le substrat est constitué du sable autoclavé 3 fois à 120°C pendant une heure.

La variété de maïs HYBRIDE PICO a été utilisée comme plante piège. Les graines de maïs ont été désinfectées avec hypochlorite du sodium (12°Chl) pendant 15 minutes puis rincées abondamment avec l'eau distillée stérile. Ensuite elles ont été transférées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 1 % (annexe 3), puis placées dans un incubateur à l'obscurité à 25°C pendant 3 jours.

Des pots en plastique de 1 L de volume, préalablement lavés et désinfectés avec de l'eau de javel (12° Chl), ont été remplis à moitié avec le substrat sableux sur lequel 200 g de l'inoculum y ont été déposés. Les pots ont été ensuite recouverts du substrat sableux autoclavé afin de limiter les risques de contamination. Les graines pré-germées de maïs ont été semées à raison de trois plantules par pot. Dans les mêmes conditions expérimentales, Deux répétition ont été réalisées et un témoin aussi a été réalisés avec seulement du substrat autoclavé afin de vérifier que les conditions de culture sont exemptes de contaminants (Fig. 19).



**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 ont été déposés en chambre de culture contrôlée (une température de 25°C et une photopériode de 16 heures) et arrosés quotidiennement à l'eau distillée stérile. Lorsque

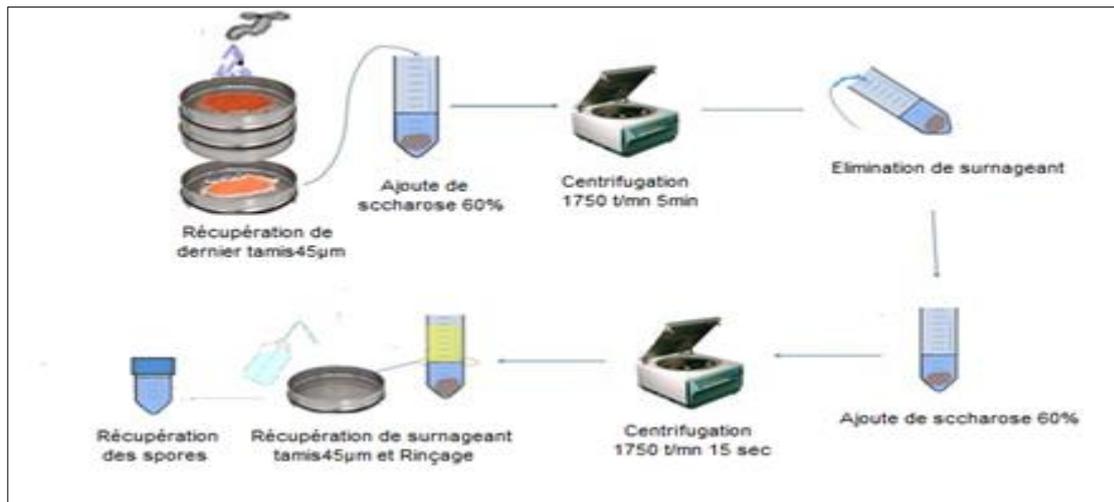
les plantes montrent des signes de carence en phosphore ou en azote, elles ont été irriguées à la solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938) (annexe 4). Après 42 jours de culture, les plantes de maïs ont été dépotées, leur hauteur a été mesurée, leur système racinaire a été utilisée pour l'estimation du taux de colonisation MA et le substrat de sol séché à température ambiante pour l'extraction et caractérisation phénotypique des spores, suivant les protocoles déjà décrits précédemment.

#### **II.2.2.2 Extraction des spores**

Les spores de CMA ont été extraites par la technique de tamisage humide de Gerdemann et Nicolson (1963) suivie d'une centrifugation selon la méthode décrite par (Daniels et Skipper, 1982).

100g de sol rhizosphérique sèche issus de la culture de maïs en pot a été déposé sur une série de tamis superposés à mailles décroissantes (500-250-125-63-45 $\mu$ m de diamètre) et soumis à un jet d'eau de robinet jusqu'à ce que l'eau qui en ressorte devienne claire et limpide.

Pour optimiser le rendement, cette étape de mise en suspension suivie de tamisage a été répétée au moins trois fois. Les particules retenues dans le tamis de 45 $\mu$ m de diamètre ont été récupérées dans des tubes de centrifugation remplis à 1/3 d'une solution de saccharose à 60% (p/v). Ces tubes ont été soumis à une première centrifugation à 1 750 tr/mn pendant 5 minutes. À l'issue de la première centrifugation, le surnageant et les particules flottantes ont été éliminés. Les spores et les autres particules sédimentées au fond des tubes ont été reprises dans une solution de saccharose à 60% (p/v). Le mélange sédiments-saccharose a été de nouveau centrifugé à 1 750 tr/mn pendant 15 secondes. Le surnageant a été filtré à travers un tamis de 45 $\mu$ m de diamètre afin de récupérer les spores, puis rincées avec l'eau distillée pour éliminer le saccharose. Les suspensions sporales obtenus ont été conservées à 4°C pour l'observation, le comptage et l'identification morphologique (Fig. 20).



**Figure 20** : Protocole d'extraction des spores de CMA.

### II.2.2.3 Dénombrement des spores

Les suspensions sporales de CMA récupérées par tamisage humide ont été mis en agitation et 5 ml ont été déposés dans une boîte de Pétri dont la surface est quadrillée pour faciliter le comptage des spores sous la loupe binoculaire.

Le nombre moyen de spores est exprimé par 100g de sol sec. L'abondance relative des spores (**ARS**) est déterminée (Johnson *et al.*, 1991) comme suit :

$$\text{ARS} = \left[ \left( \frac{\text{le nombre total des spores observées d'une espèce}}{\text{nombre total des spores observés dans le site concerné}} \right) \times 100 \right]$$

### II.2.2.4 Caractérisation morphologique des spores

Les spores de CMA ont été isolées l'aide d'une pipette pasteur et montés entre lame et lamelle dans le glycérol afin d'être examinées au microscope photonique sur la base de leur caractères phénotypiques (Fig. 21), les mesures ont été effectuées au différent grossissement qui permet de mieux distinguer le pourtour de la spore.

Ces dernières ont été pré-identifiées sur la base des paramètres systématiques des spores et des hyphes suspenseurs (annexe 5).

