



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLEB BLIDA

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de

Master

Option : BIOTECHNOLOGIE ET VALORISATION

DES PLANTES.

Thème

Diversité des champignons mycorhiziens arbusculaires associés au Thym *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. et à la Ballote noir *Ballota nigra* L. du Parc National de Chréa.

Présenté par :

M^{lle} : ELDJOUDI LAMIA

Soutenu le : 23.07.2019.

Devant le jury composé de :

-Mme MOUMENE S.	MCA	USDB	Présidente.
-Mme OUATTER F.	MCB	USDB	Examinatrice.
-Mme FAIDI H.	MAA	USDB	Promotrice.

Promotion 2018-2019

Remerciements

Au terme de ce travail je remercie Dieu de m' avoir donné le courage et la volonté pour mener à bien ce mémoire de fin d'étude.

*J' exprime mes profonds remerciements à ma promotrice **Mme Faidi H.** Maître assistante à la faculté de biologie, université SAAD DAHLEB de Blida 1, pour avoir accepté de m'encadrer, pour ses conseils, sa disponibilité, sa patience et surtout sa gentillesse.*

*J'exprimons mes vifs remerciements à **Mr Bendali**, responsable de la spécialité biotechnologie et valorisation des plantes, à la faculté de biotechnologie, université SAAD DAHLEB de Blida, je le remercie également pour sa disponibilité, ses conseils avisés et le temps que vous m'a accordé.*

*je voudrais remercier d'abord la présidente **Mme Moumene S**, pour avoir honoré de sa présence, ce jury, en acceptant de le présider.*

*Je remercie **Mme Ouatter** d' avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je ne saurais oublier **Mme Nadja**, ingénieurs de laboratoire de recherche au département de Biotechnologie. pour sa disponibilité et l'aide précieuse qu'elle a su m'apporter.*

Mes vifs remerciements vont à tous les enseignants du département de Biotechnologie. Ainsi que de l'Université de SAAD DAHLAB BLIDA 1.

Enfin j'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Avant tout je tiens à remercier mon Dieu tout puissant qui m'a donné le courage et la foi pour mener ce travail.

Je dédie le fruit de mes études avec tout l'amour qui se trouve dans mon cœur à mes très chère parents, qui ont toujours étaient là pour m'entourer de tendresse d'amour et qui mon donné un magnifique modèle de courage Dieu les gardent et leurs donne une longue vie et parfait santé.

A mon grand père. A ma grande mère.

A mes très chères sœurs : Nadia, Samia, Amina, et Rokaya, qui poussé d'aller vers l'avant, sans oublié ses enfants : Allaa, Wassim et Ayoub.

A mes très chers frères : Abdallah et Ahmed, pour leur soutien et les moments d'ambiances.

A la lumière de ma vie Salouha qui est toujours derrière moi, m'en montait le moral.

A mes chères tantes : Fatiha, Naima, Faiza, Nawel et leurs maries et leurs enfants. Ainsi à Fetouma, Aouicha, Fatima Zahra et Fatiha.

A mes très chères collègues : Wassila, Noussaiba, Nassima, Imène, Mimi, Baya et Nabila.

A mes amis, en particulier : Karima, Razika et Imène. Ainsi qu'a tous mes amis de la promotion de l'option Biotechnologie et valorisation des plantes de 2018/2019.

LAMIA.

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction.....	1
Chapitre I: Rappels bibliographiques	
1. SYMBIOSE MYCORHIZIENNE.....	3
1.1.Généralités.....	3
1.2. Différents types de mycorhizes.....	3
1.2.1. Ectomycorhizes	4
1.2.2.Endomycorhizes.....	5
1.2.3. Ectendomycorhizes.....	6
1.2.4. Pseudomycorhizes à endophytes bruns cloisonnés.....	6
1.3. Mycorhizes à arbuscules (MA).....	6
1.3.1. Généralités.....	6
1.3.2. Structures des MA.....	7
1.3.3. Morphologie des MA.....	8
1.3.4. Classification des CMA.....	8
1.3.5 cycle développement des CMA.....	9
1.4 Importance des CMA.....	12
1.4.1. Nutrition minérale.....	13
1.4.2. Atténuation du stresssalin.....	13
1.4.3. Protection des agents pathogènes.....	14
1.4.4. Bioremédiation.....	14
1.4.5. Rôle écosystémique et écologique.....	14
2. FAMILLE DES LAMIACEES.....	15
2.1. Généralités.....	15
2.2. Espèces étudiées	16
2.2.1. <i>Thymus ciliatus</i>	16
2.2.1.1. Origine.....	16
2.2.1.2. Description botanique.....	16
2.2.1.3. Systématique.....	17
2.2.1.4. Noms vernaculaires.....	17
2.2.1.5. Habitat	18
2.2.2. <i>Ballota nigra</i>	18
2.2.2.1. Origine du nom.....	18
2.2.2.2. Description botanique.....	18
2.2.2.3. Systématique.....	19
2.2.2.4. Noms vernaculaires.....	19
2.2.2.5. Habitat.....	20

Chapitre II: Matériel et Méthodes1

1. MATERIEL.....	22
1.1. Matériel végétal.....	22
2. METHODES	22
2.1. Echantillonnage.....	22
2.2. Traitement et conservation des échantillons.....	23
2.2.1. Racines.....	23
2.2.2. Sol	23
2.3. Analyses physico-chimique des sols.....	23
2.3.1. Analyse granulométrique.....	24
2.3.2. Mesure de pH.....	24
2.3.3. Mesure de conductivité électrique.....	24
2.3.4. Dosage du calcaire total.....	25
2.3.5. Matière organique et Carbone total	25
2.3.6. Phosphore assimilable.....	26
2.3.7. Mesure de l'azote total.....	26
2.4. Mise en évidence de la colonisation mycorhizienne à arbuscules.....	27
2.5. Estimation des paramètres de la colonisation mycorhizienne.....	28
2.6. Détermination du potentiel infectieux mycorhizogène.....	29
2.6.1. Préparation des dilutions de sol.....	29
2.6.2. Production des plantes-test.....	30
2.6.3. Récolte et traitement du système racinaire.....	32
2.6.4. Calculs.....	32
2.7. Analyses statistiques	33

Chapitre III: Résultats et Discussion

Résultats.....	35
1. Analyses physico-chimiques des sols.....	35
2. Statut mycorhizien des deux espèces.....	36
2.1. Structures des MA.....	36
2.2. Structures des pseudomycorhizes.....	39
3. Estimation de la colonisation mycorhizienne.....	40
4. Détermination du potentiel infectieux mycorhizogène	42
4.1. Description des structures formées par les CMA.....	42
4.2. Potentiel infectieux mycorhizogène.....	43
Discussion.....	46
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	51
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1	Différentes quantités de sol non stérilisé et stérilisé utilisées lors des dilutions.	30
Tableau 2	Granulométrie des sols rhizosphériques de <i>Thymus ciliatus</i> et de <i>Ballota nigra</i> .	35
Tableau 3	Paramètres physico-chimiques des sols rhizosphériques de <i>Thymus ciliatus</i> et de <i>Ballota nigra</i> .	35
Tableau 4	Les pourcentages de plantules mycorhizées du sorgho cultivées sur une gamme de dilutions de sol rhizosphérique et de sol témoin.	44
Tableau 5	Potentiel infectieux mycorhizogène chez les espèces végétales et dans le sol témoin.	45

Liste des figures

Figure 1	Les principales symbioses mycorhiziennes décrites et de leur structures inter et intra racinaires.	4
Figure 2	Représentation schématique des types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhizes arbusculaires.	8
Figure 3	Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules.	9
Figure 4	Schéma d'une cellule corticale contenant un arbuscule. Chaque ramification fongique à l'intérieur de la cellule végétale est entourée par une membrane péri-arbusculaire dérivée de la plante.	11
Figure 5	Schéma des différentes étapes de colonisation des champignons MA.	12
Figure 6	Fonctionnement des champignons mycorhiziens à arbuscules.	13
Figure 7	Représentation schématique générale des lamiaceae.	15
Figure 8	Caractères morphologiques de <i>Thymus ciliatus</i> (Desf.) Benth.	17
Figure 9	Caractères morphologiques de <i>Ballota nigra</i> .	19
Figure 10	Aspect botanique de <i>Ballota nigra</i>	22
Figure 11	Aspect botanique de <i>Thymus ciliatus</i>	22
Figure 12	Notation de la colonisation Barème de classe d'infection endomycorhizienne (de classe 0 à classe 5).	28
Figure 13	Culture de sorgho.	31
Figure 14	Structures mycorhizienne arbusculaires observées dans les racines de <i>Ballotanigracolorées</i> au bleu de Trypan.	38
Figure 15	Structures mycorhizienne arbusculaires observées dans les racines de <i>Thymus ciliatuscolorées</i> au bleu de Trypan.	39
Figure 16	Structures des endophytes non mycorhiziens dans les racines de <i>Thymus ciliatus</i> et de <i>Ballotanigra</i> .	40
Figure 17	Paramètres de la colonisation mycorhizienne à arbuscules	41
Figure 18	Structures formées par les CMA dans les racines de sorgho colorés au bleu de Trypan.	43

Liste des abréviations

CMA : Champignons Mycorhiziens à Arbuscules.

PPA: Pré-Pénétration Apparatus.

MA : Mycorhize à Arbuscules.

PAM : Plantes Aromatiques et Médicinales.

I.N.S.I.D : Institut National des Sols, de l'Irrigation Et du Drainage

ENSA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie.

PNC : Parc National de Chréa.

CE : Conductivité électrique.

MO : Matière Organique.

PIM : Potentiel infectieux mycorhizogène.

KOH : hydroxyde de potassium.

L'étude du statut mycorhizien des deux plantes spontanées appartenant à la famille des lamiaceae a été entreprise chez le thym (*Thymus ciliatus*) et la ballote noir (*Ballota nigra*) dans la région de Chréa (W. Blida) où les espèces étudiées sont présentes.

L'analyse physico-chimique a montré que les sols rhizosphériques sont de texture limoneuse, un pH alcalin (pH=7.19 et 7.20), leurs conductivités électriques sont de 0.19 et 0.92 pour *B. nigra* et *T. ciliatus* respectivement, ils sont riches en azote ($0.15 < N\% < 0.25$) et en matières organiques ($MO\% > 6$). Cependant, le taux de phosphore assimilable est plus important (51.63 ppm), environ le double dans le sol de ballote par rapport au sol du thym (28.48 ppm), et ne sont pas de nature calcaire ($CaCO_3\% < 5$).

Les examens microscopiques des racines des deux espèces ont révélé un taux de colonisation mycorhizienne moyenne (55% et 51%) avec la présence de différentes structures caractéristiques des mycorhizes arbusculaires ; des arbuscules, des vésicules et des peletons et cela indépendamment de l'espèce. En plus de ces structures, les racines des deux espèces étaient fortement colonisées par d'autres espèces fongiques qui sont les endophytes non mycorhiziens à mycélium septé bien colorées au bleu Trypan.

Le test biologique réalisé sur le sorgho dans les dilutions de sol, a montré la présence des caractéristiques morphologiques des champignons endomycorhiziens identiques à celles observées en conditions naturelles chez le thym et la ballote, il a permis aussi d'évaluer le pouvoir mycorhizogène des sols des deux espèces. Le sol où pousse *Thymus ciliatus* a présenté le potentiel infectieux mycorhizogène le plus faible (1.38g) donc le plus important.

Mots clés : *Thymus ciliatus*, *Ballota nigra*, mycorhizes arbusculaires, potentiel infectieux mycorhizogène, endophytes.

Abstract

The study of the mycorrhizal status of two spontaneous plants belonging to the family Lamiaceae has been undertaken in Thyme (*Thymus ciliatus*) and Black Ballot (*Ballota nigra*) in the region of Chr ea (W. Blida) where the species studied are present. .

The physicochemical analysis showed that the rhizospheric soils are of silty texture, an alkaline pH (pH = 7.19 and 7.20), their electrical conductivities are of 0.19 and 0.92 for *B. nigra* and *T. ciliatus* respectively, they are rich in nitrogen ($0.15 < N\% < 0.25$) and organic matter (MO% > 6). However, the level of available phosphorus is greater (51.63 ppm), about twice as much in the ballot soil compared to the soil of thyme (28.48 ppm), and are not limestone ($CaCO_3\% < 5$).

Microscopic examination of the roots of both species revealed an average rate of mycorrhizal colonization (55% and 51%) with the presence of various characteristic structures of arbuscular mycorrhizae; arbuscules, vesicles and peletons regardless of the species. In addition to these structures, the roots of both species were strongly colonized by other fungal species which are non-mycorrhizal endophytes with septal mycelium well stained with Trypan blue.

The biological test carried out on sorghum in soil dilutions, showed the presence of morphological characteristics of endomycorrhizal fungi identical to those observed under natural conditions in thyme and ballot, it also made it possible to evaluate the mycorrhizal two species. The soil where *Thymus ciliatus* grows has the lowest infectious mycorrhizogenic potential (1.38g), which is the most important.

Key words: *Thymus ciliatus*, *Ballota nigra*, arbuscular mycorrhizas, mycorrhizal infectious potential, endophytes.

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales, en particulier, les espèces de la famille des Lamiacées, l'une des plus répandues dans le règne végétal (Naghibi et *al.*, 2005).

la famille des lamiacées se compose surtout de plantes herbacées, des arbustes, et de quelques arbres. Elle a une distribution cosmopolite (Yuan et *al.*, 2010), c'est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (Hilan et *al.*, 2006).

Dans la nature, l'aptitude d'une espèce végétale à coloniser un écosystème donné et s'y maintenir découle souvent des relations qu'elle établit avec les microorganismes qui l'entourent. Parmi les microorganismes associés aux racines des plantes, les champignons qui forment les mycorhizes, en particulier, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), tiennent une place considérable du fait de leur ubiquité et de leur importance pour la vie des plantes, ils sont considérés comme des acteurs clés des services écosystémiques (Barea, 1999).

Les champignons symbiotiques des plantes, en particulier les champignons mycorhiziens à arbuscules (MA), jouent un rôle important dans les sols puisqu'ils colonisent la grande majorité des plantes et qu'ils sont impliqués dans le prélèvement et le transfert des éléments essentiels et non essentiels vers la plante. Ayant co-évolué avec les plantes depuis des millions d'années, les champignons MA ont établi une étroite collaboration avec leur plante hôte. Ils contribuent à la nutrition végétale en prélevant des nutriments peu disponibles pour la plante et améliorent ainsi sa croissance. Le champignon échange alors ces éléments essentiels contre des molécules carbonées (sucres), issues de la photosynthèse, indispensables à son propre développement. De plus, la colonisation mycorhizienne favorise la croissance des plantes en conditions de stress (biotiques ou abiotiques) (Van der Heijden et *al.*, 2006).

En Algérie, l'étude de la diversité des champignons mycorhiziens arbusculaires reste le parent pauvre de l'écologie microbienne. Aucune étude ne s'est focalisée sur les associations mycorhisiennes des espèces végétales du parc national de Chréa, en particulier, les espèces de la famille des Lamiacées, malgré l'omniprésence des symbioses mycorhiziennes dans notre environnement naturel.

Dans le contexte d'une contribution à la caractérisation de la diversité des champignons mycorhiziens dans le parc national de Chréa, deux espèces de plantes de la familles des lamiacées, *Thymus ciliatus* et *Ballota nigra* ont fait l'objet de notre étude. Les deux plantes poussent spontanément dans le parc national de Chréa.

L'objectif de notre étude était d'établir le statut mycorhizien des deux espèces dans leur milieu naturel et d'évaluer le potentiel infectieux mycorhizogène (PIM) des sols rhizosphériques des deux espèces étudiées. En parallèle, une étude pédologique des sols était prévue.

