

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعيدة مولاي الطاهر  
Université Saïda MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية العلوم  
Faculté des Sciences  
قسم البيولوجيا  
Département de Biologie

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master**

En : Biotechnologie végétale

Spécialité : Biotechnologie Végétale

Thème

## **Technologie d'étude de la symbiose mycorhizienne**

Présenté par :

- Mr : ZAHAF Khelifa
- Mr : HADDI Mohamed

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Melle. CHIKHI Amira	MCA Université SAIDA
Examineur	Mr. AMMAM ABDELKADER	MCA Université UMTS
Rapporteur	Mme FARES SORIA	MCA Université UMTS

Année universitaire 2021/2022



Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à :*

*Avant tout à l'âme de ma tante et mes grands parents*

*A ma très chers Mère*

*A ma grande Mère*

*Je ne serais pas arrivé ou je suis maintenant sans leurs prières et leurs sacrifices.*

*A mon père*

*À mes chères sœurs et son petites familles et sons fils Abdelkader et israa et watyn et riadh*

*Et mes chères frères chafei et mohamed et barae Qu'allah vous protège et vous garder Pour moi*

*A mes uncles et mes tantes*

*A mes chères cousins Diaa et hmed et houdaifa et khelifa, Nadir et cousines qui sont toujours la pour moi*

*A tout mes amis surtout Israa qui m'a toujours conseillé et Zaki, Omar, Salem, Mohamed, Aboubaker et Ali.*

*Khelifa*

*Je didié se travail à :*

*Mes chers parents*

*Aek et meriem*

*MA sœur et mon frère Abderahmae*

*Mon cher ami et frère binôme khelifa*

*Et tout mes amis naceur et boubaker et tout ces qui m'aime*

*Mohamed*

## Remerciements

Ce travail est le résultat des efforts conjugués de plusieurs personnes, sans lesquelles il n'aurait pas pris corps. Nous voudrions dire infiniment merci :

Au Mme FARES, notre encadreur de mémoire. Vous nous avez fait l'honneur de diriger notre mémoire. Nous vous remercions de vos conseils précieux. Soyez rassuré de toute notre reconnaissance et de notre profond respect.

Au président des jury de notre Thèse Dr CHIKHI et Mr. AMMAM pour nous honorer à l'évaluation de ce travail.

Au Directeur, aux enseignants, aux responsables des laboratoires de biologie et à tout le personnel de l'université de Saida merci pour votre dévouement et vos sacrifices.

Au tous qui nous aidons pour faire ce travail

---

## Résumé

La symbiose endomycorhizienne est la forme d'association la plus répandue et présente des anatomies très variées. L'une des caractéristiques morphologique de cette association est la formation des mycorhizes à vésicules et arbuscules (CMA). Et Dans le but de contribuer à la recherche scientifique qui préconise des stratégies basées sur l'utilisation des engrais biologiques ou biofertilisants à base de champignon mycorhizien,

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

Dans la première partie de l'étude, a pour récapitulé les connaissances acquise de technologie d'étude de statut mycorhizien ; C'est la raison pour laquelle nous a permis de présenter dans la première partie les composantes de la symbiose mycorhizienne et démontrer le Cycle de vie des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules.

Dans la deuxième partie de l'étude, la plante de *Pisum Sativum* récoltées a été estimée 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.

De plus 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 96.6% 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** : symbiose endomycorhizienne, biofertilisants, mycorhizes à vésicules et arbuscules, *Pisum Sativum*, spores, champignon mycorhizien.

---

## Abstract

Endomycorrhizal symbiosis is the most common form of association and has a wide variety of anatomies. One of the morphological characteristics of this association is the formation of vesicular and shrub mycorrhizae (MAC). And In order to contribute to scientific research that advocates strategies based on the use of biological fertilizers or biofertilizers based on mycorrhizal fungus,

Our study was conducted to estimate the rate of natural shrub mycorrhizal colonization of *Pisum Sativum*. from a site located in a semi-arid area of western Algeria (saida) and to isolate the spores of the mycorrhizal shrub fungi native to the rhizospheric soil of *Pisum Sativum* by trying to identify them morphologically.

In the first part of the study, summarized the acquired knowledge of technology of study of mycorrhizal status; This is why we were able to present in the first part the components of the mycorrhizal symbiosis and demonstrate the life cycle of the mycorrhizal blister and shrub fungi.

In the second part of the study, the harvested *Pisum Sativum* plant was estimated using an endomycorrhizal colonization rating scale. Microscopic root examinations revealed the presence of arbuscular mycorrhizal fungi with high colonization rates.

In addition, corn plants have been used as a trap plant to obtain spores of fungus mycorrhizal to healthy shrubs for morphological identification. The results showed that most of the observed roots were heavily mycorrhized by arbuscular mycorrhizal fungi at high rates 96.6% compared to the roots of control plants that have no fungal colonization. As well as spore isolation reveal different morphotypes with very reduced density.

Keywords: endomycorrhizal symbiosis, biofertilizers, vesicle and shrub mycorrhizae, *Pisum Sativum*, spores, mycorrhizal fungus.

## ملخص

التعايش بالاندوميكوروزي هو الشكل الأكثر شيوعاً للارتباط وله مجموعة متنوعة من التشريعات. إحدى الخصائص المورفولوجية لهذا الارتباط هي تكوين الفطريات الحويصلية والشجيرات (MAC). ومن أجل المساهمة في البحث العلمي الذي يدعو إلى استراتيجيات قائمة على استخدام الأسمدة البيولوجية أو الأسمدة الحيوية القائمة على الفطريات الفطرية،

أجريت دراستنا لتقدير معدل الاستعمار الفطري للشجيرات الطبيعية في ببسوم ساتيفوم. من موقع يقع في منطقة شبه قاحلة في غرب الجزائر (صيدا) ولعزل جراثيم فطريات الشجيرات الفطرية الأصلية في التربة الجذرية في ببسوم ساتيفوم من خلال محاولة التعرف عليها شكلياً.

في الجزء الأول من الدراسة، لخصت المعرفة المكتسبة بتكنولوجيا دراسة الحالة الفطرية؛ لهذا السبب تمكنا من تقديم مكونات التعايش الفطري في الجزء الأول وإظهار دورة حياة البثور الفطرية وفطريات الشجيرات.

في الجزء الثاني من الدراسة، تم تقدير نبات ببسوم ساتيفوم المحصود باستخدام مقياس تصنيف استعمار بطانة الرحم. كشفت فحوصات الجذر المجهرية عن وجود فطريات فطرية عضلية ذات معدلات استعمار عالية.

بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام نباتات الذرة كنبات مصيدة للحصول على جراثيم من الفطريات الفطرية للشجيرات الصحية لتحديد الشكل. أظهرت النتائج أن معظم الجذور المرصودة تم تفكيها بشكل كبير بواسطة الفطريات الفطرية العضلية بمعدلات عالية 96.6% مقارنة بجذور نباتات التحكم التي ليس لها استعمار فطري. بالإضافة إلى عزل البوغ يكشف عن أنماط مختلفة ذات كثافة منخفضة للغاية.

**الكلمات الرئيسية:** التعايش البطاني الحلقي، الأخصاب الحيوية، الحويصلة والشجيرات الفطرية، ببسوم ساتيفوم، الجراثيم، الفطريات الفطرية.



### Liste des abréviations

**E** : Endogonaceae

**MA** : Mycorhize à arbuscule

**CMA** : Champignons Mycorhiziens Arbusculaires

**G** : Glomus

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AC** : cellules auxiliaires

**%** : Pour cent

**H+** : cation Hydrogéné

**Atpase** : adénosine triphosphatases

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde carbone

**Cm** : centimètre

**H** : Heure

**°C** : Degré Celsius

**L** : Litre

**°chl** : degré de chlore

**Liste des tableaux**

**Table 1:** selon Fondevilla et al,(2011) le pois est un plante Dicotylédones de la famille les *Fabacées* et sous famille les *Papilionacées* : ..... 29

---

## Liste des figures

<b>figure 1:</b> principales types de mycorhizes associées aux hotes (selosse et le tacon,1998).....	7
<b>Figure 2:</b> Les différents types de symbioses mycorhiziennes : schémas d'une coupe longitudinale de racines mycorhizées.....	8
<b>Figure 3 :</b> Phylogénie actuelle des Glomeromycota, tirée de (Redecker et al., 2013). .....	12
<b>Figure 4:</b> Schématisation de l'établissement de la symbiose mycorhizienne(A) .....	13
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique d'une MA (Marleau, J. 2011).....	15
<b>Figure 6 :</b> Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe. ....	16
<b>Figure 7 :</b> Arbuscule fongique de Glomus .....	17
<b>Figure 8:</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). .....	18
<b>Figure 9:</b> Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans (Garbaye, 2013).....	19
<b>Figure 10:</b> Aspect des cellules auxiliaires (AC) (Bago et Cano, 2005). .....	20
<b>Figure 11:</b> Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'échange des principaux nutriments entre le CMA et sa plante hôte (Ramos et al., 2011). .....	23
<b>Figure 12 :</b> Les produits MYKE® PRO.....	27
<b>Figure 13 :</b> les différentes organes de partie aerien de pois, A: fleur, B:grosses, C:feuilles et tiges .....	30
<b>Figure 14:</b> les échantillons de <i>Pisum Sativum</i> récoltée <i>in-natura</i> de la ferme agricole de HASSANA ; Saida. ....	34
<b>Figure 15:</b> les racines découper de pois après le rinçage .....	35

---

<b>Figure 16:</b> Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.....	36
<b>Figure 17:</b> Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique. ....	36
<b>Figure 18 :</b> Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire .....	38
<b>Figure 19:</b> Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules .....	38
<b>Figure 20 :</b> dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).....	39
<b>Figure 21:</b> Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963). ....	41
<b>Figure 22 :</b> Structures mycorhiziennes arbusculaires observées dans les racines de <i>Pisum Sativum</i> récoltées <i>in-nature</i> .....	44
<b>Figure 23: :</b> Comparaison de taux de colonisation MA naturelle de <i>Pisum Sativum</i> .....	45
<b>Figure 24 :</b> les plantes de maïs après 42 jours de culture.....	46
<b>Figure 25 :</b> Aspect des hyphes intra-racinaire de CMA du maïs. Gr : (x40) .....	47
<b>Figure 26:</b> Aspect d'appressorium de CMA du maïs.Gr : (X40).....	47
<b>Figure 27:</b> Racine de maïs colonisée par les vésicules différents grossissement. ....	48
<b>Figure 28:</b> Aspect des arbuscules des CMA à l'intérieur des racines de maïs.....	49
<b>Figure 29 :</b> Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne de Maïs .....	50
<b>Figure 30:</b> différents morphotypes des spores isolées de la rhizosphère de maïs. ....	52

---

**Table des matières**

I.1. Introduction.....	2
II.1. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE :	5
II.1.1 LES COMPOSANTES DE LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE :	5
II.1.3 LES PRINCIPAUX TYPES DE LA SYMBIOSES :	6
II.3.1.1. LES ECTOMYCORHIZES :	6
II.3.1.2. LES ENDOMYCORHIZES :	6
II.3.1.3. LES ECTENDOMYCORHIZES :	7
II.2.3 LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ARBUSCULAIRES (CMA) :	9
II.3.2.1. HISTORIQUE :	9
II.3.2.2. Taxonomie et phylogénie des CMA actuelle.....	10
II.3.2.3. LA COLONISATION DES RACINES PAR LES CMA .....	13
II.3.2.4. Structure des champignons mycorhizes à arbuscules .....	14
II.3.3 Importance de la symbiose mycorhizienne à arbuscules .....	20
II.3.3.1. Rôle nutritif des CMA vis à vis des plantes .....	20
II.3.3.1.1. Apport en phosphore .....	21
II.3.3.1.2. Apport en Azote .....	22
II.3.3.2. Rôle nutritif des plantes vis à vis des CMA.....	23
II.3.3.2.1. Apport en carbone .....	23
II.4.3 Technologie de production d'inoculum mycorhizien.....	24
II.3.4.1. Inoculation mycorhizien .....	24
II.3.4.2. Production d'inoculant mycorhizien .....	24
II.3.4.3. Etapes de production d'inoculum mycorhizien .....	25
II.3.4.4. Qualité d'inoculum mycorhizien.....	26
II.3.4.5. Production industrielle d'inoculant mycorhizien :.....	27
II.4. présentation de plante d'étude.....	28
II.1.4 Pisum sativum :	28
II.4.1.1. Origine et Historique :	28
II.4.1.2. taxonomie .....	29
II.4.1.3. Caractéristiques botaniques :	29
II.4.1.4. Les conditions de cultivés le pois :	30

---

➤ La chaleur.....	30
➤ la Lumière:.....	30
➤ L'eau : .....	30
➤ Terre: .....	31
III.1. Matériel et méthodes .....	33
III.1.1 Choix de site et prélèvement des échantillons.....	33
III.2.1 Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes .....	33
III.1.2.1. Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer :.....	33
III.1.2.1.1. la colonisation de mycorhizes :.....	33
III.1.2.1.2. Estimation de la colonisation MA naturelle des racines.....	36
III.1.2.2. Protocole d'isolement des spores des CMA.....	39
III.1.2.2.1. Piégeage des endomycorhizes .....	39
III.1.2.2.2. Extraction des spores :.....	40
III.1.2.2.3. Observation et Caractérisation morphologique des spores :.....	41
III.1.2.3. Traitement des données.....	42
IV.1. Etude de la Symbiose mycorhizienne .....	44
IV.1.1 Estimation de la colonisation MA naturelle des racines.....	44
IV.2. Piégeage des endomycorhizes .....	46
IV.1.2 Estimation de la colonisation MA du maïs .....	50
II.2.2 Fréquence de mycorhization : .....	50
IV.2.2.1. Diversité spécifique et répartition des CMA dans le site d'étude : .....	51
VII.1. Annexe 1 .....	72
VII.2. Annexe 2 :.....	72
VII.3. Annexe 3 : .....	73
VII.4. Annexe 04 :.....	74
Caractéristique morphologique d'un grand nombre de Glomeromycota des classes jusqu'aux genres (Oehl et al ;2011) .....	74
VII.5. Annexe 5 .....	75

# **PARTIE I. INTRODUCTION**

---

### **I.1. Introduction**

les mycorhizes sont des associations symbiotiques contractées par les racines des végétaux avec certains champignons du sol. C'est une relation naturelle entre la plante et le champignon à bénéfice réciproque. La mycorhization est indispensable pour 80 % des plantes à racines. Les mycorhizes favorisent l'absorption par les racines des éléments minéraux de la rhizosphère et du sol, et améliorent ainsi la nutrition de la plupart des espèces végétales et permettent de mieux absorber l'eau et de résister aussi au stress hydrique ainsi qu'aux maladies.

Le phosphore est un composé essentiel du vivant. Il se retrouve notamment dans les acides nucléiques et les protéines (Chapuis, D., Aerts, V., & Bonneville, R. 2021). 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.

