

REUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Génie de l'Environnement

**Mise au point d'un biofertilisant à base d'agents
mycorhiziens endémiques**

Présenté par : Chikhi Nour El Houda

Encadré par : Pr. Aouabed Ali

Co-Encadreur : Faidi Houria

Année Universitaire

2022 / 2023

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Dieu Tout Puissant, de m'avoir permis de mener à bien ce mémoire de fin d'étude, et de m'avoir donné la force et le courage pour l'accomplissement de mes études.

Je tiens également à remercier mon encadreur Mr. Aoubed Ali professeur à l'Université de Blida 1 pour avoir accepté de diriger mes travaux. Je tiens encore à lui remercier pour sa disponibilité, son aide, sa gentillesse non mesurables et pour tous ses précieux conseils.

Ma profonde gratitude va à Madame Faidi Houria, enseignante a la faculté de biologie Université de Blida 1, pour m'avoir introduit dans le domaine des mycorhizes. Ses grandes connaissances m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail, je la remercie d'avoir dirigée et suivie ce travail. Elle m'a guidée et elle a fait preuve d'une très grande disponibilité et surtout d'avoir toujours cru en moi.

Je tiens à remercier vivement Mr. Bouras et Mr. badis, Professeurs à l'Université de Blida 1, j'ai apprécié en eux un esprit écoutant, jugeant, enseignant et conseiller.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de jury Professeur Badis et Docteur Dadou de m'honorer de leurs présences pour juger ce travail.

Dédicaces

En ce moment où j'achève ce mémoire, je souhaite m'adresser à la personne qui a parcouru ce chemin avec détermination, persévérance et courage : moi-même. Je me félicite pour ma volonté inébranlable de poursuivre mes objectifs, Je me dédie ce mémoire pour rappeler à moi-même que je suis capable de grandes choses. Cette réalisation est un témoignage de ma force intérieure, de ma détermination et de ma capacité à persévérer malgré les défis. Je suis fier(e) de ce que j'ai accompli et je me rappellerai toujours que je suis capable de réaliser de grandes choses lorsque je m'investis pleinement.

À mes chers parents, Tout au long de ma vie académique, vous avez été mes plus grands admirateurs et mes plus fervents supporters. Vous avez célébré mes réussites avec une fierté éclatante et m'avez soutenu dans les moments difficiles en me rappelant que chaque épreuve est une occasion d'apprendre et de grandir. Vous avez sacrifié tant de choses pour moi, mettant mes besoins et mes aspirations avant les vôtres. Votre amour inconditionnel et votre dévouement ont été ma plus grande source d'inspiration et de force. Cette réalisation n'est pas seulement la mienne, mais aussi la vôtre. Je vous dédie ce mémoire avec tout mon amour et ma reconnaissance, en espérant que cela puisse refléter une infime partie de la gratitude que je ressens à votre égard.

À la personne qui a été présente à tout moment de mon parcours, je suis infiniment reconnaissante pour tes encouragements constants et ton soutien indéfectible. Ta confiance en moi a été un moteur puissant qui m'a poussée à me surpasser et à réaliser mes rêves. Je suis honorée d'avoir une personne aussi exceptionnelle dans ma vie.

A ma sœur Soumia et mes amies proches, je vous remercie du fond du cœur pour votre amitié sincère et votre soutien sans faille. Votre présence a rendu ma vie plus riche, plus colorée et plus significative. Je suis reconnaissante d'avoir des amis aussi formidables à mes côtés.

Résumé

L'objectif de ce travail était la maîtrise de la multiplication des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), et la production d'un biofertilisant à base de ces champignons.

Le premier essai de multiplication des CMA de deux inocula I1 et I2 produits à l'Université *Blida 1* dans le cadre du projet de coopération Algéro-Canadienne, sur deux espèces de plantes-hôtes avait échoué. Une deuxième tentative, où nous avons testé l'effet de trois proportions de compost (0,5 et 10%), a été lancée. La multiplication de CMA de I2 a encore échoué. Pour I1, Les fréquences de mycorhizations maximales étaient de 85.55 % pour le substrat sans compost, 72.22 % pour 5 % de compost et 46.89 % avec 10 % de compost. L'intensité de colonisation du système racinaire M % était faible, 24.52% pour le substrat sans compost, 16.06 % pour 5 % de compost et 8.05 % pour 10 % de compost. De faibles teneurs arbusculaires A% ont été notées, 11.19 % pour le substrat sans compost, 7.57 % pour 5 % de compost et 3.71 % pour 10 % de compost. Ces résultats montrent que l'utilisation de compost ne favorise pas la multiplication des CMA.

Pour la production d'un biofertilisant à base de CMA, l'inoculum primaire utilisé est constitué de sol rhizosphérique et de fragments racinaire de *Lavandula stoechas* récolté dans la Forêt de Oued Djer El'Affroun. L'évaluation de l'état de mycorhization de *L. stoechas*, montre que le système racinaire est bien mycorhizé (F% = 89 %), l'intensité de la colonisation du cortex racinaire est importante (M% = 55 %) où les arbuscules représentent 45 %. La densité sporale du sol rhizosphérique de *L. stoechas* est d'environ 15 spore/g de sol. Une grande diversité des spores a été observée indiquant la présence de plusieurs espèces de CMA. Ces résultats prouvent que l'inoculum primaire est riche en propagules.

La multiplication des champignons mycorhiziens pour produire un biofertilisant est considéré comme un processus complexe, elle nécessite de nombreuses tentatives qui prennent beaucoup de temps, c'est la raison pourquoi il est impossible d'atteindre le but de cette étude. Cependant, le projet se poursuivra jusqu'à ce que les résultats souhaités soient réalisés.

Mot Clés : Biofertilisant, champignons mycorhiziens arbusculaires, mycorhizes, symbiose mycorhizienne.

Abstract

The objective of this work was to master the multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), and the production of a biofertiliser based on these fungi.

The first AMF multiplication trial of two inocula I1 and I2 produced at Blida 1 University as part of the Algerian-Canadian cooperation project, on two species of host plants had failed. A second attempt, where we tested the effect of three compost proportions (0.5 and 10%), was launched. The multiplication of I2 CMA has failed again. For I1, the maximum frequency of mycorrhizations was 85.55% for the substrate without compost, 72.22% for 5% compost and 46.89% with 10% compost. The colonization intensity of root system M% was low, 24.52% for the substrate without compost, 16.06% for 5% compost and 8.05% for 10% compost. Low arbuscular contents A% were noted, 11.19% for the substrate without compost, 7.57% for 5% compost and 3.71% for 10% compost. These results show that the use of compost does not promote the multiplication of AMF.

For the production of a biofertilizer based on AMF, the primary inoculum used consists of rhizospheric soil and root fragments of *Lavandula stoechas* harvested in the forest of Oued Djer El'Affroun. The evaluation of the mycorrhizal state of *L. stoechas*, shows that the root system is well mycorrhized (F% = 89%), the intensity of colonization of the root cortex was significant (M% = 55%) where arbuscules represent 45%. The spore density of the rhizospheric soil of *L. stoechas* about 15 spore/g soil. A wide diversity of spores was observed indicating the presence of several AMF species. These results show that the primary inoculum is full of propagules.

The multiplication of mycorrhizal fungi to produce a biofertilizer is considered a complex process, it requires many attempts that take a long time, which is why it was impossible to achieve the purpose of this study. However, the project will continue until the desired results are achieved.

Keywords : Biofertiliser, arbuscular mycorrhizal fungi, mycorrhizae, mycorrhizal symbiosis.

ملخص

كان الهدف من هذا العمل هو إتقان كيفية تكاثر فطريات الميكوريز الشجرية، وإنتاج سماد حيوي يعتمد على هذه الفطريات.

أول تجربة تمثلت في مضاعفة الفطريات الشجرية الموجودة في لقاحين I1 و I2 اللذان تم إنتاجهما في جامعة البليلة 1 كجزء من مشروع التعاون الجزائري الكندي، على نوعين من النباتات لكنها بائت بالفشل. في محاولة ثانية، أين تم دراسة تأثير ثلاث نسب من السماد (0, 5, 10%) على مردود الفطريات الموجودة في اللقاحين السابقين. الفطريات الموجودة في اللقاح I2 لم تتضاعف. أما بالنسبة إلى فطريات اللقاح I1، أقصى ترددات التفطر بلغت 85.55% للقوام بدون سماد، و72.22% مع 5% سماد و46.89% مع 10% سماد. كثافة استعمار النظام الجذري كانت منخفضة، 24.52% للركيزة بدون سماد، 16.06% مع 5% سماد و8.05% مع 10% سماد. لوحظت محتويات منخفضة من نسبة الشجيرات A%، 11.19% للركيزة بدون سماد، و7.57% مع 5% سماد و3.71% مع 10% سماد. تظهر هذه النتائج أن استخدام السماد لم يشجع على مضاعفة الفطريات الميكوريزية الشجرية الموجودة في اللقاح I1.

لإنتاج سماد حيوي يعتمد على الفطريات الميكوريز الشجرية، تم استخدام لقاح أولي يتكون من التربة الجذعية وشطايا جذرية من نبتة الخزامى التي تم حصادها في غابة واد جر بالعفرون. يُظهر تقييم حالة الفطريات الميكوريزية في نبتة الخزامى أن النظام الجذري مملوء بالفطريات حيث تردد التفطر 89%، وشدة استعمار القشرة الجذرية بلغت 55% حيث 45% منها عبارة عن شجيرات مما يدل على أن الاستعمار الفطري الميكوريزي في حالة نشطة. لوحظ وجود تنوع كبير في عائلة الفطريات الميكوريزية الشجرية في اللقاح الأولي حيث بلغت كثافة الأبواغ حوالي 15 بوغ في واحد غرام من التربة.

مضاعفة فطريات الميكوريز لإنتاج سماد بيولوجي تعتبر عملية معقدة نوعا ما تحتاج إلى كثير من المحاولات التي تتطلب وقتا طويلا، لهذا كان من المستحيل الوصول إلى الهدف الأساسي من هذه الدراسة، لكن مع هذا سيبقى المشروع متواصل حتى تتحقق النتائج المطلوبة.

كلمات مفتاحية: سماد حيوي، فطريات الميكوريز الشجرية، ميكوريز، تعايش فطري.

Liste des Figures

Num de fig.	Titre	P
Figure I.1	Marché des biofertilisants à base des mycorhizes : utilisation agricole des fertilisant à base de Phosphore, en millions de tonnes métriques, Globale, 2018-2023	07
Figure I.2	Marché des biofertilisants à base des mycorhizes : taille du marché par région en 2021.	08
Figure I.3	Schéma montrant les différences entre les ecto- et les endomycorhizes	10
Figure I.4	Classification des CMA.	13
Figure I.5	Composition de l'association mycorhizienne arbusculaire	13
Figure I.6	Cycle de développement des champignons MA	16
Figure I.7	Effets positifs de la colonisation mycorhizienne arbusculaires.	18
Figure II.1	a) inoculum 1, b) inoculum 2.	24
Figure II.2	Distribution du substrat dans les sacs de culture (a) et inoculation (b) .	25
Figure II.3	Schéma de la mise en place des cultures.	26
Figure II.4	Photographie de l'espèce <i>lavandula stoechas</i> .	27
Figure II.5	Mise en place de la culture piège.	28
Figure II.6	la méthode de la coloration des racines.	29
Figure II.7	Montage des fragments racinaires entre lame et lamelle.	29
Figure II.8	Notation du degré de mycorhization des fragments racinaires. L'échelle s'étend de 0 (pas de mycorhization) jusqu'à 5 (au moins 90% du fragment est mycorhizé) et la notion de la richesse en arbuscules (classe de A₁ à A₃).	30
Figure II.9	extraction des spores des CMA à partir d'un sol rhizosphérique par le tamisage humide.	33
Figure II.10	Séparation des spores des CMA extraites.	33
Figure III.1	Développement des plantules de sorgho (<i>Sorghumsp.</i>) et de persil (<i>Petroselinumcrispum</i>) inoculées par les CMA.	34

Figure. III.2	Racine non mycorhizée (a) et racine mycorhizée(b).	36
Figure III.3	Différentes structures des CMA formées dans les racines de sorgho au cours des différents prélèvements.	38
Figure III.4	Histogramme montrant la variation de la fréquence de mycorhization (F%) en fonction la période de prélèvement et les proportions de compost dans le substrat (0, 5 et 10 %).	39
Figure III.5	Histogramme montrant la variation de l'intensité de mycorhization (M %) en fonction la période de prélèvement et les proportions de compost dans le substrat (0, 5 et 10 %).	40
Figure III.6	Histogramme montrant la variation de la teneur arbusculaire (A%) en fonction de la période de prélèvement et les proportions de compost dans le substrat (0, 5 et 10 %).	41
Figure III.7	Les Points d'entrées des champignons mycorhiziens arbusculaires	43
Figure III.8	Arbuscules.	44
Figure III.9	Vésicules.	44
Figure III.10	Spores.	45
Figure III.11	Bac de production de l'inoculum brute(6 semaines des cultures).	46
Figure III.12	Diversité des spores isolées à partir du sol rhizosphérique de <i>L. steocha</i>	47
Figure III.13	Structures morphologiques de quelques spores isolées du sol rhizosphérique de <i>L. steochas</i> observées au microscope.	48

Liste des Tableaux

Num de tableau	Titre	P
Tableau II.1	Caractéristiques du compost (TADFI Champost).	24

Liste des Abréviations

CMA : Champignons Mycorhiziens Arbusculaires.

MA : Mycorhize Arbusculaire.

TCAC : Taux de Croissance Annuel Composé.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Abréviations

Introduction 01

Chapitre I: Recherche Bibliographique

1. La pollution environnementale causée par les engrais chimiques 03

1.1. Lessivage et infiltration des nitrates 03

1.2. Métaux lourds 03

1.3. Phosphore 04

2. Biofertilisants 05

2.1. Croissance du marché des biofertilisants 05

2.2. Marché des biofertilisants à base des mycorhizes 05

2.3. Principales tendances du marché 06

2.4. Paysage concurrentiel 08

3. Mycorhizes 09

3.1. Définition et concept 09

3.2. Types des mycorhizes 09

4. Mycorhizes arbusculaires (MA) 11

4.1. Généralités 11

4.2. Champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) 11

4.3. Structures des mycorhizes arbusculaires MA	13
4.4. Cycle de développement des CMA	15
4.5. Rôles des CMA	17
5. Impact de l'agriculture moderne sur les mycorhizes	20
5.1. La fertilisation	20
5.2. Travail du sol	20
5.3. Pesticides	20
6. Méthodes de multiplication de l'inoculum	21
6.1. Méthode conventionnelle	21
6.2. Méthode de culture <i>in vitro</i> et mode d'emploi	22
7. Conclusion.....	22

Chapitre II: Matériel et Méthodes

1. Essais de multiplication des CMA	23
1.1. Premier essai	23
1.2. Deuxième essai	25
2. Essai de production d'un inoculum brute	26
2.1. Prélèvement de l'inoculum primaire	26
2.2. Mise en place de la culture piège	27
3. Mise en évidence et estimation du taux de mycorhization	28
3.1. Mise en évidence	28
3.2. Estimation	30
4. Analyse statistique	31
5. Extraction des spores de CMA	32
5.1. Tamisage du sol	32
5.2. Centrifugation	32

Chapitre III: Résultats et Discussions

1. Essais de multiplication des CMA	34
1.1. Premier essai	34
1.2. Deuxième essai	36
1.3. Discussion	42
2. Essai de production d'un inoculum brute	42
2.1. Evaluation de l'état de mycorhization de <i>L. stoechas</i>	42
2.2. Culture piège	46
2.3 Extraction des spores	46
2.4 Discussion	48
Conclusion	49

Introduction
générale

L'agriculture moderne fait face à de nombreux défis. La population mondiale en constante augmentation force les agriculteurs à rendre leurs terres de plus en plus productives. À l'heure actuelle, la productivité élevée de l'agriculture intensive est grandement dépendante des intrants chimiques, en particulier des engrais qui enrichissent les sols d'éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes [1].

Les engrais chimiques sont des engrais inorganiques formulés en concentrations appropriées, fournissent trois éléments nutritifs principaux : l'azote, le phosphore et le potassium (N, P et K) pour diverses cultures et conditions de croissance. Cependant, environ 40 à 70 % de l'azote, 80 à 90 % du phosphore et 50 à 70 % du potassium des engrais normaux appliqués sont perdus dans l'environnement et ne peuvent pas être absorbés par les plantes, provoquant non seulement des pertes économiques et des ressources importantes, mais aussi une pollution environnementale très grave [2,3].

La politique agricole doit limiter les engrais de synthèse tout en favorisant l'utilisation des biofertilisants et de l'agriculture biologique. De nombreux pays proposent divers programmes pour encourager les fabricants de biofertilisants et prennent plusieurs initiatives pour faire passer les pratiques agricoles conventionnelles aux pratiques agricoles biologiques. Le marché mondial des biofertilisants devrait croître de 12,1 % au cours de la période de prévision (2023-2028) [4].

L'université de Blida a vu la création d'une filiale « mycorhizes » qui a pour objectif principal d'accroître la sécurité alimentaire, d'améliorer la productivité par la conceptualisation de la bio-fertilisation et de réaliser une bio innovation (la mycorhization) d'être produite et adoptée à grande échelle. Actuellement, le marché des biofertilisants à base de mycorhizes est vierge en Algérie.

Ce projet entre dans le cadre de la filiale « mycorhizes » par la maîtrise de la caractérisation et de la multiplication des nouvelles souches des mycorhizes endémiques.

L'objectif principal de ce travail est la mise au point d'un biofertilisant à base de champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) endémiques.

Pour cela un essai de multiplication des CMA qui passe par deux expériences a été lancé :

- Pour la première expérience nous avons testé deux espèces de plantes-hôtes.
- Pour la deuxième expérience nous avons testé l'effet des trois proportions de compost sur l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

Un autre essai concernait la production d'un inoculum brute a partir d'un inoculum primaire a été lancé.