Chapitre I

Rappels bibliographiques

1. SYMBIOSE MYCORHIZIENNE

1.1. Généralités

À de rares exceptions près, les plantes vertes terrestres vivent en symbiose, c'est-à-dire en association intime, durable et à bénéfice mutuel, avec des champignons liés aux racines sous la forme d'organes mixtes appelés mycorhizes (Garbaye, 2013).

Le terme mycorhize (mycorrhiza en anglais) vient de l'association de deux mots grecs ; *mykês*, qui signifie champignon, et *rhiza* qui signifie racine ; désigne une association symbiotique entre un champignon et les racines d'une plante (Fortin et *al.*, 2016).

Les associations mycorhiziennes sont très fréquemment rencontrées dans presque tous les écosystèmes naturels. Environ 95% des plantes terrestres sont en effet capables de former des mycorhizes. Ces associations racine/champignon forment une symbiose qui joue un rôle essentiel dans l'absorption des éléments minéraux dans les écosystèmes terrestres. Les deux partenaires s'échangent mutuellement des éléments nécessaires à leur bon développement; les champignons (hétérotrophes) fournissent des éléments minéraux à la plante (autotrophe) en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse. Cette colonisation des plantes par les champignons est une association très ancienne (Selosse et Le Tacon, 1998).

1.2. Différents types de mycorhizes

Il existe plusieurs formes d'associations mycorhiziennes connues sous les noms d'endomycorhizes à arbuscules, d'ectomycorhizes, d'ectendomycorhizes, de mycorhizes éricoïdes et de mycorhizes orchidoïdes, elles sont classés par leurs caractéristiques morphologiques distinctes (Fortin et *al.*, 2016) (fig. 1).

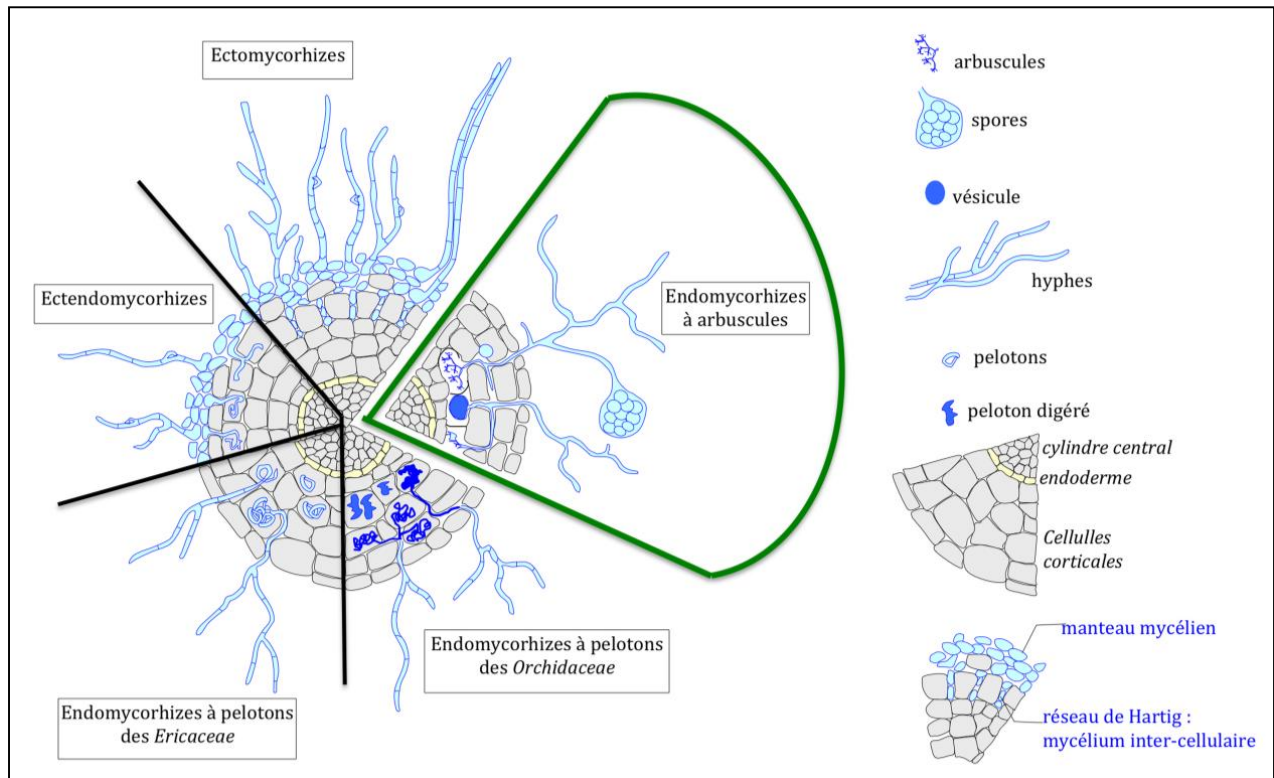


Figure 1: Les principales symbioses mycorhiziennes décrites et de leur structures inter et intraracinaires, à partir de Selosse et Le Tacon (1998).

1.2.1. Ectomycorhizes

Chez les ectomycorhizes (du grec *ektos* :à l'extérieur), le mycélium se développe à l'extérieur des cellules corticales, les hyphes forment un manchon ou **manteau fongique** autour des racelles et pénètrent aussi dans la racine (fig. 1) ou ils s'insinuent entre les cellules pour former le **réseau de Hartig** (Hartig étant le chercheur qui l'a observé et décrit le premier).

La symbiose ectomycorhizienne ne concerne que 5 % des espèces végétales, principalement les essences forestières des régions tempérées, méditerranéennes et boréales, mais il a été également décrit chez quelques espèces tropicales.

Plus de 5000 espèces de champignons appartenant principalement aux Basidiomycètes, mais aussi aux Ascomycètes forment des ectomycorhizes avec les plantes (Brundrett, 2002).

1.2.2. Endomycorhizes

Les hyphes des endomycorhizes (du grec *endon* :à l'intérieur) pénètrent à l'intérieur des cellules du cortex racinaire où leur prolifération conduit à la formation d'arbuscules ou de pelotons. Le réseau de Hartig et le manteau fongique sont absents. On distingue les endomycorhize à pelotons et les endomycorhize à arbuscules (Garbaye, 2013).

- **Endomycorhizes à peloton**

- ❖ **Endomycorhizeséricoides**

Cette symbiose est présente chez toutes les espèces d'Ericacées. Le partenaire fongique est un Ascomycète (Smith et Read,1997).Le mycélium extra-racinaire forme un réseau d'hyphes vivants dans le sol et le mycélium intra-racinaire colonise l'épiderme et forme des pelotons mycéliens intracellulaires, cette association reste active pendant une courte période de temps, après, les cellules corticales dégènèrent et le champignon colonise en saprophyte les cellules mortes de la plante (Fortin et al., 2008).

- ❖ **Endomycorhizes Orchidoïdes**

Cette mycorhize est spécifique des Orchidées, ils s'associent avec des Basidiomycètes. Le champignon pénètre dans les cellules racinaires, mais ne forme que très rarement un réseau intercellulaire, les hyphes s'enroulent sur eux-mêmes et forment des pelotons intracellulaires, l'infection se propage directement d'une cellule à une autre, puis les pelotons d'hyphes dégènèrent et sont digérés par les cellules plus internes, d'ailleurs à l'âge adulte, certains Orchidées éliminent complètement le champignon alors que d'autres, le garderont toute leur vie (Fortin et al.,2008).Les graines et les embryons d'orchidées sont presque dépourvues de réserves nutritives, dès leur germination, la colonisation par le champignon leur est nécessaire pour se développer (Rasmussen, 2002).

- **Endomycorhizesà arbuscules**

Elles sont formées par des champignons inférieurs et concernent environ 80 % des espèces végétales (Barea et al., 1999). Ces associations doivent leur nom aux structures fongiques résultant des hyphes intracellulaires qui se ramifient intensément à l'intérieur des cellules du cortex racinaire

pour former des structures appelées arbuscules. Ces hyphes peuvent former des vésicules (Bonfante-Fasolo, 1984).

1.2.3. Ectendomycorhizes

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, et les caractéristiques des endomycorhizes soit, la pénétration à l'intérieur des cellules corticales par les hyphes (Yu et *al.*, 2001). Leurs partenaires fongiques sont principalement des Ascomycètes, quelques espèces de Basidiomycètes peuvent former ce type de mycorhize (Smith et Read, 2008).

1.2.4. Pseudomycorhizes à endophytes bruns cloisonnés

Les endophytes racinaires sont les champignons présents dans les tissus végétaux sans causer de dégâts apparents à la plante hôte et leur rôle vis-à-vis de la croissance des plantes en milieu pollué est documenté depuis peu. Ils demeurent entièrement dans les racines et ne sont présents dans le sol rhizosphérique que de façon transitoire, ils n'émergent que pour sporuler ou lors de la sénescence des tissus de la plante hôte (Berthelot et *al.*, 2016).

Ce groupe de champignons est principalement représenté par les endophytes bruns septés (DarkSeptate endophyte ou DSE). Ce sont des champignons bruns due à la présence de mélanine, à hyphes cloisonnés stériles et formant des microsclérotés dans les plantes (Jumpponen, 2001).

1.3. Mycorhizes à arbuscules (MA)

1.3.1. Généralités

Les mycorhizes à arbuscules (MA) représentent le type mycorhizien le plus répandu dans la flore actuelle (Smith et Read, 1997). Elles ont d'abord été reconnues et décrites en tant que mycorhizes endotrophiques ou mycorhizes vésiculaires-arbusculaires. Le terme vésiculaire a finalement été abandonné car il est devenu clair que certains taxa ne forment pas de vésicules. Le terme arbusculaire, retenu pour désigner ce type de mycorhizes, réfère aux structures situées à l'intérieur des cellules corticales des racines appelées arbuscules (arbres nains). La grande majorité des plantes terrestres sont capables de former des mycorhizes arbusculaires (Brundrett, 2009).

Les CMA sont associés avec les racines de plus de 80% des espèces végétales. Cela inclut les Angiospermes, Gymnospermes, Sporophytes et Ptéridophytes (Smith & Read, 2008). Cependant, certaines familles comme la *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Caryophyllaceae*, sont généralement très peu ou pas colonisées par les CMA (Bothe, 2012).

1.3.2. Structures des MA

Le champignon mycorhizien à arbuscule forme plusieurs structures à l'intérieur des racines, principalement des arbuscules, des vésicules des spores et des hyphes (Tommerup, 1984). Le terme propagule est utilisé pour les désigner puisque toutes ces structures servent à propager l'espèce (Fortin et *al.*, 2008).

• Arbuscule

L'arbuscule est l'unité au niveau de laquelle se produisent les échanges entre la plante hôte et le champignon. C'est une ramification latérale des hyphes fongiques dans les cellules du cortex racinaire où le champignon pénètre et croît à l'intérieur. La membrane de la cellule hôte s'invagine et enveloppe le champignon, ce nouveau compartiment fournit un contact direct entre le champignon et la plante (Guissou, 2001). Les arbuscules ont une durée de vie limitée estimée en moyenne à 8 jours, ils entrent ensuite en sénescence et sont complètement éliminés de la cellule végétale qui retrouve son état initial (Javot et *al.*, 2007).

• Vésicule

La vésicule est une structure de stockage, c'est un renflement globuleux formé par le champignon symbiotique généralement dans les espaces intercellulaires et parfois à l'intérieur de certaines cellules du cortex racinaire (Garbaye, 2013).

• Spore

La spore sert d'organe de stockage et de propagation des CMA. Elle est produite à l'extrémité d'un hyphe sporogène ou suspenseur (structure reliant la spore aux hyphes du mycélium) dont la morphologie est utilisée pour identifier certains genres de CMA, à l'intérieur des racines ou dans le sol (Schenk et Perez, 1990).

1.3.3. Morphologie des MA

La morphologie des structures symbiotiques intraracinaires est classée en deux types, *Paris* et *Arum*, selon les deux plantes où ils ont été décrits pour la première fois.

- Dans la colonisation de type *Arum*, le champignon prolifère le long de la racine dans les espaces intercellulaires et l'arbuscule entre dans les cellules par les axes résultants.
- Dans le type *Paris*, le champignon diffuse de cellule à cellule, et dans de nombreux cas des peletons d'hyphes sont formés sans ou avec des arbuscules (fig.2) (Bonfante et Genre, 2008).
- La plupart des plantes forment une structure intermédiaire entre ces deux modèles, ce qui conduit à la formulation du terme « type *Arum-Paris* continuum » (Dickson, 2004).

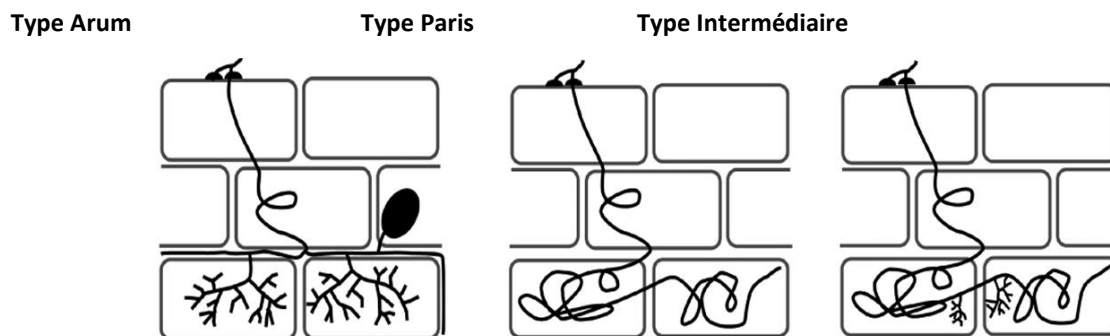


Figure 2: Représentation schématique des types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhizes arbusculaires (Garbaye, 2013).

1.3.4. Classification des CMA

Ces champignons symbiotiques étaient autrefois classés dans l'ordre des Glomales parmi les Zygomycètes. Les études phylogénétiques récentes ont conduit à la création, en 2001, d'un phylum bien individualisé, celui des *Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001). Le phylum regroupe 250 espèces comprenant 18 genres et 4 ordres (fig. 3).