La contribution des CMA à la fertilité phosphatée des sols vient principalement de leur capacité à explorer un plus grand volume de sol grâce à l'établissement de nombreux hyphes donnant ainsi accès à une ressource en P supérieure pour la plante. Secondairement, et de manière plus faible, les CMA peuvent participer à rendre bio-disponible le P du sol grâce aux phosphatases qu'ils excrètent ; il s'agit d'enzymes qui dégradent le phosphore organique en ortho phosphates. Les ions phosphates absorbés par les CMA ont trois allocations possibles : une partie est utilisée par le champignon, une autre partie est cédée à la plante via l'interface arbusculaire, et le reste est mis en réserve dans les vacuoles du CMA sous forme de poly phosphates (Gavériaux, 2012). Les CMA semblent donc potentiellement bénéfiques à la plante hôte en augmentant le prélèvement des ions phosphates pour la plante (Calonne, M. 2012,).



La maîtrise de ces associations plantes/microorganismes permet d'améliorer durablement la production des écosystèmes et de lutter contre la dégradation de l'environnement en maintenant et régénérant la fertilité des sols.

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 *Pisum Sativum* cultivée en zone semi-aride (Saida).

De ce fait l'objectif de notre travail est :

- récapitulé les connaissances acquise sur symbiose mycorhizienne arbusculaire en décrivons l'établissement de cette symbiose.
- Estimation de taux de colonisation MA naturelle de *Pisum Sativum* récoltée in-nature.
- Isolement des spores des CMA indigène du sol rhizosphérique de *Pisum Sativum*. en essayant de les identifier morphologiquement.

# **PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## **II.1. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE :**

### **II.1.1 LES COMPOSANTES DE LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE :**

Les mycorhizes résultent d'une union durable basée sur des échanges réciproques entre les racines des végétaux et certains champignons du sol. Elles constituent des composantes essentielles dans la relation sol-plantes-microorganismes. En effet, certaines espèces végétales ne peuvent croître normalement sans s'associer à un partenaire fongique (Janos, 1980 ; Gobat et al., 2003).

La diversité végétale est entre 220 000 et 420 000 espèces de plantes terrestres (Scotland et al., 2003). D'après l'examen de plus de 10 000 espèces, en majorité des angiospermes, des structures mycorhizienne sont été observées chez 86 % d'entre elles (Brundrett, 2009 ; Tedersoo et al., 2010). Le nouvel organe mixte résulte de l'association intime de la plante hôte et du champignon mycorhizes et chaque partenaire optimise son développement grâce à cette symbiose. Les racines de plus de 80 % des espèces de plantes vasculaires présentent ou sont susceptibles de présenter des structures mycorhiziennes au sein de leur système racinaire. La présence de mycorhizes est donc un phénomène général chez les plantes à l'exception de quelques familles comme les Brassicaceae, les Caryophyllaceae, les Cyperaceae, les Juncacée, les Chenopodiaceae et les Amaranthaceae qui présentent très peu d'associations mycorhize (Strullu, 1991 ; Norman et al., 1995). Leur impact est primordial dans tout ou partie du cycle de la plante, surtout, mais non exclusivement, pour la nutrition. Le champignon profite des ressources carbonées synthétisées par la plante via la photosynthèse et qui sont indispensables à son métabolisme et à sa fructification. En retour, les hyphes fongiques améliorent la nutrition hydrique et minérale de la plante hôte grâce à l'augmentation du volume de sol prospecté et à la production de divers enzymes extracellulaires (protéinases, phosphatases, etc.) susceptibles de mobiliser des éléments nutritifs à partir de composés complexes du sol (Manjunath et al., 1989 ; Leyval et Berthelin, 1993 ; Gobat et al., 2003)

### **II.1.3 LES PRINCIPAUX TYPES DE LA SYMBIOSES :**

D'après la morphologie de l'organe résultant de l'association plante – symbiote fongique, différents types de mycorhizes sont distingués. Les mycorhizes à arbuscules, les mycorhizes orchidoïdes et les ectomycorhizes sont les plus fréquentes et les plus étudiées. Les mycorhizes à arbuscules sont les plus primitives et les plus répandues dans les écosystèmes naturels et cultivés (Tedersoo et al., 2010). Les mycorhizes à arbuscules seraient à l'origine des autres types de symbiose mycorhizienne et coïncideraient avec celle des végétaux terrestres il y a 450 millions d'années (Wang et Qiu, 2006).

#### **II.3.1.1. LES ECTOMYCORHIZES :**

(du grec *ektos* : à l'extérieur) 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 (réseau de Hartig). Ce type d'association est principalement représenté chez les essences forestières des régions tempérées, méditerranéennes et boréales, mais il a été également décrit chez quelques espèces tropicales de la famille des Dipterocarpaceae, Euphorbiaceae, Cesalpiniaceae, Myrtaceae et Fagaceae). Les partenaires fongiques appartiennent aux Basidiomycètes (*Boletus*, *Russula*, *Laccaria*...), mais aussi aux Ascomycètes (*Tuber*, *Elaphomyces*...).

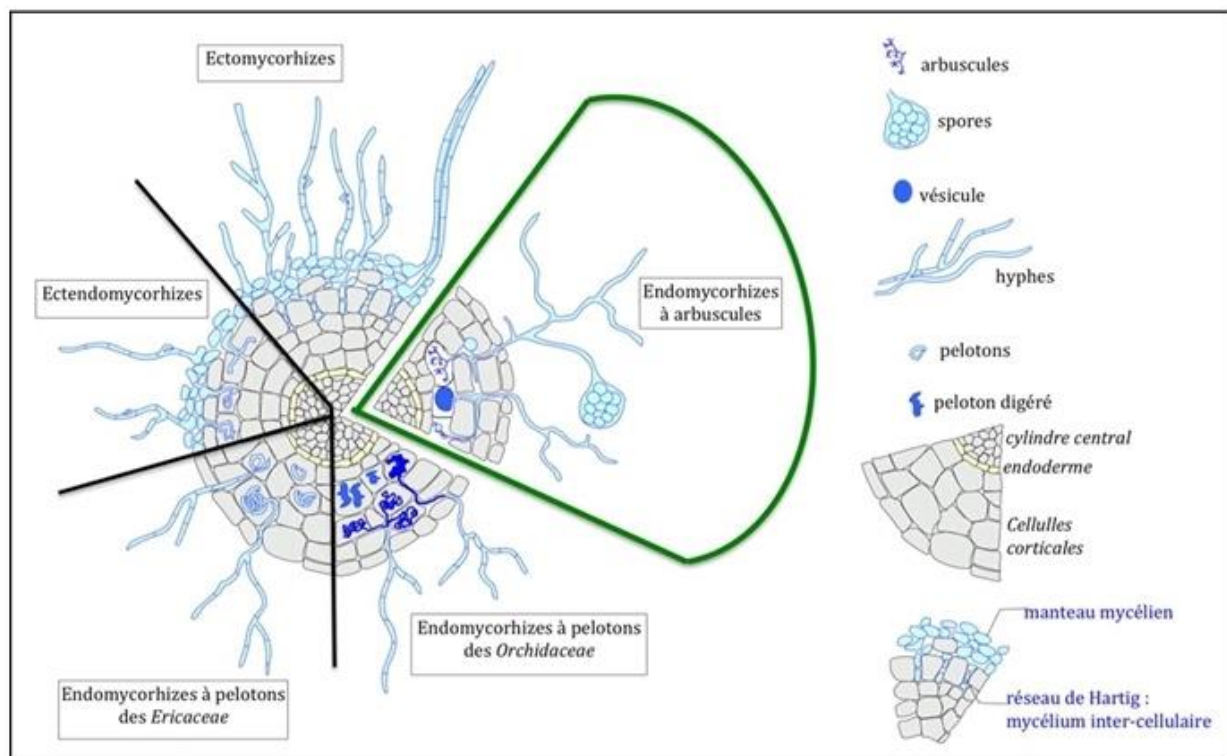
#### **II.3.1.2. LES ENDOMYCORHIZES :**

(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 DES ORCHIDEES formées par des Basidiomycètes et LES ENDOMYCORHIZES DES ERICACEES associées aux Ascomycètes (les *Pezizaceae*). Dans ces deux cas, le mycélium forme des pelotons à l'intérieur des cellules du parenchyme cortical. - LES ENDOMYCORHIZES DES CISTACEES où les pénétrations endocellulaires ont une forme coralloïde. Les champignons symbiotiques impliqués appartiennent aux Ascomycètes hypogés (les *Terfeziaceae*). - LES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES formées par des champignons inférieurs et qui concernent environ 80 % des espèces végétales (Barea et Honrubia, 1993). Ces

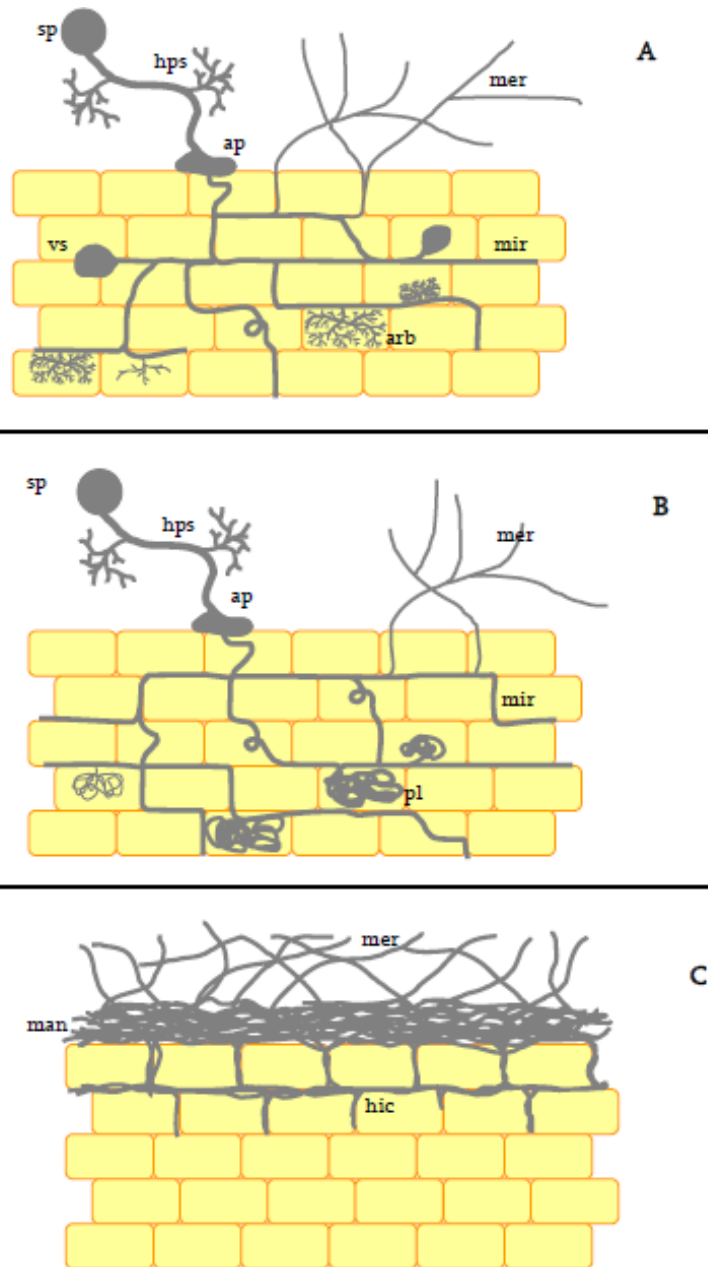
associations doivent leur nom aux structures fongiques résultant des hyphes intracellulaires qui se ramifient intensément à l'intérieur des cellules du cortex racinaire pour former des structures appelées arbuscules. Ces hyphes peuvent former des vésicules (Bonfante-Fasolo, 1984).

### II.3.1.3. LES ECTENDOMYCORHIZES :

caractérisées à la fois par la présence du manteau mycélien et le développement d'hyphes inter et intracellulaires. Elles se rencontrent chez les Arbutacées, les Monotropacées et sont formées par des Basidiomycètes (Cortinarius, Boletus...) (Mikola, 1948).



**figure 1 :** principales types de mycorhizes associées aux hôtes (selosse et le tacon, 1998)



**Figure 2:** Les différents types de symbioses mycorhiziennes : schémas d'une coupe longitudinale de racines mycorhizées

**A**, La symbiose mycorhizienne à arbuscules ; **B**, La symbiose mycorhizienne des Ericoïdes ; **C**, La symbiose ectomycorhizienne  
**ap:** appressorium ; **arb** : arbuscule ; **hic**: hyphes intercellulaires ; **man**: manchon fongique ; **hps**: hyphes pré-symbiotiques ;

**mer**: mycélium extra-radicaire ; **mir**: mycélium intraradicaire ; **pl**: peloton ; **sp**: spore ; **vs**: vésicule.

### **II.2.3 LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ARBUSCULAIRES (CMA) :**

Plus de 95% des plantes terrestres peuvent vivre en symbiose avec les champignons (Amari, M., & Nakache, C. 2021). 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 pour former des mycorhizes;(Suty, L. 2015). Du grec « mykès » qui signifie champignon et « rhiza » qui signifie racine. La symbiose mycorhizienne est donc une association symbiotique entre une plante et un champignon mycorhizien. Le terme de symbiose se définit ici comme une relation entre deux organismes hétérospécifiques qui se traduit par des effets bénéfiques aussi bien pour l'un que pour l'autre (Wipf,et all. 2013). A l'heure actuelle, environ 200 espèces de Gloméromycètes sont connus (Branger, A., Richer, M. M., &Roustel, S. 2007). Les endomycorhizes établies par les CMA de la classe des Gloméromycètes sont les plus courantes, plus de 80% des plantes terrestres sont concernées (Djaoui, M. 2016. ). Toutefois, il existe des plantes non mycotrophes, c'est le cas des Brassicacées (choux, navet, colza), des Chénopodiacées (betterave, épinard), des polygonacées (renouée, oseille, rhubarbe, sarrazin) (Gotoéchan, O. H. M. 1999).

#### **II.3.2.1. HISTORIQUE :**

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

symbiotiques appartenant à l'ordre des Glomales dans deux sous-ordres, Glomineae et Gigasporineae. Redecker et al. (2000) se sont basés sur des données phénotypiques et moléculaires pour placer *Sclerocystiscoremioides* dans le genre *Glomus*, éliminant ainsi le genre *Sclerocystis*. Morton et Redecker (2001) en croisant des données morphologiques, moléculaires et biochimiques, ont décrit deux autres familles, Archaeosporaceae et Paraglomaceae. La première famille héberge le genre *Archaeospora*, avec trois espèces et la seconde, le genre *Paraglomus*, avec aussi deux espèces.

### **II.3.2.2. 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 (Oehlet al., 2008 ; Morton et Msiska, 2010 ; Schüßler et Walker, 2010 ; Oehlet al., 2011a ; Oehlet al., 2011b ; Oehlet 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).