Ce mémoire est donc constitué de 3 chapitres. Le premier chapitre est dédié à l'état des connaissances en littérature scientifique sur la pollution environnementale causé par l'utilisation excessive des engrais chimique et leurs impacts, sur le marché des biofertilisants. Ensuite, sur les champignons mycorhiziens à arbuscules et leur importance pour les végétaux et l'environnement, sur les impacts de l'agriculture moderne sur les mycorhizes, et en fin les méthodes de multiplication des CMA. Ce chapitre fini avec une petite conclusion.

Le second chapitre concerne le matériel et les méthodes afférentes à la réalisation des essais. Enfin, le troisième chapitre concerne les résultats obtenus et leurs discussions. Il est suivi d'une conclusion générale, des perspectives de recherche future et des références bibliographiques citées tout au long de ce manuscrit.

Chapitre I

Recherche

Bibliographique

1. Pollution environnementale causée par les engrais chimiques

L'utilisation aveugle et à long terme d'engrais est devenue une source importante de pollution des sols et de l'eau, qui met en danger la santé humaine et les écosystèmes terrestres et aquatiques vierges.

Les formes solubles de ces éléments nutritifs fournis par les engrais se dissolvent dans l'eau et sont transportées en solution par percolation profonde des eaux d'irrigation et de pluie vers les eaux souterraines où elles rendent l'eau potable impropre à la consommation humaine et animale [5].

1.1. Lessivage et infiltration des nitrates

À l'échelle mondiale, les nitrates sont les polluants chimiques qui présentent la plus grande distribution dans les eaux souterraines.

L'utilisation des engrais chimique en grande quantité par rapport aux besoins des plantes conduit au lessivage et à l'infiltration des engrais excédentaires dans les nappes phréatiques, ce qui augmente le pourcentage de nitrates dans de nombreux aquifères.

Les plantes utilisent 50% d'engrais azotés appliqués au sol, 2 à 20% perdus par évaporation, 15 à 25% de composés organiques réagissent dans le sol argileux et les 2 à 10% restants interfèrent avec les eaux de surface et souterraines [6].

Dans le sol, l'azote est converti en ammoniac [7], qui à son tour est converti en nitrite (NO_2) et en nitrate (NO_3), qui est très soluble et mobile et qui est vaguement lié aux particules du sol. De plus, l'oxydation du NO_2 en NO_3 par l'oxygène dissous dans l'eau entraîne une diminution des niveaux d'oxygène dans l'eau [8].

En conséquence, La consommation d'eau contaminée par le NO_3 cause la méthémoglobinémie ou le syndrome du bébé bleu chez les nourrissons ou l'apparition d'un cancer gastrique chez les adultes [9].

1.2. Métaux lourds

Les engrais disponibles dans le commerce sont mélangés avec une gamme d'éléments traces métalliques (ETM) [10].

L'utilisation excessive de ce dernier pendant une longue période entraînant une accumulation de métaux lourds (ML) dans les sols agricoles, réduit la fertilité du sol et par conséquent, diminue la croissance et la productivité des plantes [11].

Il est extrêmement difficile de récupérer la nature du sol après qu'il soit contaminé par les métaux lourds. Le Cu, le Zn et le Cd présentent un potentiel d'accumulation le plus élevé [12].

L'accumulation de métaux lourds dans les tissus humains internes peut affecter le système nerveux central et agir comme un pseudo-Co-facteur ou promoteur de certains problèmes de santé, tels que les crises épileptiques, les maux de tête et le coma. La contamination par les métaux lourds est considérée comme une menace pour la santé des adultes et des enfants [13].

1.3. Phosphore

Le phosphore contenu dans les engrais chimiques provient de l'exploitation de ressources non renouvelables. Il est considéré comme très immobile et se lie étroitement aux particules du sol ayant le moins de lessivage.

Le phosphore n'est pas facilement disponible et les plantes l'utilisent de façon inefficace, ne prenant que 5 à 10 % du phosphore appliqué [14]. En termes de budget global. L'accumulation de P dans les sols du monde est supérieure à son élimination dans les cultures, ce qui entraîne un déséquilibre entre l'apport et la production de ce dernier.

De plus, l'application répétée d'engrais entraîne une accumulation excessive dans le sol ; par conséquent, une grande partie du phosphore non utilisé est laissé dans le sol qui, sous l'effet de la pluie, a tendance à être entraîné vers les cours d'eau [15].

Cet apport important de phosphore dans les milieux aquatiques a pour effet d'enclencher l'eutrophisation. Ce processus, commençant par une croissance anarchique des algues, des cyanobactéries et des plantes aquatiques, entraîne une réduction de l'oxygène dissous dans l'eau et engendre un déséquilibre des systèmes aquatiques.

L'eutrophisation se traduit par une baisse de la biodiversité et une prolifération d'espèces plus tolérantes au stress comme les bactéries, reconnues pour leur potentiel de toxicité [16].

2. Biofertilisants

Un biofertilisant est un produit contenant des micro-organismes vivants qui contribue à améliorer la croissance des plantes. Il optimise les fonctions du sol et sa fertilité grâce à l'action des micro-organismes qu'il contient [17].

Le biofertilisant a été reconnu comme un substitut aux engrais inorganiques commerciaux afin de stimuler le rendement des cultures en augmentant la fertilité des sols dans une agriculture durable. Ces engrais biologiques potentiels sont écologiques, car ils protègent l'environnement et agissent également comme intrants agricoles rentables [18]. Récemment, des efforts ont été faits pour mettre au point des engrais biologiques riches en nutriments de haute qualité, afin de certifier la sécurité alimentaire.

2.1. Croissance du marché des biofertilisants

En raison de l'émergence de la pandémie de COVID-19, il y a eu une perturbation de la chaîne d'approvisionnement à cause de laquelle le secteur agricole a dû faire face à des problèmes tels que l'indisponibilité de la main-d'œuvre, les barrières de transport, la restriction de l'accès au marché et le manque de stocks dans certaines régions qui ont légèrement affecté la croissance du marché des biofertilisants [4].

2.2. Marché des biofertilisants à base des mycorhizes

Les mycorhizes contribuent de manière significative à la nutrition des plantes, en particulier à l'absorption du phosphore. Ils contribuent à l'absorption sélective des éléments immobiles (P, Zn et Cu) et mobiles (S, Ca, K, Fe, Mn, Cl, Br et N) des plantes et à l'absorption d'eau.

Le marché des biofertilisants à base de mycorhizes est segmenté géographiquement en Amérique du Nord, en Europe, en Asie-Pacifique, en Amérique du Sud, au Moyen-Orient et en Afrique et, en outre, chaque région est sous-segmentée en différents pays.

Le marché des mycorhizes devrait enregistrer un TCAC de 14,8 % au cours de la période de prévision 2022-2027 [19].

La crise mondiale causée par la pandémie de COVID-19 a exercé un impact significatif sur la plupart des industries, cependant, l'industrie des engrais, y compris le marché des Biofertilisants à base de mycorhizes, a montré une certaine résilience dans la chaîne d'approvisionnement pendant la crise. Les fabricants d'engrais ont développé une immunité globale en travaillant pendant longtemps dans un environnement très turbulent.

Les gouvernements de différents pays proposent divers programmes pour encourager les fabricants de biofertilisants, et ils prennent plusieurs initiatives pour faire passer les pratiques agricoles conventionnelles aux pratiques agricoles biologiques. Ceux-ci stimulent l'utilisation des biofertilisants mycorhiziens.

En outre, l'augmentation de la demande alimentaire et la nécessité d'un développement agricole durable, une efficacité impressionnante sur la croissance de cultures importantes et l'épuisement des niveaux de phosphore dans les sols sont les facteurs qui animent le marché. Cela a à son tour conduit les fabricants de mycorhizes à combler l'écart entre la demande et l'offre de ces biofertilisants, car il y a une tendance croissante vers les produits biologiques [19].

2.3. Principales tendances du marché

2.3.1. Appauvrissement des niveaux de phosphore dans le sol

Le phosphore est un macronutriment qui joue de nombreux rôles cruciaux dans les plantes. C'est un composant vital des acides nucléiques, jouant ainsi un rôle vital dans la reproduction des plantes. La concentration de phosphate soluble dans la plupart des solutions de sol est très faible et le phosphore est relativement immobile dans le sol.

En plus de cela, la surexploitation des terres agricoles par des cultures continues et des conditions de sécheresse fréquentes ont entraîné un épuisement supplémentaire des niveaux de phosphore dans de nombreuses régions du monde.

Compte tenu de la demande mondiale croissante de nourriture et du taux actuel d'extraction du phosphore résultant de l'augmentation de l'utilisation et de la diminution de l'offre mondiale, il existe un besoin urgent d'une alternative durable.

Les microorganismes, tels que les champignons mycorhiziens qui peuvent grandement améliorer l'absorption du phosphore pourraient donc être une approche très efficace pour surmonter la crise du phosphate. Par exemple, en Inde, un grand pays agricole, la carence en phosphore est répandue dans tous les principaux écosystèmes rizicoles.

L'utilisation à grande échelle de biofertilisants à base de mycorhizes pour la production de riz a entraîné des augmentations de rendement d'environ 10 % ainsi qu'une réduction significative de l'utilisation d'engrais chimiques. Ainsi, les biofertilisants mycorhiziens peuvent enrichir efficacement le sol avec une carence en phosphore [19].

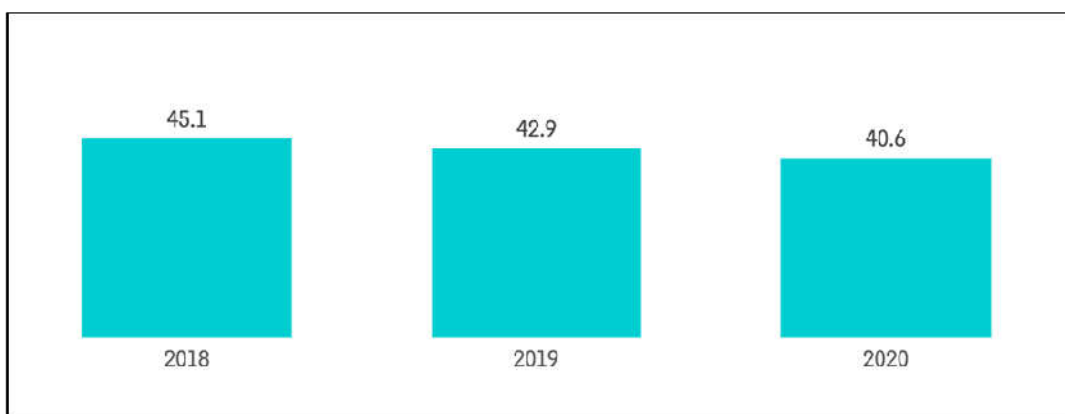


Figure I.1 : Marché des biofertilisants à base des mycorhizes : utilisation agricole des fertilisant à base de Phosphore, en millions de tonnes métriques, Globale, 2018-2020 [19].

2.3.2 Asie-Pacifique

L'Asie-Pacifique est le plus grand marché pour les biofertilisants à base de mycorhizes. En 2018, le ministère chinois de l'Agriculture a publié un plan pilote de remplacement des engrais dans environ 100 districts de Chine, qui visait à réduire l'utilisation d'engrais chimiques d'au moins 20 %. Ainsi, à son tour, encourageant

l'utilisation de biofertilisants à base de mycorhizes dans le pays. Étant donné que les niveaux de phosphate extraits dans les sols chinois ont été épuisés,

Les engrais à base de mycorhizes peuvent constituer d'excellentes alternatives aux homologues chimiques pour raviver naturellement les niveaux de phosphate dans les sols.

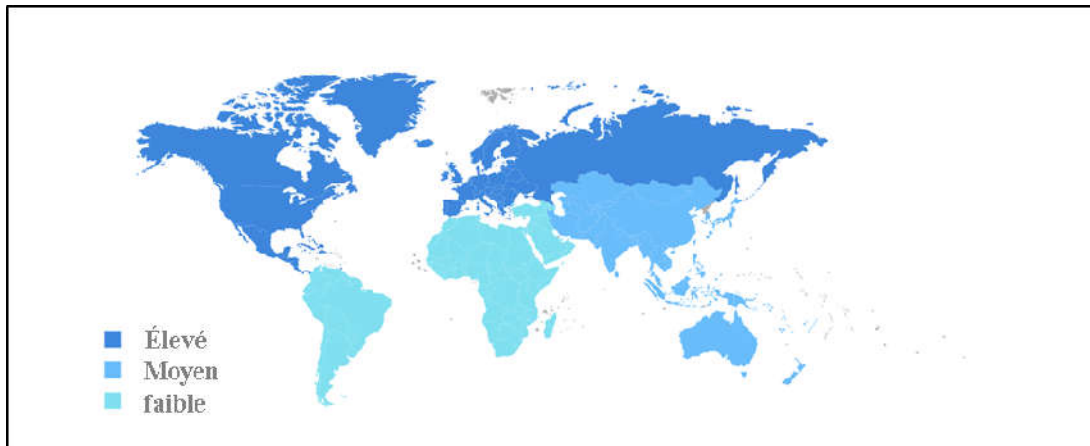


Figure I.2 : Marché des biofertilisants à base des mycorhizes : taille du marché par région en 2021 [19].

2.4. Paysage concurrentiel

Le marché des biofertilisants à base de mycorhizes est un marché fragmenté avec de nombreux acteurs régionaux occupant des parts pour être compétitifs sur le marché. Agrilife, Agrinos, Symborg, Sustane Natural Fertilizers Inc et Valent Biosciences LLC sont quelques-uns des principaux acteurs du marché. Ces acteurs adoptent diverses stratégies, telles que des lancements de produits, des partenariats et des acquisitions, pour gagner une plus grande part de marché.

L'investissement en la recherche, le développement et l'introduction de nouveaux produits est une stratégie principale adoptée par toutes les grandes entreprises impliquées dans le marché étudié. Outre les lancements de produits, les entreprises concluent des partenariats et des accords, afin d'augmenter leur clientèle et de développer leurs capacités de recherche et de développement.

3. Mycorhizes

3.1. Définition et concept

Les mycorhizes sont des « unions durables » résultant de l'association entre les racines des végétaux et certains champignons du sol. Chaque union est basée sur des échanges réciproques, Ils établissent des relations intimes et stables qualifiées de symbiose mutualiste connue sous le nom de mycorhizes. Cette association est la plus importante dans les différents écosystèmes de notre planète en termes d'individus concernés et en termes d'impact sur les écosystèmes [20].

Le champignon profite des ressources carbonées synthétisées par la plante via la photosynthèse et qui sont indispensables à son métabolisme, à son cycle de développement 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 (phosphatase, phytase) susceptibles de mobiliser du phosphore à partir de composés complexes du sol [21].

Les mycorhizes sont distribuées dans tous les climats et les écosystèmes, indépendamment du type de sol [22], de la végétation et des conditions environnementales, elles jouent un rôle actif dans l'amélioration de la diversité et la productivité des plantes, dans la diversité de la microflore, de la microfaune et de la qualité du sol [23].

Quelques familles de plantes vasculaires sont qualifiées de non mycotrophes, elles n'établissent pas de symbiose mycorhizienne, il s'agit des Crucifères, des Chénopodiacées, des Amaranthacées des Cypéracées, des Urticacées, des Juncacées et quelques espèces de Caryophyllacées [24].

3.2. Types des mycorhizes

On distingue trois groupes principaux d'associations mycorhiziennes [25] ; Les ectomycorhizes et les endomycorhizes (fig. I.3).

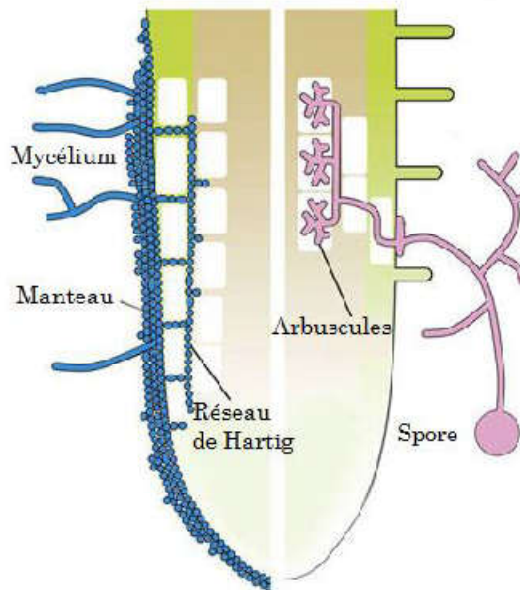


Figure I.3 : Schéma montrant les différences entre les ecto- et les endomycorhizes [26].

3.2.1. 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). Vers l'extérieur, des hyphes prolifèrent à partir du manteau fongique et colonisent le milieu environnant en formant le « réseau extra-matriciel ».

La symbiose ectomycorhizienne concerne 3 à 5 % des plantes vasculaires et se rencontre principalement chez les dicotylédones [27].

3.2.2. Ecto-endomycorhize

Les ectendomycorhizes sont des formes intermédiaires qui possèdent à la fois les caractéristiques des ectomycorhizes, c'est-à-dire, un réseau de Hartig bien développé et un manteau fongique plus ou moins épais, ou absent dans quelques cas, et les caractéristiques des endomycorhizes soit, la pénétration à l'intérieur des cellules corticales par les hyphes [30].

3.2.3. Endomycorhizes

A l'inverse des ectomycorhizes, les hyphes des endomycorhizes pénètrent à l'intérieur des cellules où leur prolifération conduit à la formation d'arbuscules ou de pelotons.

Ainsi, il existe plusieurs types d'endomycorhizes dont les plus connus sont les mycorhizes arbusculaires (MA) [28]. La caractéristique de ce type de mycorhizes est le développement d'hyphes intercellulaires et d'arbuscules dans les cellules corticales profondes. Certaines espèces développent également les vésicules à l'intérieur et entre les cellules de la racine [29].

4. Mycorhizes arbusculaires (MA)

4.1. Généralités

Les mycorhizes arbusculaires sont des associations symbiotiques mutualistes entre les racines de la plupart des plantes vasculaires (90%), et un petit groupe de champignons de la nouvelle classe des *Gloméromycota* appelé champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) [31]. Ils sont de loin les plus répandues à la surface du globe ou ils se sont adaptés à de nombreux écosystèmes naturels de plusieurs plantes hôtes.