| Classes ordres            | Familles                   | Genres                  | Spores              | Perois des spores | Structures mycorrhiziennes    |         |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------------|---------|
| <b>Glomeromycetes</b>     |                            |                         |                     |                   |                               |         |
| <b>Glomerales</b>         | <b>Glomeraceae</b>         | <i>Glomus</i>           |                     | 1                 | Vesicles, Arbuscl, Hyphae     |         |
|                           |                            | <i>Funnelliformis</i>   |                     | 1                 | V, A, H                       |         |
|                           |                            | <i>Septoglomus</i>      |                     | 1                 | V, A, H                       |         |
|                           |                            | <i>Simiglomus</i>       |                     | 1                 | V, A, H                       |         |
|                           | <b>Entrophosporaceae</b>   | <i>Claroideoglomus</i>  |                     | 1                 | V, A, H                       |         |
|                           |                            | <i>Albahypha</i>        |                     | 1                 | V, A, H                       |         |
|                           |                            | <i>Viscospora</i>       |                     | 1                 | V, A, H                       |         |
|                           |                            | <i>Entrophospora</i>    |                     | 2                 | V, A, H                       |         |
|                           | <b>Diversisporales</b>     | <b>Diversisporaceae</b> | <i>Diversispora</i> |                   | 1                             | V, A, H |
|                           |                            |                         | <i>Redeckera</i>    |                   | 1                             | V, A, H |
|                           |                            |                         | <i>Otospora</i>     |                   | 2                             | V, A, H |
|                           |                            |                         | <i>Tricispora</i>   |                   | 2                             | V, A, H |
|                           |                            | <b>Sacculosporaceae</b> | <i>Sacculospora</i> |                   | 3                             | V, A, H |
|                           |                            | <b>Pactisporaceae</b>   | <i>Pactispora</i>   |                   | 2                             | V, A, H |
| <b>Acaulosporaceae</b>    |                            | <i>Kuklospora</i>       |                     | 3                 | V, A, H                       |         |
|                           |                            | <i>Acaulospora</i>      |                     | 3                 | V, A, H                       |         |
| <b>Gigasporales</b>       | <b>Scutellosporaceae</b>   | <i>Orbispora</i>        |                     | 3                 | A, H                          |         |
|                           |                            | <i>Scutellospora</i>    |                     | 3                 | A, H                          |         |
|                           | <b>Dentiscutaleaceae</b>   | <i>Fuscutata</i>        |                     | 3                 | A, H                          |         |
|                           |                            | <i>Dentiscutata</i>     |                     | 3                 | A, H                          |         |
|                           |                            | <i>Quatunica</i>        |                     | 4                 | A, H                          |         |
|                           |                            | <i>Racocetra</i>        |                     | 3                 | A, H                          |         |
|                           | <b>Racocetraceae</b>       | <i>Cotraspora</i>       |                     | 3                 | A, H                          |         |
|                           |                            | <i>Racocetra</i>        |                     | 2                 | A, H                          |         |
|                           | <b>Gigasporaceae</b>       | <i>Gigaspora</i>        |                     | 1                 | A, H                          |         |
|                           | <b>Archaeosporomycetes</b> |                         |                     |                   |                               |         |
| <b>Archaeosporales</b>    | <b>Ambisporaceae</b>       | <i>Ambispora</i>        |                     | 3 (Ac)<br>1 (Gl)  | V, A, H                       |         |
|                           | <b>Archaeosporaceae</b>    | <i>Archaeospora</i>     |                     | 2 (Ac)<br>1 (Gl)  | A, H                          |         |
|                           |                            | <i>Intraspora</i>       |                     | 2 (Ac)<br>1 (Gl)  | A, H                          |         |
|                           | <b>Geosiphonaceae</b>      | <i>Geosiphon</i>        |                     | 1                 | Associated with cyanobacteria |         |
| <b>Paraglomeromycetes</b> |                            |                         |                     |                   |                               |         |
| <b>Paraglomerales</b>     | <b>Paraglomeraceae</b>     | <i>Paraglomus</i>       |                     | 1                 | A, H                          |         |

**Figure 21 :** Caractéristiques morphologiques d'un grand nombre de Glomeromycota des classes jusqu'aux genres (Oehl *et al.*, 2011).

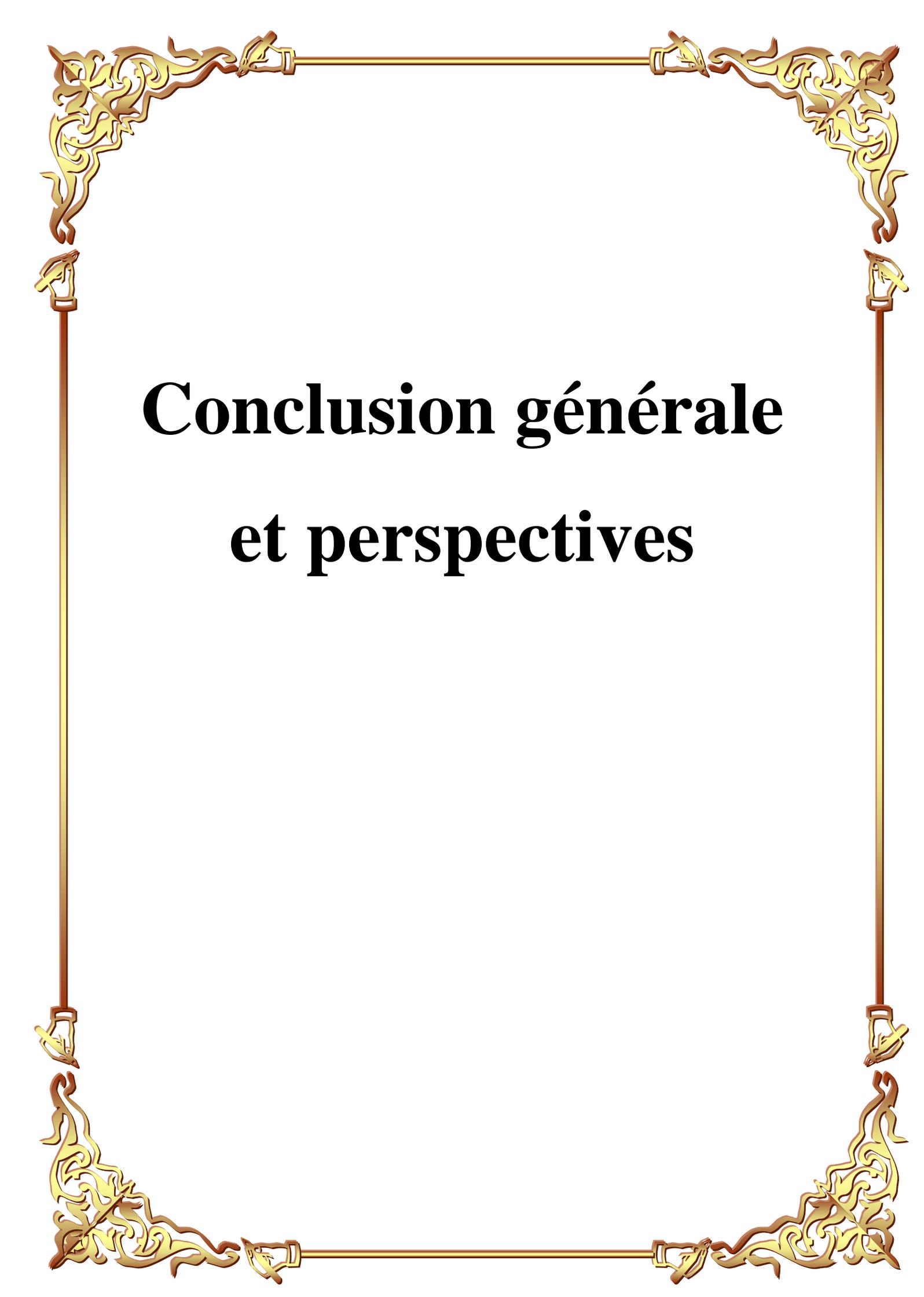
Pour identifier les différentes spores, nous avons utilisé le manuel de Schenck et Perez (1990) et le site de Blaszkowski (2006)

<http://www.agro.ar.szczecin.pl/jblaszkowski/SpeciesdescriptionsofAMF.html>.

Ainsi que les descriptions fournies sur les sites internet de l'INVAM (West Virginia University, Morgantown, USA) <http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>.