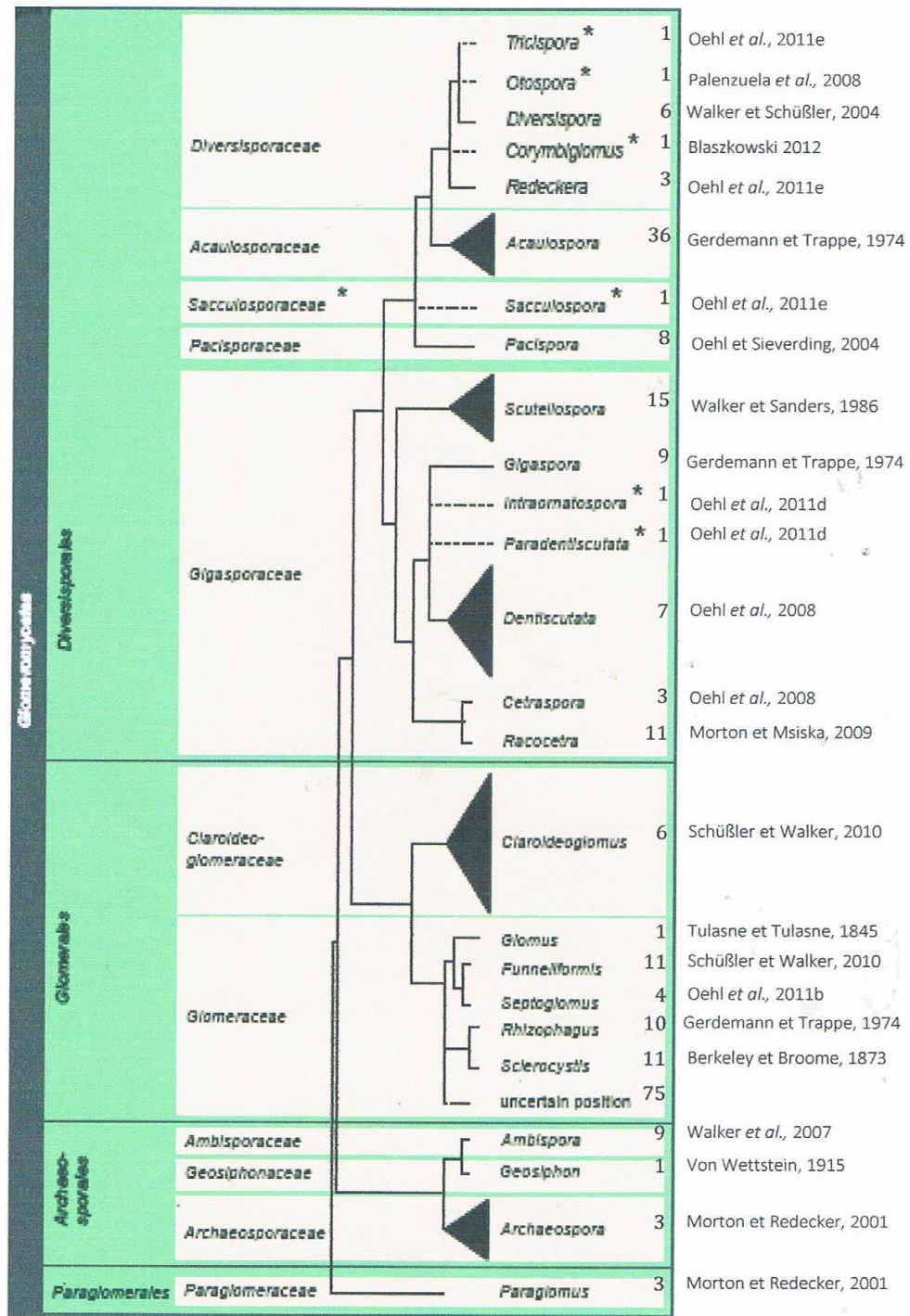
L'ordre des Paraglomerales (Schüßler et al., 2001) compte une famille comprenant un seul genre : *Paraglomus* (Morton et Redecker, 2001b). Ce genre serait le clade qui a divergé en premier selon les études phylogénétiques basées sur l'ADN ribosomal (Redecker et Raab, 2006). Les trois espèces de référence 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. 3) les cinq autres se nomment : les *Scutellospora*, les *Gigaspora*, les *Dentiscutata*, les *Cetraspora* et les *Racocetra*.



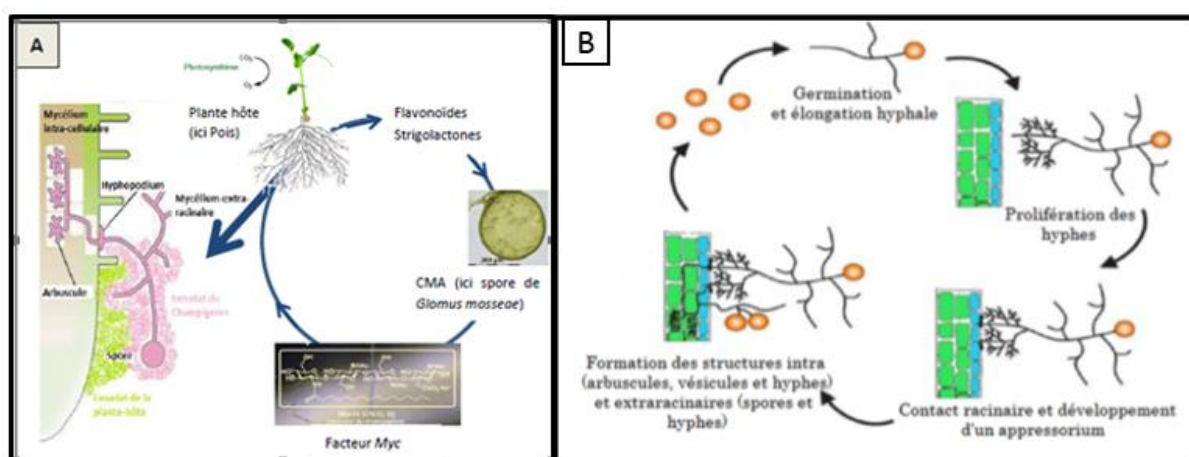
**Figure 3** :Phylogénie actuelle des Glomeromycota, tirée de (Redecker *et al.*, 2013).

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. 3). 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).

### II.3.2.3. LA COLONISATION DES RACINES PAR LES CMA

L'établissement de la symbiose entre la plante et le CMA s'effectue via un échange de signaux moléculaires. La reconnaissance entre le champignon et la plante-hôte met en jeu les exsudats racinaires et fongiques (Figure 4.A) : les flavonoïdes et les strigolactones, substances chimiques émises par la plante-hôte, vont stimuler l'activité métabolique du champignon (Jost, J. P., & Jost-Tse, Y. C. 2016). Elles vont induire chez le CMA l'expression du gène *Mycp* de facteurs Myc. Ces facteurs Myc vont induire des déformations dans les cellules de l'hôte pour l'établissement de la symbiose, ainsi que la croissance des hyphes colonisant les racines. (Rival, P. 2013). 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 » (Figure 4.B).



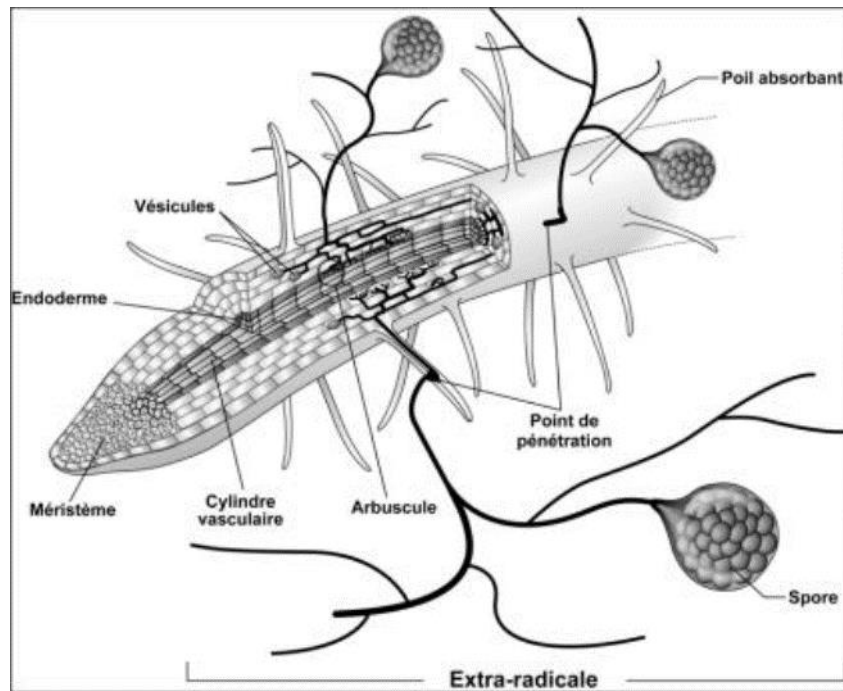
**Figure 4:** Schématisation de l'établissement de la symbiose mycorhizienne(A)

(Rival, P.2013). et Cycle de développement des CMA (B) (Akiyama, 2007)

Les hyphes adhèrent ensuite aux parois externes des cellules de la racine, formant un hyphopodium, avant de les perforer en sécrétant des enzymes qui vont détruire la cellulose, les hémicelluloses et les pectines constituant ces dernières. Une fois 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 17.(Pons, S. 2020).. Les arbuscules sont des structures spécialisées dans le transfert de l'eau et des éléments nutritifs entre le champignon et la plante ; pour le phosphore le transfert s'effectue sous forme d'ions ortho phosphates via des transporteurs spécialisés insérés dans les membranes cellulaires à l'interface entre la plante et le champignon. Les sucres provenant de la plante sont conduits en sens opposé par des transporteurs d'hexoses qui sont d'autres canaux spécialisés (Henry, C. 2011). Après différenciation des structures intra-racinaires, le champignon produit des spores à partir de son mycélium extra-(Calonne, M. 2012). Tous ces mécanismes de communication moléculaires sont encore peu connus mais la recherche progresse régulièrement grâce notamment aux progrès de la génomique (Coussy, F., Bonin, F., Azorin, P., Tariq, Z., & Driouch, K. (2019).

#### **II.3.2.4. Structure des champignons mycorhizes 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 21. (Marleau, J. et al 2011). (Fig.5). Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre.



**Figure 5:** Représentation schématique d'une MA (Marleau, J. 2011)

#### a) Spores

Les spores constituent la principale structure anatomique qui sert à la détermination morphologique des espèces de CMA (HAMRIT, H., & DERRI, H. 2020).

Les spores des glomérromycètes sont en nombre variable dans le sol. Elles sont produites dans le sol sur le mycélium externe des endomycorhizes 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 de conservation dans le sol (Garbaye, J. 2013), qui peut rester en dormance pendant de longues périodes (Jouvet, M. 1992).

Elles atteignent des dimensions imposantes de 40 à plus de 500  $\mu\text{m}$ . Ces spores possèdent également des parois ou enveloppes extrêmement épaisses (2-35  $\mu\text{m}$ ) qui les protègent contre les stress environnementaux (Fig. 6) (Garbaye, 2013).



**Figure 6** : Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe.

### **b) Arbuscules**

L'arbuscule c'est une ramification latérale des hyphes fongiques dans les cellules du cortex racinaire (Bouali, F., Bouras, L., & Bouziane, Z. E. 2016), leur taille varie de 2  $\mu\text{m}$  à 6  $\mu\text{m}$ , jusqu'au moins d'un micro de diamètre (Fig. 7) (Baroghel-Bouny, V., Ammouche, A., & Hornain, H. 2001)

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 (Peyret-Guzzon, M. 2014).

L'arbuscule augmente la surface de contact entre la symbiose, cette interface arbusculaire représente le site d'échange des nutriments (Lenoir, I. 2015). Leur début de formation est approximativement 2 jours après pénétration du champignon dans la racine et leur moyenne de vie peut atteindre quelques jours (2 à 15 jours) (Callot, G. 1999).



**Figure 7** : Arbuscule fongique de *Glomus*

**c) 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.8). 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.

D'ailleurs, ce sont des propagules infectives (Risède, J. M. 1994) 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 8:** 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).

#### d) Hyphes

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 (Peyret-Guzzon, M. 2014).

La capacité des différents CMA à former ces réseaux mycéliens peut différer (Sanon, A. A. 2005). 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. 9) (Garbaye, 2013).





**Figure 9:** Racine endomycorhizées environnées de mycélium portant des spores (photo de Yolande Dalpé) citée dans (Garbaye, 2013).

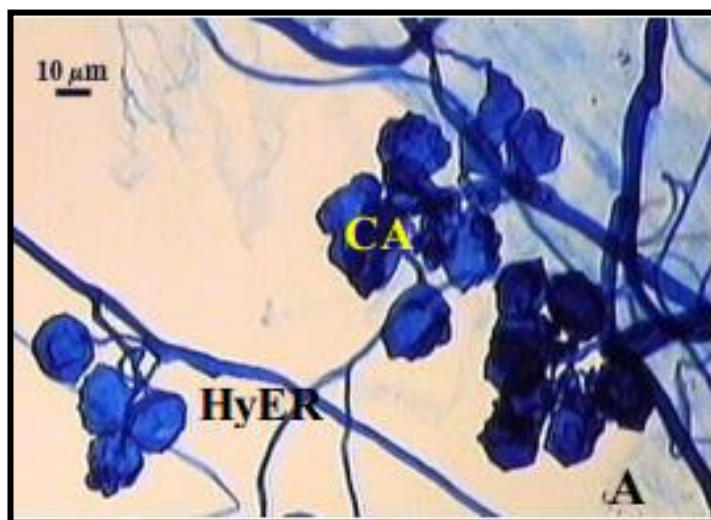
#### **e) Cellules auxiliaires**

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

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

### **II.3.3 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.

#### **II.3.3.1. Rôle nutritif des CMA vis à vis des plantes**

La symbiose MA améliore principalement la nutrition des plantes hôtes (Miller et al., 1986 ; Lataf et Chaoxing, 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<sup>+</sup>-ATPase de la membrane plasmique de la plante et du champignon, des transporteurs du phosphate et des canaux ioniques (Fig. 11). Les

systèmes H<sup>+</sup>-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<sub>4</sub><sup>+</sup>), de nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), de potassium (K<sup>+</sup>), de plusieurs anions, de saccharose, de glucose (Glu) et de fructose (Fru) (Ramos et al., 2011). De plus, l'oscillation du Ca<sup>2+</sup> et les changements de pH induisent une dépolarisation membranaire durant l'échange des ions (Fig. 11).

#### **II.3.3.1.1. 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<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), 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 intraracinaire 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).