La colonisation racinaire par les CMA ne produit pas de modifications morphologiques de la racine appréciables à l'œil nu. Le champignon colonise seulement l'épiderme et le parenchyme cortical des racines, sans pour autant atteindre le cylindre central ni les zones méristématiques [32].

4.2. Champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA)

Les CMA sont des biotrophes obligatoires : un partenaire végétal est nécessaire pour leur nutrition et pour accomplir leur cycle de développement. Le mycélium pénètre dans les cellules corticales de la racine de l'hôte et forme des arbuscules, des vésicules et des pelotons dans la cellule végétale. Les échanges nutritifs entre les deux partenaires, sont réalisés au niveau des arbuscules.

Le champignon prospecte le sol via son mycélium et capture des éléments minéraux nécessaires à la plante ; en échange de ces éléments minéraux transmis à la plante, la plante va transmettre du sucre au champignon et des lipides pour qu'il puisse se développer et accomplir son cycle de vie (symbiose obligatoire) [33]. Le champignon sporule dans le sol ou dans les racines et confère à la plante une résistance aux stress biotiques et abiotiques [34].

Les CMA, longtemps considérés comme des Zygomycètes, sont aujourd'hui regroupés dans une classe à part, les Gloméromycètes composée de quatre ordres : les *Glomérales*, les *Paraglomérales*, les *Archéosporales* et les *Diversisporales* [31]. On observe parmi les Gloméromycètes une grande diversité morphologique, notamment au niveau des spores qui sont de taille, couleur et forme très variables selon les espèces [35].

Gerdemann et Trappe ont pu résumer la diversité des champignons endomycorhiziens en évoquant une première classification basée essentiellement sur la similarité des phénotypes de leurs spores. Cinq genres ont été définis : *Endogone*, *Glomus*, *Sclerosystis*, *Acaulospora* et *Gigaspora* [36].

Ensuite, les mêmes auteurs ont révisé la famille des Endogonacées, et 44 espèces au sein de 7 genres ont été caractérisées. Parmi elles, beaucoup de taxons ont été redéfinis, 2 genres (*Acaulospora* et *Gigaspora*) et 12 nouvelles espèces ont été décrits. Un grand nombre d'espèces (80%) de plantes terrestres sont capables d'interagir avec les champignons MA (les Bryophytes, les Lycopodes, les Monilophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes) [37].

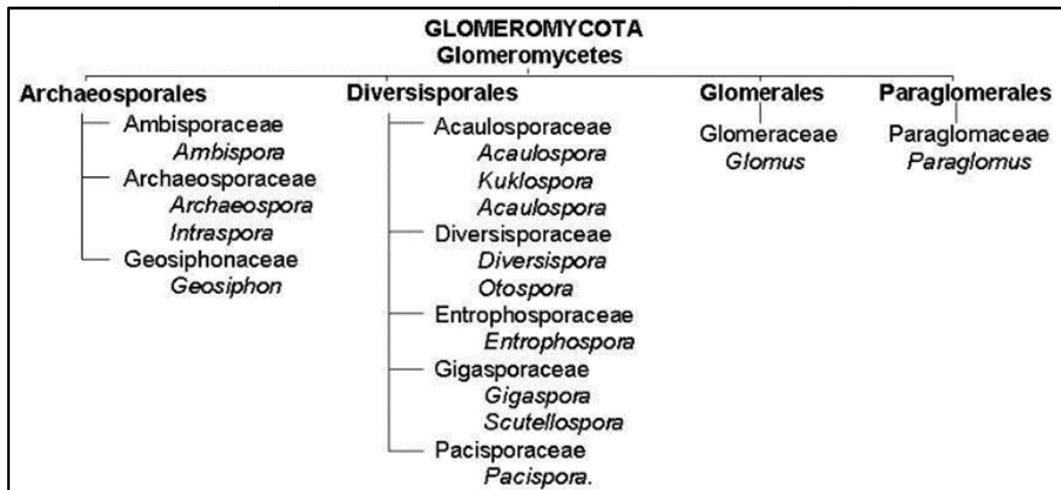


Figure I.4 : Classification des CMA [38].

4.3. Structures des mycorhizes arbusculaires MA

Les CMA sont formés d’hyphes coenocytiques qui ne possèdent pas de septa. Ils développent des structures extra-racinaires et des structures intra-racinaires. Les principales structures des MA sont : les hyphes, les *appressoria*, les arbuscules, les vésicules et les spores (fig. I.3).

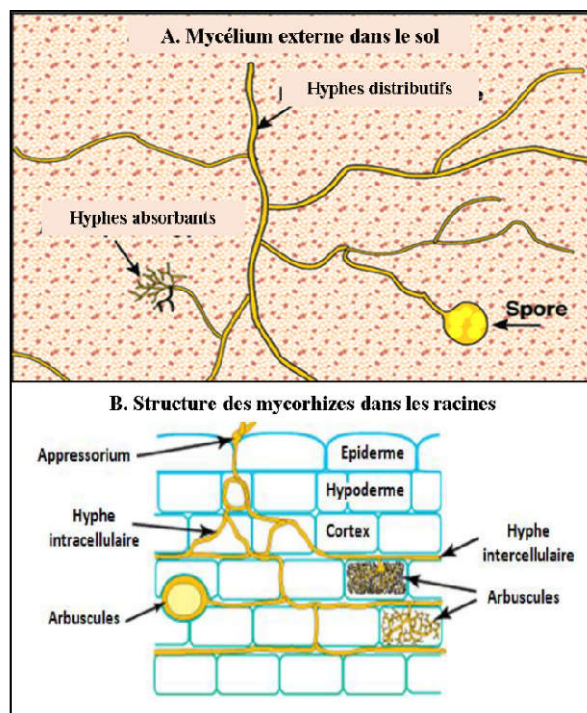


Figure I.5 : Composition de l’association mycorhizienne arbusculaire [39].

4.3.1. Structures extra-racinaires

4 types de structures extra-racinaires sont formées par les CMA :

- **Les hyphes fins ramifiées absorbantes** (Branched absorbing structure)

Considérés comme des sites majeurs de l'absorption de nutriments issus du sol [40].

- **Les hyphes de prospection** (runner hyphae)

Se propagent dans le sol peuvent atteindre des dizaines de mètres de longueur par gramme de sol [41].

L'exploration du sol par ce réseau mycélien permet au champignon d'entrer en contact avec d'autres plantes hôtes et de garantir sa survie. Ce réseau mycélien permet l'absorption des éléments nutritifs du sol nécessaire à la plante et au champignon, il peut être défini comme une extension du système racinaire [42].

- **Les spores**

Elles sont produites dans les hyphes extra-racinaires des CMA par reproduction asexuée, seul le genre *Rhizophagus* forme des spores à l'intérieure des racines. Ce sont des organes qui servent à identifier morphologiquement les espèces de CMA et permettent leurs disséminations dans l'environnement [43]. Elles sont de forme sphérique ou ovale, leur taille peut varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres en fonction des espèces. Elles peuvent rester en dormance durant de longues périodes et leur viabilité varie en fonction des conditions de l'environnement.

- **L'appressorium**

Une structure renflée formé par le CMA au contact de l'épiderme et qui lui permet de pénétrer dans le cortex racinaire par pression mécanique.

4.3.2. Structures intra-racinaires

Les CMA développent 3 types de structures intra-racinaires différentes :

- **Le mycélium intra-racinaire**

Il permet la colonisation de la racine par le champignon et la formation de différentes structures à l'intérieur des cellules corticales.

- **L'arbuscule**

L'hyphe intra-racinaire va se ramifier à plusieurs reprises dans la cellule du cortex racinaire interne pour former l'arbuscule, site d'échange nutritif entre la plante et le CMA [44]. Le temps de vie d'un arbuscule est estimé de 4 à 10 jours [45].

- **Les pelotons**

L'hyphe intra-racinaire s'enroule sur elle-même dans les cellules corticales périphériques pour former les pelotons [46]. Ces structures semblent être différenciées dans les cellules dégénérantes et ne sont probablement pas fonctionnelles.

- **Les vésicules**

Certains hyphes perforent la paroi cellulaire et pénètrent à l'intérieure de la cellule, se dilatent à leur extrémité pour former d'énormes ampoules inter ou intracellulaires appelées vésicules. Ce sont des structures de réserves, elles possèdent une paroi épaisse et contiennent principalement des lipides [47].

4.4. Cycle de développement des CMA

L'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules peut être initiée par le contact entre une racine compatible avec plusieurs propagules germinatives (spores, fragments racinaires mycorhizés, hyphes présents dans le sol ou même des vésicules isolées) [48].

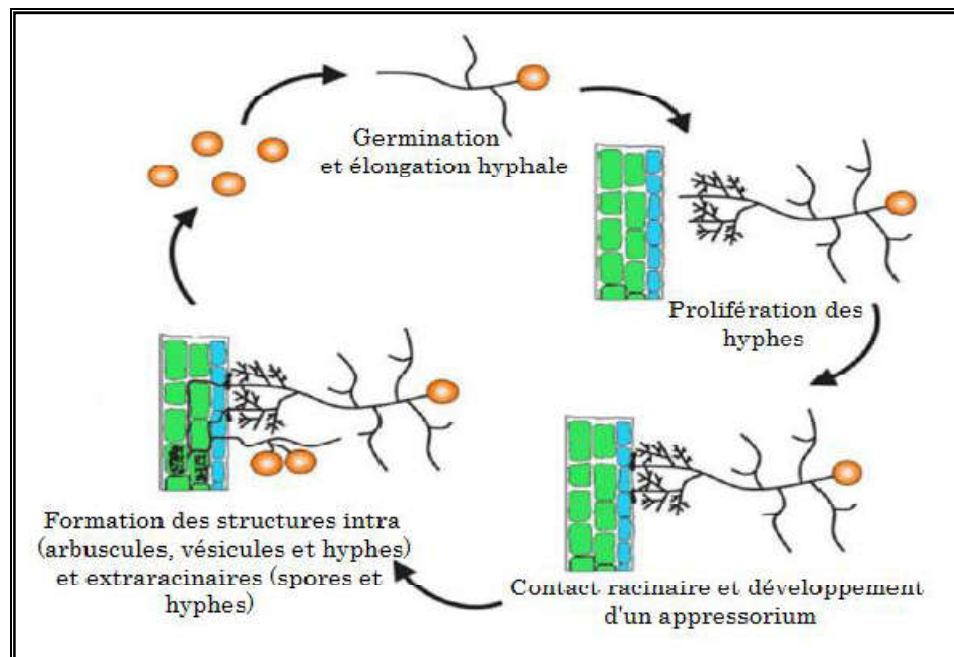


Figure I.6 : Cycle de développement des champignons MA [49].

- 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 change de morphologie par une ramification prononcée, stimulée par des exsudats racinaires tels que les strigolactones. En réponse à cette stimulation par la plante, les CMA vont également relâcher des facteurs « Myc » dans le sol qui vont entraîner l'activation de la voie de signalisation de la symbiose chez la plante [50] et provoquer une augmentation de la formation de racines latérales de la plante [51].
- Les hyphes issues des spores germées arrivent à proximité d'une racine et Au contact de l'hyphe avec la racine de la plante hôte, le champignon différencie un appressorium la formation de cet organe est considérée comme l'évènement le plus décisif dans la reconnaissance et la colonisation de la plante-hôte [52].
- L'appressorium différencie une hyphe d'infection qui s'insinue entre les cellules épidermiques et corticales de la racine par pression mécanique sans toutefois pénétrer la membrane plasmique et forme différentes structures tel que les pelotons et l'organe d'échange (nutritif) l'arbuscule. Certains CMA forment aussi des structures de réserves intra-racinaires, les vésicules.

- Après différenciation des structures intra-racinaires, le champignon produit des spores à partir de son mycélium extra-racinaire [49]. Le cycle de vie dure en général entre 4 et 8 mois [53].
- Après leur maturation, ces spores seront à l'origine du mycélium de départ.

4.5. Rôles des CMA

Les effets bénéfiques des CMA contribuent à de nombreux services écosystémiques cruciaux pour la durabilité des agroécosystèmes. Pour ces raisons, les CMA sont des acteurs de choix dans la formulation de biofertilisants pour le développement d'une agriculture durable.

4.5.1. Rôle écosystémique et écologique

Les hyphes des CMA contribuent à la structure du sol. En effet, Les champignons mycorhiziens sont une composante majeure de matière organique du sol et ferait un grand apport pour le stockage du carbone dans le sol. Ces hyphes représentent aussi des canalisations pouvant transporter le carbone à partir des racines de plantes à d'autres organismes du sol impliquées dans les processus du cycle des éléments nutritifs et peuvent parfois être nécessaires pour remettre en état les habitats ou la conservation des espèces rares [54] et même jouer le rôle de bioindicateurs [55].

4.5.2. Rôle nutritionnel

Le rôle majeur des CMA est l'amélioration des nutriments hydrique et minérale de la plante grâce à des transferts de l'eau et des éléments minéraux, en particulier le phosphore et l'azote, du CMA vers la plante hôte. Il en résulte une amélioration de la croissance des plantes mycorhizes.

En effet, l'élongation des hyphes extra-racinaires augmente la surface de contact entre les minéraux du sol et la racine. De plus, ils peuvent explorer des zones non accessibles pour les plantes non mycorhizées pour y prélever l'eau et les nutriments et les transférer à la plante hôte [56].

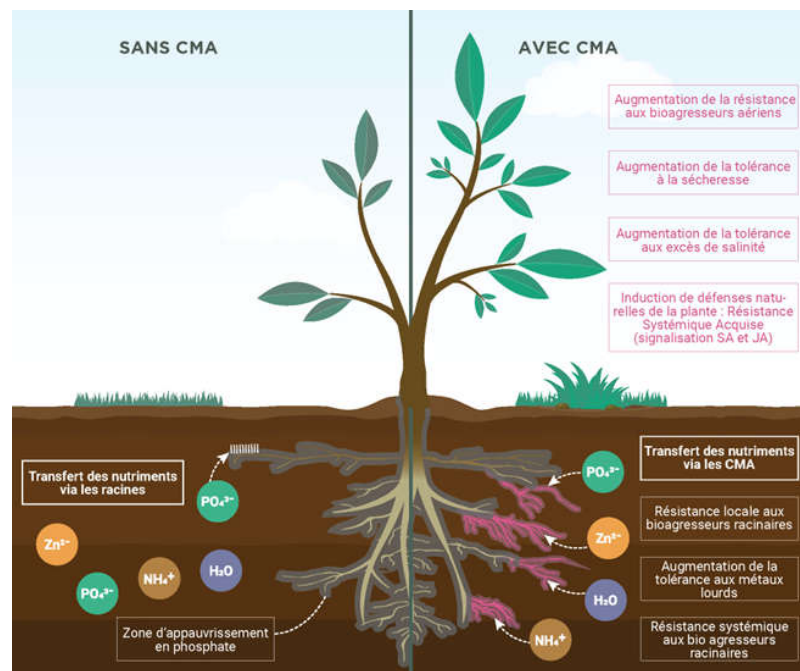


Figure I.7 : Effets positifs de la colonisation mycorhizienne arbusculaire [57].

- **Transfert du phosphore**

La plupart des sols contiennent de grandes quantités de phosphore organique ou inorganique estimées entre 200 et 3000 mg/kg de sol [57]. En effet, selon le pH du sol, cet élément se retrouve en grande partie associé au fer, à l'aluminium ou au calcium sous des formes de phosphates difficilement disponibles pour les plantes [58].

Dans des sols de pH neutre, les champignons mycorhiziens peuvent acidifier le sol grâce aux acides organiques, favorisant ainsi la solubilisation du phosphore. Dans un sol acide, les champignons mycorhiziens peuvent excréter des agents chélateurs qui libèrent le phosphore des molécules de fer et d'aluminium du sol.

Aussi, certaines études affirment que les champignons mycorhiziens peuvent produire des phosphatases, des enzymes permettant de mobiliser le nutriment à partir de sources biologiques [59].

- **Transfert de l'azote**

Le mycélium du CMA est capable de prélever l'azote sous forme d'ions ammonium (NH_4^+), sous forme de nitrates (NO_3^-) et sous forme d'acides aminés [60,61]. Il peut aussi accélérer la dégradation de la matière organique pour accroître la biodisponibilité des végétaux.

4.5.3. Biostabilisation du sol

Une nette amélioration de la structure du sol a souvent été notée en présence des mycorhizes. Le vaste réseau d'hyphes extra-matriciels et la libération dans le sol par les hyphes mycorhiziens d'une glycoprotéine, la glomaline, entraîneraient une meilleure stabilisation du sol par la formation d'agrégats beaucoup plus stables [62].

4.5.4. Bioremédiation

Les associations de plantes avec des CMA sont proposées comme une solution biologique potentielle pour améliorer la résistance des plantes à la toxicité des métaux et restaurer la fertilité des sols pollués par les métaux lourds [63]. Les CMA limitent l'entrée des métaux lourds dans les racines en les complexant dans le sol grâce notamment à une protéine spécifique, la glomaline [64].

Beaucoup d'études ont montré que la glomaline, produite par les CMA dans le sol, a la capacité de capturer la plupart des métaux lourds (Cu, Cd, Fe, Pb, Zn, et C et de réduire leur biodisponibilité [65]. Les parois du mycélium et des spores ont également une importance dans la rétention des métaux lourds présents dans le sol [66].

4.5.5. Protection contre les agents pathogènes

Les CMA sont une composante majeure de la rhizosphère des plantes et peuvent influencer sur l'incidence et la gravité des maladies des racines [67]. Ils influencent la qualité et l'abondance de la microflore au voisinage des racines et modifient l'activité microbienne de la rhizosphère globale. Ils provoquent des changements dans la structure de l'exsudation racinaire de l'hôte suite à la colonisation de l'hôte qui modifie l'équilibre microbien dans la rhizosphère. La colonisation par les CMA induit une résistance ou une tolérance des plantes face à divers agents pathogènes [68].