**II.3 Traitement des données**

Les variables de réponse telles « fréquence de colonisation, intensité de la colonisation, intensité arbusculaire, mesure de la hauteur » ont été représentées via Microsoft Excel 2007.



# **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale et perspectives

---

### Conclusion générale et perspectives

Les biofertilisants à base de mycorhizes autochtones est un projet qui peut participer dans l'amélioration de la fertilité des sols cultivés et d'assurer la durabilité de la production agricole Algérienne.

Les différents résultats enregistrés dans ce mémoire ont permis d'atteindre l'objectif fixé au départ. D'un point de vue méthodologique, la technique de coloration par la méthode de Philippe Haymann 1970 a été efficace pour l'étude de la mycorhization.

L'examen microscopique des racines de *Medicago sativa L.* ont révélé la présence de différentes structures caractéristique de MA à l'exception des arbuscules. La colonisation par les CMA atteindre 93% pendant le stade sans floraison, 99% pendant le stade de floraison 72% pendant le stade de formation des gousses.

En parallèle l'examen microscopique des racines de maïs a révélé la présence, dans la plupart des racines, des structures caractéristiques des mycorhizes à arbuscules : arbuscules, vésicules, spores, cellules auxiliaires, mycélium septé. Ce résultat est spectaculaire car les deux types de colonisation endomycorhizienne arbusculaire « *Arum* » et « *Paris* » ont été observées.

Le taux de colonisation des racines par les CMA est très élevé 90% indiquant que cette plante est hautement mycotrophe. Les résultats révèlent que les complexes mycorhiziens indigènes de sol de *Medicago sativa L.* favorisent la croissance aérienne des plantes de maïs mycozhiés par apport aux plantes témoin non mycozhiés.

Par ailleurs, la technique d'extraction des spores à partir de la mycorhizosphère de maïs, nous a permis de conclure que la mycorhizosphère contient une différente variété des spores ce qui avantage de faire des recherches pour la sélection des champignons mycorhizes les plus performants.

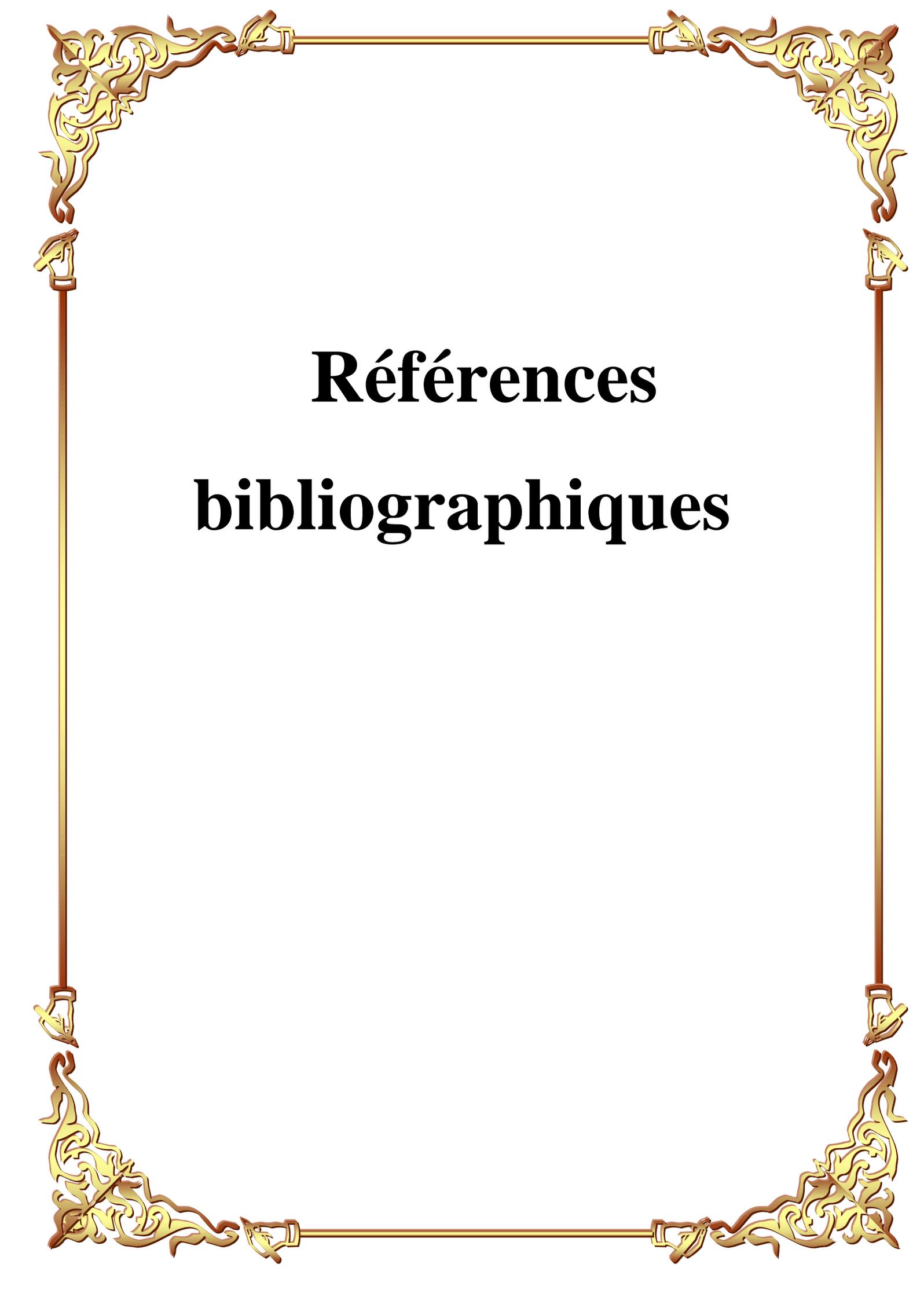
Les perspectives envisagées pour compléter cette étude sont les suivantes :

- ✓ L'isolement, la caractérisation des champignons mycorhiziens à haut pouvoir pour enrichir leur collection.
- ✓ Constitution d'une collection de souches provenant de diverses plantes.
- ✓ Le transfert des expérimentations aux champs en matière de production d'inoculum à base de souches performantes ; test de leur efficacité à échelle pilote, en pépinière et dans des parcelles d'expérimentation.
- ✓ Installation des unités de production de biofertilisants à base de micro-organismes autochtones.

## Conclusion générale et perspectives

---

- ✓ Mise au point des techniques de biologie moléculaire.
- ✓ Envisager de la production d'inoculum mixte (rhizobium, mycorhize) à l'échelle pilote dans premier temps puis généralisé à l'échelle industrielle.
- ✓ Valorisation des ressources végétales naturelles en Algérie pour contribuer au développement, à l'amélioration de sécurité alimentaire et de l'environnement par le biais de l'accroissement de la production végétale en respectant la stabilité environnementale pour le développement d'une agriculture biologique durable.