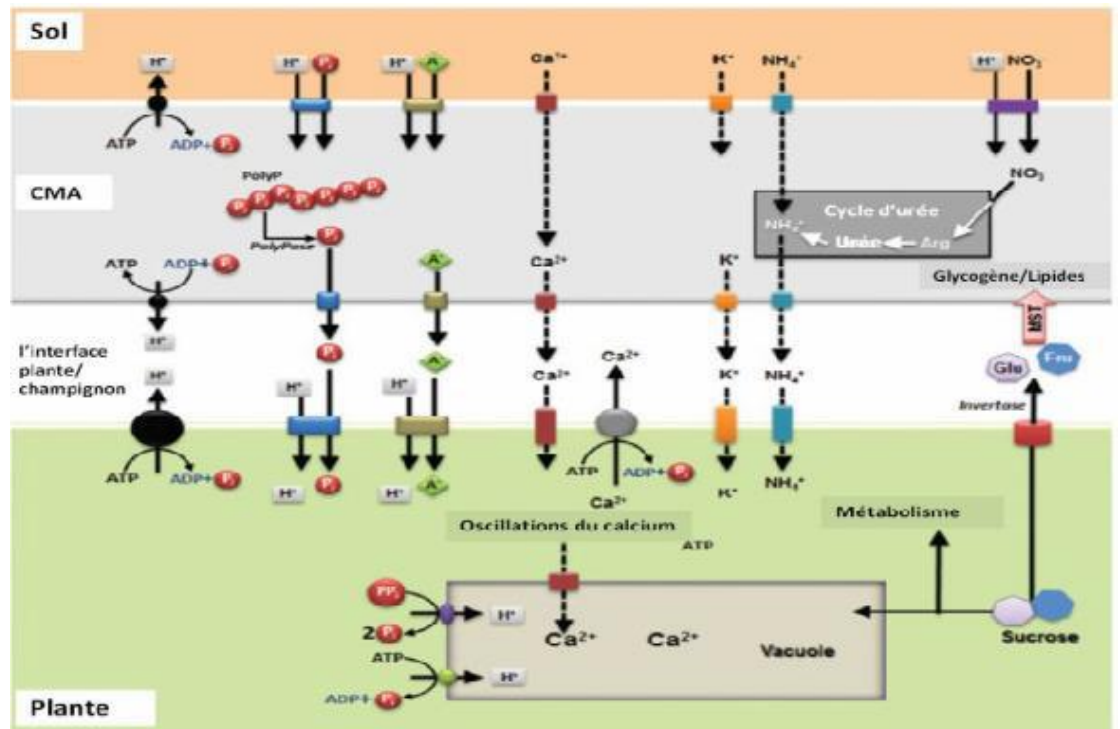
### II.3.3.1.2. Apport en Azote

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 transformé en  $\text{NH}_4^+$  et en  $\text{CO}_2$  (Cruz et al., 2009). Enfin, l'azote est transféré à de 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).



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

### II.3.3.2. Rôle nutritif des plantes vis à vis des CMA

#### II.3.3.2.1. 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).

La 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 fongique à travers des transporteurs de monosaccharides (Fig. 11) (Ramos et al., 2011).

### **II.4.3 Technologie 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.

#### **II.3.4.1. Inoculation mycorhizien**

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).

#### **II.3.4.2. Production d'inoculant mycorhizien**

De nombreux inoculums commerciaux, produits en Union Européenne ou hors UE, sont disponibles sur le marché français et européen. La majorité d'entre eux sont homologués en France ou en cours d'homologation, il s'agit d'inoculants endomycorhiziens pour la plupart. Le mode de production diffère selon la famille de champignons (ectomycorhiziens ou endomycorhiziens) (Garbaye, 1990). La production d'inoculums de champignons ectomycorhiziens se fait généralement en conditions

axéniques, sans plante hôte, en culture liquide ou sur support solide. L'inoculum se compose de mycélium fongique formulé soit sous forme de suspension liquide, soit sous forme d'inoculum solide granuleux ou poudreux. 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 cocultiver le complexe « champignon-plante hôte ». A ce jour, les deux technologies de production les plus utilisées sont (Gianinazzi-Pearson et al., 1985) :

**a. 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.

**b. la méthode « in vitro »**

consistant à multiplier le champignon endomycorhizien sur des racines cultivées sur milieu synthétique en conditions stériles.

L'inoculum sous forme solide 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 (Trouvelot et al., 1986).

**II.3.4.3. 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 (Duponnois et al., 2013) :

- (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).

#### **II.3.4.4. Qualité d'inoculum mycorhizien**

Concernant la qualité des inoculums disponibles, plusieurs critères mentionnés sur l'emballage doivent être pris en compte (Phillips et Haymann, 1970) :

- a. 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.
- b. 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).

L'importance et les bénéfices des champignons mycorhiziens ont été largement démontrés par la recherche. L'offre de produits mycorhiziens est en augmentation constante en France et ailleurs dans le monde. Les applications pratiques progressent et montrent des bénéfices réels.

Favoriser le développement des champignons mycorhiziens, qu'ils soient naturellement présents dans un sol ou introduits par inoculation, nécessite des



modifications des pratiques culturales (support de culture, fertilisation, traitements phytosanitaires). En cas d'inoculation, l'obtention de bons résultats repose notamment sur la qualité des inoculums mycorhiziens utilisés.

Comme pour la physique et la chimie de son sol, l'utilisateur peut faire appel aux outils de diagnostic et d'analyses des champignons mycorhiziens pour suivre leur évolution. Il peut également s'appuyer sur les conseils donnés par les conseillers techniques de terrain (producteurs d'inoculums, laboratoires spécialisés, cabinets de conseils, services agronomiques des chambres d'agriculture...) (Trouvelot et al., 1986).

#### **II.3.4.5. 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 (Trouvelot et al., 1986).



**Figure 12 :** Les produits MYKE® PRO.

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.

## **II.4. présentation de plante d'étude**

### **II.1.4 Pisum sativum :**

*Pisum sativum* : le pois de grande culture, est un aliment pour animaux légumineux qui gagne en popularité. Les échantillons de pois de grande culture mélangés commercialement, contenant en moyenne 23 % de protéines et 46 % d'amidon, présentent un bon équilibre entre protéines brutes et énergie métabolisable pour la consommation humaine et animale (Cowieson et coll., 2003).

#### **II.4.1.1. Origine et Historique :**

Trois siècles avant notre époque, Théophraste a décrit plusieurs espèces de la famille actuelle des légumineuses, dont les pois, dans son livre « recherches sur les plantes » (Davies et al., 1985). Il a été consommé pendant environ 5000 ans avant la naissance de Jésus-Christ et était déjà très apprécié dans les civilisations anciennes (Smartt, 1990). Les origines des pois se trouvent très probablement dans le sud-ouest de l'Asie, en Abyssinie en Afghanistan et dans les régions voisines (Zohary et Hopf, 2002).

La région méditerranéenne sert de plaque tournante secondaire. La variole serait alors dispersée sur le reste de l'Europe et de l'Asie à la suite de ces centres (Kay, 1979).

Cette culture a longtemps été pratiquée dans les États américains, et le pois de la compagnie est historiquement l'une des meilleures cultures commerciales du Wisconsin (Oelke et al., 1991).

*Pisum sativum* se trouve également dans tous les pays tempérés et dans la majorité des hautes terres tropicales (par exemple, l'Afrique centrale (Est) et l'Afrique de l'Est (Éthiopie)) (Brink et Belay, 2006).

**II.4.1.2. taxonomie**

**Table 1:** selon Fondevilla et al,(2011) le pois est un plante Dicotylédones de la famille les *Fabacées* et sous famille les *Papilionacées* :

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Class :	Dicotylédones
Sous-class :	Dialypétales
Ordre :	Rosales
Famille :	Fabacées (Légumineuses)
Sous-famille :	Papilionacées
Genre :	Pisum

Espèce: *Pisum sativum L*

**II.4.1.3. Caractéristiques botaniques :**

Botaniquement, il est décrit comme une plante herbacée annuelle autofécondée. La plante a un système racinaire principal relativement sous-développé avec des racines secondaires, tertiaires ou même tétrades pouvant atteindre une profondeur d'un mètre dans des conditions de sol favorables, mais est encore très ramifiée, en particulier dans les couches supérieures du sol. Ses feuilles sont alternes, constituées d'une à quatre paires de folioles sessiles, opposées, terminées par une vrille simple ou ramifiée. Fleurs blanches, 3-4 cm de long(Aubineau et al., 2002). Ces dernières donnent des gousses allongées et renflées, remplies de graines rondes (Couplan, 2011)



**Figure 13** : les différentes organes de partie aérien de pois, A: fleur, B:grosses, C:feuilles et tiges

#### II.4.1.4. Les conditions de cultivés le pois :

Les chercheurs ont préféré cultiver des pois dans un troisième cycle de plantation avec du blé et des tomates ou un cycle alternativement plié avec du blé ou avec des tomates, des pommes de terre, du maïs jaune ou l'un des Le sol est épuisé.

Il préférerait également ne pas cultiver de pois après une récolte en disant qu'Allen gardait ses plantes dans le champ pour les cultiver. Les initiatives des pois Afin d'obtenir un rendement très élevé de ces résultats, plusieurs exigences doivent être fournies, dont les plus importantes sont :

##### ➤ La chaleur

Le processus de germination basale nécessite des températures inférieures à 5 °C, et la plante pousse bien lorsque La température est comprise entre 15-20 m°.

##### ➤ la Lumière:

Les pois affectent la durée de la période de lumière, en particulier dans la phase de floraison.

##### ➤ L'eau :

La plante basale nécessite des acariens allant de (250 mm à 300 mm), ce qui affecte le manque d'eau dans La plante est surtout en phase de floraison et les cornes se forment.

La quantité d'eau en excès a également un effet négatif pendant la période de croissance de la plante, en particulier dans les terres argileuses. Il conduit à la suffocation et au flétrissement.

➤ **Terre:**

Les pois préfèrent un sol riche en matière organique hautement ventilée et un bon drainage, ils sont cultivés habituellement dans les territoires:

Silico-argileuse

Argilo-calcaire

limoneuse (Bekouche K, 2019)

# **PARTIE III. MATERIEL ET METHODES**

---

### **III.1. Matériel et méthodes**

#### **III.1.1 Choix de site et prélèvement des échantillons**

Dans le but d'étudier le statut mycorhizien d'une légumineuse ; Nous avons effectué une campagne de prospection dans la région de Saida.

Au cours de cette prospection nous avons identifié et prélevé des échantillons de légumineuses entières (racines et tiges) avec leur sol rhizosphérique. Les échantillons de sol sont collectés de la rhizosphère de la plante *Pisum Sativum* (pois) ; les prélèvements de sol sont collectés sur une profondeur de 0-20 cm 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.

#### **III.2.1 Méthodologie suivie pour l'étude des Mycorhizes**

##### **III.1.2.1. Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer :**

###### **III.1.2.1.1. la colonisation de mycorhizes :**

Les différentes méthodologies utilisées pour observer les structures formés par les MA respectent les étapes suivantes : nettoyage, blanchissement, acidification, teinte et élimination des excès de colorant.

###### **a- Echantillonnages :**

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 de racines le mois de Mars en 2022 au niveau de site précédemment décrit. Trois plantes de pois ont été récoltées.

Les prélèvements ont été réalisés sur une profondeur allant de 10 à 20 cm dans le sol pour extraire la plante et son système racinaires. Puis les blocs de terre prélevés ont été placés dans sachet en plastique fermés très serrés pendant le transport.



**Figure 14:** les échantillons de *Pisum Sativum* récoltée *in-natura* de la ferme agricole de HASSANA ; Saida.

#### **b- 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 par ce 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 conservées au réfrigérateur avant d'être observées directement ou traitées ultérieurement.



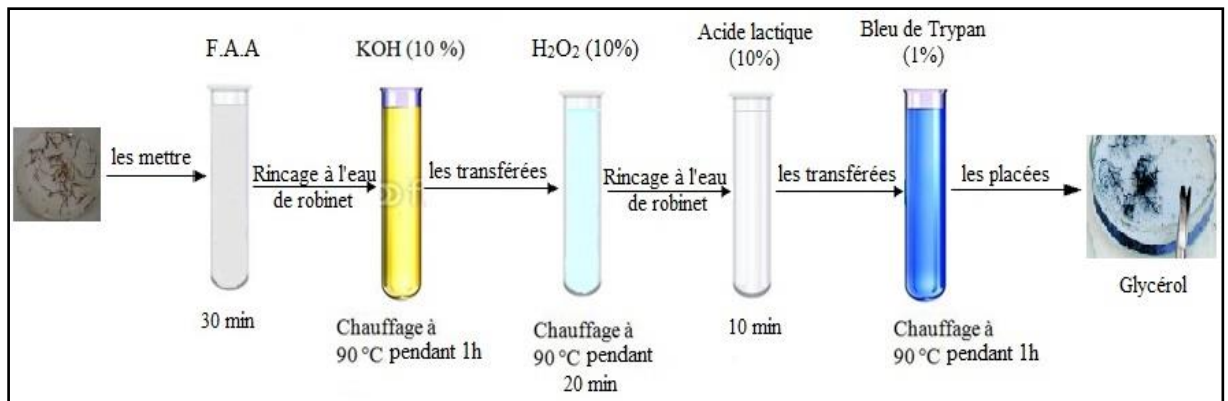


**Figure 15:** les racines découpées de pois après le rinçage

#### **c- Eclaircissements 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 (annexe 01) 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 % (annexe 02) et chauffées au bain-marie à 90°C pendant 1 h afin de les vider de leur contenu cytoplasmique. Ensuite les racines ont été transférées dans une solution de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 % et chauffées au bain-marie à 90°C pendant 20 minutes pour les blanchir. Après plusieurs rinçages à l'eau courante, les fragments racinaires éclaircis ont été submergés d'acide lactique à 10 % (annexe 01) 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 % (annexe 01) et chauffées au bain-marie à 90°C pendant 1h qui permet la coloration de la chitine des parois du champignon. Les structures fongiques, tels que les arbuscules, les vésicules et le mycélium apparaissent en bleu. Les racines ont été à nouveau rincées à l'eau courante, puis conservées dans des tubes à essai contenant de glycérol 60 % (annexe 02).

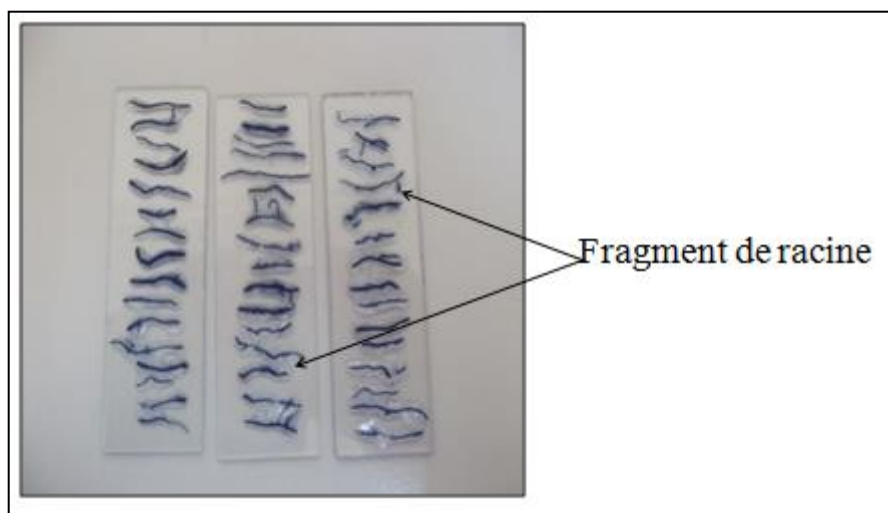


**Figure 16:** Schéma représentatif des étapes d'éclaircissement et coloration des racines.

#### d- Montage et observation des racines

Après la coloration les racines de chaque plante ont été découpées en fragments de 1cm de longueur environ et monté parallèlement à raison de 10 fragments par lame dans le glycérol, puis observer au microscope photonique à différentes grossissement.