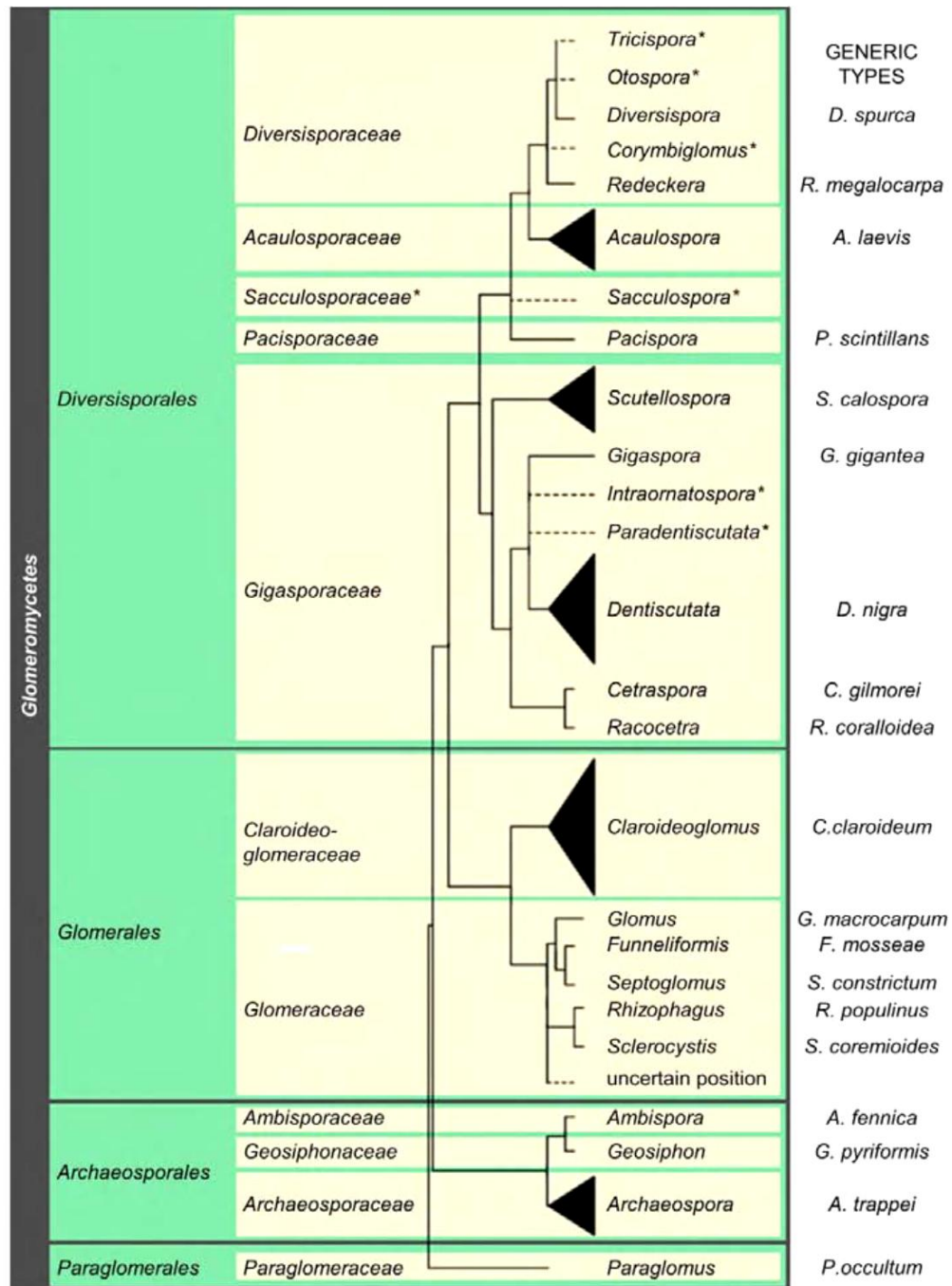


Figure 3 : Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (Redecker et al., 2013).

1.3.5.Cycle de développement des CMA

Les CMA sont des biotrophes obligatoires car hétérotrophes pour le carbone et sont incapables de compléter leur cycle de vie de manière asymbiotique. L'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules débute par le contact entre une racine compatible avec les hyphes germinatives produites par les propagules du CMA (spores asexuées ou racines déjà mycorhizées) (Requena et al., 2007).

La colonisation des racines par ces champignons suit une série de trois phases (fig. 5):

- **Phase asymbiotique : germination de la spore et ramification de l'hyphe germinative**

Dans des conditions favorables, les spores peuvent germer spontanément et produire une hyphe germinative et quelques ramifications primaires sans stimulus exogène. Lorsqu'aucun partenaire végétal est à proximité, les hyphes germinatives se cloisonnent et le cytoplasme se rétracte dans la spore (Requena et al., 2007). Les spores des CMA sont capables de germer et d'entrer à nouveau en dormance de nombreuses fois si des signaux racinaires ne sont pas perçus (Koske, 1981).

- **Phase pré-symbiotique: dialogue entre une plante et un champignon mycorhizien**

Avant le premier contact physique, les deux partenaires de la symbiose émettent des signaux dans le sol qui leur permettent d'être informés de leur présence respective. (Bonfante et Genre, 2010).

- **Signaux émis par la plante**

Les plantes produisent des exsudats racinaires capables de stimuler la germination, d'induire une ramification des hyphes et de modifier l'activité métabolique du CMA (Buée et al., 2000). Dénommées «*branching factors*», ces molécules ont été identifiées comme étant des strigolactones.

- **Signaux émis par le CMA**

Les CMA produisent des molécules diffuses qui leur permettent d'être reconnus par les plantes. Ces molécules appelées « Myc factors » induisent l'activation de gènes chez la plante hôte relatifs à l'établissement de la symbiose (Bonfante et Requena, 2011).

- **Phase symbiotique : colonisation des racines de l'hôte**

Le champignon forme une structure renflée au contact de l'épiderme appelée hyphopode ou appressorium. Les cellules végétales réorganisent leur cytosquelette et forment un système membranaire de pré-pénétration (PPA), qui va permettre au champignon d'entrer dans la racine et d'atteindre la zone corticale de la racine pour y développer des structures hyper-ramifiées appelées arbuscules. Ces derniers sont entourés d'une membrane plasmique péri-arbusculaire séparant le champignon du cytoplasme végétal et assurant les échanges entre le champignon et la plante grâce à des transporteurs spécifiques (Bonfante et Genre, 2010) (fig.

4). Un grand nombre d'espèces de CMA produisent également des vésicules qui sont des structures de réserves localisées à l'intérieur ou entre les cellules corticales (Smith et Read, 2008).

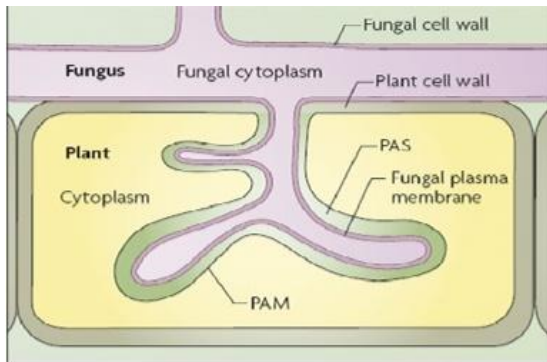


Figure 4 : Schéma d'une cellule corticale contenant un arbuscule. Chaque ramification fongique à l'intérieur de la cellule végétale est entourée par une membrane péri-arbusculaire dérivée de la plante (Parniske, 2008).

De manière concomitante au développement dans la racine, le champignon va se développer dans le sol. Le mycélium extra-racinaire s'organise en un réseau très dense d'hyphes, qui peut former jusqu'à plusieurs mètres d'hyphes par cm^3 de sol (Miller et *al.*, 1995). Ces structures vont puiser eau et sels minéraux puis les transporter vers la racine. C'est aussi à ce moment-là que le champignon va former de nouvelles spores, structures de reproduction et de dissémination des CMA, complétant ainsi son cycle de vie (Javot et *al.*, 2007).

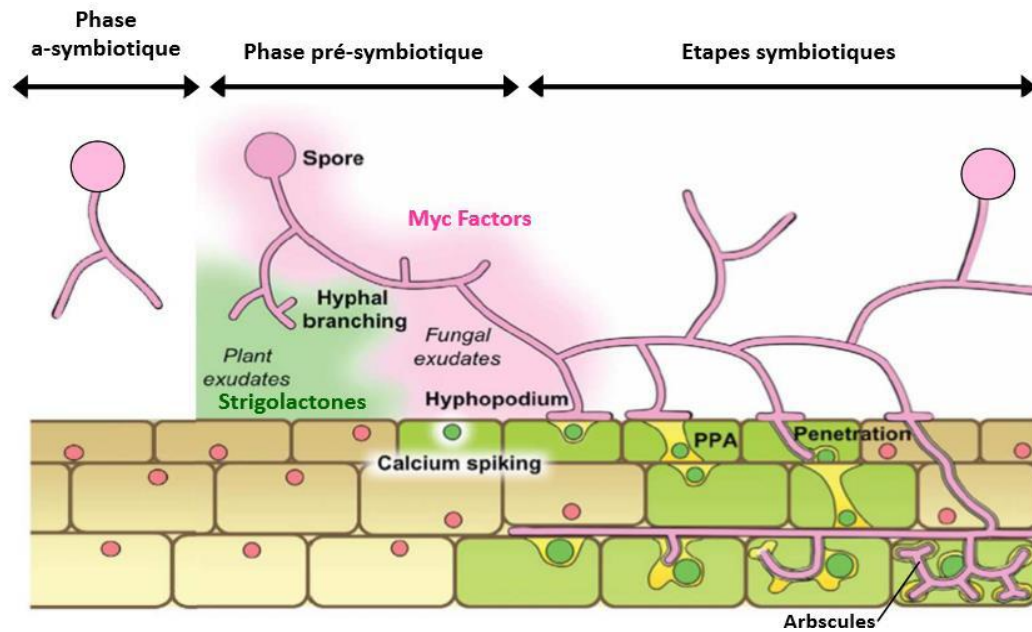


Figure 5: Schéma des différentes étapes de colonisation des champignons MA (adapté d'après Bonfante et Genre, 2010).

1.4. Importance des MA

Dans la nature, les mycorhizes sont la règle, pas l'exception (Garg et Chandel, 2010). Les CMA sont omniprésents et forment des relations symbiotiques avec les racines de la plupart des plantes terrestres (Akhtar et Siddiqui, 2008). Dans cette association le champignon prend le rôle de la racine de la plante et agit comme une extension du système racinaire (Muchovej, 2004).

Les mycorhizes influencent sur la colonisation des racines par d'autres micro-organismes, et réduisent la sensibilité des racines à des agents pathogènes transmis par le sol comme les nématodes ou les champignons phytopathogènes (Selvaraj et Chellappan, 2006).

Les MA modifient également les relations sol-plante-eau, favorisant ainsi une meilleure adaptation des plantes à des conditions défavorables, comme la sécheresse, la salinité ou le stress de chaleur. À des concentrations élevées de métaux lourds dans les sols, les champignons mycorhiziens se sont avérés détoxifier l'environnement pour la croissance des plantes (Muchovej, 2004) (fig. 6).

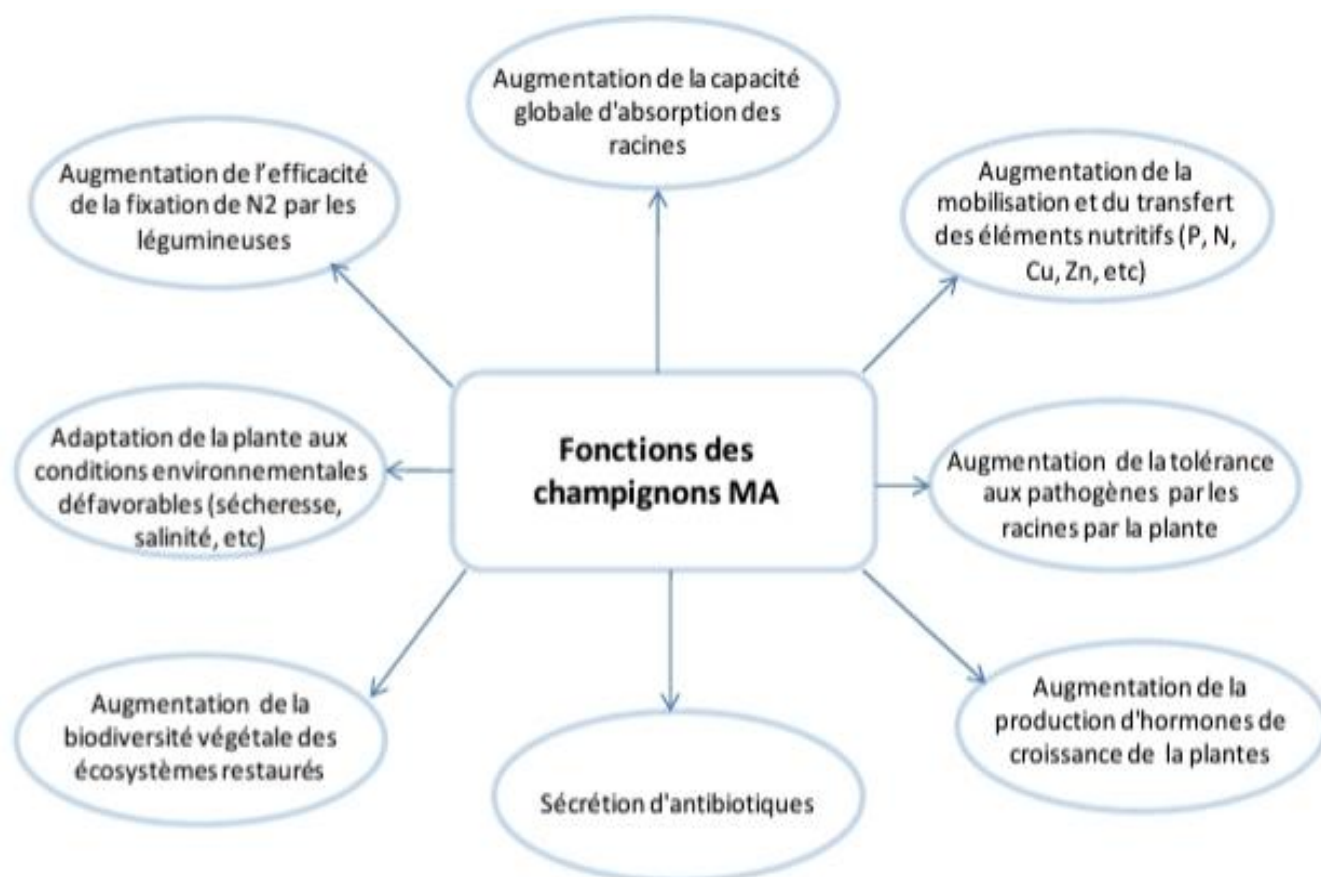


Figure 6 : Fonctionnement des champignons mycorhiziens à arbuscules (Mekahlia,2013).

1.4.1. Nutrition minérale

Les systèmes extensifs de mycélium (les parties végétatives du champignon) explorent efficacement des substrats de sol et acquièrent les nutriments du sol inorganiques, y compris la majeure partie de macro- nutriments N, P et K et certains micro-nutriments, Cu, Fe et Zn. Ces éléments nutritifs dérivés du sol sont non seulement essentiels pour le développement des CMA, mais sont aussi en partie transférés à la plante hôte (Smith et Read,1997; Bonfante et Genre, 2008).

1.4.2. Atténuation du stress salin

La salinisation des sols est une menace croissante à la culture de plantes cultivées dans le monde problème étant plus grave dans les zones arides et semi-arides (Garg et Chandel,2010).

Même si la salinité affecte la formation et la fonction de la symbiose mycorhizienne (Juniper et Abbott, 2006), les CMA se reproduisent naturellement dans les milieux salins (Garcia et Mendoza, 2007) et se sont montrés efficaces pour augmenter le rendement des plantes dans ces milieux.

Plusieurs études ont montré que l'inoculation de champignons mycorhiziens améliore la croissance et la productivité des plantes dans diverses conditions de stress salin (Giri *et al.*, 2007).

1.4.3. Protection des 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 (Linderman, 1992). 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 (Akhtar et Siddiqui, 2008).

1.4.4. 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 (Vivas *et al.*, 2005).

Les CMA interviennent dans les interactions entre la plante et les métaux toxiques du sol, en réduisant la toxicité de ces métaux. Par conséquent, les CMA jouent un rôle écologique important dans la phyto-stabilisation des sols pollués par les éléments traces et potentiellement toxiques (Garg et Chandel, 2010).

1.4.5. 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 (Brundrett et Abbott, 2002).

2. FAMILLE DES LAMIACEES

2.1. Généralités

Les Lamiacées, anciennement appelée Labiées, est l'une des familles les plus vaste dans le règne végétal. Elles constituent l'une des principales familles de plantes dicotylédones, elle comprend approximativement 240 genres et 7200 espèces (Harley et *al.*, 2010), plus ou moins cosmopolites, mais particulièrement répandues depuis le Bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (Botineau, 2010).