# **Références**

## **bibliographiques**

## Références bibliographiques

- 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.
- Abdelguerfi A. et Chebouti A., 2002.** Les espèces fourragères et pastorales, leur utilisation au Maghred (Algérie, Maroc et Tunisie). FAO-RNE, p 135.
- Akiyama K., Matsuzaki k., Hayashi H. 2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. 435 : 824-827.
- Alexander I.J., Ahmad N., See L.S. 1989.** Mycorrhizas in tropical forests. Dans: Proctor J. (ed) Mineral nutrients in tropical forest and savanna ecosystem. Blackwell Scientific Publications, pp. 169- 188.
- Al-Garni S.M.S. 2006.** Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer Rhizobium bacterium. *African Journal of Biotechnology*. 5: 133-142.
- Alguacil M.M., Hernández J.A., Caravaca F., Portillo B., Roldán A. 2003.** Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiologia Plantarum*. 118: 562-570.
- Allen MF .1992.** Mycorrhizal Functioning. Chapman Hall, New York.
- Apse M.P., Blumwald E. 2002.** Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 146-150.
- Aroca R., Ferrante A., Vernieri P., Chrispeels M.J. 2006.** Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. *Annals of Botany*. 98: 1301-1310.
- Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. 2007.** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses. *New Phytologist*. 173: 808-816.
- Aroca R., Vernieri P., Ruiz-Lozano J.M. 2008.** Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*. 59: 2029-2041.
- 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.
- Augé R.M. 2001.** Water relations, drought and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11: 3-42.

- BAAMER M. 1998.** Comportement de quelque variété introduite et population saharienne de luzerne dans la région d'Ouargla, M.I.A.S, I.H.A.S, Ouargla. 15-27.
- Bago B., Cano C., 2005.** Breaking Myths on Arbuscular mycorrhizas in Vitro Biology. In Vitro Culture of Mycorrhizas. (Ed. by S. Declerck, D. G. Strullu, and A. Fortin). *Soil Biol.* 4 : 111-138.
- Bago B., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology.* 124: 949-958.
- Bago B., Pfeffer P., Shachar-Hill Y. 2001.** Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *New Phytol.* 149 : 4-8.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piché Y .1999.** Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo twophoton microscopy. *Protoplasma.* 209: 77-89.
- 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.
- Becard G., Fortin J. A. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhizaformation on Ri T-ADN transformed roots. *New Phytol.* 108 : 211-218.
- Benabderrahim M. A., Haddad M. et Ferchichi A., 2008.** Essai d'adaptation de 16 cultivars de luzerne pérenne (*Medicago sativa L*) dans un système oasien du sud tunisien : Gabes (local) et 15 cultivars étrangers. *Option méditerranéennes.* Série A, N°79. CIHEM, 419-422.
- 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.
- Blaszcowski J., 1993.** *Scutellospora armeniaca*, a new species in glomales (zygomycetes) from Mycologia. **84**, 6: 939-944.
- Blaszkowski J., Czerniawska B., 2006.** The occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi of the phylum Glomeromycota in Israeli soils. *Acta Soc. Pol.* 75 : 339-350.
- Bolan N.S. 1991.** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil.* 134:189-207.
- Bonfante P., Genre A. 2010.** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications.* 1: 48.
- Bonfante P., Perotto S. 1995.** Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130 : 3-21.

- 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.
- Boulet F., Lambers H. 2005.** Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi colonisation in cluster roots of shape *Hakea verrucosa* F. Muell (Proteaceae), and its effect on growth and nutrient acquisition in ultramatic soil. *Plant and Soil*. 269 : 357-367.
- Boullard B., 1968.** Les mycorhizes. (Eds.) Masson et Cie, Paris, France, 135 p.
- Bourgeois Bach S. 2005.** Culture et utilisation de la luzerne. ProConseil, Moudon, Association pour le développement de la culture fourragère, domaine de changins.
- Bourrelier P.H., Berthelin J. 1998.** Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. *Rapport de l'Académie des sciences*. 42 : 440 .
- Brundrett M. C. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. 154: 275-304.
- Brundrett M. C. 2009.** Mycorrhizal association and other means of nutrition of vascular plants : understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*. 320 : 37-77
- 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.
- Brundrett M C, Kendric B. 1990a.** The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytol*. 144 : 457-468.
- Buée 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.
- Camprubí A, Calvet C, Cabot P, Pitet M, Estaún V. 2010.** GlomerArbuscularmycorrhizal fungi associated with psammophilic vegetation in Mediterranean coastal sand dunes. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: 96-102.
- Cantrell I. C., Linderman R. G. 2001.** Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil*. 233: 269-281.
- Casieri L., Lahmidi N.A., Doidy J, Veneault-Fourrey C., Migeon A., Bonneau L., Courty P.E., Garcia K., Charbonnier M., Delteil A., Brun A., Zimmermann S., Plassard C,**

- Wipf D. 2013.** Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza*. 23: 597-625.
- Cavagnaro T. R., Gao L. L., Smith F. A., Smith S. E., 2001.** Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytol.* 151 : 469-475.
- Chaudhary VB, Lau MK, Johnson NC (2008).** Macroecology of Microbes-Biogeography of the Glomeromycota. Varma A. (ed.). *Mycorrhiza*: 529-561.
- 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.
- Cho k., Toler H., Lee J., Ownley B., Stutz. J. C., Moore. J. l., Augé R. M., 2006.** Mycorrhizal symbioses and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *J. Plant Physiol.* 163 : 517-528.
- Commission Des Communautés Européennes. 2002.** Vers une stratégie thématique pour la protection des sols-COM (2002) 17 final. Bruxelles le 16.4.2002, 39 p.
- Cornet F., Diem H. G. 1982.** Etude comparative de l'efficacité des souches de rhizobium d'Acacia isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium-Glomus mosseae* sur la croissance d'Acacia holosericea et A. Raddiana. *Revue Bois et forêts des Tropique*. 198 : 3-15.
- Cruz C., Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., Martins-Loução M. A, Jakobsen I. 2007.** Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizae fungi. *Plant Physiol.* 144 : 782-792.
- Cruz C, Ramos A. C, Façanha A. R, Feigó J. A, Martins-Loução M. A. 2009.** Enzyme activity modulated by AMF colonization : the urea cycle and membrane-bound phosphatase activities. In: Ashok K. Chauhan and Ajit varma. (Org.). Text Book on molecular Biotechnology. 1 Ed. i.K. international Publishing House Pvt. Chapter Xvi : 1-1336.
- Dalpé Y. 2005.** Les Mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection*. 86 : 53-59.
- Dalpé Y.2006.** Mycorhizes et bénéfiques marginaux. *Québec Vert* : 8-9.
- Danneberg G., Latus C., Zimmer W., Hundeshagen B., Schneider-Poetsch Hj., Bothe H. 1992.** Influence of vesicular arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.* 141: 33-39.
- Davey M., Currah R. S. 2006.** Interactions between mosses (Bryophyta) and fungi. *Canadian Journal of Botany*. 84 : 1509-1519.
- Declerck S. 2014.** Gestion intégrée du système sol/plante. Document non publié, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve. *Memoirs*. 5: 1-76.