La plante est jugée mycorhizée lorsque le système racinaire présente au moins un point de colonisation (pénétration d'un hyphes dans la racine ; présence des structures de colonisation).



**Figure 17:** Montage des racines entre une lame porte-objet dans du glycérol pour l'identification microscopique.

#### III.1.2.1.2. Estimation de la colonisation MA naturelle des racines

Le pourcentage de colonisation des racines est calculé selon la méthode de Trouvelot et al. (1986). Les fragments racinaires de *Pisum Sativum* observés ont été notés dans un

tableau, selon un barème de notation (Figure 23) qui permet d'estimer rapidement le degré de colonisation mycorhizienne et la richesse en arbuscules.

Cette technique calcule 5 paramètres de la colonisation mycorhizienne arbusculaire quel 'est réalisée en utilisant les formules de calcul suivantes :

- **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 développée dans le système racinaire (M%)** : qui exprime la portion du cortex colonisée par rapport à l'ensemble du système racinaire.

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

Avec  $n_5$ ,  $n_4$ ,  $n_3$ ,  $n_2$ ,  $n_1$  sont les nombres de fragments respectivement notés dans les cinq classe 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%
1	→	↓ 1% du cortex

- **Teneur arbusculaire de la colonisation dans la partie endomycorhizée du système racinaire (a%)** : est abondance en arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments racinaires.

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

Où  $m_3$ ,  $m_2$ ,  $m_1$  = % de  $m$ , classés  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  respectivement. Avec :

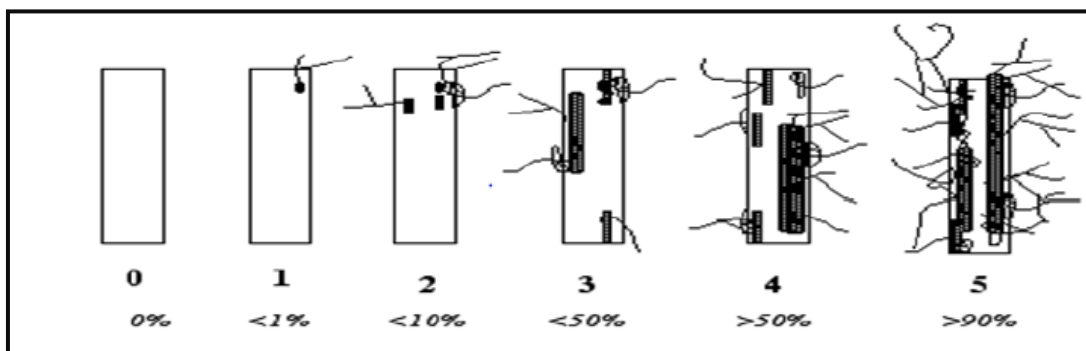
$$m_3 = ((95n_5A_3 + 70n_4A_3 + 30n_3A_3 + 5n_2A_3 + n_1A_3) / \text{nombre de fragments mycorhizes}) * 100 / m$$

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

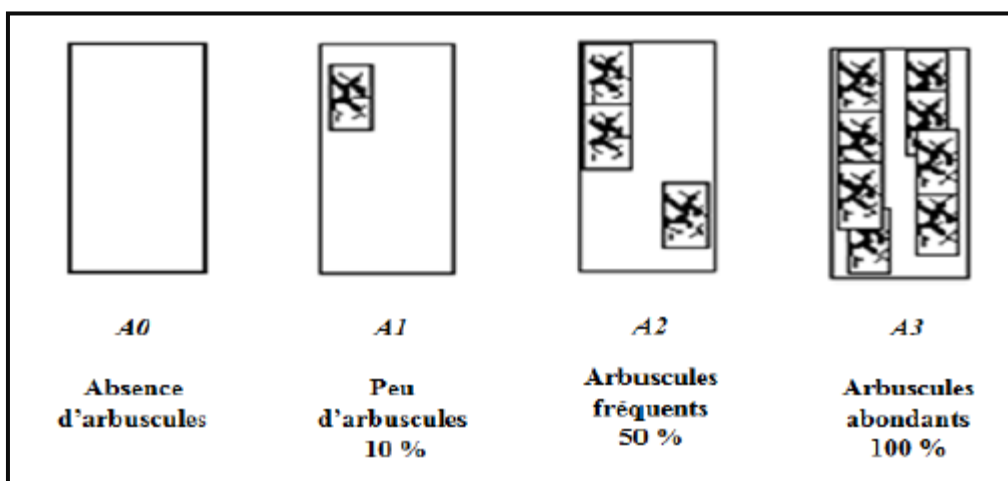
➤ **A%** : teneur arbusculaire de la colonisation ramené au système racinaire entier :

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

Ces cinq paramètres sont fonction de la teneur en spore, vésicule et hyphe de la racine.



**Figure 18** :Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire



**Figure 19**: Echelle d'évaluation de la présence des arbuscules

### III.1.2.2. Protocole d'isolement des spores des CMA

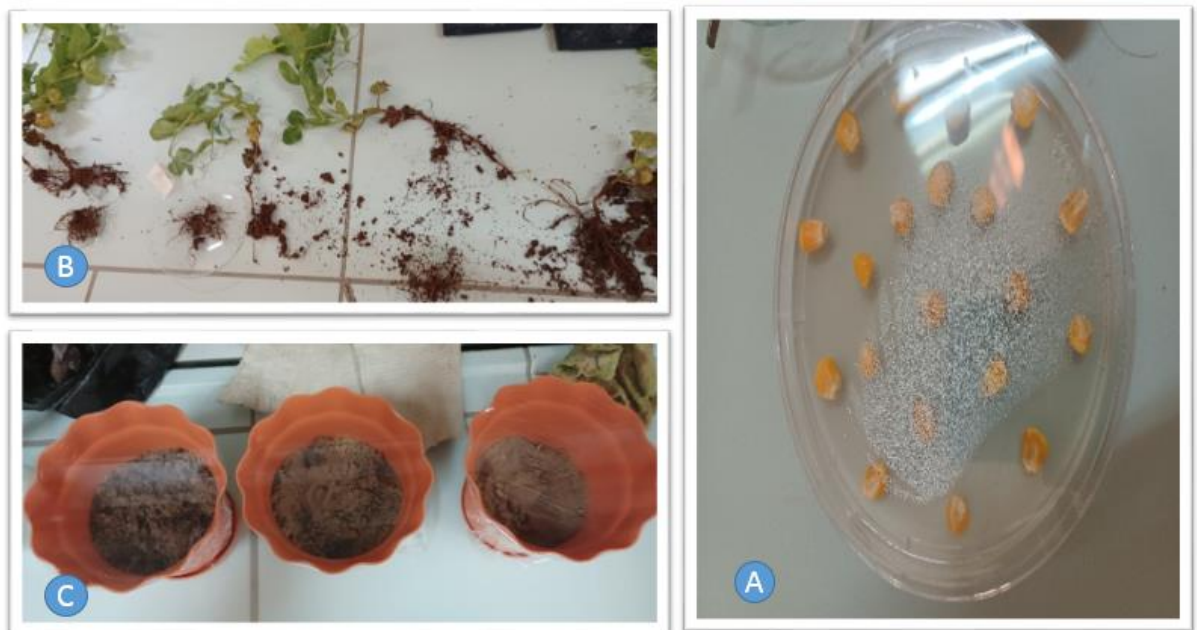
#### III.1.2.2.1. Piégeage des endomycorhizes

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

L'inoculum est constitué du sol rhizosphérique de la plante d'intérêt *Pisum Sativum* contenant des racines de la même plante coupée en petits fragments et soigneusement mélangée avec ce sol.

Le substrat est constitué du sable autoclavé 3 fois 120°C pendant une heure pour tout risque de contamination par d'autre champignons.

La variété de maïs *HYBRIDE PICO* a été utilisée comme plante piège. Les graines de maïs sont désinfectées avec de l'hypochlorite de sodium 12°Chl pendant 15 min et rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile. Ensuite elles ont été transférées dans des boîtes de pétrie contenant de l'eau gélosée à 1% (annexe 02), puis placées dans un incubateur à l'obscurité à 25°C pendant 3 jours.



**Figure 20** : dispositif expérimental de la méthode de piégeage Morton et Walker(1992).

**A** : la germination de graine de maïs

**B** : plantules de *Pisum Sativum* pour préparation de substrat.

**C** : plantules de maïs transplantés.

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 200g de l'inoculum y ont été déposés. Les pots ont été ensuite recouverts du substrat sableux autoclave afin de limiter les risques de contamination. Les graines pré-germées de maïs ont été semées à raison de trois plantules par pot. Deux répétitions sont réalisées pour chaque sol. Un témoin sans inoculum est réalisé dans les mêmes conditions avec seulement du substrat autoclave afin de vérifier que les conditions de culture soit exemptes de contamination (Figure 24).

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. La fertilisation n'est appliquée que lorsque les plantes montrent des signes de carence en phosphore ou en azote, en utilisant la solution nutritive de Hoagland et Arron (1938) (annexe 03).

Après 42 jours de culture, les plantes de maïs ont été dépotées, leur système racinaire est utilisé pour l'estimation de taux de colonisation MA (suivant les protocoles déjà décrits précédemment) et le substrat de chaque sol est récolté, sèche à température ambiante pour l'extraction de la caractérisation phénotypique des spores.

#### **III.1.2.2.2. 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 sur gradient de saccharose selon la méthode décrite par Giovannetti et al. (1991).

En effet, 100g de sol rhizosphérique sèche issus de la culture de maïs sont prélevés et mis dans 1000ml d'eau, la suspension est ensuite vigoureusement agitée pendant 1min puis filtrée dans une série de tamis à mailles décroissantes (500 -250- 125 et 45  $\mu$ m) sous un jet d'eau de robinet jusqu'à ce que l'eau qui en ressorte devienne claire et limpide. Les tamis contenant les spores des CMA sont mélangés et mis en suspension dans de l'eau distillé.

Les particules retenues dans le tamis des 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 1750 tr /mn pendant 5min pour réduire les particules de sol et les fragments racinaires, le surnageant et les particules flottantes ont été éliminés. Les spores et les 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 1750tr/mn pendant 15 secondes. Le surnageant est filtré sur un tamis de 45 $\mu$ m puis rincées avec l'eau distille pour éliminer l'excès de saccharose. les suspensions sporales obtenus ont été conservés à 4°C pour l'observation et l'identification morphologique (Figure25).



**Figure 21:** Extraction des spores des champignons endomycorhiziens selon la méthode de Gerdemann et Nicolson (1963).

### III.1.2.2.3. Observation et Caractérisation morphologique des spores :

Les spores des champignons mycorhiziens sont souvent libres dans le sol et peuvent donc être séparées des fines particules de sol par tamisage humide par les méthodes précédemment décrite. Chaque fraction de sol retenue dans chaque tamis est récupérée dans une boîte de Pétri et observée à la loupe binoculaire. Ainsi les spores détectées ont été récoltés au moyen d'une micropipette et leur morphologie décrite par observation microscopique. Les spores de chaque morphotype ont été montées entre lames et lamelles dans une goutte de glycérol afin d'être examinées au microscope photonique sur la base de leur caractères phénotypiques. 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 base des paramètres systématiques des spores. (annexe04)

### **III.1.2.3. 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.



# **PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION**

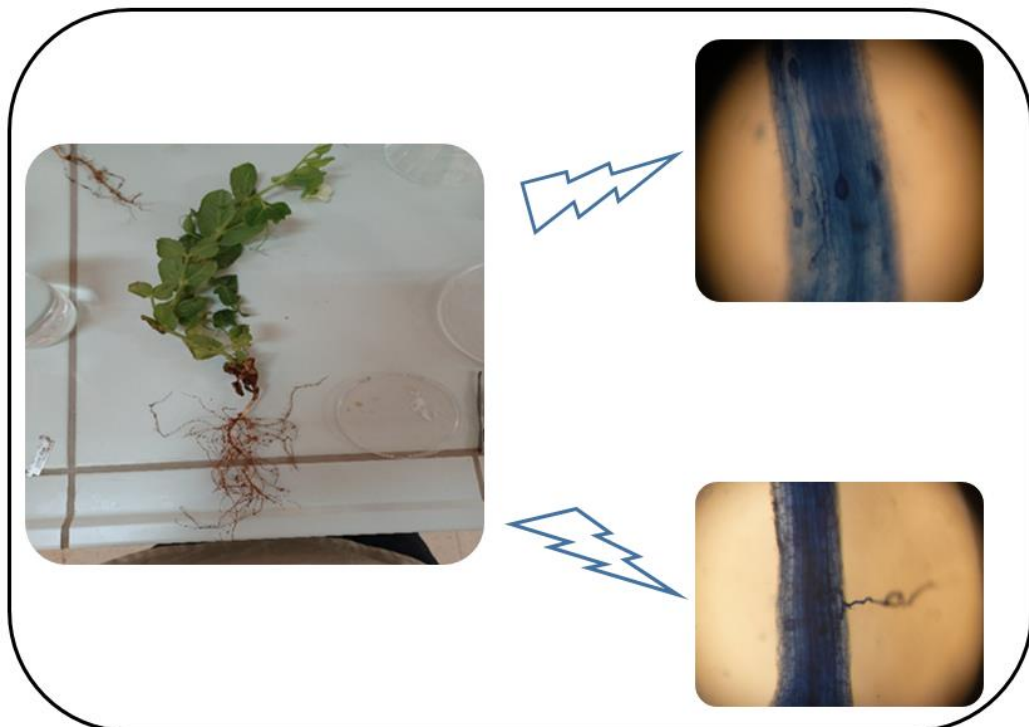
## IV.1. Etude de la Symbiose mycorhizienne