Les lamiacées sont des plantes herbacées, rarement ligneuses, souvent velues. Elles sont caractérisées par une tige à section carrée, des feuilles opposées à limbe denté, des fleurs irrégulières : calice à cinq pétale soudés, corolle en forme de tube se terminant par deux lèvres, quatre étamines (fig. 7) (Iserin, 2001).

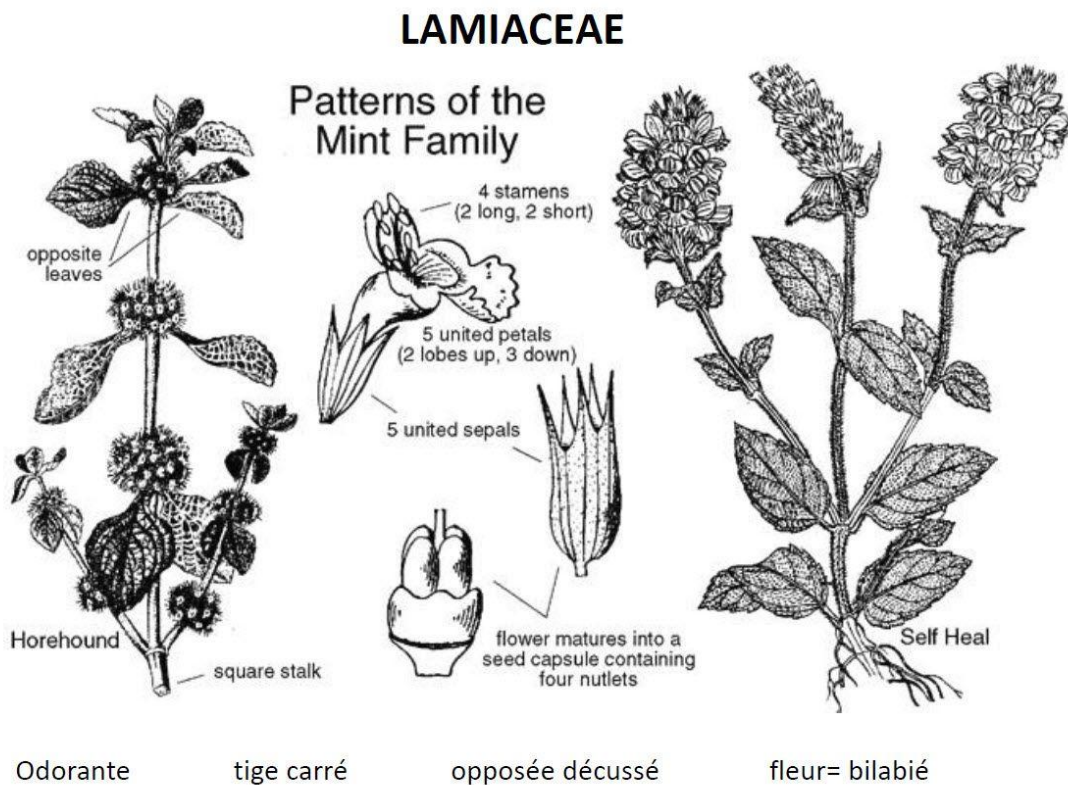


Figure 7: Représentation schématique générale des lamiacées (Rothmaler, 1995).

Les Lamiaceae est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant. Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leur sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes (Hilan et al., 2006).

En Algérie, on énumère les genres : *Lamium*, *Phlomis*, *Ballota*, *Stachys*, *Salvia*, *Nepeta*, *Pitardia*, *Prunella*, *Cleonia*, *Marrubium*, *Sideritis*, *Melissa*, *Ziziphora*, *Satureja*, *Origanum*, *Thymus*, *Thymbra*, *Lycopus*, *Mentha*, *Lavandula*, *Prasium*, *Ajuga*, *Teucrium* et *Rosmarinus* (Valdes et al., 2002).

2.2. Espèces étudiées

2.2.1. *Thymus ciliatus*

2.2.1.1. Origine

L'origine du nom est sujette à diverses interprétations : Thym proviendrait du mot latin « *Thymus* » dérive du mot grec « thymos » qui signifie « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante, 2001).

2.2.1.2. Description botanique

Thymus ciliatus (Desf) Benth. de la famille de lamiaceae est une plante aromatique endémique qui se trouve à l'état spontané sous forme d'un sous-arbrisseau très ramifié à la base et très feuillu présentant un polymorphisme remarquable (Hazzit, 2009).

Le thym peut atteindre 40 centimètres de hauteur, pouvant former des touffes bien étalées sur le sol. Les petites feuilles florales sont peu dilatées et opposées, sans stipules, courtement pétiolées, oblongues, glabres, mais généralement ciliées à la base et un peu enroulées sur les bords colorées (Hans, 2007). Les feuilles sont sessiles, elliptiques, lancéolées. La tige généralement tétra-angulaire est très ramifiée et ligneuse en sa partie inférieure (fig. 8). La période de floraison de l'espèce a lieu, Mai à Août (Prasanth et al., 2014).



Figure 8: Caractères morphologiques de *Thymus ciliatus*(Desf.) Benth. (Iserin, 2001).

2.2.1.3. Systématique

La classification botanique de *Thymus ciliatus*(Dobignard et Chatelain, 2012) :

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Embranchement : Magnoliophyta
- Sous-embranchement : Magnoliophytina
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Thymus*
- Espèce : *Thymus munbyanus* Boiss. & Reut

2.2.1.4. Noms vernaculaires

Plusieurs appellations de *Thymus ciliatus* ont été reportées dans la littérature :

Nom Français : Thym (Trabut, 1935).

Nom arabe : Zaitra (Quezel & Santa, 1963).

Nom berbère : Azukni, Tazuknite, Djertil (Trabut, 1935 ; Quezel & Santa, 1963).

2.2.1.5. Habitat

Le thym est une espèce endémique de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) (Benabid, 2000). *Thymus ciliatus* est une espèce qui pousse autour du bassin méditerranéen et dans le Nord de l'Algérie. Le thymus comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Nickavar et al., 2005) dans toutes les régions montagneuses. Elle est rencontrée dans les pelouses, les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailloux (Hans, 2007).

2.2.2. *Ballota nigra*

2.2.2.1. Origine du nom

La ballote noir c'est un nom français dérivant du nom latin *Ballota nigra* : *Ballota* vient du grec *Ballo*, qui signifie « je rejette » car l'odeur de la plante est plutôt désagréable, ou de *Balloté*, qui désignait déjà l'espèce. L'épithète *nigra* c'est-à-dire noire, fait allusion à ses feuilles qui noircissent lorsqu'elles vieillissent (Sangwan et al., 2001).

2.2.2.2. Description botanique

La Ballote ou Ballote noire (*Ballota nigra*) fait partie de la famille des Lamiacées. La Ballote est une plante herbacée, vivace, à croissance rapide et de 30 à 85 cm de haut, avec des tiges quadrangulaires, très velues, sont ramifiées près de leur base et portent des feuilles opposées (fig. 9) (Sangwan et al., 2001), d'un vert sombre légèrement grisé et à pétiole court. Elles ne dépassent pas 5 cm de long et 3,5 cm de large. Le limbe est ovale ou arrondi à bords irrégulièrement crénelés et présente une nervation marquée au niveau de la face inférieure (Lee et al., 2004; Franz et al., 1995); Froissée, il émane de la plante une forte odeur fétide; sa saveur est amer (Sangwan et al., 2001). Les fleurs sont assez grandes, purpurines, elles s'épanouissent au mois de Mai, parfois encore jusqu'au début de l'hiver. Les fleurs de *Ballota nigra* sont ciliées, non épineuses (Beloued, 2012).

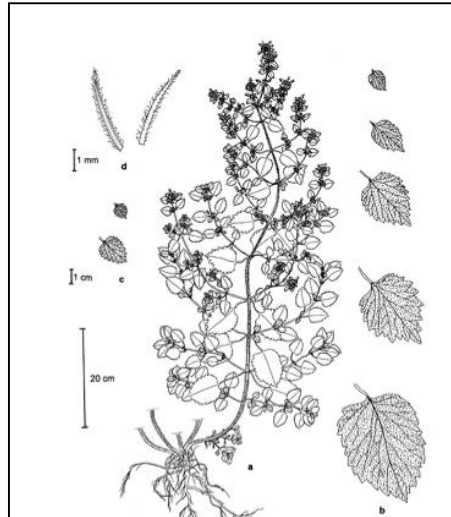


Figure 9 : Caractères morphologiques de *Ballota nigra* (Nurten, 2005).

2.2.2.3. Systématique

La situation botanique de l'espèce *Ballota nigra* L. est donnée ci-dessous (Goetz et Ghédira, 2012):

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Embranchement : Magnoliophyta
- Sous-embranchement : Magnoliophytina
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Ballota*.
- Espèce : *Ballota nigra* L.

2.2.2.4. Noms vernaculaires

Noms vulgaires : ballote, ballote noire, ballote fétide, ballote puante, marrube noir ; marrube fétide (Balansard, 1934).

Nom arabe : feraciounaçoued (Beloued, 2012).

Nom anglais : black horehound (Balansard, 1934).

2.2.2.5. Habitat

La ballote noir est rencontré dans presque toute l'Europe, en Asie occidentale et en Afrique septentrionale. La ballote noir pousse sur les décombres, les bords de chemins et de haies, les terrains vagues et les lieux incultes. Il s'agit d'une plante rudérale, aimant les sols azotés, Légers et un peu humides où elle croît par grosses touffes (Balansard, 1934).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Le travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) du département de Biotechnologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb, Blida. Les analyses de sol ont été effectués au niveau du laboratoire de pédologie de l'Institut National des Sols, de l'Irrigation et du Drainage (I.N.S.I.D.) d'El Harrach.

La durée de stage était de quatre mois (du mois du Février au mois de Juin 2019).

1. MATERIEL

1.1. Matériel végétal

L'étude a porté sur deux espèces de plantes spontanées appartenant à la famille des Lamiacée, il s'agit de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra* (Fig. 10 et 11) récoltées dans le Parc National de Chréa, wilaya de Blida. Les deux espèces ont été identifiées au département de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomiques (ENSA) d'El-Harrach.



Figure 10 : Aspect botanique de *Ballota nigra* **Figure 11** : Aspect botanique de *Thymus ciliatus*

2. METHODES

2.1. Echantillonnage

Pour chaque espèce végétale, cinq individus situés à des distance variable les uns des autres sont choisis au hasard, autour du pied de chaque plante sélectionnée des prélèvements de racines

ainsi que de sol rhizosphérique ont été réalisés par Mme Faïdi au mois de juillet 2018 dans deux régions différentes du parc national de Chréa, Pour *Ballota nigra*, l'échantillonnage a été effectué dans la région de Hakkou Ferraoun. cependant, les échantillons de *Thymus ciliatus* ont été récoltés à Chréa à 1519m d'altitude.

2.2. Traitement et conservation des échantillons

2.2.1. Racines

Seules les radicules et les racines fines sont prélevées car elles sont plus susceptibles d'être mycorhizées et plus facilement observables au microscope. Elles sont abondamment lavées à l'eau pour éliminer toutes les particules de sol et conservées dans l'éthanol 70° dans des flacons soigneusement étiquetés.

Les échantillons de racines ont servi à l'étude du statut mycorhizien de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra*.

2.2.2. Sol

Le prélèvement du sol rhizosphérique est effectué à des profondeurs variant de 10 à 20cm. Les cinq échantillons de sol prélevés sont mélangés pour obtenir un seul échantillon de sol représentatif pour chaque espèce. Après une semaine de séchage à l'air libre, le sol est tamisé (à mailles 2mm) et conservé dans des sachets à 4°C. Le témoin correspond à un sol nu prélevé dans le même site.

Les échantillons de sol (1 à 1,5 kg par espèce) ont servi pour l'évaluation du potentiel infectieux mycorhizogène (PIM).

2.3. Analyses physico-chimique des sols

Le sol prélevé autour des deux plantes est soumis à une analyse physico-chimique. Les analyses sont réalisées au niveau du laboratoire de pédologie de l'Institut National des Sols, de l'Irrigation et du Drainage (I.N.S.I.D.) d'El Harrach.

Les paramètres analysés sont : la texture (granulométrie), le pH, la conductivité électrique (CE), le taux du carbone (C%), le phosphore assimilable, l'azote total, le taux de matière organique (MO%) et le calcaire total.

2.3.1. Analyse granulométrique

Elle est réalisée pour définir la texture du sol. Le principe de cette analyse est de classer les éléments du sol d'après leurs grosseur et de déterminer le pourcentage de chaque fraction (sable, limon, argile) (Rouiller et *al.*, 1994). L'analyse granulométrique est déterminée par la méthode de la pipette de Robinson. La terre fine obtenue par tamisage au tamis à mailles de 2mm, est utilisée. La matière organique est éliminée par un oxydant (H_2O_2) et la durée d'exposition dépend de la teneur en matière organique (24 à 48h). Les particules minérales sont ensuite dispersées à l'aide d'un dispersant alcalin (hexametaphosphate de sodium). Les particules grossières de diamètre supérieure à 50 μm sont séparées par tamisage et les particules moyennes et fines sont obtenues par la mesure de la vitesse de sédimentation. La texture de sol est définie d'après le triangle des textures (annexe 4).

2.3.2. Mesure de pH

Le principe consiste à mesurer le pH d'un mélange de 20g de sol tamisé à 2 mm avec 50ml d'eau distillée. Le contenu est agité pendant quelques minutes puis filtré à travers un papier filtre. Le pH du filtrat est ensuite mesuré à l'aide d'un pH mètre (Callot-Dupuis, 1980).

2.3.3. Mesure de conductivité électrique (CE)

Elle consiste à déterminer la conductivité électrique (CE) du mélange eau /sol pour déterminer le niveau de la salinité du sol. Un mélange de 1/5 du sol avec 4/5 d'eau distillée est agité quelque minute, ensuite la solution est chauffée à 25°C (T), une première lecture est réalisée à cette température (CT) à l'aide du conductivimètre, puis chauffée à 35°C (T') et une deuxième lecture est réalisée (CT')(Aubert, 1978).

Le coefficient de température β est calculé comme suit :

$$\beta = (CT' - CT) \times 100 / (T' - T) \times CT.$$

La conductivité électrique est exprimée en milli Siemens (mS) et le degré de la salinité du sol est évalué en se référant aux normes internationales de la salinité (Annexe 4).

2.3.4. Dosage du calcaire total

Le calcaire n'est pas un constituant toujours présent dans le sol. Par contre pratiquement tous les sols contiennent du calcium si peu soit-il, cet élément se trouvant en particulier fixé sur l'argile sous forme d'ion calcique ou en solution sous forme de sels solubles de calcium.

Le calcaire ou carbonate de calcium, CaCO_3 , est un sel insoluble mais l'eau chargée de gaz carbonique peut le dissoudre lentement le transformant en un sel soluble, le bicarbonate de calcium. C'est ainsi que peu à peu le calcaire disparaît d'un sol donné, mais solution du sol et l'argile gardent très longtemps du calcium provenant de la dissolution du calcaire.

On utilise selon la méthode (Callot-Dupuis, 1980), la propriété du carbonate de calcium qui se décompose sous l'action d'un acide (HCl) en eau et gaz carbonique, ce dernier est recueilli dans un tube gradué en ml.

$$\text{CaCO}_3\% = (p \times V) \times 100 / (P \times v)$$

P : poids du CaCO_3 pure utilisé pour l'étalonnage.

V : volume du gaz carbonique dégagé par l'échantillon du sol.

P : poids de l'échantillon du sol.

v : volume de gaz carbonique dégagé par le CaCO_3 .