4.5.6. Résistance aux stress environnementaux

Les CMA ont une grande importance dans la résistance des plants contre les différents stress biotiques et abiotiques. Sous le stress de la sécheresse, les CMA stimulent la croissance des plantes et augmentent leur survie [69]. Ils améliorent leur croissance et leur rendement sous stress salin et semblent leur apporter nombreux avantages lorsqu'elles sont soumises au stress osmotique. Ainsi ils peuvent aider les plantes à survivre dans les sols affectés par les précipitations acides [70].

5. Impact de l'agriculture moderne sur les mycorhizes :

5.1. La fertilisation

Pour augmenter la croissance et le rendement des cultures, les agriculteurs pratiquant une agriculture conventionnelle ont souvent recours aux engrais minéraux phosphatés. Lorsque la concentration de phosphore biodisponible est supérieure au besoin de la plante, la dépendance de celles-ci aux mycorhizes sur le plan nutritionnel est considérablement réduite.

Ainsi, dans les sols fortement concentrés en phosphore, il est montré que la colonisation des racines des plantes est réduite, voire inhibée [71]. Les engrais de ferme comme le fumier et le compost qui libèrent plus lentement les éléments nutritifs ne semblent pas avoir les mêmes impacts négatifs sur les mycorhizes.

Au contraire, lorsque ces engrais ne sont pas sur utilisés, ils permettent de stimuler la communauté des CMA [72].

Enfin, la dépendance mycorhizienne des plantes et le potentiel mycorhizogène des sols sont inversement corrélés avec la concentration de fertilisant minéral appliqué dans les champs.

5.2. Travail du sol

Le labour affecte toutefois radicalement le potentiel mychorizogène du sol en détruisant le réseau mycélien des champignons et en enfouissant en profondeur les propagules. Ces perturbations physiques réduisent l'abondance des CMA de la couche supérieure du sol, là où se trouvent majoritairement les racines des plantes hôtes [73].

Les labours ont aussi pour effet de changer la communauté de CMA présente dans les zones perturbées en sélectionnant les espèces qui développent très rapidement leur réseau mycélien ou qui sporulent rapidement.

5.3. Pesticides

L'intensification de l'agriculture s'est accompagnée de l'usage de nombreux pesticides. L'impact de ces produits sur les mycorhizes est souvent complexe et difficile à mesurer [74]. Leurs effets dépendent du type de produit, de la dose et de leur temps d'action.

Plusieurs pesticides, en particulier les fongicides, peuvent avoir un impact direct sur la colonisation et la sporulation des CMA et même aboutir à leur disparition. Les fongicides servants à enrober les semences sont probablement les plus dommageables pour les mycorhizes [75].

6. Méthodes de multiplication de l'inoculum

Les champignons mycorhiziens arbusculaires sont des symbiotes obligatoires strictes. Sans l'utilisation de plantes hôtes il serait impossible de mener à terme le cycle de vie du mycorhize jusqu'à la production de nouvelles propagules / spores [76].

A ce jour, les deux technologies de production les plus utilisées sont : la méthode conventionnelle et la méthode *in vitro*.

6.1. Méthode conventionnelle

Elle consiste à multiplier les champignons mycorhiziens sur les racines d'une plante-hôte entière, cultivée dans des containers en conditions contrôlées, en serre ou en chambre de culture [77]. La production d'inocula doit se faire sur des supports vivants, et non inertes [78].

6.1.1. Sélection de la plante hôte

Il est très important de choisir une plante mycorhizotrophe qui supporte la croissance des MA, appartenant à des familles des Graminées, Alliées et Légumineuses.

Les plantes qui présentent un système racinaire extensif sont des très bons hôtes pour la propagation des CMA. La sélection des espèces est en fonction de la disponibilité des semences et de leur adaptabilité aux conditions pédoclimatiques locales.

6.1.2. Prélèvement de l'inoculum initial

Le prélèvement de l'inoculum initial peut être effectué dans des zones non cultivées où les plantes locales sont saines (arbustes, légumineuses, graminées...). Le sol sera prélevé à 10-25 cm de profondeur, il contiendra des racines fines. Une autre option consiste à prélever des racines de plants sains directement sur la parcelle enfin de culture sous réserve d'avoir vérifié la présence des structures mycorhiziennes.

6.2. Méthode de culture *in vitro* et mode d'emploi

Cette méthode consiste à multiplier le champignon mycorhizien sur des racines cultivées sur milieu synthétique en conditions stériles. La multiplication *in vitro* est souvent à moindre coût, et nécessite des systèmes plus réduits, ainsi que des milieux de culture artificiels pour des temps de production plus courts.

D'autres modes d'inoculation peuvent être pratiqués, comme le pralinage des racines et l'injection au pied des arbres [77]. De nouvelles technologies sont aussi en développement, comme l'enrobage de graines avec des spores de champignons MA, ou leur distribution via les circuits d'arrosage. Leur réussite devrait fortement favoriser l'essor de l'utilisation des champignons MA en production végétal [77].

Cette technique présente également plusieurs inconvénients. En effet seulement 18 espèces ont pu être cultivées en culture *in vitro* depuis 40 ans. Les espèces adaptées à ce type de culture sont principalement des espèces du genre *Rhizophagus*. Certaines espèces sporulent peu ou pas et perdent leurs caractéristiques physiologiques après plusieurs repiquages. Cette technique demande beaucoup de qualification et de précaution pour éviter les contaminations.

7. Conclusion

En conclusion, L'interaction complexe entre les plantes et les mycorhizes arbusculaires va au-delà de la simple acquisition de nutriments, elle influence également la santé des sols, la biodiversité microbienne, et a des implications pour la séquestration du carbone.

Comprendre ces relations symbiotiques offre des perspectives intéressantes pour le développement de pratiques agricoles durables, réduisant ainsi la dépendance aux engrais chimiques et favorisant la résilience des cultures. Cependant, il reste des défis à surmonter, notamment en ce qui concerne la manipulation et l'optimisation de ces associations pour des bénéfices agronomiques. La recherche continue dans ce domaine est cruciale pour maximiser les avantages des mycorhizes arbusculaires dans le contexte de la sécurité alimentaire mondiale et de la durabilité environnementale. En fin de compte, l'étude approfondie de cette symbiose complexe ouvre la voie à des pratiques agricoles plus équilibrées, respectueuses de l'environnement et résilientes.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

1. Essais de multiplication des CMA

1.1. Premier essai

Etant donné que les CMA sont des biotrophes obligatoires, leur association avec une plante mycorrhizotrophe est nécessaire pour leur nutrition et pour accomplir leur cycle de développement. Pour sélectionner le meilleur partenaire végétal, une expérimentation de plusieurs espèces de plantes-hôtes est fondamentale.

Dans cette même optique, deux espèces de plantes-hôtes, le sorgho (*Sorghum sp.*) appartenant à la famille des Poacées et le persil (*Petroselinum crispum*) à la famille des Apiécées sont testées pour multiplier les CMA contenus dans deux biofertilisants à base de CMA que nous avons nommés inoculum 1 (I₁) et inoculum 2 (I₂) :

- **L'inoculum 1** correspond à un biofertilisant à base de plusieurs espèces de CMA (inoculum brute) isolées à partir de sol rhizosphérique de plantes prélevées au parc nationale de Chréa. Le produit contient des propagules d'espèces endémiques de champignons mycorhiziennes à arbuscules (CMA), bénéfique à la croissance et à la santé des plantes, dans un mélange de substrat (sable et compost).
- **L'inoculum 2** correspond au biofertilisant à base de trois espèces de CMA (*Glomus sp.*, *Gigaspora sp.*, *Acaulospora*) produit à l'Université Blida I dans le cadre du projet de coopération Algéro-Canadienne numéro 108945 « Contribution à la sécurité alimentaire par le développement d'agents mycorhiziens endémiques en Algérie » (fig. II.1). Le produit contient des propagules d'espèces endémiques de (CMA) dans un mélange de substrat inertes (organique et minérale) et de bio-additifs favorisant le développement de la symbiose entre la plante et les CMA.



Figure II.1 : a) inoculum 1, b) inoculum 2.

1.1.1. Préparation du substrat de culture et inoculation

Le substrat de culture utilisé est un mélange de perlite, de tourbe et de compost de commerce désinfecté à la vapeur et dont les caractéristiques sont mentionnées dans le tableau II.1 Le mélange perlite-tourbe-compost, réalisé dans les proportions 4 :4 :2 (v/v/v),est distribué dans des sacs en plastique de 15 cm de diamètre.

Tableau II.1 :Caractéristiques du compost (TADFI Champost).

Propriétés physiques	Eléments fertilisants de la matière brute (%)
MO : 36%	N : 1
MS : 45%	P ₂ O ₅ : 1
pH : 7.5 et 8	K ₂ O ₅ : 1.15
Densité : 0.43	C/N : 18

Les deux inocula sont distribués dans les sacs de culture contenant le substrat à raison de 100g par sac. Cinq répétitions (cinq sacs) par espèce et par type d'inoculum ont été considérées. Afin de vérifier si les conditions de culture sont exemptes de contaminants mycorhiziens, un témoin sans inoculum (avec seulement du substrat) est réalisé dans les mêmes conditions pour chaque espèce. Au total, 22 sacs sont considérés (20 sacs inoculés et 2sacs témoins).

Les graines de sorgho et de persil sont désinfectées superficiellement à l'hypochlorite de sodium et semées en surface entre deux fines couches de substrat. Les sacs ont été couverts par du film alimentaire, ce dernier permet d'avoir un effet de serre afin de favoriser la germination. Les sacs inoculés sont gardés en culture sous serre chauffée et arrosés selon le besoin (fig. II.2).

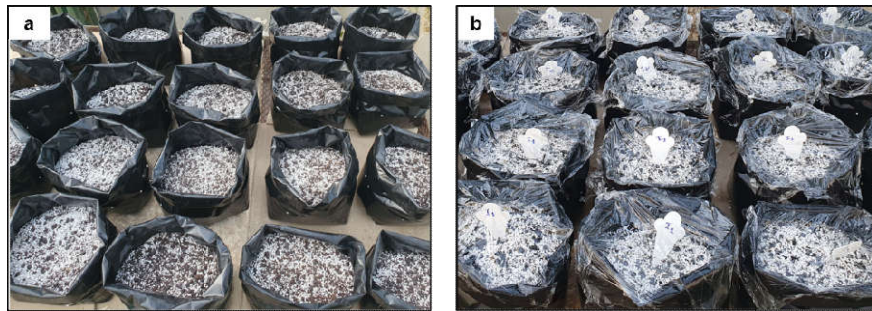


Figure II.2 : Distribution du substrat dans les sacs de culture (a) et inoculation (b).

1.1.2. Prélèvements

Deux prélèvements de plantules de persil et de sorgho ont été effectués à 4 et 8 semaines. Le prélèvement consiste à récupérer une plantule de chaque sac de culture avec son système racinaire le plus complet possible. Après élimination de la partie aérienne, les racines sont soigneusement lavées à l'eau de robinet pour éliminer les particules du sol et colorées selon la technique de Phillips et Hayman [79].

1.2. Deuxième essai

La deuxième expérience a été lancée le 17.04.2023 pour tester l'effet de trois proportions de compost (0,5 et 10%) sur l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules entre le sorgho (*Sorghum sp.*) utilisé comme plante hôte et les CMA des deux inocula (I_1 et I_2) de la première expérience.

1.2.1. Préparation du substrat de culture et inoculation

Le substrat est constitué d'un mélange de perlite et de tourbe (même volume) auquel sont ajoutés les différentes proportions de compost. Le mélange ainsi réalisé est distribué dans des sacs en plastique. Trois répétitions par proportion de compost et par inoculum ont été considérées (fig.II.3).

Les deux inocula sont distribués dans les sacs de culture contenant le substrat à raison d'environ 250g par sac. Les graines de sorgho sont ensuite semées entre deux couches du même substrat. Un témoin (sans inoculum) a été réalisé pour chaque proportion de compost, soit au total 21 sacs, 18 sacs inoculés et 3 sacs témoins.

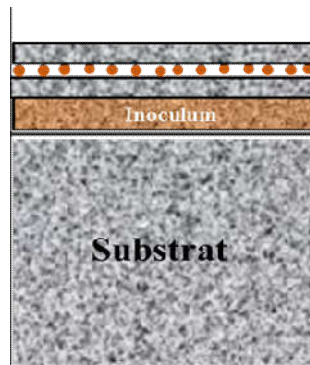


Figure II.3 : Schéma de la mise en place des cultures.

1.2.1. Prélèvements

Quatre prélèvements de plantules de sorgho ont été effectués à 3, 4, 6 et 8 semaines de culture. Pour chaque sac de culture, une plantule est prélevée, son système racinaire est récupéré en entier et soigneusement lavé à l'eau de robinet. Ainsi, les racines sont prêtes pour subir le protocole de coloration de Phillips et Hayman [79].

Pour chaque prélèvement et pour chaque proportion de compost, une estimation du taux de colonisation mycorhizienne arbusculaire a été réalisée en adaptant la méthode de Trouvelot et al [80].

2. Essai de production d'un inoculum brute

La technique de "piégeage" est utilisée pour produire un inoculum brut, elle consiste à multiplier les CMA d'un inoculum primaire par une plante-hôte (*Sorghum sp.*).

2.1. Prélèvement de l'inoculum primaire

Le sol rhizosphérique et les racines d'une plante considérée comme très mycotrophique, la lavande (*Lavandula stoechas L.*), ont été prélevés dans la forêt de Oued Djer (El' Affroun) (fig. III.4).



Figure II.4 : Photographie de l'espèce *lavandula stoechas*.

Trois individus de *Lavandula stoechas* ont été choisis au hasard. Après avoir débarrassé la couche de litière, le sol rhizosphérique et les racines de chaque individu ont été prélevés entre 0 et 30 cm de profondeur et stockés séparément dans des sachets.

En retour au laboratoire, pour chaque échantillon les racines fines (radicelles) ont été bien lavées à l'eau de robinet pour les débarrasser des particules de sol, découpées en fragment de 1 à 2cm de longueur et conservées séparément dans l'alcool 70°.

Les sols rhizosphériques des trois individus sont mélangés. Après séchage à température ambiante, le sol ainsi constitué est tamisé (2 mm). Une partie environ (600g) est conservée pour l'extraction des spores. Les racines retenues par le tamis sont découpées et mélangé avec le reste du sol pour constituer l'inoculum primaire à partir duquel une culture piège des CMA a été réalisée. Le sorgho (*Sorghum sp.*) est utilisé comme plante piège.

2.2. Mise en place de la culture piège

L'inoculum primaire (le sol) a été mélangé avec de la perlite désinfectée à la vapeur (120°C pendant 30min) et du compost « Champost » dans les proportions 4 :4 :1 (v/v/v). Un bac en plastique est garni de ce mélange pour la mise en place de la culture piège (fig.II.4).

Après désinfection superficielle à l'hypochlorite de sodium, Les graines de sorgho sont semées à la surface du substrat de culture et couverte d'une fine couche de même substrat et arrosé avec de l'eau distillée. Un film plastique est utilisé pour protéger contre le dessèchement.

Le bac est gardé en culture sous serre et arrosé selon le besoin et une fois par mois par une solution nutritive (annex2).

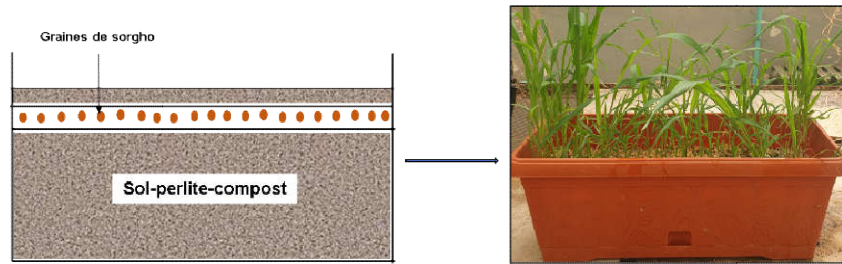


Figure II.5 : Mise en place de la culture piège.

3. Mise en évidence et estimation du taux de mycorhization

3.1. Mise en évidence

La colonisation des racines par des CMA est mise en évidence par l'adoption de la méthode de Philips et Hayman [79]. La technique consiste à éclaircir les racines, les colorer et les observer au microscope photonique.

3.1.1. Eclaircissement et coloration

L'éclaircissement des racines se fait dans des tubes à essai, il consiste à les blanchir dans une solution de potasse (KOH) à 10% à 90°C. la durée de cette étape est variable selon la structure des racines en effet, les racines fines à structures primaire prennent moins de temps que les racines épaisses et fibreuses. Dans notre cas 20 min était suffisante pour vider le contenu des cellules végétales des racines de persil et de sorgho lors du premier prélèvement.

Les fragments racinaires éclaircis sont lavés sous un jet d'eau de robinet pour les débarrasser du KOH. Ils sont ensuite trempés dans de l'acide lactique à 10% pendant quelques minutes afin de blanchir et de débarrasser le KOH résiduel.

Enfin, les racines sont colorées dans une solution de bleu de Trypan à 0.05% (Annexe2) au bain marie à 90°C pendant 15min. Elles sont ensuite bien rincées avec de l'eau et conservées dans un mélange de glycérol d'eau et d'acide lactique 10% (dans le même volume) qui permet aussi de diluer le colorant non fixé.

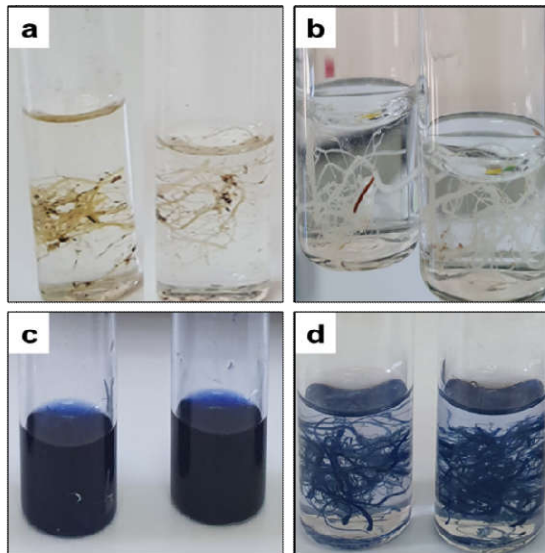


Figure II.6 : la méthode de la coloration des racines.

a : Eclaircissement des racines avec du KOH, **b :** Blanchissement des racines avec de l'acide lactique, **c :** Coloration des racines par la solution de bleu de trypan, **d :** Conservation des racines dans une solution de lactoglycérol.