### IV.1.1 Estimation de la colonisation MA naturelle des racines

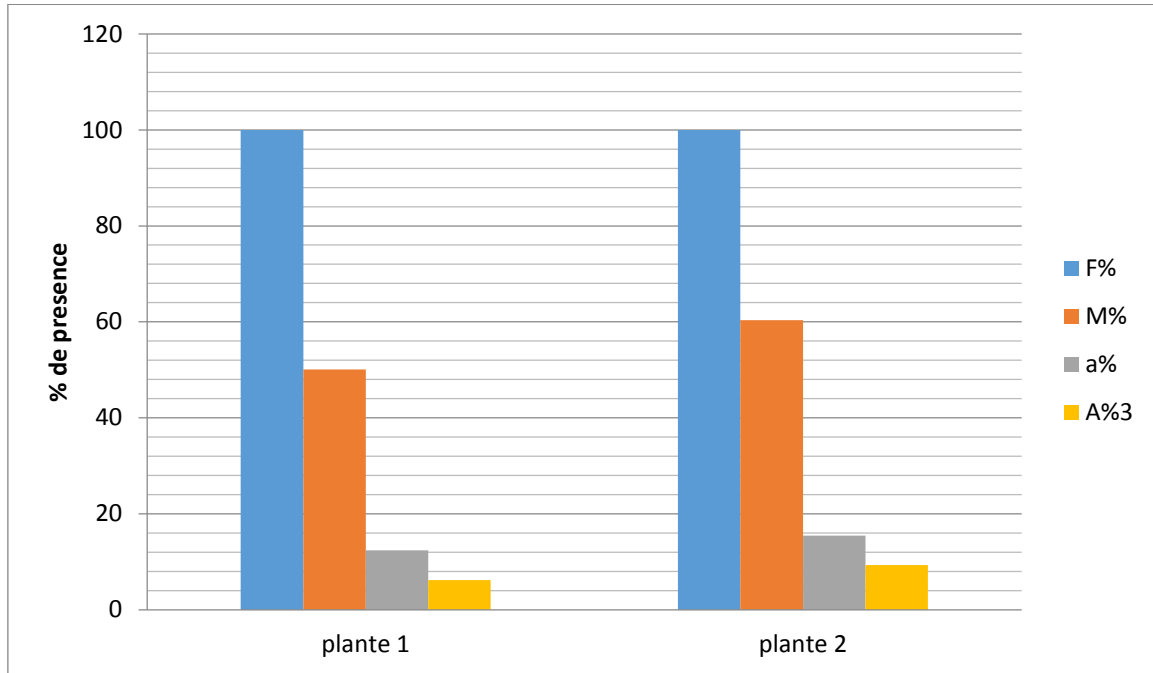
L'examen microscopique des racines de *Pisum Sativum* récoltées in-nature (stade sans floraison), après éclaircissement et coloration au bleu de Trypan selon la technique de Phillips et Hayman (1970), révèle une colonisation par les champignons MA.

La colonisation se manifeste par différentes structures (Fig. 21), à savoir l'existence d'un nombre élevé de vésicules intra et intercellulaires de forme sphériques, ovoïdes, allongés, de taille variable et aussi la présence d'un réseau important d'hyphes intra et extra- radiculaires.

Comme le confirment Tchameni et al., (2008), le nombre élevé de vésicules reflète probablement une importante activité symbiotique. Ainsi que leur présence traduit l'efficacité de la symbiose (Boullard, 1968). En outre, la présence des vésicules est signe d'une colonisation ancienne (Brundrett et al., 1999), leur paroi est souvent mince mais peut être épaisse, dans le cortex des racines âgées (Gavériaux, 2012).



**Figure 22 :** Structures mycorhiziennes arbusculaires observées dans les racines de *Pisum Sativum* récoltées in-nature .



**Figure 23:** : Comparaison de taux de colonisation MA naturelle de *Pisum Sativum*.

**F%** : Fréquence de la colonisation ; **M%** : intensité de mycorhization relative ; **m%** : intensité de mycorhization absolue.

Ces résultats confirment que les plantes cultivées dans les écosystèmes semi arides et arides sont plus dépendantes des champignons endomycorhiziens à arbuscules (Stutz et al., 2000 ; Wubet et al., 2003 ; Tao et zhiwei, 2005 ; Karaaesaln et Uyancöz, 2011). En outre, la plus part des légumineuses herbacées forment des relations symbiotiques avec les champignons MA (Zaidi et al., 2003). D'après Teuber et Brick (1988) ainsi que Barnes et Sheaffer (1995) la luzerne peut aussi avoir une relation symbiotique avec les champignons produisant le type communs de mycorhizes arbusculaire ; cette association bénéfique permet également au champignon de former un réseau mycélien externe, permanent, reliant les plantes entre elles et leur permettant de mieux exploiter les ressources nutritives surtout en conditions défavorables (carences en élément nutritif cas des sols dégradés) (Chiarello et al., 1982 ; Arvieu et al., 2003).

## IV.2. Piégeage des endomycorhizes

La croissance des plantes de maïs s'est déroulée, pendant les 42 jours dans la chambre de culture, jusqu'au prélèvement des racines mycorhiziennes. La colonisation MA de ces plantes a été évalué. Les résultats de l'observation microscopique des racines de maïs (colorée au bleu de trypan) montrent que la présence (les arbuscules, les vésicules de différentes formes, des hyphes, les cellules auxiliaires...), comparée aux racines des plantes témoins cultivées sur le sable stérile qui ne présente aucune colonisation fongique.



**Figure 24** : les plantes de maïs après 42 jours de culture.

➤ **Les hyphes :**

Les différents fragments racinaire présente une abondance importante d'hyphes et surtout les hyphes extra-racinaires qui sont coenocytique, d'aspect et de diamètre différents, fins ou épais et qui portent parfois des spores.ces résultats rejoignent ceux de Zubek et al.(2008).Fig 24

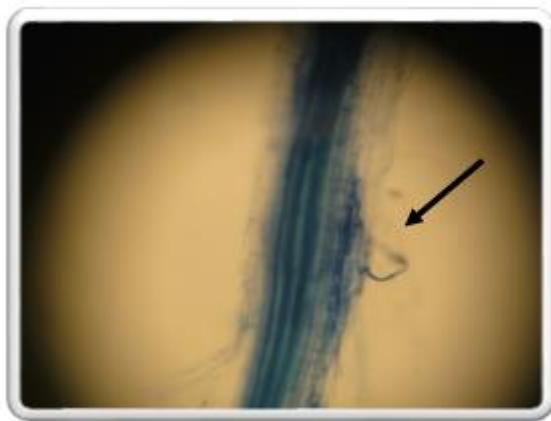


**Figure 25 :** Aspect des hyphes intra-racinaire de CMA du maïs. Gr : (x40)

➤ **L'appressorium :**

les CMA pénètrent dans les cellules corticales de l'hôte à l'aide d'appressoriums ou par les poils absorbants, comme le décrit Ligrone et al. (2007). ces structures sont considérées comme l'évènement le plus décisif dans le déroulement de la mycorhization endomycorhizienne.

Nous avons constaté que la morphologie des appressoriums est variable certains sont lobés tandis que d'autres portent des ramifications, le champignon généralement forme une boucle dans la première cellule épithéliale qu'il pénètre puis progresse entre les cellules adjacentes pour coloniser le cortex racinaire grâce aux hyphes intra\_racinaires. fig 25



**Figure 26:** Aspect d'appressorium de CMA du maïs. Gr : (X40)

➤ **Les vésicules :**

La colonisation se manifeste par différentes structures tels que les vésicules, nous avons observé l'existence d'un nombre très élevée de vésicules intra et intercellulaires de forme globulaire ou oviides, allogés de taille variable (fig) qui confirme encore la prédominance des Glomus. ces Glomeracées sporulent et développent un réseau d'hyphes plus rapidement que les autres CMA. ces résultats rejoignent ceux de Souza, (2006) et de Wubet et al. (2003) qui ont rapporté que les Glomeracées infectent et colonisent plus rapidement les racines que les Gigasporacées et les Acaulosporacées.



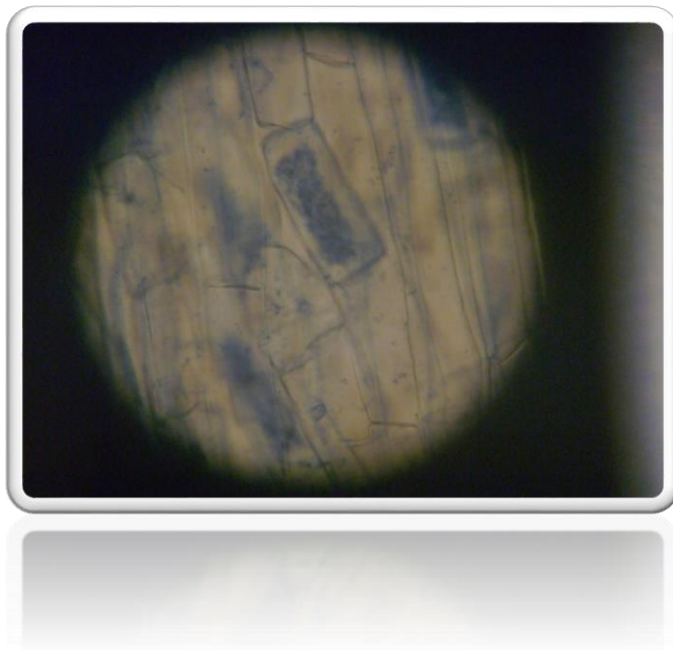
**Figure 27:** Racine de maïs colonisée par les vésicules différents grossissement.

La présence importante de vésicules ovalaire et allongées dans les sol des région semi arides indique la prédominance d'espèces appartenant surtout au genre Glomus. la dominance des Gmoleracées dans les zones arides et semi arides a été rapportée par de nombreux travaux (Souza et al., 1999; Franke-Snyder et al., 2001; Lovelock et al., 2003).

Comme le confirment Tchameni et al., (2008). le nombre élevé de vésicules reflète probablement une importante activité symbiotique, ainsi que leur présence traduit l'efficacité de la symbiose (Boullard, 1968). En outre, la présence des vésicules est signe d'une colonisation ancienne (Brundrett et al., 1999). leur paroi est souvent mince mais peut être épaisse, dans le cortex des racines âgées (Gaveriaux, 2012).

➤ **Les arbuscules:**

Nous avons observé quasiment dans la plus part des système racinaires de maïs examinés qui sont caractérisée par des arbuscules à tronc cylindrique et des hyphes intercellulaires plus au moins épais (fig),intensement colorés avec la coloration de Phillips et Hayman(1970) ,les vésicules sont peu présentes :ce morphotype est dominant il correspond aux espèces appartenant aux Gloméracées.(Dodd et al.,2000 ;Blaszowski,2003).



**Figure 28:**Aspect des arbuscules des CMA à l'intérieur des racines de maïs.

L'observation de ces structures signifient que les plantes de maïs ont établie une symbiose fonctionnelle vus que les arbuscules sont considérés comme le site d'échange des nutriments (Abbott,1982 ;Gianiazzi-Pearson,1996 ;Ramos et al.,2011) .Cette amélioration observée par plusieurs auteurs (Gerdemann ,1964 ;Sylvia et al.,1993 ; Zhu et al.,2012) est liée à la nutrition minerale tel que l' azote et phosphore qui sont améliorées (Allen,1982 ;Davies et al.,1996 ;Auge,2001)

Les structure MA obsevée dans les racines de maïs reflète une diversité importante des CMA dans le sol d'étude (HASSANA Saida). plusieurs auteur ont signalé l'occurrence et la diversité des CMA dans des sols sablonneux(Stahl,1900 ;Read,1989.Hu et al.,(2010)ont rapporte que le sol riche en CMA diversifiés est plus bénéfique écologiquement.

Ces résultats confirment l'effet majeur des champignons mycorhiziens dans l'amélioration de la croissance des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées (Karagiannidis, 1998 ; Smith et Read, 2008).

#### IV.1.2 Estimation de la colonisation MA du maïs

Les examens microscopiques effectués sur des racines de pois de la ferme agricole ont montré la présence de mycorhization chez la majorité des plantes. La fréquence, l'intensité de mycorhization et la teneur arbusculaire ont été calculées. Les résultats représentés par l'histogramme (fig 29) montrent que la plante *Pisum Sativum* est mycotrophe.

#### II.2.2 Fréquence de mycorhization :

La colonisation des MA est traduite par une forte fréquence de colonisation (F%), elle est de 96,6% dans la zone d'étude ; mais le degré d'intensité mycorhizienne, que ce soit dans les systèmes racinaires (M%) ou dans les fragments racinaires (m%) dépassent 50%.