2.3.5. Matière organique et Carbone total

La teneur en matière organique totale du sol est obtenue généralement par le dosage du carbone (C%). Le rapport MO/C est estimé à environ (= 1,72) (Anne, 1945).

Le carbone de la matière organique est oxydé par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique (H_2SO_4). On admet que l'oxygène consommé est proportionnel au carbone que l'on veut doser. L'excès de bichromate inutilisé dans la réaction est dosé par le sel de Mohr.

Les quantités de la matière organique mesurées sont comparées avec les normes internationales (annexe 4).

2.3.6. Phosphore assimilable

Le but est d'estimer la part du phosphore, exprimé en anhydride phosphorique (P_2O_5), présent dans le sol et susceptible de participer à l'alimentation des végétaux. Les méthodes permettent de mettre en solution le P_2O_5 dit assimilable qui est ensuite dosé par photolorimétrie.

Il existe différentes méthodes chimiques d'extraction, dont le but est d'estimer la part du phosphore, exprimé en anhydride phosphorique (P_2O_5), présent dans le sol et susceptible de participer à l'alimentation des végétaux. Ces méthodes permettent de mettre en solution le P_2O_5 dit assimilable qui est ensuite dosé par photolorimétrie.

La méthode Olsen (1954) est utilisée dans cette étude, elle consiste à extraire le phosphore dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium 0,5 N ajusté à pH 8,5 dans un rapport prise d'essai/volume d'extraction ($m/v = 1/20$). Le dosage est basé sur la formation et la réduction d'un complexe formé par l'acide phosphorique et l'acide molybdique. Le complexe phospho-molybdique, sous l'effet de la chaleur et en présence d'acide ascorbique développe une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de la solution en orthophosphate.

Les quantités de phosphore assimilable mesurées sont comparées avec les normes universelles (annexe 4).

2.3.7. Mesure de l'azote total

La méthode suivie est celle de Kjeldahl (1883). Elle consiste à une digestion acide du sol suivie d'une distillation. Le sol est traité avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) dans un rapport sol/Solution 1/20 en présence d'un catalyseur de sélénium. La distillation est réalisée par

l'entraînement à la vapeur en présence de 40ml de NaOH 1N et le distillat est recueilli dans 20ml d'acide borique et 4 gouttes de rouge de méthyle. A la fin, le titrage est fait avec l'acide sulfurique 10N.

Les quantités d'azote total mesurées sont comparées avec les normes universelles (annexe 4).

2.4. Mise en évidence de la colonisation mycorhizienne à arbuscules

Dans les racines, la mise en évidence de la colonisation endomycorhizienne est réalisée grâce à une adaptation de la technique de Phillips et Hayman (1970). Cette technique nécessite trois étapes : l'éclaircissement des racines, la coloration des champignons et en fin l'observation au microscope photonique

• Eclaircissement

Les racines fines non lignifiées des deux espèces étudiées sont bien rincées afin de les débarrasser de toute particule d'éthanol puis découpées en fragments d'environ 1cm de longueur. Les fragments racinaires sont trempés dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 10 % et placés dans une étuve à 90°C pour vider les cellules de leur contenu cytoplasmique. Après environ 60minutes pour *Thymus ciliatus* et 45 minutes pour *Ballota nigra* (cette durée change selon l'épaisseur et la fragilité des fragments racinaires), les fragments racinaires sont rincés à l'eau afin d'éliminer toute trace de KOH, puis ils sont plongés dans de l'acide lactique à 10 % pendant quelques minutes pour neutraliser le KOH restant et pour les blanchir, puis un nouveau rinçage à l'eau est effectué.

• Coloration

Les racines ainsi éclaircies, sont ensuite colorées dans une solution de bleu de Trypan à 0,05% (Annexe 1) à l'étuve à 90°C pendant 20 minutes. Les racines colorées sont conservées dans des flacons étiquetés contenant du glycérol+ eau distillée (v/v) qui permet de diluer le colorant non fixé et d'empêcher le dessèchement.

• Montage et observation

60 à 100 fragments racinaires sont montés entre lames et lamelles, à raison de 10 fragments par lame, dans du glycérol et observés au microscope photonique. Chaque fragment est soigneusement vérifié sur toute sa longueur aux grossissements $\times 10$ et $\times 40$. La mycorhization s'observe par une coloration bleue foncée des structures fongiques dans les racines.

2.5. Estimation des paramètres de la colonisation mycorhizienne

La méthode de Trouvelot et *al.* (1986) est utilisée pour l'estimation du degré de colonisation mycorhizienne de chaque fragment. Elle consiste à estimer la proportion de cortex racinaire qui est mycorhizée, et de prendre en compte l'ensemble des structures des CMA (hyphes, arbuscules, vésicules)(Fig. 12). Les fragments racinaires observés sont notés dans une grille selon un barème de classe (Annexe 2).

Avec cette méthode, trois paramètres de la colonisation sont calculés, à savoir :

- Fréquence de la colonisation mycorhizienne (F%) : pourcentage du nombre de fragments racinaires mycorhizés, elle reflète l'importance des points de pénétration de la colonisation du système racinaire.

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

Où : N = nombre de fragments observés

n_0 = nombre des fragments non mycorhizés

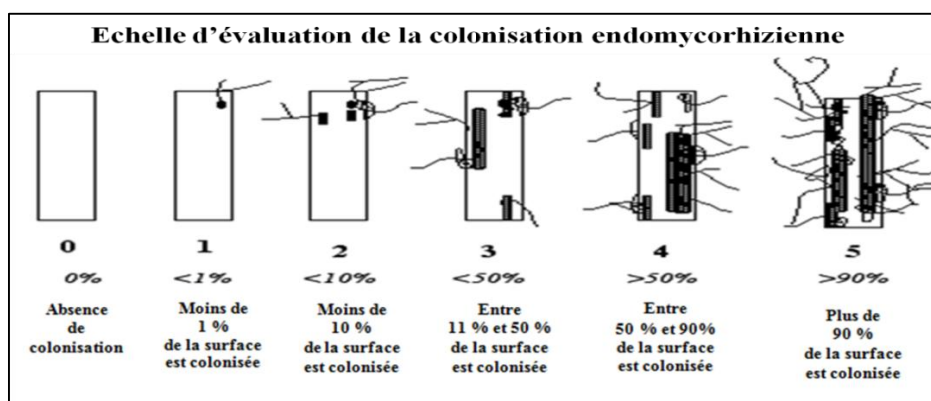


Figure 12 : Notation de la colonisation endomycorhizienne (de classe 0 à classe 5)

(d'après Trouvelot et *al.*, 1986).

- Intensité de la colonisation du cortex racinaire ou intensité de mycorhization relative (M%) : proportion du cortex colonisé estimée par rapport au système racinaire entier, elle reflète l'importance de la colonisation du système racinaire.

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

n_5 = nombre de fragments notés 5, n_4 = nombre de fragments notés 4, n_3 = nombre de fragments notés 3, n_2 = nombre de fragments notés 2

- Intensité de la colonisation développée dans la partie mycorhizée du système racinaire ou intensité de mycorhization absolue (m%) : proportion du cortex colonisé dans la partie mycorhizée du système racinaire.

$$m (\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2) / (N - n_0)$$

Le calcul de ces paramètres a été réalisé par l'utilisation du programme informatique MYCOCALC, disponible sur le site Internet <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/>

2.6. Détermination du potentiel infectieux mycorhizogène

Le potentiel infectieux mycorhizogène (PIM) d'un sol représente sa capacité à initier la formation d'une association mycorhizienne à partir d'une quantité d'inoculum présente dans ce sol sous forme de spores, de mycéliums et de débris racinaires portant des vésicules (Plenchette, 1989).

La méthode utilisée pour évaluer le PIM a été décrite par Plenchette (1989). Elle consiste à cultiver de jeunes plants mycotrophes sur une série de dilutions de sol naturel avec le sol stérile.

Le sol utilisé est celui échantillonné sous les espèces (sol rhizosphérique) dilué par un sol sableux stérilisé à l'autoclave à 120°C deux fois pendant une durée de une heure à 24 heures d'intervalle. Un témoin de sol récolté loin de l'influence des racines est prévu.

2.6.1. Préparation des dilutions de sol

Six dilutions sont réalisées en triplicata (trois répétitions) (tab.1) pour chaque sol échantillonné. L'homogénéisation des sols mélangés est déterminante pour la bonne conduite de

l'expérience. Pour ce faire, les mélanges sont réalisés par l'ajout d'une quantité de sol non stérilisé avec d'autre quantité de sol stérilisé, dans des sacs en plastique qu'on agite vigoureusement. Par exemple : pour la dilution 3, nous avons pesé 12g de sol non stérilisé et nous avons ajouté 88g de sol stérilisé pour obtenir un mélange de 100g pour cette dilution.

Tableau 1 : Différentes quantités de sol non stérilisé et stérilisé utilisées lors des dilutions.

Dilutions de sol	1	2	3	4	5	6
Quantité de sol non stérilisé (g)	3	6	12	24	48	100
Quantité de sol stérilisé (g)	97	94	88	76	52	0

2.6.2. Production des plantes-test

Le sorgho (*Sorghum sudanense*), de la famille des Poacées, est retenu comme plante hôte mycotrophe. Il s'agit d'une espèce peu exigeante offrant une grande aptitude à la production rapide de racines néoformées et étant également fortement mycotrophe (Planchette et Morel, 1996), c'est-à-dire qu'elle peut s'associer avec diverses espèces de CMA et avec un très fort taux de colonisation.

• Pré-germination/ transplantation

Le recours à la pré-germination présente l'avantage de fournir aux expériences une population uniformisée de plantules ayant préalablement poussé dans les mêmes conditions, et de contourner les problèmes de graines non germées (Planchette et *al.*, 1989).

• Désinfection superficielle

Les graines du sorgho achetées au commerce sont immergées dans de l'eau distillée pendant 15 minutes, elles sont ensuite désinfectées avec l'hypochlorite de sodium à 10 % additionnées de deux gouttes de Tween 20 (mouillant) pendant 20 minutes avec agitation. Quatre rinçages successifs sont réalisés à l'eau distillée préalablement stérilisé à 120°C pendant 20 min.

❖ Mise en germination

Les graines désinfectées sont mises à germer dans des boîtes de Pétri stériles sur papier filtre stérile imbibé d'eau distillée stérile. La pré-germination est réalisée à l'étuve à 25 °C pendant quatre jours.

❖ Transplantation

Les graines pré-germées obtenues sont repiquées dans des petits pots en plastique contenant 100g de chacune des dilutions de sol à raison de dix graines par pot. 1cm de gravier stérile est placés au fond du pot pour l'aération. Les jeunes plantules sont arrosées avec de l'eau distillée stérile selon le besoin.

Le test biologique a donc nécessité un total de 54 pots (3solsx 6dilutionsx 3répétitions) (fig.13).

• Conditions de croissance

Pour la détermination du PIM, la plupart des auteurs utilisent des chambres de cultures dans lesquelles les conditions sont contrôlées et parfois les serres. Néanmoins, par manque de chambres de culture ou de serre climatisée pour accueillir notre expérience nous étions contraint à envisager une autre solution. Le seul espace intérieur disponible était la paillasse du laboratoire à température ambiante et où la source lumineuse était la lumière naturelle traversant la baie vitrée située sur un des murs. Les plantes ont été arrosées selon le besoin à l'eau distillée stérile . La culture a duré trois semaines.

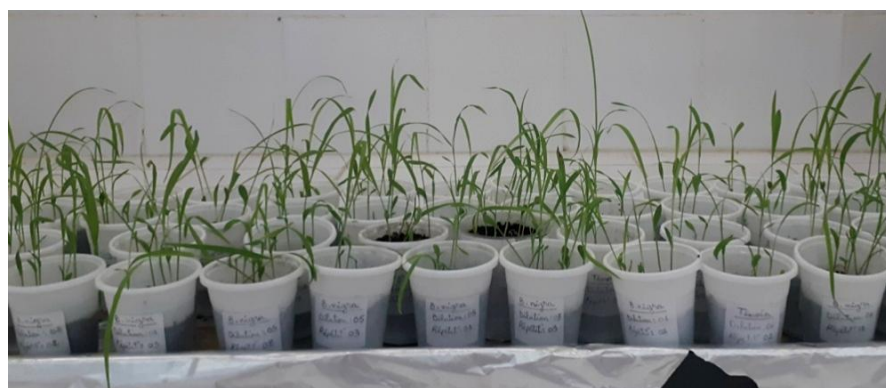


Figure 13 : Culture de sorgho.

2.6.3. Récolte et traitement du système racinaire

• Dépotage

Après trois semaines de culture, les sols sont dépotés, les plantules sont sectionnées au collet, et le système racinaire est séparé du substrat par un lavage à l'eau. Chaque pot contenant plusieurs plantules, l'objectif est de récupérer chaque système racinaire séparément pour chaque plantule. Le fait de mouiller abondamment le sol avant de le dépoter permet d'avoir un sol plus friable, facilitant l'opération.

Après dépotage, chaque système racinaire est conservé individuellement dans l'éthanol à 70° dans des tubes soigneusement étiquetés.

• Coloration et Observation

Chaque système racinaire est coloré dans sa totalité par la méthode de Phillips et Hayman (1970) décrite précédemment. Les racines sont ensuite découpées en fragments montées parallèlement entre lames et lamelles et observées au microscope photonique.

• Estimation du potentiel mycorhizien

Chaque système racinaire récolté est classé selon la présence ou l'absence de colonisation mycorhizienne. L'observation d'une seule structure mycorhizienne permet d'affirmer le résultat positif, alors que l'affirmation du résultat négatif demande l'observation de la totalité du système racinaire. La difficulté est de différencier un vrai positif, contenant des CMA, d'un faux positif, qui peuvent être d'autres champignons. L'affirmation du vrai positif a lieu si au moins une des trois caractéristiques suivantes sont diagnostiquées : (i) présence de vésicules, (ii) présence d'arbuscules, (iii) présence de mycélium non cloisonné pénétrant dans la racine.

2.6.4. Calculs

Le nombre de plantes mycorhizées/pot est enregistré et les résultats sont exprimés en pourcentage de plantes mycorhizées / pot.

Pour chaque sol testé, des régressions linéaires $y = \alpha x + \beta$ sont calculées à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées (y) en fonction du logarithme de la quantité de sol non stérilisé (x). Deux estimateurs sont construits par la méthode des moindres carrés : α et β , estiment respectivement la pente et l'intersection de la droite avec l'ordonnée (Planchette et *al.*, 1989).

2.7. Analyses statistiques

Les données sont calculées sous forme d'une moyenne de 3 répétitions à l'aide du logiciel EXCEL 2007 et les graphiques sont réalisés également à l'aide du même logiciel. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% ($p < 0,05$) pour évaluer la signification de l'effet seuil Pen utilisant le logiciel SPSS 8.0.

Chapitre III

Résultats et Discussion

Résultats

1. Analyses physico-chimiques des sols

L'analyse des paramètres physico-chimiques des sols prélevés autour de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra* a permis d'obtenir les résultats consignés dans les deux tableaux ci-dessous.

Tableau 2 : Granulométrie des sols rhizosphériques de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra*.

	Granulométrie				
	Argile (%)	Limon f (%)	Limon g (%)	Sable f (%)	Sable g (%)
<i>T. ciliatus</i>	4.33	48	18.07	7.2	22.4
<i>B. nigra</i>	7.16	45.84	2.34	9.5	35.16

f : fin, g : grossier

La lecture des résultats de la granulométrie (Tableau 2) et (Annexe 6) avec leur extrapolation sur le triangle des textures (Annexe 4) ont permis de conférer la texture limoneuse aux deux sols rhizosphériques.