3.1.2. Montage et observation

Pour chaque échantillon, 30 fragments racinaires d'une longueur d'environ 1 à 2cm sont montés entre lames et lamelles dans du glycérol pur a raison de 10 fragments par lame (fig. II.6). Après un léger écrasement des fragments avec la pomme de la main, les lames sont observées sur un microscope photonique à grossissement x10 et x40. Une coloration bleu foncé des structures fongiques dans les racines est observée dans le cas d'une colonisation par les CMA.

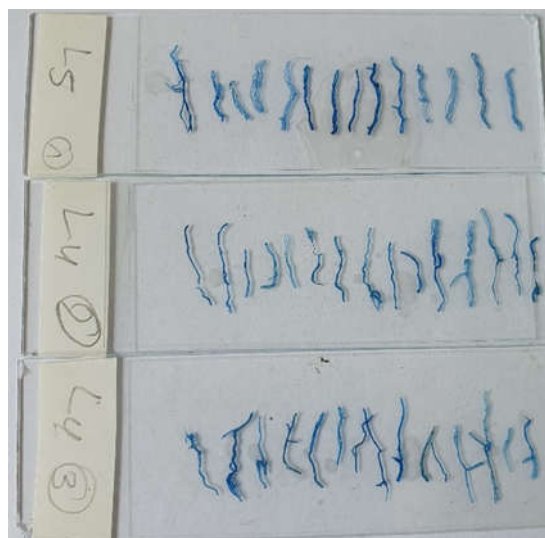


Figure II.7 : Montage des fragments racinaires entre lame et lamelle.

3.2. Estimation

L'estimation de la colonisation mycorhizienne arbusculaire été effectuée par l'adoption de la méthode de Trouvelot et al [80]. Cette méthode consiste à observer et noter selon un barème la colonisation de chaque fragment racinaire. Cette colonisation est attribuée au moyen de six classes comprises entre 0 et 5 et la richesse en arbuscules par quatre sous classes notées de A₁ à A₃.

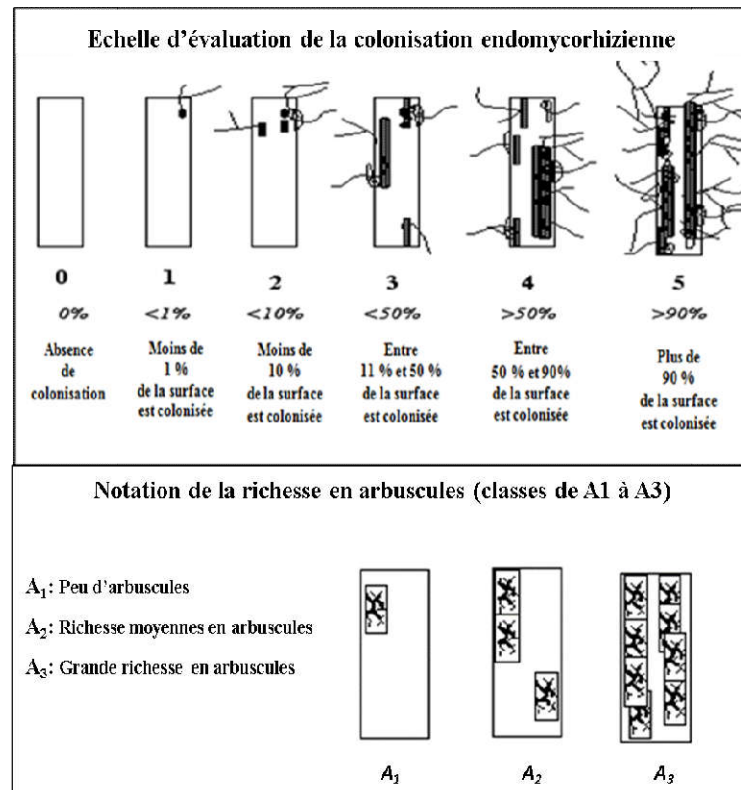


Figure II.8 : Notation du degré de mycorhization des fragments racinaires. L'échelle s'étend de 0 (pas de mycorhization) jusqu'à 5 (au moins 90% du fragment est mycorhizé) et la notion de la richesse en arbuscules (classe de A₁ à A₃) [80].

Avec cette méthode, trois paramètres de la colonisation mycorhizienne à arbuscules sont calculés : La fréquence de mycorhization (F%) ;L'intensité de mycorhization (M%) et la teneur en arbuscules (A%).

- **F%** :La fréquence de la colonisation mycorhizienne (% du nombre de fragments racinaires mycorhizés).Elle reflète l'importance des points de pénétration de la colonisation du système racinaire.Selon l'équation (1) suivante :

$$F (\%) = 100 (N-n_0) / N \quad (1)$$

Où :

N représente le nombre de fragments observés, (n_0) représente le nombre des fragments non mycorhizés.

- **M%** : L'intensité de la colonisation du cortex racinaire (proportion du cortex colonisé estimée par rapport au système racinaire entier et exprimée en %).

Elle reflète l'importance de la colonisation du système racinaire. Selon l'équation (2) suivante :

$$M (\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2) / N \quad (2)$$

(n_5) représente le nombre de fragments notés 5, (n_4) représente le nombre de fragments notés 4, (n_3) représente nombre de fragments notés 3, (n_1) représente le nombre de fragments notés 2.

- **A%** : La teneur en arbuscules de la colonisation ramené au système racinaire entier (proportion du système racinaire renfermant des arbuscules, exprimée en %). Selon l'équation (3) suivante :

$$A\% = a*(M/100) \quad (3)$$

(a) représente le nombre d'arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments de racines.

Les paramètres de mycorhization ont été calculés grâce à un programme sur internet appelé MYCOCALC.

4. Analyse statistique

Pour la deuxième expérience, les données des trois paramètres de la colonisation mycorhizienne F%, M% et A% sont exprimés sous forme de moyenne de 3 répétitions. Ces pourcentages moyens sont soumis à une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (proportion de compost et période de prélèvement) suivie du test de comparaisons multiples de Tukey. La signification est considérée au seuil de 5 %. L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel XLSTAT 2022.

5. Extraction des spores de CMA

Les spores ont été extraites selon la méthode de tamisage humide décrite par Gerdemann et Nicolson [81].

5.1. Tamisage du sol

Dans un bêcher de 1 L, 10 g de sol ont été immergés dans 0.5 L d'eau courante et agités pendant 1 min avec une spatule. Après décantation, le surnageant a été passé à travers quatre tamis superposés à mailles décroissantes (240 μm , 100 μm , 63 μm , et 45 μm). Le contenu retenu par les tamis de 100 μm , 63 μm et 45 μm a été récupérée (annexe 5).

5.2. Centrifugation

Le contenu récupéré des tamis a été réparti dans trois tubes et centrifugé pendant 5 min à 2000tr/min. Le surnageant a été jeté et un gradient de viscosité a ainsi été créé en ajoutant 20 ml d'une solution de saccharose à 50% dans chaque tube de centrifugation. Le mélange a été rapidement agité et le tube a été renvoyé à nouveau dans la centrifugeuse pendant 1 min à 2000 tr / min. le surnageant a été versé sur le tamis avec une maille de 45 μm , après un bon rinçage à l'eau de robinet pour éliminer le saccharose, les spores sont récupérées dans une boîte pétrie.

La récolte des spores est faite sous loupe binoculaire a à l'aide d'une pince fine (fig.II.9).

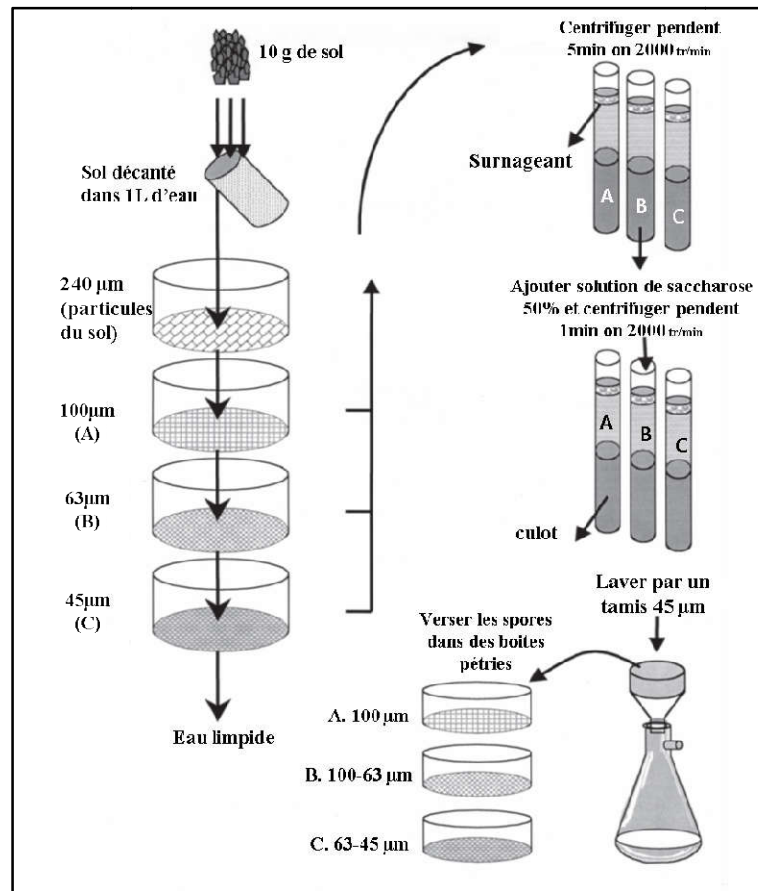


Figure II.9 : extraction des spores des CMA à partir d'un sol rhizosphérique par le tamisage humide [82].

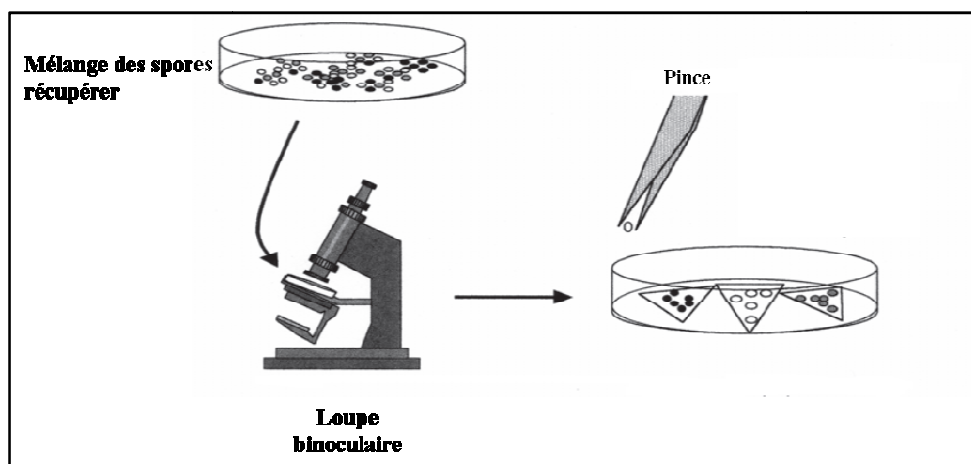


Figure II.10 : Séparation des spores des CMA extraites [82].

Chapitre III

Résultats et Discussion

1. Essais de multiplication des CMA

1.1. Premier essai

Dans cette expérience, le sorgho (*Sorghum sp.*) et le persil (*Petroselinum crispum*) sont testés pour multiplier les CMA contenus dans deux biofertilisants à base de CMA nommés inoculum 1 (I₁) et inoculum 2 (I₂) (fig. III.1).

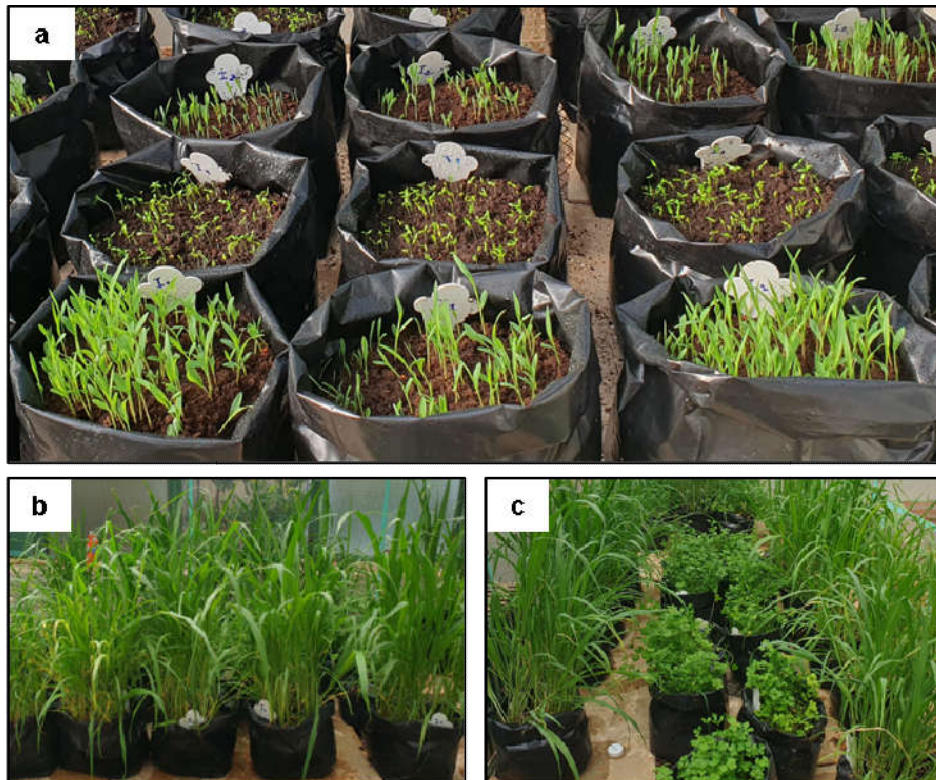


Figure III.1 : Développement des plantules de sorgho (*Sorghum sp.*) et de persil (*Petroselinum crispum*) inoculées par les CMA.

(**a** : 2 semaines de culture, **b** et **c** : 8 semaines de culture).

Les plantes de sorgho et de persil non inoculées ont été utilisées pour s'assurer que les conditions de culture étaient exemptes de contaminants mycorhiziens. Pour cela, deux prélèvements périodiques ont été effectués à 4 et 6 semaines de culture. L'observation des racines colorées a révélé l'absence totale de colonisation mycorhizienne.

Concernant les plantes inoculées, les prélèvements ont été effectués à 4, 6 et 8 semaines de culture.

A la quatrième semaine après inoculation, quel que soit l'inoculum et quel que soit la plante-hôte, les résultats montrent l'absence totale des structures des CMA dans les racines. Deux semaines après, (soit 6 semaines de culture), les racines des plantes inoculées par I₂ sont toujours indemnes de toute infection par les CMA. Par contre, celles inoculées par I₁ présentaient quelques points d'entrées des CMA avec formation de quelques arbuscules.

Au dernier prélèvement (8 semaines après inoculation), les CMA de l'inoculum 1, même s'ils ont développé quelques points d'entrées, l'intensité de colonisation du cortex est restée très faible.

Les chances de développement de mycorhizes 8 semaines après inoculation sont minimales, voire impossibles, raison pour laquelle nous avons décidé d'arrêter l'expérience.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de l'échec de la multiplication des CMA des deux inocula comme :

- La quantité d'inoculum utilisé (100 g) qui pourrait être insuffisante.
- Utilisation de 20% de compost dans le substrat pourrait être non favorable à l'établissement de la symbiose mycorhizienne (surtout la richesse en Phosphore).
- En fin, les propagules des CMA de l'inoculum 1 et surtout celle de l'inoculum 2 pourraient être non viables, donc incapable de générer des mycorhizes.

1.2. Deuxième essai

Après l'échec de la première tentative de multiplication des CMA sur deux espèces de plantes-hôtes. Une deuxième tentative a été lancée en testant, cette fois-ci, l'effet de trois proportions de compost sur l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. L'inoculation a été faite par les deux inocula (I_1 et I_2) utilisés dans la première expérience.

L'observation des racines de sorgho inoculé par I_1 a révélé la présence de structure caractéristique des CMA à partir de la troisième semaine après inoculation (fig. III.2 b). Par contre, quel que soit la période de prélèvement, aucune trace des CMA n'a été observée dans les racines des plantes inoculées par I_2 (fig. III.2 a).

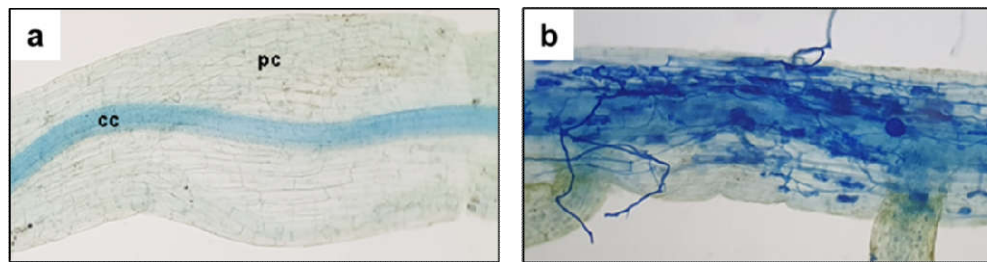


Figure. III.2 : Racine non mycorhizée (a) et racine mycorhizée (b).
(cc : Cylindre central, pc : Parenchyme cortical).

Ces résultats ajoutés au résultat de l'expérience 1 ont confirmés que les propagules des CMA de l'inoculum I_2 ne sont pas viables. Pour cette raison, nous avons décidé d'arrêter la culture des plantes inoculé par I_2 à 6 semaines, et de continuer l'évaluation de la mycorhization des plantes inoculées par I_1 .

1.2.1. Structures formées par les CMA de l'inoculum 1

L'observation microscopique des racines des plantes inoculées par I_1 montre, d'une manière générale, que même quand l'infection par les CMA existe, le développement de la symbiose mycorhizienne était localisé surtout autour des points d'entrée (fig. III.3 a et c). Cette faible colonisation du cortex racinaire était plus accentuée pour les substrats avec 5 et 10% de compost.