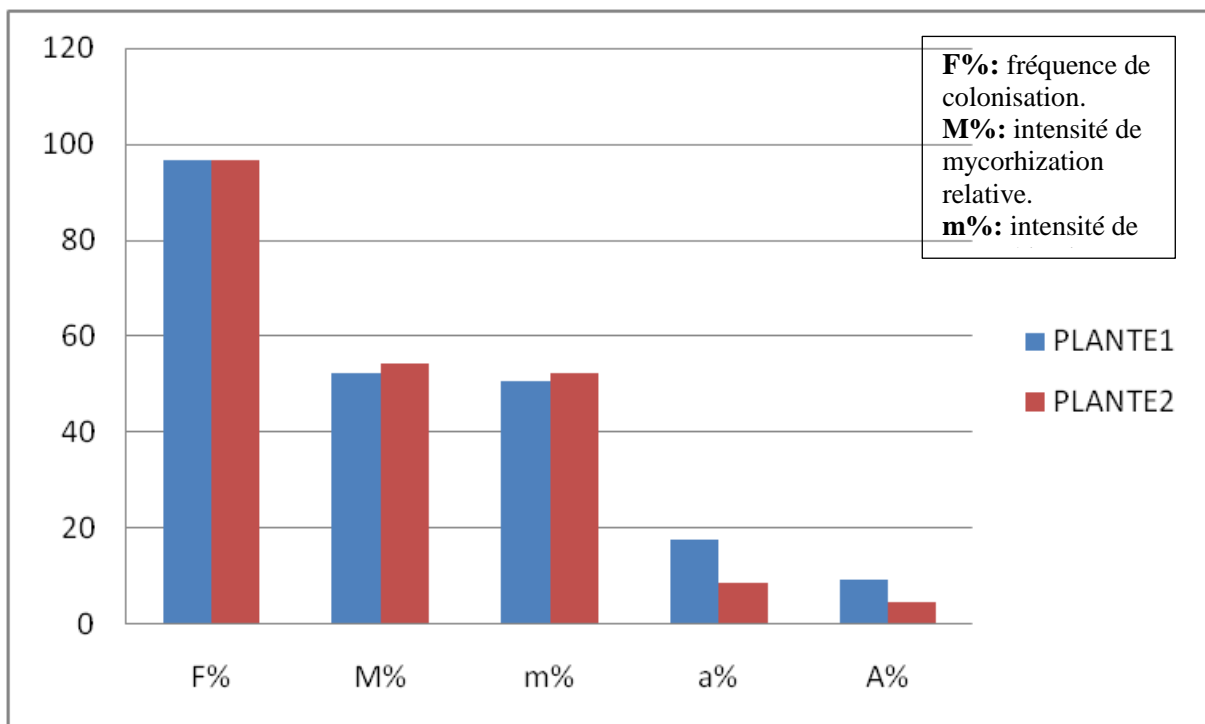


Figure 29 : Estimation des paramètres d'infection mycorhizienne de Maïs



➤ **Intensité de mycorhization absolue m% :**

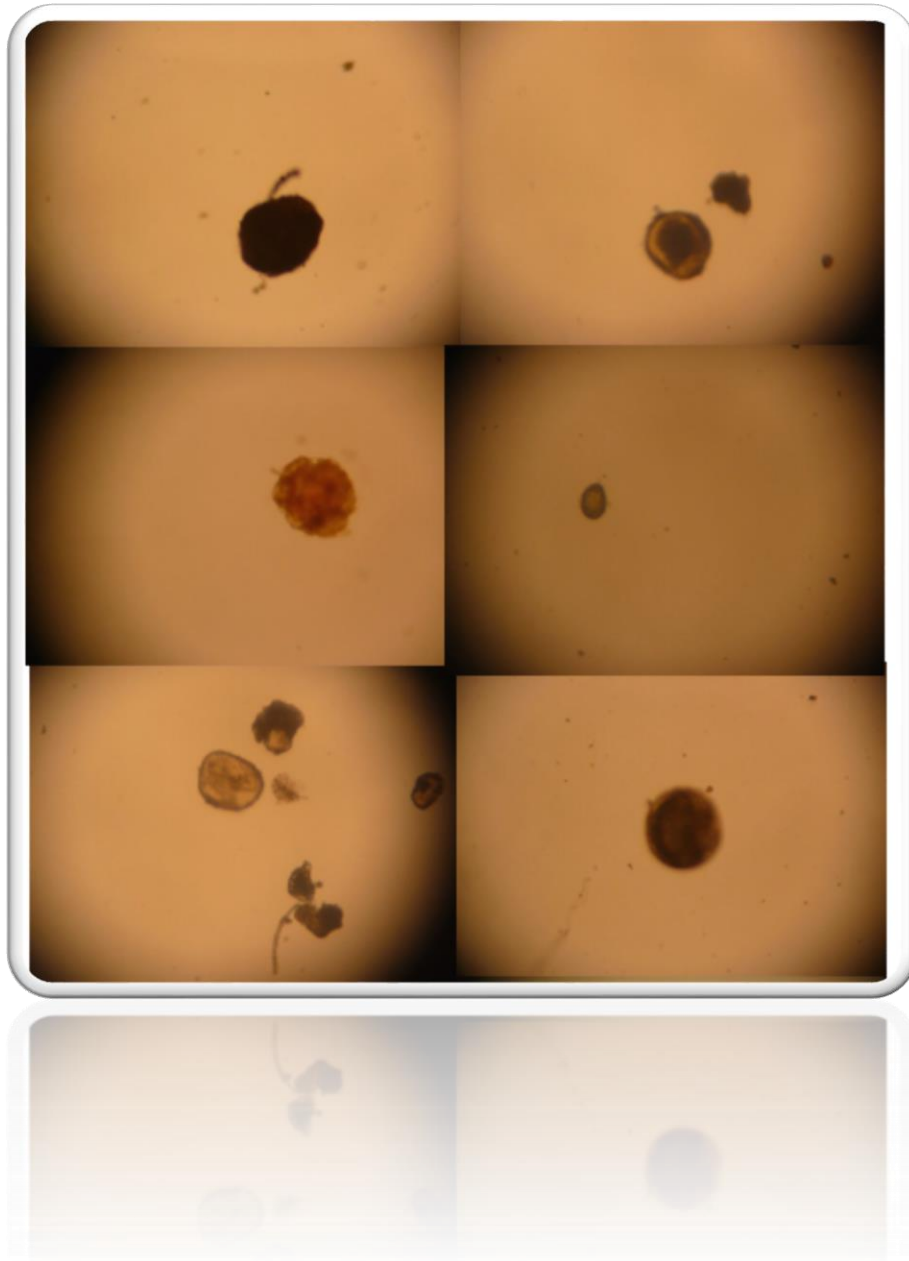
L'intensité de mycorhization absolue dépassé 50 pour les deux plantules. L'intensité de mycorhization est réduite quand le niveau de phosphore augmente dans le sol et devient ainsi directement disponible pour la plante (Dickson et al ; 1999).

On peut observer très nettement les arbuscules au sien des cellules corticales de la racine observée, les hyphes apparaitre coenocétiques et des vésicules gonflées.

**IV.2.2.1. Diversité spécifique et répartition des CMA dans le site d'étude :**

La méthode par tamisage humide du substrat de culture de maïs pour la zone d'étude nous a permis d'isoler diverses spores qui se différencient par leur caractéristique morphologique à savoir la couleur et la taille et la forme, ets.et leur dimension.la distinction et la description des espèces sont réalisés en se référant à la clé d'identification d'international Culture collection of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi (INVAM).( Fig).

On observe aussi des spores contiennent des globules ressemblant à des spores miniatures avec attachement. D'autre spores sont aussi présentes, sessiles, sphérique de couleur brun, orange et noir parfois sombre, elle est composée de 2 couches fines transparente de type membranaire, le saccule sporifère est souvent absent en raison de son détachement lors du tamisage humide ; la morphologie de ces spores est caractéristiques de *Glomus* .Ces résultats sont en d'accord avec ceux de Abbas et al (2006) Affaf et al(2016).



**Figure 30:** différents morphotypes des spores isolées de la rhizosphère de maïs.

Nous avons constaté la présence de spores à l'intérieur d'autres spores plus volumineuse .selon Gerdemann et Nicolson (1963), ces spores mortes sont parfois présentes chez les Glomus.

Nous avons remarqué que la densité des spores isolées du culture de sol du maïs de la plante prélevé est plus importante certains auteurs la densité des spores de CMA

augmente dans les climats secs (Uhlmann et al., 2006) ;elle est liée à leur adaptation aux écosystèmes chauds secs et arides(Mangan et al.,2004 ;Tao et ZHIWAI,2005).

La repartions et la dominance des différents morphotypes observés dans les différents sites montrent que les morphotypes marron et jaune sont communs dans tous les sites.

Ces observation indiquent que la dominance de ces spores constitue une composante majeure de la flore endomycorhizienne et que la zone et leur condition pédologique sont favorables et propices au développement de ces morphotype.plusieur auteurs ont signalé la dominance. Du genre *Glomus* dans les régions arides et semi arides (Tarafdar et Kumar, 1996 ; Mathur et al. 2007). Il a été rapporté que certaines espèces telles que *Glomus* intraradices se retrouve dans une large gamme de sol. Les différents morphotypes des spores varient énormément entre les régions, la nature de sols, les espèces végétales et les différents sites. Ceci est en accord avec plusieurs auteur (Brundrett, 1991 ; Mohammad et al. 2003 ;Bouazza Marouf et al .,2015).

# **PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

## Conclusion

La rédaction de ce rapport nous a appris à synthétiser plusieurs travaux de recherche en approfondissant nos connaissances. Cette étude permettra de constater l'intérêt de la symbiose mycorhizien assurant la durabilité de la production agricole et la maîtrise de méthodologies d'études de statut mycorhizien.

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 *Pisum sativum*. Ont révélé la présence de différentes structures caractéristique de MA. La colonisation par les CMA atteindre 93%; 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,.

Le taux de colonisation des racines par les CMA est très élevé 96.6% indiquant que cette plante est hautement mycotrophe. Les résultats révèlent que les complexes mycorhiziens indigènes de sol de *Pisum sativum* . 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.
- Mise au point des techniques de biologie moléculaire.
- 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.

# **PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

**Références bibliographiques**

- Akiyama, K. (2007). Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0705070393-0705070393.
- Amari, M., & Nakache, C. (2021). *Les champignons mycorrhiziens et les écosystèmes forestiers* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA).
- Ames R. N., Schneider R. W. 1979. Entrophospora, a new genus in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 8, 347-352.
- Aubineau, M., Bermond, A., Bougler, J., Ney B. et Roger-Estrade, J. (2002). *Larousse Agricole*. 4 ème édition, Larousse. 800 pages.
- Bago, A. & Cano, C., (2005). Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 97(6), 1201-1214.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949–958
- Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci* 9:26–32
- Barea, J.M., Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C. (1993). Mycorrhiza and crops. In: *Advances in Plant Pathology Vol; 9. Mycorrhiza: A Synthesis*, Tommerup, (ed.). Academic Press, London, pp. 167-189
- Baroghel-Bouny, V., Ammouche, A., & Hornain, H. (2001). Matrices cimentaires: Analyse de la microstructure et propriétés de transfert. *Revue française de génie civil*, 5(2-3), 149-177.
- Bekouche, K., DiK, S., Zebdi, R., (2019) le test de salinité sur le régulateur de croissance GA3 de pisum sativum, Mémoire Master 2 Université Eloued.
- Błaszowski, J., Renker, C., & Buscot, F. (2006). *Glomus drummondii* and *G. walkeri*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycological Research*, 110(5), 555-566.

- Bolan NS. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plant. *Plant Soil* 134, 189–207.
- Bonfante, P., & Perotto, S. (1995). Tansley Review No. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New phytologist*, 130(1), 3-21.
- Bonfante-Fasolo, P., & Vian, B. (1984). Wall texture in the spore of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Protoplasma*, 120(1), 51-60.
- Branger, A., Richer, M. M., & Roustel, S. (2007). *Alimentation et processus technologiques*. Educagri Editions.
- Brink, M. et Belay, G. (2006). *Ressources végétales de l'Afrique tropicale : céréales et légumes secs*. 1 ère édition, Backhuys Publishers. 326 pages.
- Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320(1), 37-77.
- Callot, G. (1999). *La truffe, la terre, la vie*. Editions Quae.
- Calonne, M. (2012, December). Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorrhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*. Université du Littoral Côte d'Opale.
- Casieri, L., Ait Lahmidi, N., Doidy, J., Veneault-Fourrey, C., Migeon, A., Bonneau, L., ... & Wipf, D. (2013). Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. *Mycorrhiza*, 23(8), 597-625.
- Couplan, F. (2011). *Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées*. Delachaux et Niestlé. 256 pages.
- Coussy, F., Bonin, F., Azorin, P., Tariq, Z., & Driouch, K. (2019). Biologie des métastases et mécanismes moléculaires de leur formation. *Bulletin du Cancer*, 106(1), 24-36.



- Cowieson, A. J., Acamovic, T., & Bedford, M. R. (2003). Supplementation of diets containing pea meal with exogenous enzymes: effects on weight gain, feed conversion, nutrient digestibility and gross morphology of the gastrointestinal tract of growing broiler chicks. *British Poultry Science*, 44(3), 427-437.
- Cruz, C., Correia, P., Ramos, A., Carvalho, L., Bago, A., Loução, M. A. M. (2009). Arbuscular mycorrhiza in physiological and morphological adaptations of Mediterranean plants. In: Varma, A., Hock, B. (eds). *Mycorrhiza: biology, genetics, novel endophytes and biotechnology*. Springer, Germany, pp. 729–749.
- Cruz, C., Egsgaard, H., Trujillo, C., Ambus, P., Requena, N., MartinsLoucao, M. A. & Jakobsen, I. (2007). Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 144: 782–792.
- Dalpe, Y., & Monreal, M. (2004). Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. *Crop management*, 3(1), 1-11.
- Davies, D. R., Berry, G. J., Heath, M.C. et Dawkins, T. C. K. (1985). *Pea (Pisum sativum L.)*. Williams Collins, Sons. 198 pages.
- DJAOUI M. (2016) Etude des mycorhizes du merisier (*Prunus avium*) de la région de Beni-Zmenzer, dans la Wilaya de Tizi-Ouzou. Mémoire Master universite tizi-ouzou
- Duponnois, R., Ramanankierana, H., Hafidi, M., Baohanta, R., Baudoin, E., Thioulouse, J., ... & Prin, Y. (2013). Native plant resources to optimize the performances of forest rehabilitation in Mediterranean and tropical environment: Some examples of nursing plant species that improve the soil mycorrhizal potential. *Comptes Rendus Biologies*, 336(5-6), 265-272.
- 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(5), 1115-1126.
- Fondevilla, S. Kuter, H. Krajinski, F. Cubero, J.I. Rubiales, D. 2011. Identification of genes differentially expressed in a resistant reaction to *Mycosphaerella pinodes* in pea using microarray technology. *BMC Genomics*, 13: 12 -28.

- Fortin, J. A., Plenchette, C. and Piché, Y. 2008. Les mycorhizes: la nouvelle révolution verte. Édition multimondes, Québec, QC. 138 pp.
- Garbaye, J. (2013). La symbiose mycorhizienne: une association entre les plantes et les champignons. *La symbiose mycorhizienne*, 1-280.
- Garbaye, J., R. Dupponois and J.L. Wahl. 1990. the bacteria associated with *Laccaria laccata* Ectomycorrhizas or Sporocarps: Effect on Symbiosis Establishment on Douglas Fir. *Symbiosis*: 9, 267-273
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244.
- GAVÉRIAUX, J. P. LES GLOMEROMYCOTA.
- Sheaffer, C. C., Peterson, M. A., Mccalin, M., Volene, J. J., Cherney, J. H., Johnson, K. D., Woodward, W. T., & Viands, D. R. (1995, March). Acide detergent fiber, neutral 62 detergent fiber concentration and relative feed value. In North American Alfalfa Improvement Conference, Minneapolis.
- Chiarello N, Huckman JC, Mooney HA. 1982. Endomycorrhizal role for interspecific transport of phosphorus in a community of annual plants. *Science* 217 : 941-943.
- Chapuis, D., Aerts, V., & Bonneville, R. (2021). Avant-propos: par Danièle Olivier et Paul Rigny. In *Chimie, aéronautique et espace* (pp. 9-10). EDP Sciences.
- Calonne, M. (2012, December). Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*. Université du Littoral Côte d'Opale.
- Zubek, S., Turnau, K., & Blaszkowski, J. (2008). Arbuscular mycorrhiza of endemic and endangered plants from the Tatra Mts. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 77(2).

- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P., & Duckett, J. G. (2007). Glomeromycotean associations in liverworts: a molecular, cellular, and taxonomic analysis. *American Journal of Botany*, 94(11), 1756-1777.
- Mohammad, M. J., & Mazahreh, N. (2003). Changes in soil fertility parameters in response to irrigation of forage crops with secondary treated wastewater. *Communications in soil science and plant analysis*, 34(9-10), 1281-1294.
- Wubet, T., Weiß, M., Kottke, I., & Oberwinkler, F. (2003). Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*). *Canadian Journal of Botany*, 81(3), 255-266.
- Souza A., Garcia D., Sueiro L., Gilart F., Porrás E. and Licea L., 2006. Pre-sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants. *Bioelectromagnetics*. 27: 247-257.
- Franke-Snyder M., Douds D.D. Jr., Galvez L., Phillips J.G., Wagoner P., Drinkwater L., Morton J.B., 2001. Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. *Appl. Soil Ecol.* 16, 35–48.
- Lovelock, C. E., Andersen, K., & Morton, J. B. (2003). Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecologia*, 135(2), 268-279.
- Dodd, J. C., Boddington, C. L., Rodriguez, A., Gonzalez-Chavez, C., & Mansur, I. (2000). Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant and soil*, 226(2), 131-151.
- Blaszkowski, J., Adamska, I., & Czerniawska, B. (2003). *Glomus clarioideum* and *G. spurcum*, arbuscular mycorrhizal fungi [Glomeromycota] new for Poland and Europe, respectively. *Acta societatis botanicorum Poloniae*, 72(2).
- Abbott, L. K. (1982). Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Australian journal of Botany*, 30(5), 485-499.