- Declerck S., D'Or D., Bivort C., de Souza F. A., 2004.** Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture : spore production and function of auxiliary cells. *Mycol. Res.* 108 : 84-92.
- Declerck S., Strullu D. G., Plenchette C., 1998.** Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. Isolated from tropical ecosystem : a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia.* 90 : 576-585.
- Delalande M., Greene S., Hughes S., Nair R., Huguet T., Aouani ME., Prospero J.M. 2007.** Wild accessions / populations. *Medicago truncatula handbook.* 1-27.
- Deliane E, Chiraa A, Chira L, Savulescu E. 2011.** Arbuscular mycorrhizae : an overview. South western Journal of Horticulture, *Biology and Environment.* 2 : 167-192.
- Dewhurst R. et Coulmier D., 2004.** Effets des extraits à base de luzerne sur les acides gras du lait de vaches laitières Holstein. *Renc. Rech. Ruminants,* 2004, 11.
- Dexheimer J. 1997.** Étude structurale et fonctionnelle des interfaces entre le champignon et la plante-hôte. *Rev. For. Fr.* 43-56.
- Dickson S. 2005.** The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist.* 163: 187-200.
- Dickson S., Smith F.A., Smith S.E. 2007.** Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza.* 17: 375-393.
- 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.
- Druva-Lusite I., Ievinsh G. 2010.** Diversity of arbuscular mycorrhizal symbiosis in plants from coastal habitats. *Environmental and Experimental Biology.* 8 : 17-34.
- Duceppe M.O., Bertrand A., Pattathil S., Miller J., Castonguay Y., Hahn M.G., Michaud R., Dubé M. P. 2012.** Assessment of genetic variability of cell wall degradability for the selection of Alfalfa with improved saccharification efficiency. *BioEnergy Res.* 5(4): 904 -914.
- Evelin H., Kapoor R., Giri B. 2009.** Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany.* 104: 1263-1280.
- Feng G., Zhang X., Li X., Tian C., Tang C., Rengel Z. 2002.** Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza.* 12: 185-190.
- Ferrol N., González-Guerrero M., Valderas A., Benabdellah K., Azcón-Aguilar C. 2009.** Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochemistry Reviews.* 8: 551-559.

- Finlay R. D. 2008.** Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*. 59:115-1126
- 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.
- Fortin J. A., Plenchette C., Piche Y. 2011.** Les mycorhizes: la nouvelle révolution verte, Editions Multimondes et Editions QUAE.
- Founoune H. 2001.** La symbiose ectmycorhizienne des Acacias Australiens en Afrique de l'Ouest : impact sur le développement de la plante hôte. 186.
- Francis R., Read D. J. 1994.** The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and Soil*. 159 : 11-25.
- Fraústro Da Silva J. J. R., Williams R. J. P. 2001.** The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life, 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford: Clarendon Press.
- Garbaye J. 2013.** La symbiose mycorhizienne: Une association entre les plantes et les champignons. Éditions QUAE, Versailles.
- Garcia-Garrido J. M., Ocampo J. A. 2002.** Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* 53: 1377-1386.
- Garg N., et Chandel S. 2010.** Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30: 581-599.
- Gavériaux J.P., 2012.** Les Glomeromycota – Mycorhizes VAM et Geosophon pyriformis (Kützing) Wettstein, *Bull. Soc. Mycol. Nord Fr.* 92 : 1-17.
- 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.
- Gerdemann J. W., Nicolson T. H. 1963.** Spores of endomycorrhizal endo- gone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46 : 235-244.

**Gerdemann J. W., Trappe J. M. 1974.** The Endogonaceae in the Pacific North West. *Mycologia*.

**Gianinazzi S., Gollotte A., Binet MN., van Tuinen D., Redecker D. et Wipf D., 2010.** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*. 20 :519-530.

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

**Giovannetti M., Sbrana L., Avio L. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungal mycelium: from germlings to hyphal networks. *Mycorrhizal Technology In: Agriculture Ed : by Gianinazzi S, SchOepp H, Barea JM, Haselwandter K.* 49-58.

**Giovannetti M, Avio L., Sbrana C. 2010.** Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth: physiological and genetic aspects. Dans: Koltai H., Kapulnik Y (Eds) *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and Function*, 2nd Edition.

**Giri B., Kapoor R., Mukerji K.G. 2007.** Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology*. 54: 753-760.

**Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P., Del-carte J. 2010.** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14 :549-560.

**González-Guerrero M., Melville L. H., Ferrol N., Lott J. N. A., Azcón-Aguilar C., Peterson R. L. 2008.** Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 103-110

**González-Guerrero M., Benabdellah K., Ferrol N., Azcón-Aguilar C. 2009.** Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhizas. Dans: Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (eds) *Mycorrhizas -Functional processes and Ecological Impact*. Springer-Verlag, Germany. 1-16.

**Govindarajulu P., Altwegg R., Anholt B. R. 2005.** Matrix model investigation of invasive species control : bullfrogs on vancouver island. *Ecol Appl*. 15 : 2161-2170.

**Guether M., Balestrini R., Hannah M. A., Udvardi M. K., Bonflote P., 2009.** Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytol*. 182 : 200-212.

- Guether M., Neuhauser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P. 2009.** A mycorrhizal specific mycorrhizal fungi ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*. 150 : 73-83.
- Guissou T., B A A. M., Plenchette C., G Uinko S., Duponnois R., 2001.** Effects des mycorrhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique de quatre arbres fruitiers. *Science et changements planétaires/ Sécheresse*. 12, 2: 121-127.
- Gutteridge J. M., Halliwell B. 1989.** Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillière's clinical haematology*. 2: 195-256.
- Habibzadeh Y. 2015.** The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus levels on dry matter production and root traits in cucumber (*cucumis sativa L.*). 9 : 65-70.
- Hanway J. J., Heidel H. 1952.** Soil analysis methods as used in Iowa State College soil testing laboratory. *Iowa Agricultural News*. 57: 1-31
- Harley J. L., 1986.** Mycorrhizal studies : past and future. In : Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. 1<sup>er</sup> 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.
- Hart M. M., Klironomos J. N., 2002.** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning In : Van der Heijden MGA, Sanders IR (Eds) *Mycorrhizal ecology*, vol 157. New York. 225-242.
- Hatimi A, Tahrouch S. 2007.** Caractérisations chimique, botanique et microbiologique du sol des dunes littorales du souss-Massa. *biomatec Echo*. 2 : 85-97.
- Hause, B. & Fester, T. (2005).** Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, 15:373-379.
- Hausmann N. cT., Hwakes C. cV. 2009.** Plant neighborhood control of arbuscular mycorrhizal community composition. *New Phytologist*. 183 : 1188-1200.
- 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.
- Hirrel M C, Mehravaran H, Gerdemann J W. 1978.** Vesicular arbuscular mycorrhizae in the *Chenopodiaceae and cruiiferae* : do they occur ? *Can J Bot*. 56 : 2813-2817.

- He Z. Q., He C. X., Zhang Z. B., Zou Z. R., Wang H. S. 2007.** Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 59: 128-133.
- Heggo A., Angle J.S., Chaney R.L. 1990.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry*. 22: 865-869.
- Helgason T., Fitter A. 2005.** The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist*. 19 : 96-101.
- Hempel S., Götzenberger L., Kühn I., Michalski G. S., Rillig C. M., Zobel M., et al. 2013.** Mycozrhizas in the Central European flora-relationships with plant life history traits and ecology. *Ecology*. 94 : 1389-1399.
- Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. 2007.** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. 68: 139-146.
- Hnatyszyn M. et Guais A., 1988.** Les fourrages et l'éleveur. Agriculture d'aujourd'hui, Science-techniques et application, p 450.
- Hodge A., Helgason T., Fitter A. 2010.** Mini-review : Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*. 3, 267-273.
- Hopkins W.G. 2003.** Physiologie végétale. Deuxième édition, Bruxelles, De Boeck Université. 352.
- Ismail Y., Hijri M. 2012.** Arbuscular mycorrhization with *Glomus irregulare* induces expression of potato PR homologues genes in response to infection by *Fusarium sambucinum*. *Functional Plant Biology*. 39, 3 : 236-245.
- Ismail Y., Mc Cormick S., Hijri M. 2013.** *The arbuscular mycorrhizal fungus, Glomus irregular, controls the mycotoxin production of Fusarium sambucium in pathogenesis of potato*. Yaacov Okon édition, Federation of European Microbiological Societies, 6 p. 348. (Collection FEMS Microbiology Letters).
- Javot H., Pumplin N., Harrison M. J. 2007b.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis : Transport properties and regulatory roles. *Plant, cell Environment*. 30 : 310-322.
- Jeffries P. and Barea J. M. 2000.** Arbuscular mycorrhiza key component of sustainable plant–soil ecosystems, in: B., Hock (Ed.), *The Mycota. IX. Fungal Associations*. Springer, Berlin. 95-113.
- Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. et Barea JM., 2003.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*. 37:1-16.