Tableau 3 : Paramètres physico-chimiques des sols rhizosphériques de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra*.

	pH	CE (%)	CaCO ₃ (%)	N total (%)	P ₂ O ₅ (ppm)	MO (%)	C total (%)
<i>T. ciliatus</i>	7.19	0.92	0.63	0.22	28.48	7.84	4.55
<i>B. nigra</i>	7.20	0.19	3.36	0.19	51.63	6.65	3.86

pH : potentiel d'hydrogène, CE : Conductivités Electriques, CaCO₃ : carbonate de calcium, N : azote, P₂O₅ : anhydride phosphorique (phosphore assimilable), MO : matière organique, C : carbone.

L'examen du tableau 3 et des tableaux des normes de chaque paramètres étudiés (Annexe 4) révèle que les sols rhizosphériques des deux espèces sont alcalins. La conductivité électrique, qui indique l'état de salinité, est de 0.19 pour *B. nigra* et de 0.92 pour *T. ciliatus*; les deux sols sont donc non salins. Les valeurs de l'azote total ($0.15 < N\% < 0.25$) indiquent une richesse en azote. Cependant, la quantité de phosphore assimilable est plus importante (51.63 ppm), environ le double, dans le sol où pousse la ballote par rapport au sol où pousse le thym (28.48 ppm). Les deux sols sont très riches en matière organique (MO% >6) et ne sont pas de nature

calcaire (CaCO_3 % < 5) néanmoins, le sol où pousse la ballote semble plus riche en carbonates de calcium (3.36%) comparé au sol où pousse le thym (0.63%).

2. Statut mycorhizien des deux espèces

Les examens microscopiques des fragments de racines traitées selon la méthode modifiée de Phillips et Hayman (1970) et colorées au bleu Trypan révèlent la présence de toutes les structures caractéristiques des CMA (des hyphes, des *appressoria*, des vésicules, des arbuscules et des spores) (fig.14 et fig.15) chez les deux espèces végétales étudiées. La colonisation endomycorhizienne est donc de type arbusculaire.

2.1. Structures des MA

Les différentes structures que nous avons observé sont :

- **Hyphescœnocytiques extra et intra-racinaires**

Les hyphes extraradiculaires sont observés sur les racines des deux espèces étudiées (fig.14c), ils sont épais et fortement colorés au bleu de Trypan, ils présentent le diamètre le plus important et portent parfois des spores (fig.14m).

Les hyphes intraradiculaires (fig.14c,i et fig.15h), ayant un diamètre moins important, sont soit intercellulaires (l'hyphe se développant entre les parois des cellules) portant parfois des vésicules intercellulaires (fig.15g), soit intracellulaires (l'hyphe pénètre la cellule et se développe à l'intérieur). Des hyphes droits intensément colorés au bleu de Trypan s'étendent entre les cellules racinaires et se ramifient parfois en prenant des formes d'un « Y » et des liaisons en « H » (Fig.14h,l).

- ***Appressorium***

les hyphes fongiques entrent en contact avec les racines et forment des structures d'adhésion appelées *appressorium* ou hyphopodium (point d'entrée du champignon) (fig.14b et fig.15b), c'est un gonflement de l'extrémité de l'hyphe qui se forme après contact avec les cellules épidermiques, c'est un signe de reconnaissance entre le champignon et les racines d'une plante.

Différents aspects d'*appressorium* sont observés dans les racines des deux plantes étudiées(fig.15c).

- **Peletons**

Les hyphes progressent dans le cortex racinaire puis s'enroulent en peletons mycéliens (fig.14b,i et fig.15c) qui sont parfois présents à l'intérieur des cellules les plus externes du cortex. Ils sont beaucoup plus abondants au point de pénétration de l'hyphe lors de la colonisation de la plante.

- **Arbuscules**

Les hyphes intercellulaires pénètrent les cellules du cortex interne et se ramifient pour former des structures rappelant des petits arbres, les arbuscules intracellulaires, composés d'un tronc gonflé appelé le tronc arbusculaire et de ramifications de plus en plus fines (fig.14e,f,g,i et fig.15d,e). Ils ont été rarement observés dans les racines des deux plantes étudiées. La présence des arbuscules est un signe d'une colonisation en phase active.

- **Vésicules**

Les vésicules sont des renflements (dilatations) des extrémités des hyphes mycéliens. Elles sont observées en nombre important, de différentes formes(de sphérique à ovale ou allongées) et de différentes tailles, elles sont dotées de quelques déformations (fig.14k,n,p et fig.15f,h,i) . Elles sont surtout intercellulaires mais peuvent aussi se former à l'intérieur des cellules (fig.14j,p et fig.15g). La présence des vésicules est un signe d'une colonisation ancienne (sénescence).

- **Spores**

Les spores extra ou intraradiculaires (intercellulaires) sont également observées attachées à une hyphe suspenseur (Fig.14m,n,o), elles sont de petite taille et de forme globulaire ou sphérique.

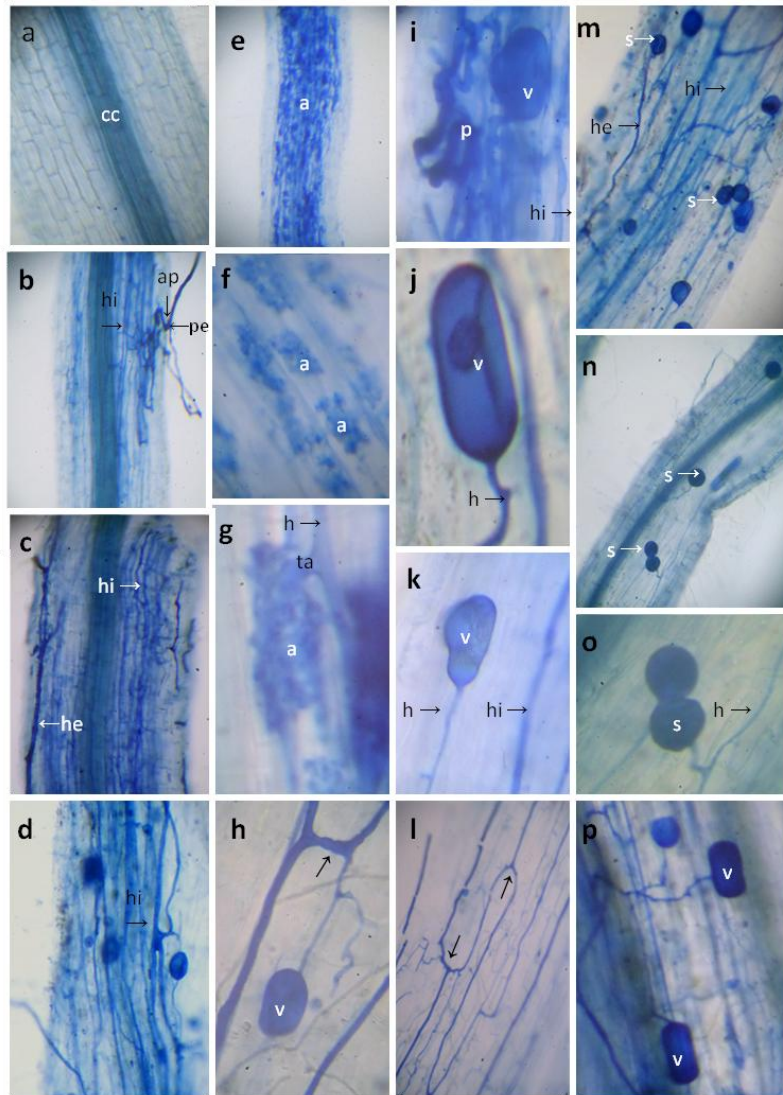


Figure 14: Structures mycorhiziennes arbusculaires observées dans les racines de *Ballotanigracolorées* au bleu de Trypan.

a: fragment racinaire non mycorhizé, cylindre central (cc); **b:** point d'entrée (pe), appressorium (ap), hyphes extraracinaires (he) et intraracinaires (hi); **c,d:** fragments racinaires fortement colonisés; **e,f:** arbuscules (a); **g:** détail d'un arbuscule montrant le tronc arbusculaire (tr); **h:** jonction en H des hyphes (flèche); **i:** détail des pelotons d'hyphes (p); **j,p:** différentes formes de vésicules (v), **l:** ramification en Y des hyphes (flèche); **m, n, o:** spores (s).

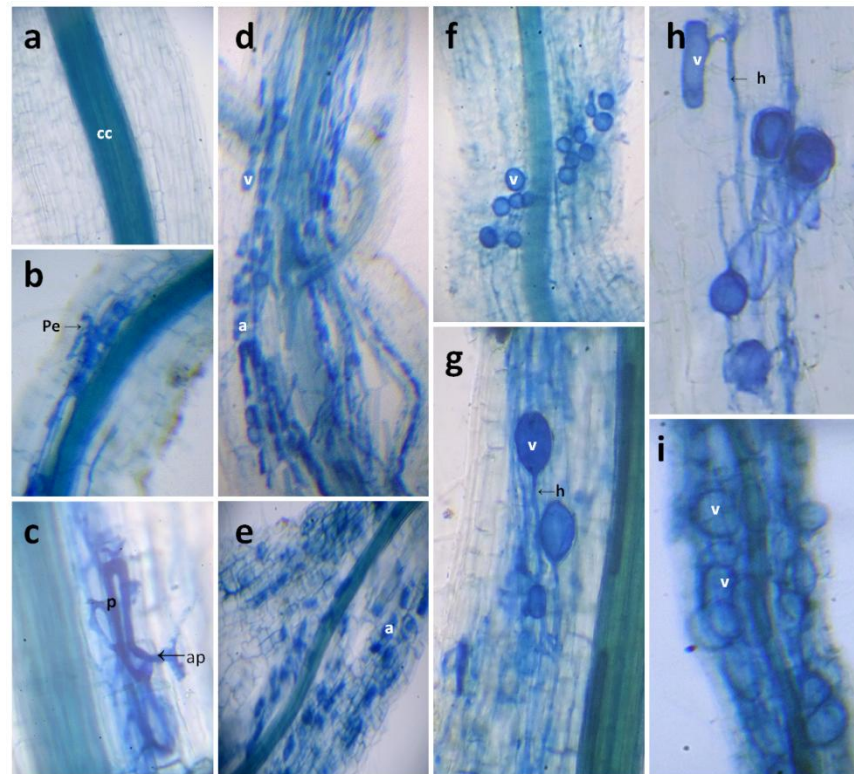


Figure 15: Structures mycorrhiziennes arbusculaires observées dans les racines de *Thymus ciliatus* colorées au bleu de Trypan.

a: racine non mycorhizée, cylindre central (cc); **b, c:** point d'entrée (pe), appressorium (ap) et peleton d'hyphe (p); **d, e:** fragments racinaires fortement colonisés montrant des arbuscules (a); **f, g, h, i:** différentes formes de vésicules (v) et des hyphes

2.2. Structures des pseudomycorhizes

Lors des examens microscopiques des racines, nous avons remarqué dans les systèmes racinaires de thym et de ballote, en plus des structures des CMA, la présence d'autres espèces fongiques à mycélium septé bien colorées au bleu Trypan. Ces espèces sont les endophytes non mycorrhiziens.

Les endophytes foncés septés (Dark Septate Endophyte ou DES) ont été aussi observés dans les fragments racinaires (Fig.16). Ils se caractérisent par la présence d'hyphes cloisonnées (Fig.16a,b) pouvant produire des microsclérotés de formes variées dans les cellules corticales (Fig. 16a,b). Ces structures sont observées chez les deux espèces étudiées.

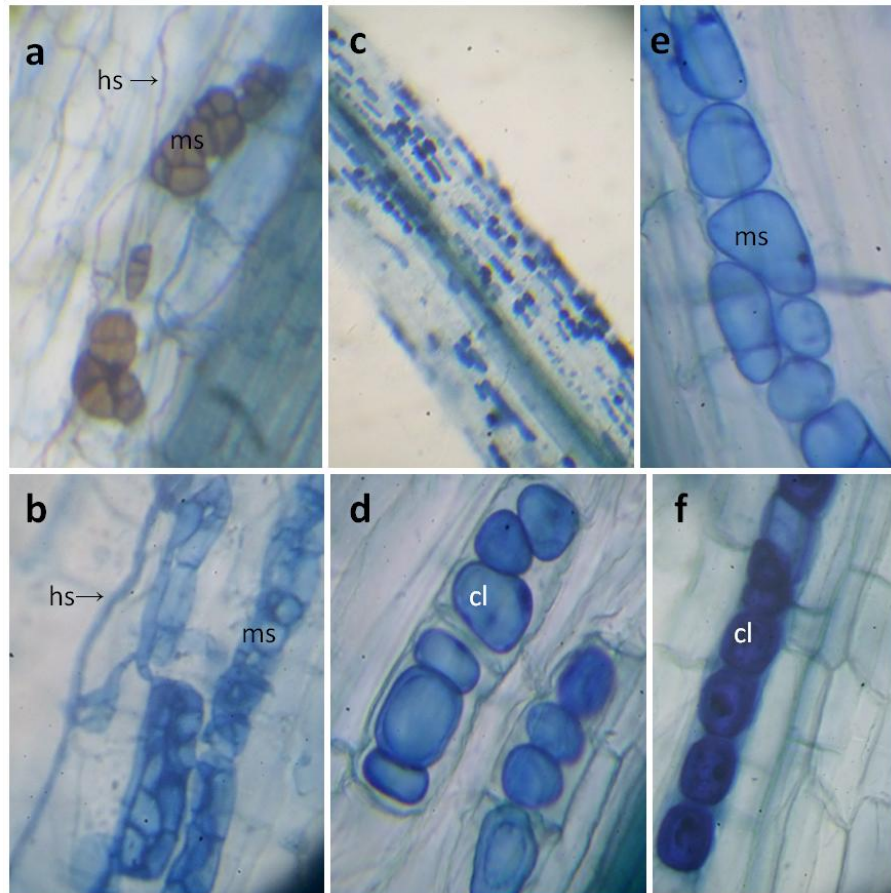


Figure 16 : Structures des endophytes non mycorhiziens dans les racines de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra*.
(ms: microsclérote; hs: hyphe septé; cl: clamidospore)

3. Estimation de la colonisation mycorhizienne

Les résultats de calcul des paramètres de la colonisation mycorhizienne arbusculaire selon la méthode de Trouvelot (1986) sont représentés dans le tableau I (Annexe 3) et illustrés par la figure 17.

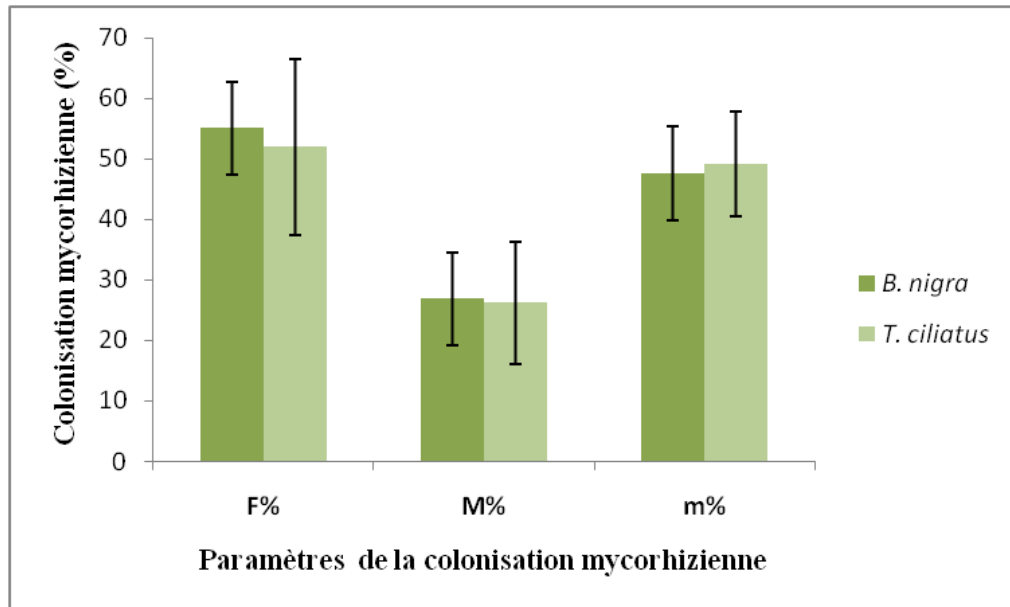


Figure17 : Paramètres de la colonisation mycorhizienne à arbuscules (F% : Fréquence de mycorhization, M% : Intensité mycorhizienne de système racinaire, m% : Intensité mycorhizienne des fragments racinaires mycorhizés) chez *Thymus ciliatus* et *Ballota nigra*.