L'apparition des différentes structures caractéristiques des CMA en particulier, les arbuscules, les vésicules et les spores est fonction de la période de prélèvement.

- **Arbuscules**

Ces structures ont été observées à partir de la quatrième semaine après inoculation quel que soit la proportion de compost. Leur densité, même s'elle a augmentée au cours des différents prélèvements, reste très faible (ils sont éparpillés) surtout pour le substrat de 10 % de compost comparé à substrat sans compost (fig. III.3 a, b et c).

Au dernier prélèvement, la formation des arbuscules a été notée uniquement avec le substrat sans compost. Ce résultat indique que la symbiose mycorhizienne est restée active même après 8 semaines de culture (fig. III.3 d).

- **Vésicules**

À partir du troisième prélèvement, les arbuscules avaient commencé à se collapser et disparaître pour les proportions de 5 et 10 % (fig. III.3 f), ils étaient remplacés progressivement par les vésicules. L'apparition de ces dernières est un signe de sénescence de la symbiose mycorhizienne.

- **Spores**

Les spores, organes de reproduction et de dissémination des CMA, ont été observées uniquement pour les proportions de 5 et surtout 10% à partir de la sixième semaine après inoculation. Indiquent la fin d'établissement de la symbiose MA, qui représente la fin de cycle de développement des CMA (fig. III.3 g).

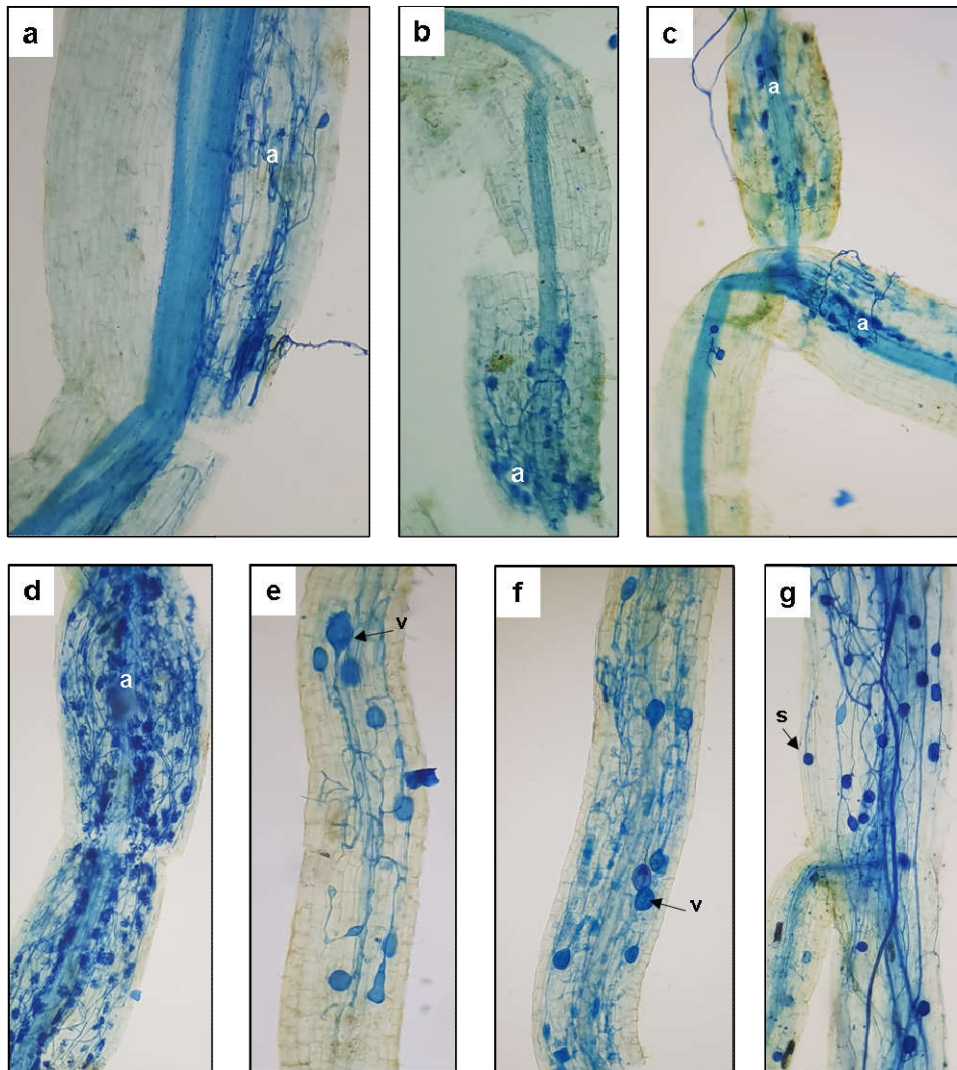


Figure III.3 : Différentes structures des CMA formées dans les racines de sorgho au cours des différents prélèvements.

a, b, c : Fragments racinaires montrant une faible colonisation

d : colonisation de type arbusculaire, **e, f, g** : Formation des vésicules et spores

(**a** : Arbuscule, **v** : Vésicules, **s** : Spore)

1.2.2. Estimation des paramètres de la colonisation mycorhizienne

Trois paramètres de la colonisation mycorhiziennes ont été estimés à sa voir, la fréquence de la mycorhization F%, l'intensité de mycorhization M% et la teneur arbusculaire A%. Les résultats sont appuyés par une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs, suivie du test de comparaisons multiples de Tukey.

1.2.2.1. Fréquence de la mycorhization F%

Ce paramètre représente le pourcentage du nombre de fragments racinaires mycorhizés, il reflète l'importance des points de pénétration de la colonisation du système racinaire. Les résultats du calcul de ce paramètre sont représentés dans la Figure III.4.

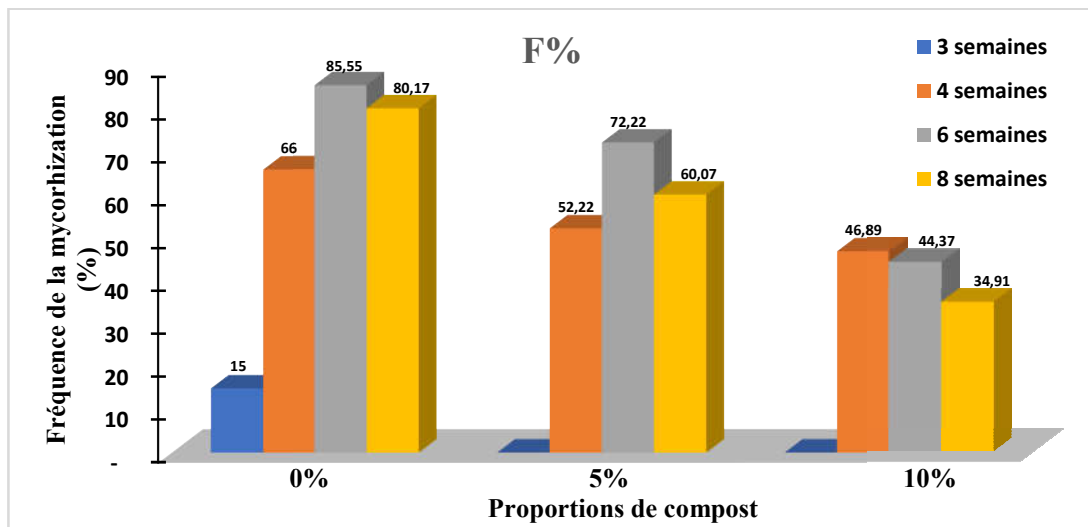


Figure III.4 : Histogramme montrant la variation de la fréquence de mycorhization (F%) en fonction la période de prélèvement et les proportions de compost dans le substrat (0, 5 et 10 %).

Les colonisations par les CMA ont été observées à 3 semaines après inoculation (premier prélèvement) avec le substrat sans compost (0 %), par contre ce n'est qu'au deuxième prélèvement, soit une semaine après, que la mycorhization a débuté dans les deux substrat enrichis.

Au deuxième prélèvement, F % a augmenté de manière spectaculaire pour atteindre 66 % pour le substrat sans compost, 52.22 % pour 5 % de compost et 46.89 % pour 10 % de compost. En effet, pour chaque proportion de compost, les différences observées entre les fréquences du premier prélèvement et celles du deuxième prélèvement sont très hautement significatives ($p < 0,0001$).

A la sixième semaine après inoculation (troisième prélèvement), F% a atteint des valeurs maximales statistiquement comparables ($p > 0.05$) qui étaient de 85.55 % pour le substrat sans compost et 72.22 % pour 5 % de compost. Par contre, avec 10 % de compost, la fréquence de mycorhization avait déjà atteint son maximum (46.89 %) au deuxième prélèvement.

Au dernier prélèvement, F% a diminuée pour les trois proportions de compost, cette diminution est statistiquement non significative ($p > 0.05$).

1.2.2.2. Intensité de mycorhization (M%)

Ce paramètre représente la proportion du cortex colonisé estimée par rapport au système racinaire entier (en %), il reflète l'importance de la colonisation du système racinaire. Les résultats relatifs au calcul de M % sont représentés dans la Figure III.5.

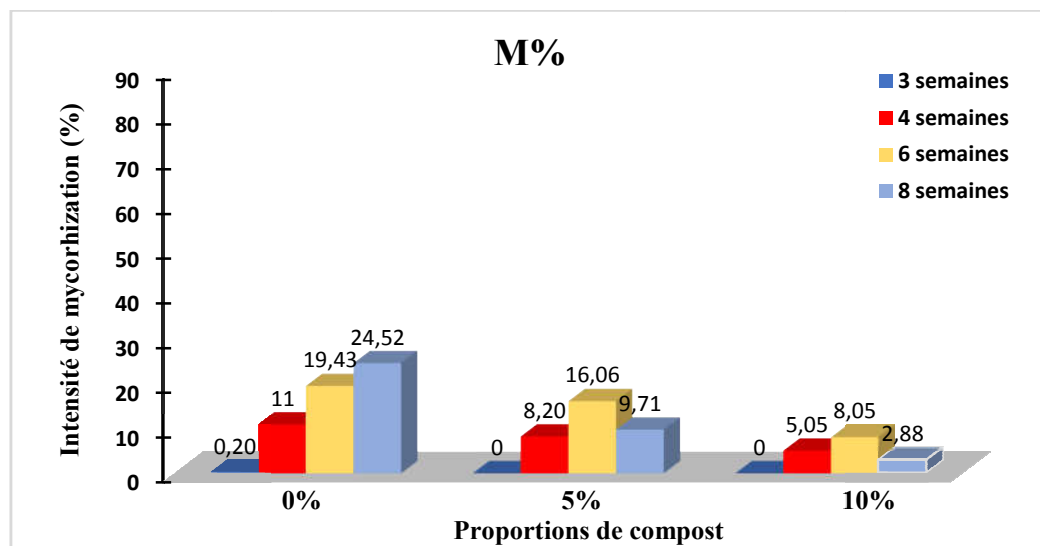


Figure III.5 : Histogramme montrant la variation de l'intensité de mycorhization (M %) en fonction la période de prélèvement et les proportions de compost dans le substrat (0, 5 et 10 %).

L'analyse des résultats (fig. III.5) montre, qu'au cours des différents prélèvements, M % a augmenté pour atteindre de 24.52 % pour le substrat sans compost, 16.06 % pour 5 % de compost et 8.05 % pour 10 % de compost. Ces valeurs de M% même maximales, restent très faible. Néanmoins, les différences observées entre le substrat sans compost et le substrat avec 10% de compost sont statistiquement significatives ($p = 0.002$).

1.2.2.3. Teneur arbusculaire (A%)

Ce paramètre représente l'abondance en arbuscules dans le système racinaire. Les résultats du calcul de A% sont représentés dans la figure III.6.

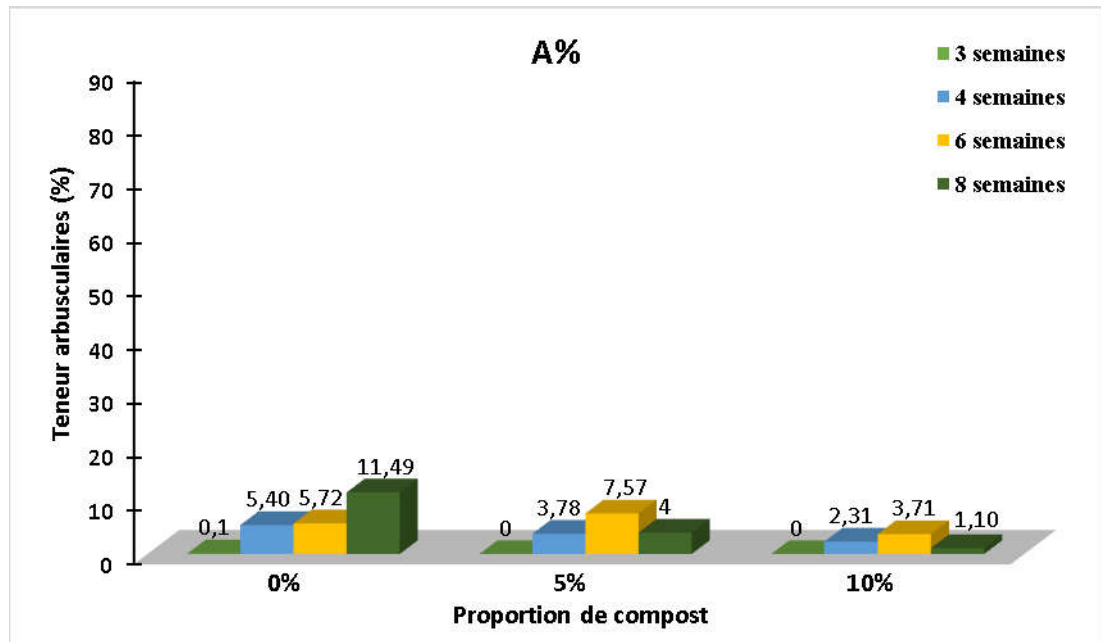


Figure III.6 : Histogramme montrant la variation de la teneur arbusculaire (A%) en fonction de la période de prélèvement et les proportions de compost dans le substrat (0, 5 et 10 %).

En générale, les résultats montrent de faibles teneurs arbusculaires quel que soit la proportion de compost. A% a augmenté au cours des différents prélèvements pour atteindre des valeurs de 11.19 % pour le substrat sans compost, 7.57 % pour 5 % de compost et 3.71 % pour 10 % de compost. Ces valeurs de A%, même si elles sont maximales, reste très faibles.

Des différences statistiquement significatives ($p = 0.002$) sont observées entre les trois proportions de compost. Le substrat sans compost s'est révélé le plus favorable à la formation des arbuscules suivi par le substrat de 5 % alors que c'est le substrat de 10 % le moins favorable.

1.3. Discussion

Dans le deuxième essai nous avons testé l'effet de trois proportions de compost sur la multiplication des CMA.

Les résultats obtenus montrent que même si nous avons observé de faibles intensités de colonisation mycorhizienne (M%) et de faibles teneurs arbusculaires (A%) avec et sans compost, l'utilisation de 5 % de compost et surtout de 10 % avaient réduit encore plus ces deux paramètres.

Avec le substrat sans compost, la symbiose mycorhizienne est restée active même après 8 semaines de culture. Par contre, l'utilisation du compost (5 et surtout 10 %) avait réduit cette activité à 6 semaines.

2. Essai de production d'un inoculum brute

Une culture piège des CMA d'un inoculum primaire a été établie en utilisant le sorgho (*Sorghum sp.*) comme plante hôte. L'inoculum primaire est constitué de sol rhizosphérique et de racines de *L. stoechas* mycorhizée naturellement.

2.1. Evaluation de l'état de mycorhization de *L. stoechas*

2.1.1. Mise en évidence de la mycorhization

L'observation microscopique des fragments racinaires de *L. stoechas* révèlent que l'espèce est naturellement mycorhizée. Toutes les structures caractéristiques des CMA (des hyphes cœnocytiqes, des arbuscules, des vésicules et des spores) ont été mis en évidence.

- **Hyphes cœnocytiqes**

Elles se forment à l'extérieure et à l'intérieure des racines. Les hyphes extraracinaires sont épaisses et fortement colorées au bleu Trypan. Par contre, les hyphes intraracinaires présentent un diamètre moins important, elles peuvent être intercellulaires ou intracellulaires (fig. III.7).

- *Appressorium*

Au niveau des points d'entrées des CMA, l'hyphe de pénétration se renfle au contact avec les cellules épidermiques pour former une structure d'adhésion et de pénétration appelée *appressorium*. La formation de cette structure est un signe de reconnaissance entre le champignon et les racines d'une plante.

- *Pelotons*

Après pénétration, les hyphes progressent dans le cortex racinaire puis s'enroulent en pelotons mycéliens à l'intérieur des cellules du parenchyme cortical externe (fig. III.7 a).

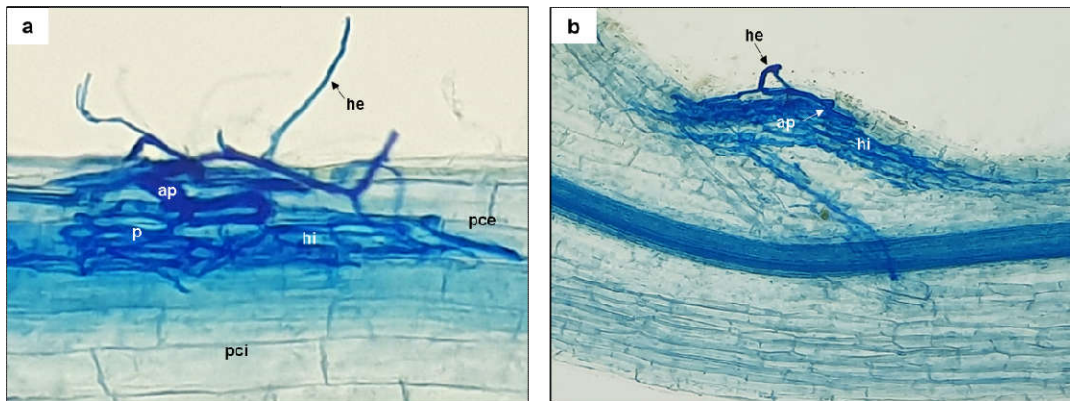


Figure III.7 : Les Points d'entrées des champignons mycorhiziens arbusculaires.