- Jindal V., Atwal A., Sekhon B. S., Singh R. 1993.** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on metabolism of moong plants under NaCl salinity. *Plant Physiology and Biochemistry*. 31: 475-481.
- Johansson J. F., Paul L. R., Finlay R. D. 2004.** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 1–12.
- Johnson D., Vande nkoornhuysen P. J., Leake J. R., Gilbert L., Booth R. E. Grime J. P., Young J. P. W., Read D. J., 2004.** Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytol.* **161**, 2: 503-515.
- Johnson N., Zak D., Tilman D., Pfleger F. 1991.** Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia*. **86**, 3: 349-358.
- Joner E.J. & Johansen A. (2000).** Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104, pp. 81-86.
- Jung M. C., Thornton I. 1996.** Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. *Applied Geochemistry*. 11: 53-59.
- Jung S. C., Martinez-Medina A., Lopez-Raez J. A., Pozo M. J. 2012.** Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *Journal of chemical Ecology*, **38** : 651-664.
- Juniper S., Abbott L. K. 1993.** Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity. *Mycorrhiza*. 4: 45-57.
- 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.
- 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.
- karandashov V., Bucher M. 2005.** Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends plant Sci.* 10 : 22-29.
- Kernaghan G., 2005.** Mycorrhizal diversity : cause and effect. *Pedobiol.* 49 : 511-520.
- Koffi M C., De La Providencia I. E., Elsen A., Declerck S. 2009.** Development of an in vitro culture system adapted to banana mycorrhization. *African Journal of Biotechnology*. 8: 2750-2756.
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. G., et al. 2003.** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. 131: 952-962.

- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R. J., Downie J.A., Oldroyd G. E. 2008.** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 105: 9823-9828.
- Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R., Franken P. 2000.** Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta*. 211: 85-90.
- Lagrange A., Ducouso M., Jourand P., Majorel C., Amir H. 2011.** New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian Journal of the Microbiology*. 57 : 21-28.
- Lambers H., Clements J. C., Nelson M. N. 2013b.** How a phosphorus acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of lupines (*Lupinus, Fabaceae*). *American Journal of Botany*. 100 : 263-288.
- Lapeyronie A. 1982.** Les productions fourragères. Edition Maisonneuve et Larose. 425.
- Laouar M. et Abdelguerfi A., 2006.** Variabilité de la production de gousses et des graines chez quelques populations spontanées de *Medicago Intextra*. *Options Méditerranéennes*. pp 111-117.
- Leake J. R., Johnson D., Donnelly D. P., Muckle G. E., Boddy L., Read D. J. 2004.** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1016-1045.
- Lee Y. J., George E. 2005.** Contribution of mycorrhizal hyphae to the uptake of metal cations by cucumber plants at two levels of phosphorus supply. *Plant and Soil*. 278: 361-370.
- Lemaire G. 2006.** La luzerne : Productivité et qualité, Workshop international sur Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes : Applications biotechnologique, agronomiques et environnementales. Editeur Dr. Abdelguerfi A, Alger. 174 -182.
- Lesins K. A., Lesins I. 1979.** Genus *Medicago* (Leguminosae). A Taxogenetic study. The Hague, Boston, London.: W. Junk.
- Le Tacon F., Le Tacon T Mauron V., Rousseau Y., Backer M., Bouchard D. 1999.** Fertilisation raisonnée et mycorrhize. 4<sup>ème</sup> rencontre de la fertilisation raisonnée. Blois, novembre-décembre 1999. 211-222.
- Leveque C., Mounolou J. C., 2001.** Biodiversité. Dynamique biologique et conservation, Masson Sciences, Dunod, 248 p.

**Leyval C., 2005.** Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on heavy metal and radionuclide transfer to plants. In: PM Huang & GR Gobran (Eds) Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere. Elsevier, Amsterdam. 419-429.

**Li T., Hu Y. J., Hao Z. P., Li H., Wang Y. S., Chen B. D. 2013.** First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New phytologist*. 197: 617–30.

**Li X. L., Marschner H., George E. 1991.** Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil*. 136: 49-57.

**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.

**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.

**Malloch D, Malloh B. 1981.** The mycorrhizal status of boreal plants : species from northeastern Ontario. *Can J Bot*. 59 : 2167-2172.

**Marinoff Mariela A., Zago Gustavo L., Pzocik Horacio J., Chifa Carlos., Giménez, Maria C. 2005.** Contribution al conocimiento de la actividad farmacologica de *Medicago sativa L.* (Fabaceae), “alfalfa”. Comunicaciones Cientificas y Tecnológicas., Universidad Nacional Del Nordeste.

**Marschner H. 1995.** Mineral Nutrition in Higher Plants. Academic Press, London, RU.

**Marschner H., Dell B. 1994.** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil, Dordrecht*. 159 : 89-102.

**Marulanda A., Azcón R., Ruiz-Lozano J. M. 2003.** Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*. 119: 526-533.

**Marulanda A., Porcel R., Barea J. M., Azcón R. 2007.** Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial Ecology*. 54: 543-552.

**Matsuda Y., Noguchi Y., Ito S. 2009.** Ectmycorrhizal fungal community of naturally regenerated *Pinus thunbergii* seedling in a coastal pine forest. *J. For. Res.* 14 : 335-341.

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

markers. Doctor of philosophy (plant breeding and plant genetics). Uni wisconsin, Madison. Eata-Unis, p 118.

**Mauriès M. 1994.** La luzerne aujourd'hui. 1<sup>ère</sup> Edition France Agricole. 254.

**Mauriès M., 2001.** A Comparison of two methode of Combining Alfalfa Cubes With Corn Silage Fed to Lactating Cows. Revue : *Canadian Journal of animal science-Canada* (1977) 57,559-565.

**Mauriès M. 2003.** Luzerne culture, récolte, conservation, utilisation. Ed. France Agricole. 240.

**Mikola P. 1988.** Ectendomycorrhiza of conifers. *Silviafennica*. 22: 19-27.

**Mille G. Louppe D. 2015.** Mémento du forestier tropical. Editions Quae.

**Miller J. C., Rajapakse S., Garber R. K. 1986.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae in vegetable crops. Hort science. 21 : 974-984.

**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.

**Morton J. B. 1990.** Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia*. 82: 192–207.

**Morton J. B. Benny G. L. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order Glomales and Gigasporineae and two new families Acaulosporaceae and Gigasporaceae with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*. 37: 471-491.