L'analyse de la figure ci-dessus révèle que *Thymus ciliatus* et *Ballota nigra* se sont montrées mycotrophiques (dépendante de la mycorhization). En effet, leurs fréquences de mycorhisation (F%), paramètre qui reflète l'importance des points de pénétration de la colonisation du système racinaire, sont respectivement de 51,93% et 55,03%. L'analyse statistique (Test de Student au seuil de 5%) a montré que la différence observée entre les deux espèces végétales pour les moyennes de F% est non significative F% ($p=0,74$).

Pour le paramètre intensité de la colonisation mycorhizienne dans le système racinaire (M%), ou proportion du cortex colonisé estimée par rapport au système racinaire entier, les valeurs des moyennes de M% montrent que les CMA colonisent environ 26% du système racinaire des deux espèces.

Quant au paramètre qui estime l'intensité de la colonisation mycorhizienne dans les fragments racinaires mycorhizés (m%), ou proportion du cortex colonisé dans la partie mycorhizée du système racinaire, montre que quand la colonisation existe, le cortex est colonisé à 49,20% chez *Thymus ciliatus* et 47,60% chez *Ballota nigra*. Néanmoins, l'analyse statistique (Test de Student au seuil de 5%) a révélé une différence non significative m% ($p=0,76$) et M% ($p=0,92$) entre les deux espèces de plantes.

4. Détermination du potentiel infectieux mycorhizogène

4.1. Description des structures formées par les CMA

Après trois semaines de culture du sorgho dans les dilutions de sol, le système racinaire entier de chaque plantule est coloré au bleu de Trypan et observé au microscope photonique. L'examen microscopique des racines des deux espèces révèle la présence ou l'absence de colonisation par les CMA.

Quant la colonisation existe, elle se manifeste par l'observation des différentes structures des CMA (Fig.18). De nombreux points d'entrées sont observés avec différentes formes d'*apressoria* (Fig.18a,d), ces points d'entrées sont considérés comme l'événement le plus décisif dans le déroulement de la colonisation endomycorhizienne. Après pénétration, les hyphes s'enroulent dans les premières cellules corticales en formant des peletons (fig.18b,c), puis s'insinuent entre les cellules et les pénètrent pour former des arbuscules (fig.18d,e). La colonisation du cortex peut être. Les vésicules ont été rarement observées (fig.18f) probablement en relation avec l'âge de la colonisation. La morphologie des mycorhizes est donc analogue à celle des MA naturelles.

En plus des structures des CMA, nous avons aussi observé le mycélium septé des endophytes dans les différentes dilutions, d'où leur présence dans la rhizosphère des deux espèces étudiées est bien à l'origine de la colonisation observée dans les racines des plantules de sorgho.

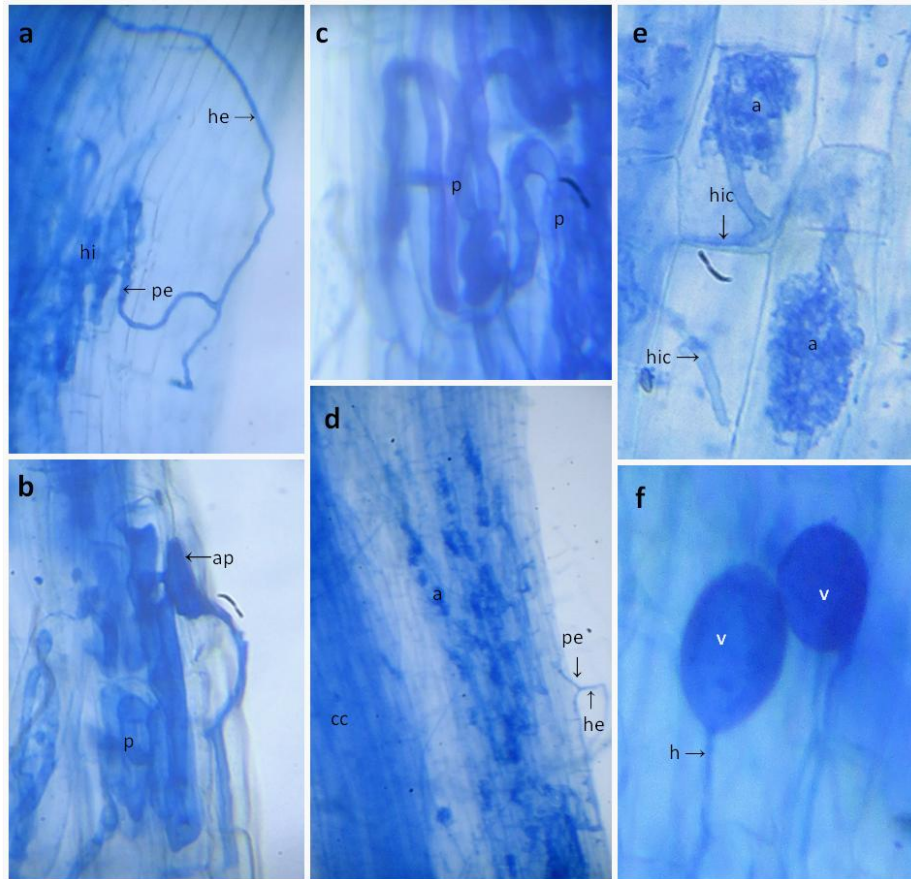


Figure 18: Structures formées par lesCMA dans les racines de sorghocolorés au bleu de Trypan.

a: point d'entrée (pe) et colonisation du cortex par les hyphes intraracinaires;**b, c:** détail de l'appressorium(ap) et de peletons d'hyphes (p) au niveau d'un point d'entrée;**d:** fragment racinaire colonisé montrant des arbuscules (a);**e:** détail des arbuscules;**f:** vésicules (v).

4.2. Potentiel infectieux mycorhizogène

Les pourcentages des plantules mycorhizées enregistrés dans le test biologique pour déterminer le potentiel infectieux mycorhizogène des sols sont donnés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Pourcentages des plantules mycorhizées du sorgho cultivées sur une gamme de dilutions du sol nu et des sols rhizosphériques de *Thymus ciliatus* et *Ballota nigra*.

		Pourcentages des plantules mycorhizées		
Dilutions %	Sols	Sol <i>Thymus ciliatus</i>	Sol <i>Ballota nigra</i>	Sol nu
	3		52.77	0
6		64.44	40	0
12		77.77	66.66	0
24		88.88	50	0
48		100	63.88	0
100		100	72.22	0

Les résultats obtenus montrent que d'une manière générale, le pourcentage de mycorhization des plantes test (sorgho) augmente avec l'augmentation de la quantité de sol non stérile pour les deux sols étudiés. Le sol nu (sans végétation) n'a donné aucune mycorhization (0%) quelque soit la quantité du sol utilisé. Le sol rhizosphérique de *Thymus ciliatus* à 100% et même à 48% a donné 100% de mycorhization des plantes test. Alors que, le taux de mycorhization a atteint 72.22% avec 100% de sol de *Ballota nigra*.

Ces pourcentages de mycorhization ont permis, par une régression linéaire, de calculer le PIM₅₀ (quantité de sol nécessaire pour mycorhizer 50% d'une population de plantes. Les résultats des calculs sont enregistrés dans le tableau suivant.

Tableau 5: Caractéristiques des droites de régression du type $y = a x + b$ établies pour déterminer le PIM₅₀ des sols rhizosphériques de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra* et du sol nu.

Origine du sol	$y=ax +b$	Coefficient de régression R^2	PIM ₅₀ (g/100g)
<i>T.ciliatus</i>	$y=0,336x+0,391$	0,712	1,38
<i>B.nigra</i>	$y=0,397x+0,012$	0,632	3.42
Sol nu	-	-	>100

Ces résultats sont traités par le logiciel SPSS 8.0, pour chaque type de sol des régressions linéaires ($y=ax +b$) sont calculées à partir de la relation pourcentage des plantes mycorhizées en fonction de logarithme de la quantité de sol non stérilisé. Avec cette équation, le PIM₅₀ de chaque sol est calculé, soit la quantité de substrat non stérile nécessaire à la colonisation de la moitié de la population dans les conditions du test biologique.

Pour le sol prélevé sous *T. ciliatus*, il faut seulement 1,38g de sol rhizosphérique pour mycorhizer 50% des plantes test. Cette quantité de sol passe à 3,42g pour le sol prélevé sous *B. nigra* tandis qu'il faut beaucoup plus que 100g de sol nu pour mycorhizer 50% des plantes. Cette quantité est beaucoup plus supérieure à la quantité de sol testé, soit 100g. Cela signifie qu'il n'y a pas assez de propagules de champignons mycorhiziens dans 100g de sol témoin pour obtenir 50% de plantules mycorhizées.

Les résultats suggèrent que le sol prélevé sous *Thymus ciliatus* est plus riche en propagules des CMA que celui prélevé sous *Ballota nigra* malgré que les valeurs des paramètres de la colonisation endomycorhizienne (F%, M%, m%) des deux espèces sont comparables.

Discussion

L'objectif de ce travail était l'évaluation du statut mycorhizien de deux espèces de lamiacées spontanées, *Thymusciliatus* et *Ballota nigra*, ainsi que la détermination du potentiel infectieux mycorrhizogène (PMI) de leurs sols rhizosphériques.

L'analyse granulométrique effectuée dans les deux stations d'étude (Chrèa et HakkouFerraoun) a montré une large prédominance des limons par rapport aux autres éléments tels que les sables et les argiles. La texture des sols rhizosphériques de *Thymus ciliatus* et *Ballota nigra* est donc limoneuse. Par ailleurs, les analyses physico-chimiques ont montré que les deux sols sont alcalins, riches en azote ($0.15 < N\% < 0.25$) et très riches en matière organique ($MO\% > 6$). Concernant le phosphore assimilable (P_2O_5), le principal facteur limitant la mycorrhization (Alvarez, 2002; Babana, 2003), les résultats des dosages montrent que le sol prélevé dans la rhizosphère de *Thymus ciliatus* est environ deux fois plus riche (51, 63 ppm) que celui *Ballota nigra* (28,48 ppm).

Les examens microscopiques des racines des deux espèces éclaircies et colorées au bleu trypan ont révélé la présence des structures caractéristiques des endomycorhizes arbusculaires (hyphes non septés, peletons, arbuscules, vésicules et spores) indiquant le caractère mycotrophique de *Thymus ciliatus* et de *Ballota nigra*. En effet, dans cette association, le champignon prend le rôle de la racine de la plante et agit comme une extension du système racinaire (Muchovej, 2004). Dans la littérature, il n'existe pas de travaux relatifs au statut mycorhizien de *Thymus ciliatus*. Kovács et Bagi (2001) ont signalé la présence de mycorhizes arbusculaires chez *Ballota nigra*.

L'estimation du degré de colonisation par les CMA en adoptant la méthode de Trouvelot et al. (1986) indique qu'environ 50% des racines, prospectées chez les deux espèces, présentaient au moins un point d'entrée des CMA. Cependant, la proportion du cortex colonisée estimée par rapport au système racinaire entier n'excède pas les 26%. L'efficacité de la colonisation MA dépend des caractéristiques chimiques du sol (Pons et Gianinazzi-Pearson, 1984) concernant surtout le phosphore, l'azote et le pH. Selon ces auteurs, les fortes concentrations de phosphores et le pH acide inhibent la germination de certaines espèces de spores. Les teneurs en phosphore des sols étudiés sont élevées surtout le sol de *Ballota nigra*, et le pH légèrement alcalin, ce qui pourrait être la cause d'une relative moyenne intensité de mycorrhization.

En plus des CMA, les racines de thym et de ballote étaient fortement colonisées par d'autres espèces fongiques à mycélium cloisonné, stérile (absence d'organes sexués comme les asques et les basides), de couleur brune, courant à la surface de la racine puis s'insinuant entre les cellules et enfin pénétrant et traversant ces cellules à l'intérieur desquelles le mycélium se différencie en masses de petites sphères à paroi épaissie. Selon Garbaye (2013), faute d'une réelle compréhension de sa signification biologique, ce type de colonisation des racines par un champignon a été prudemment nommé pseudomycorhizes à endophytes bruns cloisonnés (DarkSeptate Endophyte ou DES).

Aucune étude ne s'est focalisée sur le statut mycorhizien associés à la famille des lamiaceae en particulier celles du parc national de Chréa, pour cela, aucune référence bibliographique n'a été trouvée concernant l'étude de nos espèces.

Conclusion

Notre étude a porté sur l'évaluation du statut mycorhizien de deux espèces de lamiaceae spontanées, *Thymus ciliatus* et *Ballota nigra*, ainsi que la détermination du de leurs sols rhizosphériques. Cette étude constitue le premier travail sur le statut mycorhizien des espèces végétales des du parc national de Chréa.

Les analyses pédologique des sols rhizosphériques des deux plante sa permis de conférer la texture limoneuse aux sols des deux stations d'étude (Chréa et Hakkou Ferroun). Par ailleurs, les analyses physico-chimiques ont montré que les deux sols ne sont pas à caractère calcaire, légèrement alcalin, riche en azote et en phosphore assimilable. Leur teneur en matière organique est également très élevé.

Nous avons démontré la dépendance mycorhizienne des deux espèces étudiées. La mycorhization est naturellement établie, les mycorhizes sont de type arbusculaire. Le cortex racinaire est moyennement colonisé par les CMA malgré la richesse du sol en éléments minéraux, en particulier le phosphore assimilable; principal facteur limitant la mycorhization.

En plus des CMA, les racines de thym et de ballote étaient fortement colonisées par d'autres espèces fongiques à mycélium cloisonné, dénommés pseudomycorhizes à endophytes bruns cloisonnés(DarkSeptate Endophyte ouDES).

Notre travail a en outre , permis de déterminer le PIM des sols rhizosphériques de des deux espèces. Le pouvoir mycorhizogène des deux sols est important. Cependant, le sol de *Thymus ciliatus* a présenté le PMI le plus fort.

Afin de compléter et de poursuivre ce travail, des perspectives peuvent être envisagées pour la cautérisation de la diversité des CMA du parc national de Chréa:

- établir le statut mycorhizien des espèces végétales du parc national de Chréa, en particulier les lamiacées.
- isoler les spores de CMA associées à la rhizosphère des plantes.
- identifier les spores des CMA basées sur des critères morphologiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Akhtar MS., Siddiqui Z.A. 2008.**Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. *In: Siddiqui ZA, Akhtar MS et Futai K. (eds) Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry.* Springer Netherlands., 61–97p.
- **Alvarez G., Aubert C., Basson A., Berry D., Bodet J.M., Chautlot E., Chausson R., Cheroux M., Cluzeau D., Crete X., Jamar D., Mauchart A., Nicolardot B., Parat J., Salducci X., Stilmat D.2002.**Activites biologiques et fertilité des sols. Interets et limites des methodes analytiques. ITAB.Paris. France. 26p.
- **Anne P. 1945.** Le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron.* Avril, Mai, Juin, 1945, 5^{ème} année.n° 2, 161-172p.
- **Aubert G. 1978.** Méthode d'analyse des sols. C.R.D.P., Marseille., 546p.