(**he** : Hyphe extra-radulaire, **ap** : *Appressorium*, **hi** : Hyphe intra-radulaire, **ap** : Peloton d'hyphe, **pce** : Parenchyme cortical externe, **pci** : Parenchyme cortical interne).

- *Arbuscules*

Les hyphes intercellulaires pénètrent les cellules du parenchyme cortical interne et se ramifient pour former des structures rappelant de petits arbres, les arbuscules (fig. III.8). Ces structures étaient très abondantes dans la plupart des fragments racinaires observés. Cette abondance des arbuscules est un signe d'une colonisation en phase active.

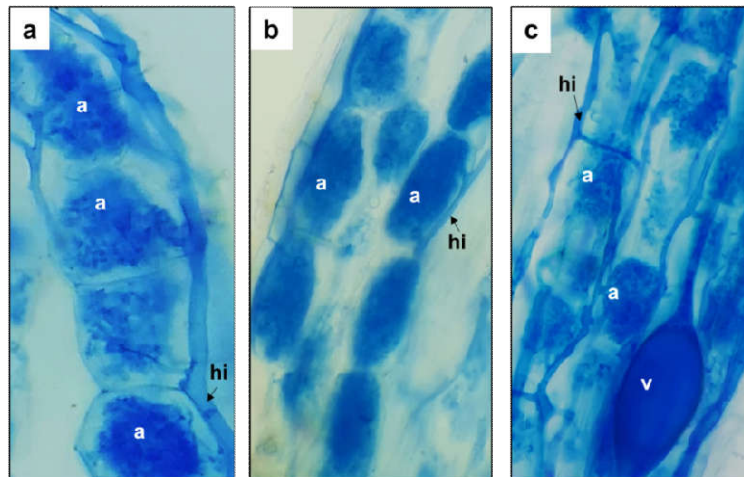


Figure III.8 : Les arbuscules.

(hi : Hyphes inter-cellulaire, v : Vésicules, a : Arbuscules)

• **Vésicules**

Sur certains fragments racinaires, d'énormes ampoules, formées par des dilatations des extrémités de certains hyphes intra-racinaires, ont été observées, ce sont les vésicules (fig. III.9). Elles sont surtout intercellulaires, mais peuvent aussi se former à l'intérieur des cellules. La forme et la taille de ces structures est variable. Leur présence est un signe d'une colonisation ancienne (sénescence).

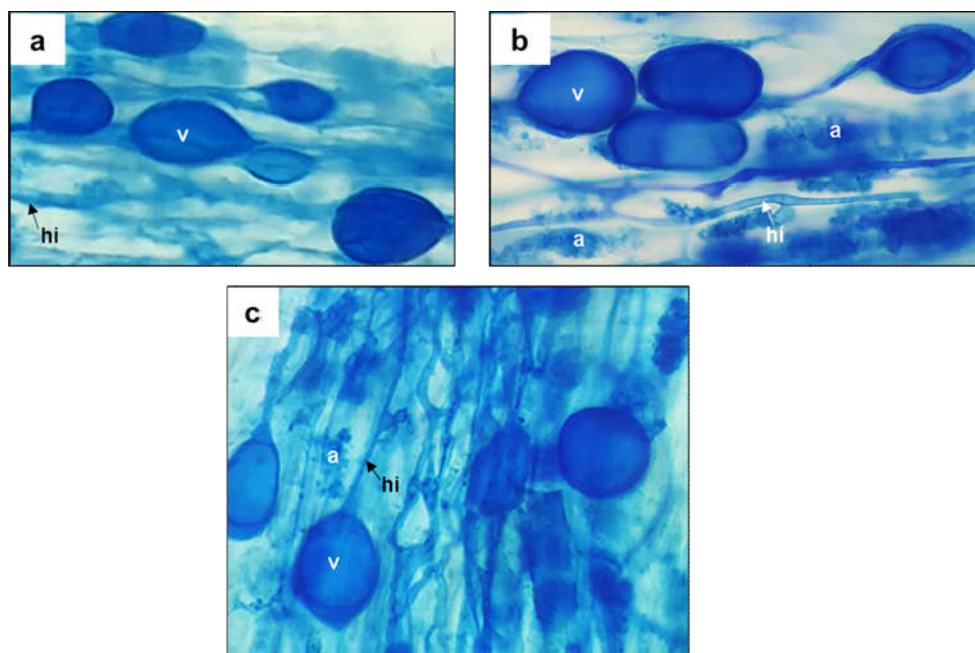


Figure III.9 : Les vésicules.

(hi : Hyphe inter-cellulaire, v : Vésicule, a : Arbuscules)

- Spores

Des structures de forme globulaire ou sphérique ont été observées sur quelques fragments racinaires, ce sont les spores qui constituent l'organe de reproduction et de dissémination des CMA.

Elles sont produites à l'extérieur à l'extrémité d'une hyphe appelée hyphe sporogène chez toutes les espèces des CMA. Cependant, seul le genre *Rhizophagus* produit les spores à l'intérieure des racines (fig. III.10).

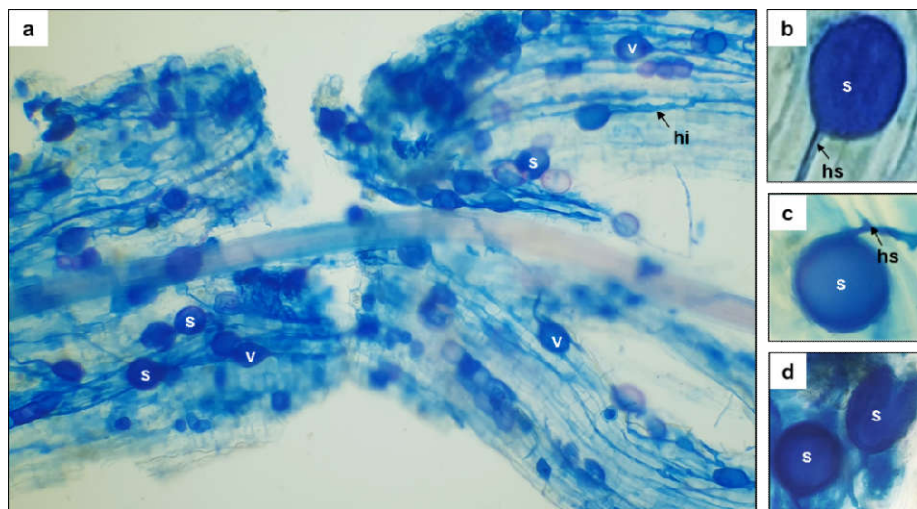


Figure III.10 : Les spores.

(hi : Hyphe inter-cellulaire, v : Vésicule, s : Spore, hs : Hyphe sporogène)

2.1.2. Estimation des paramètres de la colonisation mycorhizienne

- **Fréquence de la mycorhization F%**

89 % des fragments racinaires de *L. stoechas* observés étaient mycorhizés. Cette importante fréquence de mycorhization indique que le nombre des points de pénétration des CMA est important.

- **Intensité de mycorhization (M%)**

L'intensité de la colonisation du cortex racinaire (estimée par rapport au système racinaire entier) était de 55 %, indiquant que le système racinaire est bien colonisé.

- **Teneur arbusculaire (A%)**

Les arbuscules représentent 45% de la colonisation, cette abondance est un signe d'une colonisation en phase active.

2.2. Culture piège

La technique de “piégeage” est utilisée pour produire un inoculum brut à partir d’un inoculum primaire constitué de sol rhizosphérique, et de morceaux de racines de *L. stoechas* (fig. III.11).

Un seul prélèvement a été effectué deux semaines après inoculation, des points d’entrée des CMA et la formation de quelques arbuscules ont été observées sur les racines de la plante piège. Mais aucune évaluation des paramètres de la colonisation mycorhizienne n’a été effectuée.



Figure III.11 : Bac de production de l’inoculum brute
(6 semaines des cultures)

2.3. Extraction des spores

Les spores sont extraites du sol rhizosphérique de *Lavandula stoechas* par la méthode de tamisage humide. Le mélange de spores obtenue après extraction est observé et trié manuellement sous la loupe binoculaire.

Une grande diversité des spores a été observée. Les spores différent entre elles par leur taille, leur couleur et leur aspect (fig. III.12).

La densité sporale du sol rhizosphérique de *L. steocha* est de 14.467spore/g de sol. Cette densité est obtenue dans une période où la colonisation mycorhizienne est en phase active caractérisée par l'abondance des arbuscules. En fin de cycle de développement des CMA, cette densité sporale va certainement augmentée.

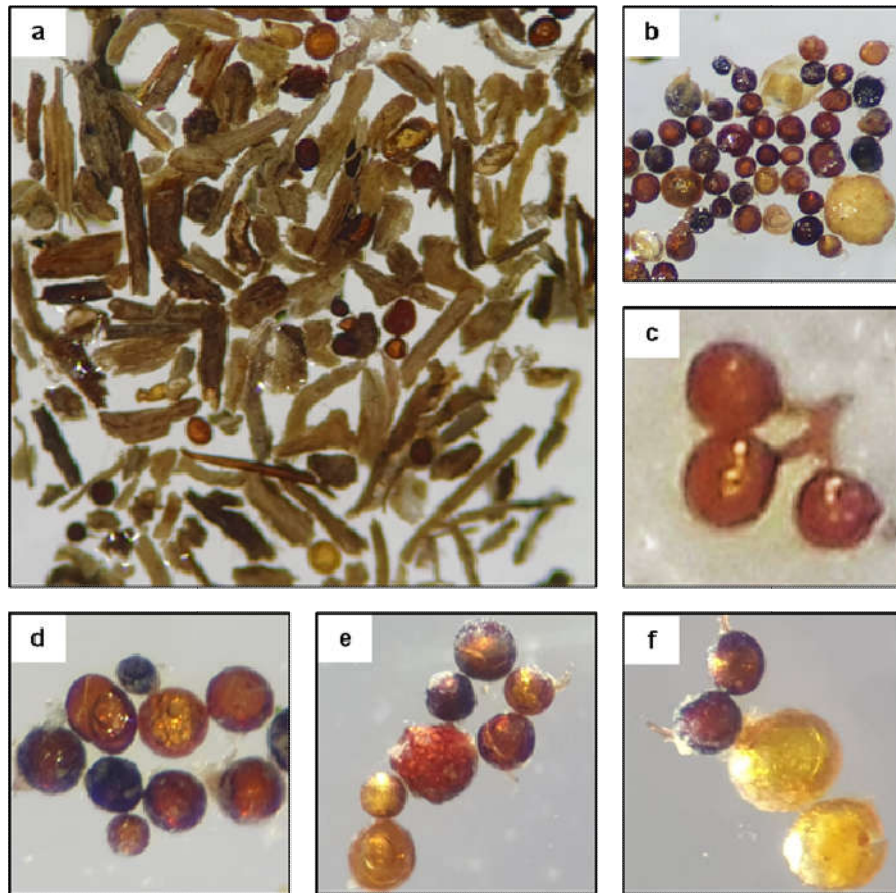


Figure III.12 : Diversité des spores isolées à partir du sol rhizosphérique de *L. steocha* (a : Mélange de spores et de débris avant séparation, b : Mélange des spores après séparation, c,d,e,f : Détails de quelques morphotypes de spores).

Quelques spores sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol et observées au microscope, l'éclatement des spores permet la rupture des membranes internes des spores qui émergent facilitant ainsi l'identification des espèces (fig. III.13).

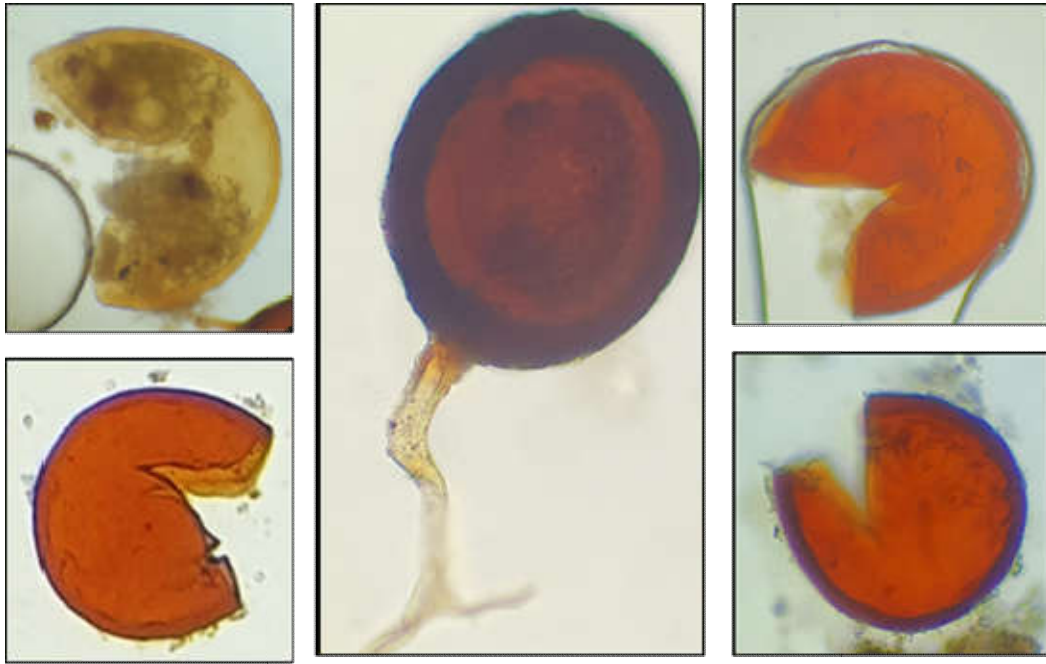


Figure III.13 : Structures morphologiques de quelques spores isolées du sol rhizosphérique de *L. stoechas* observées au microscope.

2.4. Discussion

Dans cet essai, un inoculum primaire constitué de sol rhizosphérique, et de morceaux de racines de *L. stoechas* est utilisé pour produire un inoculum brut.

Une évaluation de l'état de mycorhization de *L. stoechas*, ainsi qu'une évaluation de la densité et de la diversité sporale de sol rhizosphérique étaient nécessaires pour les utiliser comme inoculum primaire.

Après évaluation, les résultats montrent que le système racinaire est bien mycorhizé (F% = 89 %), l'intensité de la colonisation du cortex racinaire est importante (M% = 55 %) ou les arbuscules représentent 45 %.

La densité sporale du sol rhizosphérique de *L. stoechas* est d'environ 15 spore/g de sol malgré que la symbiose mycorhizienne est en phase active (teneur arbusculaire élevée). De plus, une grande diversité des spores a été observée. Ces dernières diffèrent entre elles par leur taille, leur couleur et leur aspect. Cette diversité indique la présence de plusieurs espèces de CMA.

Ces résultats justifient l'utilisation du sol rhizosphérique et des racines de cette espèce comme un inoculum primaire.

Conclusion

Notre étude a porté sur la production d'un inoculum à base de CMA pour des essais à grande échelle au niveau de la filiale. Nous avons effectué un essai de multiplication des CMA présents dans deux inocula (I_1 et I_2), qui n'a donné aucun résultat. Par la suite, nous avons testé l'effet de trois proportions de compost sur la multiplication de ces deux inocula. Seul l'inoculum I_1 a pu être multiplié.

Même si nous avons réussi à multiplier les CMA de l'inoculum I_1 , La colonisation du système racinaire et la teneur arbusculaire étaient faible. Néanmoins, l'utilisation du compost (surtout 10%) avait réduit encore plus cette colonisation. Ces résultats ne permettent pas l'utilisation de cet inoculum comme biofertilisant.

Les valeurs importantes des calculs des paramètres de la fréquence de mycorhization, l'intensité de la colonisation du cortex racinaire, la teneur arbusculaires de *L.stoechas*. Ainsi, La valeur appréciable de la densité sporale du sol rhizosphérique de cette dernière. Montrent que ce sol peut servir comme un inoculum primaire.

Afin de compléter et de poursuivre le travail de produire un inoculum brut, des perspectives peuvent être envisagées pour la cautérisation de la diversité des CMA présent dans le sol rhizosphérique de *L. stoechas* :

- Après environ 3 mois de culture, notre inoculum brut sera prêt.

Cet inoculum brut pourrait aussi servir pour développer un inoculum personnalisé composé de mélanges d'espèces de CMA bien définies. L'obtention de ces espèces nécessite le passage par deux étapes :

- La récolte des spores saines et abondantes des différentes espèces de CMA piégé (à partie de l'inoculum brute).
- Etablissement des cultures monospécifiques (chaque espèce seule).

Notre projet de Filiale est à ces débuts et notre rôle est la production d'un inoculum à base de CMA afin d'accroître la sécurité alimentaire, d'améliorer la productivité par la conceptualisation de la bio-fertilisation, de réaliser une bio innovation (la mycorhization) d'être produite et adoptée à grande échelle en Algérie.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- [1]. Childers. D.L., Corman. J., Edwards. M. and Elser. J.J. "Sustainability challenges of Phosphorus and food: Solutions from closing the human Phosphorus Cycle". *BioScience*, 61 (2), p. 117-124, (2011).
- [2]. Trenkel. M.E., « Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture ». International Fertilizer Industry Association, Paris (1997), p.7-123.
- [3]. Saigusa. M. « Broadcast application versus band application of polyolefin-coated fertilizer on green peppers grown on andisol ». *Journal of Plant Nutrition*, 23, p. 1485–1493, (2000).
- [4]. Mordor intelligence. *Marché des biofertilisants Croissance, tendances et prévisions (2023 - 2028)*
- [5]. Almasri. M.N., et Kaluarachchi. J.J. "Assessment and management of long-term nitrate pollution of ground water in agriculture-dominated watersheds". *Journal of Hydrology*, 295, p. 225–245, (2004).
- [6]. Sönmez. L., Kaplan. M., and Sönmez. S. « An investigation of seasonal changes in nitrate contents of soils and irrigation waters in greenhouses located in antalya-demre region ». *Asian Journal of Chemistry*, 19, p. 5639–5646, (2007).
- [7]. Speriran. G.K. « Geohydrology and Geochemistry near coastal ground-water-discharge areas of the Eastern Shore », Geological Survey Water-Supply Virginia. U.S. (1996), p. 2479.
- [8]. Horita. K., Wang. G., et Satake. M. « Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in soil and water samples with a diazotizable aromatic amine and coupling agent using column preconcentration an naphthalene supported with ionpair of tetradecyldimethylbenzylammonium and iodide ». *Analytica Chimica*, 350, p.295–303. (1997).
- [9]. Wolfe. A.H. et Patz. J.A. « Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications ». *Ambio*, 31, p.120–125, (2002).