**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.

**Morton J. B., Msiska Z. 2009.** Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. *Mycorrhiza*. 20: 483-496.

**Morton J. B., Redecker D. 2001a.** Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*. 93: 181-195.

- Mullen R B, Schmidt S K. 1993.** Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adonejis* : implications for the functioning of mycorrhizae in in alpine systems. *Oecologia*. 94 : 229-234.
- Newman E. I., Devoy, C. L. N., Easen N. J., Fowles K. J. 1994.** Plant species that can be linked by VA mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 126, 4: 691-693.
- Newman E. I. Reddell P.** Distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist*. 106: 745-751.
- Oehl F., Da Silva G. A., Goto B. T., Maia L. C., Sieverding E. 2011.** Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon*. 116: 365-379.
- Oehl F., Da Silva G. A, Goto B. T., Sieverding E. 2011b.** Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon*. 116: 75-120.
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K., Da Silva G. A. 2011c.** Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*. 2:191-199.
- Oehl F., De Souza F. A., Sieverding E. 2008.** Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon*. 106: 311-360.
- Ojala J.C., Jarrell W. M., Menge J. A., Johnson E. L. V. 1983.** Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil. *Agronomy Journal*. 75: 255-259.
- Oldroyd G. E. D., Downie J. A. 2006.** Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 351-357.
- Olsson P. A., Tyler G. 2004.** Occurrence of non-mycorrhizal plant species in south Swedish rocky habitats is related to exchangeable soil phosphate. *Journal of Ecology*. 92 : 808-815.
- Parniske M. 2008.** Arbuscular mycorrhiza : the mother of plant root endosymbioses. *Nature Rev Microbiol*. 6 : 763-775.
- Paszkowski U 2006.** A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 172: 35–46.
- Peay K., Kennedy P. G., Davies S. J., Tan S., Bruns T. 2009.** Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New Phytologist*. 185: 525-538.
- Peterson L. R., Massicotte Hugues B., Melville Lewis H. 2004.** Mycorrhizas : Anatomy and Cell Biology. *NRC research press. Ottawa 2004*. 1-3, 147-153.

- Peyraud J.L., Delaby L. et Lebois S., 1998.** Comparison of dehydrated lucerne and straw to reduce sub-acute reminal acidosis syndrome in dairy cows fed highly energetic diets. *Coop de France Déshydratation*.
- Pfleger F. L., Linderman. R. G. 1994.** Mycorrhizae and plant health. APS Press, *The American phytopathological society, ST. Paul, Minnesota*. 334.
- Phillips J. M, Hayman D. S. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. **55**, 1: 158–161.
- Pitman M., Läuchli A. 2002.** Global impact of salinity and agricultural ecosystems. Dans: Läuchli A., Lüttge U. (eds) *Salinity: environment–plants–molecules*. Springer, Netherlands. 3-20.
- 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.
- Porcel R., Aroca R., Cano C., Bago A., Ruiz-Lozano J.M. 2006.** Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microbial Ecology*. **52**: 575-582.
- Porcel R., Aroca R., Ruiz-Lozano J.M. 2012.** Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. **32**: 181-200
- Porcel R., Ruiz-Lozano J.M. 2004.** Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany*. **55**: 1743-1750.
- Pringle A., Bever J. D., 2002.** Divergent phonologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in a North Carolina grassland. *Am. J. Bot.* **89** : 1439-1446.
- Prosperi J.M., Oliviers I., Angevain M., Genier G. et Nansat P., 1993.** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. *Courrier de l'environnement de l'INRA*. Sauvequi peut n°4 (S4). 17-24.
- 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
- Purin, S. Rillig., M. C. 2007.** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalean : Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*. **51** : 123-130.

- Ramoliya P. J., Patel H. M., Pandey A. N. 2004.** Effect of salinization of soil on growth and macro- and micro-nutrient accumulation in seedlings of *Salvadora persica* (Salvadoraceae). *Forest Ecology and Management*. 202: 181-193.
- 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., Schimitberger 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.
- Redecker D., Morton J. B., Bruns T. D., 2000.** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol. Phyloge. Evol.*, 14(2) : 276-284.
- Redecker D., Raab P. 2006.** Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia*. 98: 885-895.
- Redecker D., Schüßler A., Stockinger H., Stuermer S. L., Morton J. B, Walker C. 2013.** An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*. 23: 515-531.
- Reinhardt., D.2007.** Programming good relations -development arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*. 10 :1-8.
- Reinhardt, D. (2007)** Programming good relations--development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 1: 98-105.
- Renault J-C., 2003.** La luzerne : culture-utilisation. Co édité par le GNIS, Aravalis-Institut du végétal et l'élevage.
- Repetto O., Bestel-Corre G., Dumas-Gaudot E., Berta G., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. 2003.** Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist*. 157: 555-567.
- Rerquena N, Jeffries P, Barea J M. 1996.** Assesment of natural mycorrhizal potential in a desertified semi arid ecosystem. *Appl Environ Micrbiol*. 62 : 842-847.
- Requena N., Serrano E., Ocón A., Breuninger M. 2007.** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. 68: 33-40.
- Rinaldi A. C., Comadini O., Kuyper T. W., 2008.** Ectomycorrhizal fungal diversity : separating the wheat from the chaff. *Fungal Divers*. 33 : 1-45.
- Rivière T., Diedhiou A.G., Diabate M., Senthilarasu G., Natarajan K., Verbeken A., Buyck B., Dreyfus B., Bena G., Bâ A.M. 2007.** Genetic diversity of ectomycorrhizal basidiomycetes from African and Indian tropical forests. *Mycorrhiza*, 17: 415-428.

- Rivera-Becerril F., Calantzis C., Turnau K., Caussanel J-P., Belinov A.A., Gianinazzi S., Strasser R.J., Gianinazzi-Pearson V. 2002.** Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1177-1185.
- Rivera-Becerril F., Metwally A., Martin-Laurent F., Van Tuinen D., Dietz K-J., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. 2005.** Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum sativum* L. *Water, Air, and Soil Pollution*. 168: 171-186.
- Robert P., Thiébeau P., Coulmier D. et Larbre D., 2010.** Luzerne et eau : mieux vaut prévenir que guérir. *COOP de France Déshydratation*.
- Rodríguez L., Ruiz E., Alonso-Azcárate J., Rincón J. 2009.** Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb-Zn mine in Spain. *Journal of Environmental Management*. 90: 1106-1116.
- Roldan A., Garcya-Orenes F., Lax A. 1994.** An incubation experiment to determine factors involving aggregation changes in an arid soil receiving urban refuse. *Soil Biol. Biochem.* 26 : 1699-1707.
- Ruiz Lozano J. 2003.** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. 13 : 209-317.
- Ruiz-Lozano J. M., 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.
- Ruiz-Sánchez M., Aroca R., Muñoz Y., Polón R., Ruiz-Lozano J. M. 2010.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*. 167: 862-869.
- Russelle M. 2001.** alfalfa. *Am .Sci.*7: 252-259.
- Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Miwa H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Murooka Y., Szczyglowski K., Downie J. A., Parniske M., Hayashi M., Kawaguchi M. 2007.** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*. 19: 610-624.
- Sánchez-Blanco M. J., Ferrández T., Morales M.A., Morte A., Alarcón J. J. 2004.** Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. *Journal of Plant Physiology*. 161: 675-682.