B

- **Balansard J. 1934.**La Ballote fétide: étude chimique et pharmacodynamique -Thèse de doctorat en pharmacie, Marseille.,20-27p.
- **Babana A.H. 2003.** Mise au point d'un inoculants biologique pour le blé irrigué du Mali.Thèse de Doctorat. Université Laval. Quebec. Canada., 154p.
- **Barea J.M., Perez Solis E., Del Val G., Azcon-Aguilar C. 1999.** Importancia de las micorrizas en el establecimiento y proteccion de las plantas en suelos degradados.*Phytoma.*, 111 :18-30p.
- **Beloued A. 2012.** Plantes médicinales d'Algérie. Alger: Office des Publications Universitaires., p :134.
- **Benabid A.2000.** Flore et ecosystèmes du Maroc. Evaluation et preservation de la biodiversité. Paris.Edition Ibis Press., 159-161p.
- **Berthelot C., Leyval C., Foulon J., Chalot M., Blaudez D.2016.** Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiology Ecology.*, p:92.
- **Bonfante P., Requena N. 2011.** Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscularmycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 451–457p.

Références bibliographiques

- **Bonfante P., Genre A. 2010.** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1: 48p.
- **Bonfante P., Genre A. 2008.** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science.*,13: 492–498p.
- **Bonfante-Fasolo P. 1984.** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae, In VA mycorrhiza, Powell, CL et Bagayaraj, DJ, CRC Press, Boca Raton., 5-33p.
- **Bothe H. 2012.** Arbuscular mycorrhiza and salt tolerance of plants symbiosis.58:7-16.
- **Brundrett M.C., Abbott L.K.2002.** Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. Kluwer Academic Publishers. K.Sivasithamparam, K.W.Dixon & R.L.Barrett (eds)., 151–193p.
- **Brundrett, M.C. 2009.** Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil.*,320 :37–77p.
- **Botineau M. 2010.** Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs. Tech. EtDoc (eds)., 1021p.
- **Brundrett M.C. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist.* 154 :275–304p.
- **Buée M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Bécard G.2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular plant-microbe interactions.*,13: 693–698p.

C

- **Callot G., Dupuis M. 1980.** Le calcaire actif des sols et sa signification. *Bull AFFES.*, 17-26p.

D

- **Dobignard A., Chatelain C. 2012.** Index synonymique de la flore d’Afrique du nord. Volume 4 :dicotyledoneae : fabaceae – nymphaeaceae. *Editions des conservatoires et jardin botaniques - Genève.*, p :431.
- **Dickson S., 2004.** The Arum–Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist.*, 163–200p.

Références bibliographiques

F

- **Franz C., Circella G., Novak J., Resch H.1995.**Influence of day length and leaf insertion on the composition of marjoram essential oil. *Flavour Fragr J.*,10: 371-374p.
- **Fortin J.A., Plenchette C., Piché Y. 2008.** Les mycorhizes la nouvelle révolution verte. Chapitres 10, Les mycorhizes en agricultures. *Ed. MultiMondes*, Québec., 87-108p.
- **Fortin A., Plenchette C., Piche Y.2016.** Les mycorhizes: la nouvelle révolution verte. *Ed. Multimondes et Québec.*, 10-14p.

G

- **Garbaye J. 2013.** La symbiose mycorhizienne, une association entre les plantes et les champignons. *Ed. Quae*,Versailles., 12-130p.
- **Garcia V., Mendoza R.E. 2007.**Arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis in a saline-sodic soil. *Mycorrhiza.*,17: 167–174p.
- **Garg N., Chandel S. 2010.** Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 30: 581–599p.
- **Goetz P., Ghédirak. 2012.** Phytothérapie anti-infectieuse. Springer Science & Business Media., p :394.
- **Giri B., Kapoor R., Mukerji K.G. 2007.** Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecol.*,54: 753–760p.
- **Guissou T., Ba. A.M., Plenchette C., Guinko S., Duponnois R. 2001.** Effets des mycorhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique de quatre arbres fruitiers. Note de recherche. *Science et chargements.*, 12(2) :121-127.

H

- **Hans W. K. 2007.**1000 Plantes Aromatiques et Médicinales.” *Ed. Terre.*,
- **Harley R.M., França F., Santos E.P., Santos J.S. 2010.** *Lamiaceae*. In : Catálogo de plantas e fungos do Brasil, *Vol 2. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.*, 1130-

Références bibliographiques

1146p. **Hazzit, M, A Baaliouamer, and A. R Veríssimo. 2009.** Chemical Composition and Biological Activities of Algerian *Thymus* Oils. *Food Chem* 116: 714–721p.

- **Hilan C., Sfeir R., Jawich D., Aitour S. 2006.** Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Journal Scientifique Libanais*. 7:13-22p.

I

- **Iserin P. 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres., 143-226p.

J

- **Javot H., Penmetsa R.V., Terzaghi N., Cook D.R., Harrison., M.J. 2007.** A *Medicago truncatula* phosphatetransporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104: 1720–1725p.
- **Jumpponen A. 2001.** Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza.*, 11: 207–211p.
- **Juniper S., Abbott L.K. 2006.** Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.*, 16: 371–379p.

K

- **Kjeldahl G. 1882.** Analyses chimiques du sol (chimie analytique), 310 :122-125p.
- **Koske R.E. 1981.** *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia.*, 73: 288–300p.
- **Kovacs G.M., Bagi I. 2001.** Mycorrhizal Status of Plants in a Mixed Deciduous Forest from the Great Hungarian Plain with Special Emphasis on the Potential Mycorrhizal Partners of *Terfezia terfezioides* (MATT.) TRAPPE (Pezizales). Vol 41. 161-320p.

L

Références bibliographiques

- **Lee D.S., Kim N.S.2004.** Headspace solid-phase micro extraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *J Separat Sci.*,27: 96-100p.
- **Linderman R.G.1992.** VA mycorrhizae and soil microbial interactions. *In: Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*, eds, Bethelenfalvay, G. J, and Linderman, R. G, ASA Special Publication No. 54, Madison, WI., 45–70p.

M

- **Mekahlia N.M. 2013.** Dépendance mycorhizienne de l'olivier (*Olea européa* L.) dans l'est algérien et mycorhization contrôlée de la variété Ferkeni. Université de Badji Mokhtar Annaba., p :19.
- **Miller RM., Reinhardt DR., Jastrow JD. 1995.** External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia.*,103: 17–23p.
- **Muchovej R.M.2004.** Importance of mycorrhizae for agricultural crops. SS-AGR-170, Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

N

- **Naghbi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S., Ghorbani A. 2005.** Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of pharmaceutical research ; 2005, vol. 2; 63-79p.
- **Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi . 2005.** Analysis of the essential oils of two Thymus species from Iran-Food Chemistry., 90 : 609-611p.
- **Nurten E., Cihat Toker M., Pinar Sahin F.2005.** Botanical properties of Mild Sedative *Ballota nigra* L. subsp. *nigra*. *Pharm.Sci.*, p :96.

O

Références bibliographiques

- **Olsen S.R. 1954.** Estimation of available phosphorous in soils by extraction with sodium bicarbonate. Cir.U.S. Dep. Agr., n° 939, 1-19p.

P

- **Parniske M.2008.** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews.Microbiology.*,6: 763–775p.
- **Pariente L. 2001.** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2 ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris. 1643 p.
- **Phillips JM., Hayman D.S. 1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55:158–160p.
- **Plenchette C. 1989.** Potentiel infectieux mycorrhizogène du sol des parcelles du dispositif Dehéraïn. C. R.Acad. Agric. Fr. 75:23-29p.
- **Pons F., Gianinazzi- Pearson V.1984.** Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement in vitro de champignons endomycorhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie mycologie.*5(2) :87-100.
- **Prasanth R., Ravi V.K., Varsha P.V., Satyam S. 2014.** Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants.*, 3 (4):1-3p.

Q

- **Quezel P., Santa S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.Tome II. *Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris France.*, p: 603.

R

- **Rasmussen H.N.2002.** Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil.*,244:149-163p.

Références bibliographiques

- **Redecker D., Schüßler A., Stockinger H., Stürmer SL., Morton JB., Walker C. 2013.** An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*.,23: 515–531p.
- **Requena N., Serrano E., Ocón A., Breuninger M. 2007.** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*.,68: 33–40p.
- **Rothmaler W. 1995.** Exkursionsflora von Deutschland Gefäßpflanzen: Atlasband, 3 Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, 753p.
- **Rouiller J., Souchier B., Bruckert S., Feller C., Toutain F., Védry J.C. 1994.** Méthodes d'analyses des sols. Masson., 619-625p.

S

- **Sangwan N.S., Farooqi F., Shabih R.S. 2001.** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*., (34): 3-21p.
- **Schenk N.C., Perez Y. 1990.** Manual for Identification of VA Mycorrhizal Fungi. Synergistic Publications, Gainesville, Florida, p :250.
- **Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*.,105: 1413–1421p.
- **Selosse MA., Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution*., 13: 15-20p.
- **Selvaraj T., Chelleppan P. 2006.** Arbuscular mycorrhizae: a diverse personality. *Central Eur. J. Agr.*,7:349–358p.
- **Smith S., Read D. 1997.** Mycorrhizal symbiosis. *Ed. Academic Press*, Second edition., 490-605p.
- **Smith S.E., Read D.J. 2008.** Mycorrhizal symbiosis, 3rd Edition. Clarendon Press, Oxford. 16-32p.

T

- **Tommerup I. 1984.** Persistence of infectivity by germinated spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans Br Mycol Soc.*, 82:275–282p.

Références bibliographiques

- **Trabut L. C. 1935.** Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le nord de l'Afrique. Alger.p : 355.
- **Trouvelot A., Kough JL., Gianinazzi-Pearson V. 1986.** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: physiology and genetics aspects of mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V et Gianinazzi S (Eds), 1st ESM, INRA Press, Paris., 217-221p.

V

- **Valdes B., Rejdali M., Achhal El Kadmiri A., Jury J.L., et Montserrat J.M. 2002.** Catalogue des plantes vasculaires du nord du Maroc incluant des clés d'identification. Volume II. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid.
- **Van der Heijden MGA, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller T, Wiemken A, Sanders IR, 2006.** The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist.*,172: 739-752.
- **Vivas A., Barea J.M., Azcon R. 2005.** Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae* both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soils. *Environ. Pollut.*,134: 257–266p.

W

- **Wang C.J.K., Wilcox H.E.1985.** New Species of Ectendomycorrhizal and Pseudomycorrhizal Fungi: *Phialophora finlandica*, *Chloridium paucisporum*, and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia.*,77:951–8p.

Y

- **Yu T.E., Egger K.N., Peterson L.R. 2001.** Ectendomycorrhizal associations – characteristics and functions. *Mycorrhiza.* 11: 167–177 p.

Références bibliographiques

- **Yuan T. W., Mabberly D. J., Steane D. A., Olmstead R. G. 2010.** Further disintegration and redefinition of *Clerodendrum* (*Lamiaceae*): Implication for the understanding of the evolution of an intriguing breeding strategy. *Taxon.*, 59: 125-133p.

Annexes

Annexe 1 : Préparation des solutions

- **Préparation de 1000 ml de la solution KOH (10%):** peser 100 g de KOH, les dissoudre dans 800 ml d'eau distillée puis compléter à 1000 ml dans une fiole jaugée (attention cette réaction est exothermique).

-**Préparation pour 1000 ml de la solution colorante :** peser 333 g d'acide lactique dans un bécher de 1000 ml, 333 g de glycérol dans un autre bécher de 1000 ml. Puis peser 0.5 g de bleu de Trypan . Verser l'ensemble des produits dans une fiole de 1000 ml et compléter avec de l'eau distillée.

- **Préparation pour 1000 ml de solution de conservation des racines :** faire la même préparation que la solution colorante sans les 500 mg de bleu de Trypan.

Annexe 2 : La grille de Barème de classe

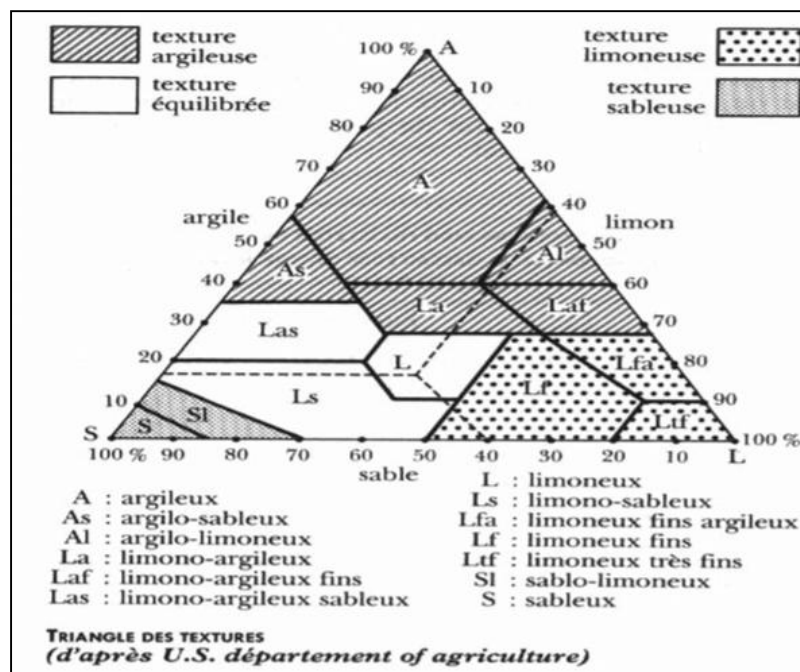
classe	0	1	2	3	4	5
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
Total						

Annexe 3

Tableau I

	F%	M%	m%
<i>B. nigra</i>	55,03 ± 13,66	26,79 ± 8,90	47,60 ± 7,71
<i>T. ciliatus</i>	51,93 ± 14,53	26,14 ± 10,09	49,20 ± 8,62

Annexe 4 : Triangle des textures du sol.



Annexe 5 : Normes d'interprétation des analyses physiques et chimiques de sol selon AFNOR

Normes d'interprétation du calcaire total

Classe du sol	Non calcaire	Faible	Modéré	Forte	Très forte
Calcaire total%	≤5	5-12,5	12,5-25	25-50	>50

Normes d'interprétation de l'azote total

Classe du sol	Très pauvre	Pauvre	Moyennement pauvre	riche	Très riche
Azote total %	<0,05	0,05-0,09	0,1-0,15	0,15-0,25	>0,25

Normes d'interprétation de pH

Normes d'interprétation	Forte acidité	Acidité légère	Très légèrement acide	alcalinité	forte alcalinité
pH	<5.5	5,5-6	6-7	7-8	>8

Normes d'interprétation du phosphore assimilable

Classe du sol	Pauvre	Moyennement pauvre	Riche	Très riche
phosphore assimilable (ppm)	<10	11-31	31-51	>51

Normes d'interprétation de la conductivité électrique

Classe du sol	Sols non salins	Sols légèrement salins	Sols salins	Sols très salins	Sols extrêmement salins
CE Ds/m	<3	3-6	6-12	12-30	>30

Normes d'interprétation de matière organique

classe du sol	Très pauvre	Pauvre	Moyennement pauvre	Riche
Matière organique	<1	1-2	2-4	>4

Annexe 6 : Résultats de la granulométrie.

	Argile (%)	Limon(%)	Sable(%)
<i>Thymus ciliatus</i>	4.33	66.07	29.6
<i>Ballota nigra</i>	7.16	48.18	44.66