- Gianinazzi-Pearson, V. (1996). Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell*, 8(10), 1871.
- Gerdemann, J. W., & Trappe, J. M. (1974). The endogonaceae in the Pacific Northwest.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., DEXHEIMER, J., GIANINAZZI, S., & JEANMAIRE, C. (1985). Plasmalemma structure and function in endomycorrhizal symbioses, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 114, 201-205,
- Giovannetti, M., Avio, L., & Salutini, L. (1991). Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus. *Canadian Journal of Botany*, 69(1), 161-167.
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2003). The living soil: basic pedology-soil biology. *The living soil: basic pedology-soil biology*.
- Gobat, J. M., Aragno, M., & Matthey, W. (2003). The living soil: basic pedology-soil biology. *The living soil: basic pedology-soil biology*.
- Gotoéchan, O. H. M. (1999). FACULTE DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION.
- Teuber, L. R., & Brick, M. A. (1988). Morphology and anatomy. *Alfalfa and alfalfa improvement*, 29, 125-162.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., ... & Shachar-Hill, Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435(7043), 819-823.
- Guether, M., Neuhauser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., & Bonfante, P. (2009). A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology*, 150(1), 73-83.
- Habibzadeh, Y. (2015). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus levels on dry matter production and root traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *African Journal of Environmental Science and Technology*, 9(2), 65-70.

- Haimet M.L., 2013. Mycorhizes: Diagnostic et inoculation. *Revue de la Société Nationale d'Horticulture de France et de ses Sociétés Adhérentes*, N° 622, pp. 8-9
- Hall, I. R. (1977). Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Transactions of the British Mycological Society*, 68(3), 341-356.
- HAMRIT, H., & DERRI, H. (2020). *Champignons mycorhiziens chez les plantes: structures et rôles* (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA).
- Janos, D. P. (1980). Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, 56-64.
- Javot, H., Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2007b). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell & Environment*, 30(3), 310-322.
- Jost, J. P., & Jost-Tse, Y. C. (2016). *Stratégie de défense des plantes contre les maladies et les parasites (et: quelques applications prat.* Editions Publibook.
- Karandashov, V., & Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in plant science*, 10(1), 22-29.
- Kay, D. E. (1979). *Food legumes*. 3ème Edition, Tropical Products Institute. 35 pages.
- Latef, A. A. H. A., & Chaoxing, H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 228-233.
- Lenoir, I. (2015, June). Intérêt de la symbiose mycorhizienne à arbuscules dans la phytoremédiation des sols historiquement contaminés par les hydrocarbures: de la protection à la dissipation. Université du Littoral Côte d'Opale.
- Leyval, C., & Berthelin, J. (1993). Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 15(4), 259-267.
- Manjunath, A., Hue, N. V., & Habte, M. (1989). Response of *Leucaena leucocephala* to vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and rock phosphate fertilization in an Oxisol. *Plant and soil*, 114(1), 127-133.

- Marleau, J., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 1-11.
- Marschner, H., & Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and soil*, 159(1), 89-102.
- Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 17-32.
- Mikola, P. (1948). On the physiology and ecology of *Cenococcum graniforme* especially as a mycorrhizal fungus of birch.
- Miller, D. D., & Walker, C. (1986). *Glomus maculosum* sp. nov. (Endogonaceae): an endomycorrhizal fungus. *Mycotaxon*, 25(1), 217-227.
- Morton JB., Benny GL. 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, J. B., & Msiska, Z. (2010). Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. *Mycorrhiza*, 20(7), 483-496.
- Morton, J. B., & Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 93(1), 181-195.
- Morton, J. B., & Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 93(1), 181-195.
- Morton, J. B., Bentivenga, S. P., & Bever, J. D. (1995). Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 25-32.
- Norman, J. M., & Becker, F. (1995). Terminology in thermal infrared remote sensing of natural surfaces. *Agricultural and Forest Meteorology*, 77(3-4), 153-166.

- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Maia LC, Sieverding E (2011a) *Glomeromycota*: two new classes and a new order. *Mycotaxon* 116:365–379
- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Sieverding E (2011b) *Glomeromycota*: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116:75–120
- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Sieverding E (2011c) New recombinations in *Glomeromycota*. *Mycotaxon* 117:429–434
- Oehl, F; E Sieverding; K Ineichen; P Mader; T Boller & A Wiemken. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agro ecosystems of Central Europe. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 2816-2824.
- Oelke, E. A., Oplinger, E. S., Hanson, C. V., Davis, D. W., Putnam, D. H., Fuller, E. I. et Rosen, C. J. (1991). Dry Field Pea. *Alternative Field Crops Manual*, 100-113.
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775.
- Peyret-Guzzon, M. (2014). Molecular community and population studies of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*).
- Phillips, J. M.; Haymann, D. S. (1970). Improved proceeding for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69: 275-280
- Pons, S., Fournier, S., Chervin, C., Bécard, G., Rochange, S., Frei Dit Frey, N., & Puech Pagès, V. (2020). Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *PLoS One*, 15(10), e0240886.
- Ramos, A. C., Façanha, A. R., Palma, L. M., Okorokov, L. A., Cruz, Z., Silva, A. G., ... & Okorokova-Façanha, A. L. (2011). An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23, 79-89.
- GERDEMANN, J. W. 1964. The effect of mycorrhizae on the growth of maize. *Mycologia* 56:342-349

- Redecker, D., & Raab, P. (2006). Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia*, 98(6), 885-895.
- Redecker, D., Kodner, R., & Graham, L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486), 1920-1921.
- Sylvia, D.M., Hammond, L.C., Bennet, J.M., Haas, J.H. et Linda, S.B. (1993). Field response of corn to water management and inoculation with a VAM fungus. *Agronomy Journal*, 85 : 193-198
- Zhu, Z., Woodcock, C. E., & Olofsson, P. (2012). Continuous monitoring of forest disturbance using all available Landsat imagery. *Remote sensing of environment*, 122, 75-91.
- Allen, P. D. (1982). Energy spectra of secondary neutrons produced by high-energy bremsstrahlung in carbon, nitrogen, oxygen and tissue. *Physics in Medicine & Biology*, 27(4), 553.
- Davis, A. L., Cai, Y., Davies, A. P. & Lewis, J. (1996) <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magnetic resonance in Chemistry*, 34, 887-890.
- Augé, R. M., Stodola, A. J., Tims, J. E., & Saxton, A. M. (2001). Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*, 230(1), 87-97.
- Stahl, E. (1900). *Der Sinn der Mycorrhizenbildung: eine vergleichend-biologische Studie*. Gebr. Borntraeger.
- Read, D.J. 1989. Mycorrhizas and nutrient cycling in sand dune ecosystems. *Proc. R. Soc. Edinb. Sect. B (Biol. Sci.)*, 96: 89–110.
- Dickson, S., & Kolesik, P. (1999). Visualisation of mycorrhizal fungal structures and quantification of their surface area and volume using laser scanning confocal microscopy. *Mycorrhiza*, 9(4), 205-213.
- GERDEMANN, J. W. & NICOLSON, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 46, 23



- Uhlmann, E., Görke, C., Petersen, A., & Oberwinkler, F. (2006). Arbuscular mycorrhizae from arid parts of Namibia. *Journal of Arid Environments*, 64(2), 221-237.
- Mangan, S. A., Eom, A. H., Adler, G. H., Yavitt, J. B., & Herre, E. A. (2004). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi across a fragmented forest in Panama: insular spore communities differ from mainland communities. *Oecologia*, 141(4), 687-700.
- Tao, L., & Zhiwei, Z. (2005). Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China. *Applied Soil Ecology*, 29(2), 135-141.
- Tarafdar, J.C. and Praveen Kumar. 1996. The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on crop, tree and grasses grown in an arid environment. *Journal of Arid Environment* 34: 197-203.
- Mathur, N., & Vyas, A. (2007). Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Am. J. Plant Physiol*, 2(2), 122-138.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B., & Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23(7), 515-531.
- Risède J. M. (1994). Eléments de caractérisation de *Cylindrocladium* sp. Agent de nécroses racinaires du bananier en Martinique. *Fruits*, 49, 167-178.
- Rival, P., Bono, J. J., Gough, C., Bensmihen, S., & Rosenberg, C. (2013). Cell autonomous and non-cell autonomous control of rhizobial and mycorrhizal infection in *Medicago truncatula*. *Plant signaling & behavior*, 8(2), e22999.
- Sanon, A. A. (2005). Rôle des champignons mycorrhiziens à arbuscules dans les mécanismes régissant la co-existence entre espèces végétales. DEA, sciences du sol, Université Henri Poincaré–Nancy, 1.
- Schaarschmidt, S., Roitsch, T., & Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany*, 57(15), 4015-4023.
- Schüßler A, Walker C (2010) *The Glomeromycota: a species list with new families*. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester. Published in December 2010 in

libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Printed copy available under ISBN-13: 978-1466388048, ISBN-10: 1466388048.

SCHÜßLER, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105(12), 1413-1421.

Selosse, M. A., & Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(1), 15-20.

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

Smartt, J. (1990). Grain legumes: Evolution and genetic resources. Cambridge University Press. 200 pages.

Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Smith, S. E., & Smith, F. A. (2012). Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*, 104(1), 1-13.

Smith, S. E., Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. (Academic Press Ltd: Cambridge, UK), 787P. In Dearnaley, J., Perotto, S., Selosse, M. A. (2016). Structure and development of orchid mycorrhizas. *Molecular mycorrhizal symbiosis*, 63-86.

Smith, S.E., Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. Academic Press, London, 605P. In Gregory, P. J. (2008). *Plant roots: growth, activity and interactions with the soil*. John Wiley & Sons, 318P.

Strullu, D. G., Romand, C., & Plenchette, C. (1991). Axenic culture and encapsulation of the intraradical forms of *Glomus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(3), 292-297.

Stürmer, S. L. (2012). A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*, 22(4), 247-258.

- Suty, L. (2015). *Les végétaux: des symbioses pour mieux vivre*. Editions Quae.
- Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., ... & Kõljalg, U. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New phytologist*, 188(1), 291-301.
- Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., ... & Kõljalg, U. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New phytologist*, 188(1), 291-301.
- Trouvelot, A. Kough, J. Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: physiology and genetics aspects of mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V et Gianinazzi S (Eds), 1st ESM, INRA Press, Paris. 217-221pp
- Walker C, Sanders FE (1986) Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27:169–182
- Walker, C., & Schüßler, A. (2004). Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research*, 108(9), 981-982.
- Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., ... & 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(2), 137-153.
- Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299-363.
- Wipf, S., Stöckli, V., Herz, K., & Rixen, C. (2013). The oldest monitoring site of the Alps revisited: accelerated increase in plant species richness on Piz Linard summit since 1835. *Plant Ecology & Diversity*, 6(3-4), 447-455.

Zohary, D. et Hophf, M. (2002). Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe and the Nile Valley. 3<sup>ème</sup> Edition, Oxford University Press Inc. 328 pages

# **PARTIE VII. ANNEXES**

---

**VII.1. Annexe 1**

- **Fixateur FAA** : Mélange éthanol-acide acétique-formol (Phillips et Hayman, 1970).

Formaldehyde 37°C.....25ml

Acide acétique glacial..... 25ml

Ethanol.....140ml

Eau distillée.....60ml

- **KOH 10%** :

KOH.....11,76ml

Eau distillée.....100ml

- **Acide lactique à 10%** :

Acide lactique.....83,33ml

Eau distillée.....250ml

- **Bleu de trypan 1%** :

Bleu de trypan.....1g

Eau distillée.....100ml

- **Glycérol à 60%** :

Glycérol.....65,2ml

Eau distillée..... 100ml

**VII.2. Annexe 2 :**

- **Eau gélosé 1%** :

Agar-agar.....1g

Eau distillée..... 100ml

pH 6.8 à 7.stériliser pendant 20 min à120°C.

**VII.3. Annexe 3 :**

Solution Nutritive Arnold &amp; Hoagland :

Solution mères	Ingrédients	Quantité g/l	Solution final ml/l
A	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	236,15	5
B	KNO <sub>3</sub>	101,11	5
C	MgSO <sub>4</sub>	120,40	2
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,10	1
E	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	183,33	1
F	Séquestrant de fer	25,00	4
Micro éléments	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,572	1
	MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	0,362	
	ZnCl <sub>2</sub>	0,110	
	CuCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,050	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,025	

pH 6 à 6.8

VII.4. Annexe 04 :

Caractéristique morphologique d'un grand nombre de Glomeromycota des classes jusqu'aux genres (Oehl et al ;2011)

Classes ordres	Familles	Genres	Spores	Parois des spores	Structures mycorhiziennes		
<b>Glomeromycetes</b>	Glomeraceae	Glomus		1	V, A, H		
		Rhizophagus		1	V, A, H		
		Glomus		1	V, A, H		
		Glomus		1	V, A, H		
		Glomus		1	V, A, H		
		Glomus		1	V, A, H		
		Glomus		1	V, A, H		
	Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora		1	V, A, H	
			Nedoclea		1	V, A, H	
			Cleocleus		2	V, A, H	
			Triospora		2	V, A, H	
		Saccosporaceae	Saccospora		3	V, A, H	
			Pactospora		2	V, A, H	
		Acaulosporaceae	Acaulospora		3	V, A, H	
			Acaulospora		3	V, A, H	
<b>Gigasporales</b>	Scolethosporaceae	Orbispora		3	A, H		
		Scolethospora		3	A, H		
		Denticulotrichaceae	Favosites		3	A, H	
			Denticulotrichum		3	A, H	
	Recurvulariaceae	Curvularia		4	A, H		
		Recurvularia		3	A, H		
	Gigasporaceae	Gigaspora		2	A, H		
		Gigaspora		1	A, H		
	<b>Archaeosporomycetes</b>	Archaeosporaceae	Archaeospora		3 (Ac) 1 (G)	V, A, H	
			Archaeospora		2 (Ac) 1 (G)	A, H	
Archaeospora				2 (Ac) 1 (G)	A, H		
Geophilaceae		Geophilum		1		Associated with cyanobacteria	
<b>Paraglomeromycetes</b>	Paraglomeraceae	Paraglomus		1	A, H		



## VII.5. Annexe 5

Grilles d'évaluation de la colonisation mycorhizienne des racines

	0	1				2				3				4				5						
		A3	A2	A1	A0	A3	A2	A1	A0	A3	A2	A1	A0	A3	A2	A1	A0	A3	A2	A1	A0			
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
11																								
12																								
13																								
14																								
15																								
16																								
17																								
18																								
19																								
20																								
21																								
22																								
23																								
24																								
25																								
26																								
27																								
28																								
29																								
30																								
<b>Tot</b>																								