- Sanders I. R., Clapp J. P., Wiemken A. 1996:** The Genetic diversity of AM fungi in natural ecosystems a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New phytol.* 13:123-134.
- San Diego, CA, EEUU. pp 1-21. Dodd J.C., Burton C.C., Burns R.G. & Jeffries P. (1987).** Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 107, pp. 163-172.
- Schaarschmidt S., Roitsch T., Hause B. 2006.** Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*lycopersicon esculentum*) roots. *J Exp Bot.* 57 : 4015-1023.
- Schenck N. C. 1982.** Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- Schreiner R. P., Bethlenfalvay G. J. 1995.** Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology.* 15: 271-285.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycological Research.* 105: 1413-1421
- Schüßler A., Walker C. 2010.** The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University.
- Selvaraj T., Chelleppan P. 2006.** Arbuscular mycorrhizae: a diverse personality. *Central Eur. J. Agr.* 7: 349–358.
- Senoo K., Narumi I. 2006.** Carrier materials. 41-49. in : BiofertilizerManual. Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), Japan.
- Shane M. W., Cawthray G. R., Cramer M. D., Kuo J., Lambers H. 2006.** Specialized ‘dauciform’ roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with ‘cluster’ roots. *Plant, Cell & Environment.* 29 : 1989-1999.
- Shane M. W, Lambers H. 2005.** Cluster roots : a curiosity in context. *Plant ans Soil.* 274 : 101-125.
- Sharifi M., Ghorbanli M., Ebrahimzadeh H. 2007.** Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology.* 164: 1144-1151.
- Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. 2008.** Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza.* 18: 287-296.

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

**Simon L., Ousquet J., Levesque R. C., Lafonde M. 1993.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67-69.

**Small E, Jomphe M. 1989.** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canad. J. Bot.* 67: 3260 – 3294.

**Smith F. A., Smith S. E. 1997.** Structural diversity in (vesicular)- arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 137 : 373-388.

**Smith S. E., Facelli E., Pope S., Smith F. A. 2010.** Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*. 326: 3-20.

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

**Smith S. E., Read D. J. 2008.** Mycorrhizal symbiosis. 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press. San Diego. 16-32.

**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.

**Smith S. E, Smith F.A. 2012.** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*. 104 : 11-13.

**Song F. Q., Kong X. S. 2012.** Molecular process of arbuscular mycorrhizal associations and the symbiotic stabilizing mechanisms. *African Journal of Microbiology Research*. 6: 870-880.

**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.

**Strullu D. G., Diop T., Plenchette C. 1997.** Réalisation de collections in vitro de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 320: 41 -47.

**Stürmer S. L. 2012.** A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*. 22: 247-258.

**Sturmer S. L., 1998.** Characterization of diversity of fungi forming arbuscular endomycorrhizae in selected plant communities. Thesis in Forestry and Consumer Science. December, Morgantown, West Virginia. USA, 94p.

**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.

- Sylvia D. M., Sinclair W. A. 1983.** Phenolic compounds of resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology*.73: 390–397.
- Tahat M. M., Sijam K., Othman R. 2010.** Mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent. *Plant pathology Journal*. 9: 198-207.
- Tao L., Zhiwei Z., 2005.** Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China. *Appl. Soil Ecol.* 29 : 135-141.
- Taylor A. F. S., Alexander I. 2005.** The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*. 19: 102-112.
- 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.
- Tedersoo L., May T. W., Smith M. E. 2010.** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*. 20: 217-263.
- Tedersoo L., Nara K. 2010.** General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 185 : 351-354.
- Tester M., Smith S. E., Smith F. A. 1987.** The phenomenon of 'nonmycorrhizal' plants. *Canadian Journal of Botany*. 65 : 419-431.
- Teuber L. R., Brick M .A. 1988)** . Morphology and Anatomy. In : Hanson A.A., Barnes D.K. and Hill R.R. (Eds) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. 125-162.
- Timonen S., Smith F. A., Smith S. E. 2001.** Microtubules of mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in symbiosis with tomato roots. *Can. J. Bot.* 79 : 307-313.
- Tisserant E., Malbreil M., Kuo A., et al. 2013.** Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110: 20117-20122.
- Thiebeau p., Justes E. et Vanloot P., 2001.** Filière luzerne en France. Des atouts en faveur de l'environnement. *Perspectives Agricoles*-n°266-mars 2001. 32-36.
- Thiebeau p., Pamaudeau V. et Guy p., 2003.** Quel avenir pour la luzerne en France et en Europe. *Le courrier de l'environnement* n°49, juin 2003. 29-46.
- Trouvelot A., Kough J. L, Gianinazzi V. 1986.** Mesure de taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In:Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds.) *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Paris, France: INRA. 217–221.

- Van der Heijden M. G. A., Bardgett R. D., Van Straalen N. M. 2008.** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*. 11 : 296-310.
- 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.
- Villax E.J., 1963.** Les cultures fourragères méditerranéennes occidentales. I.N.R.A. Rabat. 375 p.
- Voets L., De la Providencia I. E., Declerck S. 2006.** Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytologist*. 172: 185-188.
- Walker C., Schüßler A. 2004.** Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research*. 108: 981-982.
- Walker C., Vestberg M., Demircik F., Stockinger H., Saito M., Sawaki H., Nishimura I., Schüßler A. 2007.** Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*. 111: 137-153.
- 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.
- Waligora C. 2010.** Introduire la luzerne. De l'azote en quantités industrielles. *Technique. Cultivar-mars*. 42-45.
- Wang B., Qiu Y. L. 2006.** phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16 : 299-363.
- Wipf D. 2013.** Les mycorhizes, une alliance plante-champignon découverte en 1885 et encore mal connue? Conférence lors de la 10<sup>ème</sup> rencontre Bourgogne Nature. Dijon. 15-16.
- Wubet T., Kottke I., Teketay D., Oberwinkler F., 2003.** Mycorrhizal status of indigenous trees in dry Afromontane forests of Ethiopia. *For. Ecol. Manage.*, 179 : 387-399.
- Watt M., Evans J. R. 1999.** Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology*. 121 : 317-323.
- Wu Q. S., Zou Y. N., Xia R. X., Wang M. Y. 2007.** Five *Glomus* species affect water relations of Citrus tangerine during drought stress. *Botanical Studies*. 48: 147-154.

**Wu Q. S., Xia R. X., Zou Y. N. 2008.** Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*. 44: 122-128.

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

**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.

**Zhang Y., Guo L. D. 2007.** Arbuscular mycorrhizal structure and fungi associated with mosses. *Mycorrhiza*. 17 : 319-325.

**Zhong Q. H., Chao X. H., Zhi B. Z., Zhi R. Z., Huai S. W. 2007.** Changes in antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. 59: 128-133.

#### **Sites internet**

**Dalpe Y., Monreal M. 2004.** Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping 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-discrettes-du-jardinier/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>>.

**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](https://tel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/737492/filename/VA2_STEVENIN_ARNAUD_23092011.pdf)>].

**UNIFA [Union des industries de la fertilisation]. 2016.** Site internet présentant des fiches pratiques à vocation éducatives sur les questions relatives à la fertilisation en agriculture, fiche « Parlons fertilisation », UNIFA Edition 2005 <[http://www.unifa.fr/fichiers/cd\\_ferti/dossiers/pdf/PI/3\\_RaisonnementFertilisation.pdf](http://www.unifa.fr/fichiers/cd_ferti/dossiers/pdf/PI/3_RaisonnementFertilisation.pdf) >.