- [10]. Westfall. D.G., Mortvedt. J.J., Peterson. G.A0, et Gangloff. W.J. « Efficient and environmentally safe use of micronutrients in agriculture ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36, p.169–182, (2005).
- [11]. Ai. P., Jin. K., Alengebawy. A., Elsayed. M., Meng. L., Chen. M., Ran. Y. « Effect of application of different biogas fertilizer on eggplant production : Analysis of fertilizer value and risk assessment ». *Environ. Technol. Innov.*, 19, p.101019, (2020).
- [12]. Wang. X., Liu. W., Li. Z., Teng. Y., Christie. P., Luo. Y. « Effects of long-term fertilizer applications on peanut yield and quality and plant and soil heavy metal accumulation ». *Pedosphere*, 30, p.555–562, (2020).
- [13]. Lu. X., Zhang. X., Li. L.Y., Chen. H. « Assessment of metals pollution and health risk in dust from nursery schools in Xi'an, China ». *Environ. Res.*, 128, p.27–34, (2014).
- [14]. Richardson. A.E., Hocking. P.J., Simpson. R.J., et George. T.S. Plant « mechanisms to optimise access to soil phosphorus ». *Crop & Pasture Science*, 60, p.124–143, (2009).
- [15]. Beaudin. I., Michaud. A., Beaudet. P. et Giroux. M. « La mobilité du phosphore : du sol au cours d'eau ». *Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec*, p. 8, (2008).
- [16]. Environnement Canada. Éléments nutritifs - Azote et phosphore. In Anonyme. *Menaces pour les sources d'eau potable et les écosystèmes aquatiques au Canada*. (2008).
- [17]. Adesmye. A.O., Klopper. J.W. « Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency ». *Appl Microbiol biotechnol*, 85, p.1-12, (2009).
- [18]. Khosro. M. « Phosphorus solubilizing bacteria : occurrence, mechanisms and their role in crop production ». *Ressour environ*, 2, p.80-85, (2012).
- [19]. Mordor intelligence. *Marché des biofertilisants à base des mycorhizes Croissance, tendances et prévisions (2023 - 2028)*
- [20]. Lalitha. M., Anil. Kumar. K.S., Dharumarajan. S., et al « Role of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae in Mobilization of Soil Phosphorus ». *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*, Singapore (2017), p.317–331.

- [21]. Gobat. J.M., Aragno. M. et Matthey. W. « Le sol vivant, 2e Edition ». Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne, p.568, (2003).
- [22]. Smith. S.E., Christophersen H.M., Pope. S., Smith. S.A. « Arsenic uptake and toxicity in plants : integrating mycorrhizal influences. *Plant Soil*, 327, p.1-21, (2010)
- [23]. Tao. L., Zhiwei. Z., « Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China ». *Appl.Soil Ecol.*, 29, p.135-141, (2005).
- [24]. Vosatka. M., Albrechtova. J. « Benefits of Arbuscular Mycorrhizal fungi to Sustainable Crop Production ». *Microbial Strategies for Crop Improvement*, p.205- 225, (2009).
- [25]. Béreau. M., Louisanna. É., Grandcourt. A., et Garbaye. J. « Symbiose mycorhizienne et nutrition minérale Rev », (2003).
- [26]. Bonfante. P., et Genre. A. « Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis ». *Nature Communications*, p.48, (2010).
- [27]. Riedacker, A. « Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides ». Séminaire, Paris-Nancy, 20 mars-6 avril 1990 (John Libbey Eurotext), (1993).
- [28]. Garbaye. J., « Synthèse la symbiose mycorhizienne. Une association entre les plantes et champignons ». Ed : Quae (paris), p.12-15, (2013).
- [29]. He. X., Nara. K. « Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition ? ». *Trends in Plant Science*, 12, p.331-333, (2007).
- [30]. Yu T.E., Egger K.N., Peterson L.R. « Ectendomycorrhizal associations characteristics and functions ». *Mycorrhiza*. 11, p.167-177, (2010).
- [31]. Schüßler. A., Schwarzott. D., and Walker. C. « A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution ». *Mycol. Res*, 105, p.1413–1421, (2001).
- [32]. Bonfante-Fasolo. P. « Anatomy and morphology of VA mycorrhizae ». CRC Press, Boca Raton, pp. 5-33, (1984).
- [33]. Keymer. A., Pimprikar. P., Wewer. V., et al « Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi ». *eLife Sciences*, (2017).

- [34]. Fortin. J.A., Plenchette. C., Piché. Y. « Les mycorhizes : l'essor de la nouvelle révolution verte ». Édition Quæ, (2016)
- [35]. Balzergue., C. « Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate ». Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier). 2012
- [36]. Gerdemann., J.W. and Trappe., J.M. « The Endogonaceae in the Pacific Northwest ». The Mycological Society of America, p.76, 1974.
- [37]. Wang., B., Qiu., Y.L. « Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants ». *Mycorrhiza*, 16, p.299-363, (2006).
- [38]. Schüßler. A., Schwarzott. D., Waler. C. « A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution ». *ELSEVIER*, 105, 12, p.1413-1421, (2001).
- [39]. Brundrett, M.C., Abbott, L.K. (2007). « Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity». Kluwer Academic Publishers, p.151-193, (2007).
- [40]. Bago. B., Azcón-Aguilar. C., Goulet. A., Piché. Y. « Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi ». *The New Phytologist*, 139, p.375–388, (1998).
- [41]. Leake. J., Johnson. D., Donnelly. D., et al. « Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning ». *Canadian Journal of Botany*, 82, p.1016–1045, (2004).
- [42]. Newman. E.I., Reddell. P. « The Distribution of Mycorrhizas Among Families of Vascular Plants ». *New Phytologist*, 106, p.745–751, (1987).
- [43]. Gandolfi. A., Sanders. I.R., Rossi. V., Menozzi. P. « Evidence of recombination in putative ancient asexuals ». *Mol Biol Evol* , 20, p.754–761, (2003).
- [44]. Gianinazzi-Pearson. V., Gianinazzi. S. « The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. In: *Tree Root Systems and Their Mycorrhizas* ». Springer, Dordrecht, p.197–209, (1983).
- [45]. Johnson. N.C., Graham. J.H., Smith. F.A. « Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum ». *The New Phytologist*, 135, p.575–58, (1997).
- [46]. Smith. S.E., Read. D.J. « *Mycorrhizal Symbiosis* ». Academic Press, (2008).

- [47]. Crossay. T. « Caractérisation taxonomique des champignons mycorrhiziens à arbuscules natifs des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ; analyse de leur synergie permettant l'adaptation des plantes à ces milieux extrêmes ». these de doctorat en Science en microbiologie des sols , Institut des Sciences Exactes et Appliquées, Nouvelle-Calédonie, (2018)
- [48]. Declerck. S., Strullu. D.G., Plenchette. C. « Monoxenic Culture of the Intraradical Forms of *Glomus* sp. Isolated from a Tropical Ecosystem: A Proposed Methodology for Germplasm Collection ». *Mycologia*, 90, p.579–585, (1998).
- [49]. Akiyama. K. « Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis ». *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 71 (6), p.1405-1414, (2007).
- [50]. Delaux. P.M., Bécard. G., « Combier J-P NSP1 is a component of the Myc signaling pathway ». *New Phytol*, 199, p.59–65, (2013).
- [51]. Genre. A., Chabaud. M., Balzergue. C., et al « Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone ». *New Phytol*, 198, p.190–202, (2013).
- [52]. Giovannetti. M., et Sbrana. C. « Meeting a non-host : the behaviour of AM fungi ». *Mycorrhiza*, 8, p.123-130, (1998).
- [53]. Blaszkowski. J., Kovács. G.M., Gáspár. B.K. « The arbuscular mycorrhizal *Paraglomus majewskii* sp. nov. represents a distinct basal lineage in Glomeromycota ». *Mycologia*, 104, p.148–156, (2012).
- [54]. Koske, R.E., Gemma, J.N. « Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of Hawaiian plants : a conservation technique for endangered tropical species ». *Pacific Sci.*, 49, p.181–191, (1995).
- [55]. Oehl. F., Jansa. J., Ineichen., K., Mäder. P., van der Heijden. M. « Arbuscular mycorrhizal fungi as bio-indicators in Swiss agricultural soils ». *FAO*, (2011).
- [56]. Khalvati. M.A., Hu. Y., Mozafar. A. & Schmidhalter. U. « Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress ». *Plant Biology*, 7, p.706-712, (2008).

- [57]. Jacott C. N., Murray D. J., Ridout. C. D., « Trade-Offs in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Disease Resistance, Growth Responses and Perspectives for Crop Breeding ». *Agronomy*, 7(4), p.75, (2017)
- [58]. Hinsinger. P. « Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes : A review ». *Plant & Soil*, 237, p.173-195, (2001).
- [59]. Grant. C., Bittman. S., Montrea. M., Plenchette. C., et Morel. C. « soil and fertilizer phosphorus : effects on plant P supply and mycorrhizal development ». *Canadian journal of plant Science*, 85, p.3-14, (2005).
- [60]. Bago. B., Vierheilig. H., Piche. Y. et Azcón-Aguilar. C. « Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture ». *New phytologist*, 133, p.273-280, (1996).
- [61]. Hawkins. H.J., Johansen. A. et George. E. « Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi ». *Plant Soil*, 226, p.275-285, (2000).
- [62]. Rillig. M.C. et Mummey. D.L. « Mycorrhizas and soil structure ». *New Phytologist*, 171, p.41-53, (2006).
- [63]. Vivas. A., Barea. J.M., Azcon. R. « Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae* both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic in Cd polluted soils ». *Environ. Pollut.*, 134, p.257-266, (2005).
- [64]. Wright. S.F., Upadhyaya. A. « Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi ». *Soil Science*, 161, p.575–586, (1996).
- [65]. Gil-Cardesa. M.L., Ferri. A., Cornejo. P., Gomez. E. « Distribution of chromium species in a Cr-polluted soil: Presence of Cr(III) in glomalin related protein fraction ». *Science of The Total Environment*, 493, p.828–833, (2014).
- [66]. Gonzalez-Chavez. C., D’Haen. J., Vangronsveld. J., Dodd. J.C. « Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil ». *Plant and Soil*, 240, p.287–297, (2002).

- [67]. Linderman. R.G. V. « A mycorrhizae and soil microbial interactions ». In : Mycorrhizae in Sustainable Agriculture, Special Publication, 54, p.45-70. (1992).
- [68]. Akhtar. M.S., Siddiqui. Z.A. « Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens ». Springer Netherlands., p.61-97, (2008).
- [69]. Wu. Q.S. et Zou. Y.N. « Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Tolerance of Drought Stress in Plants. In: Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants ». Springer, Singapour, p.25–41, (2017).
- [70]. Augé. R.M., Toler. H.D., Saxton. A.M. « Arbuscular mycorrhizal symbiosis and osmotic adjustment in response to NaCl stress : a meta-analysis ». *Frontiers in Plant Science*, 5, p.562–574, (2014).
- [71]. Hijri. I., Sykorova. Z., Oehl. F., Ineighen. K., Mader. P., Wiemken. A. et Redecker. D. « Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity ». *Molecular Ecology*, 15, p.2277-2289, (2006).
- [72]. Gosling. P., Hodge. A., Goodlass. G. et Bending. G. D. « Review: Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming ». *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113, p.17-35, (2006).
- [73]. Oehl. F., Jansa. J., Ineichen. K., Mäder. P., van der Heijden. M. « Arbuscular mycorrhizal fungi as bio-indicators in Swiss agricultural soils ». FAO 2011.
- [74]. Gosling. P., Hodge. A. Goodlass., G. and Bending, G. D. « Review: Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming ». *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113, p.17-35, (2006).
- [75]. Fortin. J. A., Plenchette. C. et Piché., Y. « Les mycorhizes : La nouvelle révolution verte ». Québec, Éditions MultiMondes, p.138, (2008).
- [76]. Haimet. M.L. « Mycorhizes : Diagnostic et inoculation ». *Revue de La société nationale d'horticulture de France et de ses sociétés adhérentes*, 622, p. 8–9, (2013).
- [77]. Gianinazzi. S. « La biotechnologie des mycorhizes à arbuscules en horticulture. In : Alliances au pays des racines ». Colloque Scientifique de la Société d'Horticulture de France. p.14-16, (2012).

- [78]. Gianinazzi. S. et Vosatka. M. « Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems : science meets business ». Canadian Journal of Botany, 82, p.1264-1271, (2004).
- [79]. Phillips. J.M. et Haymann. D.S. « Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection ». Trans. Br. Mycol. Soc., 55(1), p.158-161. (1970).
- [80]. Trouvelot. A., Kough. J.L. et Gianinazzi-Pearson V. « Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherches et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle ». Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes, Dijon, 1985. INRA (éd.), p.217-22, (1986).
- [81]. Gerdemann. J.W. et Nicolson. T.H. « Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting ». Transactions of the British Mycological Society, 46, p.235-244, (1963).
- [82]. Brundrett. M., L. Peterson., L. Melville, H. Addy, T. McGonigle. G. Schaffer, N. Bougher, and H. Massicotte. « Practical methods in mycorrhizal research ». Université de Guelph, Guelph, Ontario, Canada, (1994).

Annexes

Annex 1 : Compositions des colorants et réactifs utilisées

1. Préparation de 1000ml de solution colorante de Bleu trypan au lacto-glycérole

Colorant bleu 100 mL.

Acide lactique 288 mL.

Glycérol 288 mL.

L'eau distillé 288 mL.

Agitation magnétique environ 30 min.

2. Acide lactique à 10%

Acide lactique 100 mL.

Eau distillé 1000 mL.

3. Potasse (KOH) à 10 %

KOH 100 g.

Eau distillé 1000 mL .

4. Saccharose 50%

Saccharose 50g.

Eau distillé 100g.

5. Lactoglycérol

Eau distillée 200g.

Acide lactique 200g.

Glycérol 200g.

Annex 2 : Solution nutritive II modifiée de Hoagland

1. Solution mère et solution de travail

Solution mère (1 mol)	Solution de travail (mL/L)	Quantité (g)
NH_4NO_3	1	80.04
KNO_3	6	101
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4	236.15
MgSO_4	2	246.48

2. Solution de microéléments

Dissoudre les quantités indiquées dans un litre d'eau distillée ; 1 mL de cette solution est ajouté à chaque litre de solution final.

Elément	Transporteur	Quantité (G)
B	H_3BO_3	2.86
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
Zn	ZnSO_4	0.22
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.08
Mo	$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02

3. Solution de fer séparée

Préparez une solution de tartrate de fer à 5 % et ajoutez-la à raison de 1 mL / L de solution finale juste avant que la solution ne soit ajoutée à la plante.

Annex 3 : Grill de baram

Lame	Classe	1	2	3	4	5
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						

Annex 4 : Analyse de la variance ANOVA

Prlv / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (F%) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
p3 vs P1	0,624	16,908	2,759	<0,0001	Oui
p3 vs p2	0,125	3,386	2,759	0,012	Oui
p3 vs p4	0,090	2,439	2,759	0,096	Non
p4 vs P1	0,534	14,469	2,759	<0,0001	Oui
p4 vs p2	0,035	0,947	2,759	0,780	Non
p2 vs P1	0,499	13,523	2,759	<0,0001	Oui
Statistique q d'écart sudétisé :			3,901		
Différence significative minimale :			0,102		

comp / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (F%) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
0 vs 0,1	0,300	9,397	2,497	<0,0001	Oui
0 vs 0,05	0,154	4,832	2,497	0,000	Oui
0,05 vs 0,1	0,146	4,565	2,497	0,000	Oui
Statistique q d'écart studentisé :			3,532		
Différence significative minimale :			0,08		

Prlv / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (M%) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
p3 vs P1	0,144	7,456	2,759	<0,0001	Oui
p3 vs p2	0,065	3,346	2,759	0,013	Oui
p3 vs p4	0,021	1,107	2,759	0,689	Non
p4 vs P1	0,123	6,349	2,759	<0,0001	Oui
p4 vs p2	0,043	2,239	2,759	0,141	Non
p2 vs P1	0,080	4,110	2,759	0,002	Oui
Statistique q d'écart studentisé :			3,901		
Différence significative minimale :			0,053		

comp / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (M%) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
0 vs 0,1	0,098	5,820	2,497	<0,0001	Oui
0 vs 0,05	0,053	3,138	2,497	0,012	Oui
0,05 vs 0,1	0,045	2,682	2,497	0,034	Oui
Statistique q d'écart studentisé :			3,532		
Différence significative minimale :			0,042		

Prlv / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (A%) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
p3 vs P1	0,056	4,836	2,759	0,000	Oui
p3 vs p2	0,018	1,574	2,759	0,412	Non
p3 vs p4	0,001	0,116	2,759	0,999	Non
p4 vs P1	0,055	4,720	2,759	0,000	Oui
p4 vs p2	0,017	1,458	2,759	0,477	Non
p2 vs P1	0,038	3,262	2,759	0,016	Oui
Statistique q d'écart studentisé :			3,901		
Différence significative minimale :			0,032		

comp / Tukey (HSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (A%) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
0 vs 0,1	0,039	3,869	2,497	0,002	Oui
0 vs 0,05	0,018	1,829	2,497	0,182	Non
0,05 vs 0,1	0,021	2,041	2,497	0,124	Non
Statistique q d'écart studentisé :			3,532		
Différence significative minimale :			0,025		

Annexe 5 : tamisage humide

