

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
° C	Degré celsius
CDP-star	Chemiluminescence substrate
g	Gramme
h	Heure
IMAGO	Instrumentation, Moyens Analytiques, Observatoires en Océanographie et Géophysique
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	Institut Sénégalais de Recherche Agricoles
L	Litre
LAMA	Laboratoire des Moyens Analytiques
LCM	Laboratoire Commun de Microbiologie
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimole
MNM	Melin Norkrans modifié par Marx
ORS	Bactéries de la collection de l'IRD de Dakar
p/v	Poids par volume
PVC	Poly-vinyl-chloride
Q.S.P	Quantité Suffisante Proportionnelle
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
s	Seconde
SSC	Sodium chloride – triSodium Citrate
UCAD	Université Cheikh Anta Diop
UFC	Unités Formant une Colonie
v/v	Volume par volume
YM	Yeast Mannitol
YM A	Yeast Mannitol Agar
µg	Microgramme
µl	Microlitre

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure des mycorhizes (Moussain, 1989)	6
Figure 2 : Evolution de la hauteur des plants de <i>A. mangium</i> en fonction du nombre de souches de champignons ectomycorhiziens inoculés aux plants.....	28
Figure 3 : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et la croissance des plants, la nodulation du système racinaire et la teneur en P des parties aériennes.	29
Figure 3 A : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et la biomasse aérienne des plants.....	29
Figure 3 B : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et la biomasse racinaire des plants.....	29
Figure 3 C : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et la biomasse totale des plants.....	29
Figure 3 D : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et le taux de mycorhization des plants.....	29
Figure 3 E : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et le nombre de nodules des plants.....	29
Figure 3 F : Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et la teneur en phosphore des parties aérienne des plants.....	29
Figure 4 : Comparaison de l'effet théorique de l'inoculation fongique sur la biomasse totale des plants versus l'effet mesuré dans l'expérience en serre après 4 mois de culture.....	31

Figure 5 : Pourcentage des nodules formés par <i>Bradyrhizobium sp.</i> Aust 13C dans les différents traitements.....	32
--	----

Liste des tableaux

Tableau 1 : Origines des souches de champignons ectomycorhiziens utilisés dans l'expérience en serre.....	18
--	----

Tableau 2 : Quantités requises d'inoculum fongique (ml par litre de sol) et bactérien (ml / pot) dans les différents traitements de l'expérience en serre.....	19
---	----

Tableau 3 : Effet de l'inoculation par différentes souches fongiques et par <i>Bradyrhizobium sp.</i> Aust 13C sur la croissance, les teneurs en N et P des plants d' <i>A. mangium</i> , le développement de la nodulation et de la symbiose mycorhizienne après 4 mois de culture en serre.....	26
--	----

Tableau 4 : Effet de l'inoculation par un nombre croissant de souches fongiques et par <i>Bradyrhizobium sp.</i> Aust 13C sur la croissance, les teneurs en N et P des plants d' <i>A. mangium</i> , sur le développement de la nodulation et de la symbiose mycorhizienne après 4 mois de culture en serre.....	27
---	----

Tableau 5 : Equations et coefficients de régression des courbes calculées entre le nombre de souches de champignons ectomycorhiziens inoculés et les différents paramètres mesurés sur les plants d' <i>A. mangium</i> après 4 mois de culture en serre.....	30
---	----

Liste des planches

Planche 1 : Racines d' <i>Acacia mangium</i> ectomycorhizées	6
---	---

Planche 2 : <i>Acacia mangium</i> et ses caractéristiques morphologiques.....	16
--	----

Planche 3 : Hybridation sur membrane d'ADN extrait de nodules d' <i>Acacia mangium</i> avec la sonde AUST13C.....	32
--	----

Sommaire

Introduction	1
Synthèse Bibliographique.....	3
I. La symbiose fixatrice d'azote	3
1. La symbiose Rhizobium –Légumineuses.....	3
1.1. Généralités sur les rhizobiums.....	3
1.2. Généralités sur les Légumineuses.....	4
1.3. Mécanisme d'installation de la symbiose.....	4
II. La symbiose mycorhizienne.....	5
1. Les mycorhizes.....	5
1.1. Les mycorhizes à arbuscules.....	7
1.2. Les Ectendomycorhizes.....	7
1.3. Les Ectomycorhizes.....	7
1.3.1. Mise en place de la symbiose mycorhizienne.....	8
1.3.2. Fonctionnement de la symbiose mycorhizienne.....	9
1.3.2.1. Alimentation hydrique.....	9
1.3.2.2. Nutrition minérale.....	10
1.3.2.3. Production d'hormones.....	10
1.3.2.4. Protection phytosanitaire.....	11
2. La mycorhizosphère.....	11
3. La mycosphère.....	12
4. Les microorganismes non symbiotiques et la symbiose mycorhizienne.....	12
III. Interaction entre champignons.....	13
IV. Interaction entre les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrice d'azote.....	13
V. Caractères généraux de <i>Acacia mangium</i>	14
1. Caractéristiques botaniques.....	14
2. Aire de répartition.....	14
3. Intérêts de l'arbre.....	14
4. Symbiose fixatrice d'azote.....	15
Matériel et Méthodes	17
I. Germination des graines <i>d'A. mangium</i>	17
II. Préparation des inocula fongiques et bactériens.....	17

III. Expérience en serre.....	19
IV. Paramètres mesurés	20
1. Croissance des plantes.....	20
2. Mesure des taux de mycorhization et de nodulation.....	20
3. Suivi de la souche <i>Bradyrhizobienne sp</i> Aust 13C par hybridation sur membrane	20
3.1. Désinfection en surface des nodules et extraction de l'ADN des nodules.....	20
3.2. Préparation de la membrane.....	21
3.3. Dépôt des échantillons sur la membrane et hybridation.....	21
3.3.1. Préhybridation.....	22
3.3.2. Hybridation au sens strict.....	22
3.3.3. Lavages.....	22
3.3.4. Révélation.....	22
V. Analyse statistiques.....	23
Résultats.....	25
I. Développement des plants d' <i>A. mangium</i> inoculés par une souches fongiques et par une <i>bradyrhizobium</i> Aust 13C	25
II. Développement des plants d' <i>A. mangium</i> inoculés par un nombre croissant de souches fongiques et par une <i>bradyrhizobium</i> Aust 13C dans les différents traitements.....	25
III. Mesure de la capacité de nodulation de Aust 13C dans les différents traitements.....	31
Discussions.....	33
Conclusions et Perspectives	36
Références bibliographiques.....	37
Annexe.....	47

INTRODUCTION

La baisse des potentialités agricoles des sols sahéliens est devenue un problème très préoccupant depuis plusieurs décennies. Cette baisse de la productivité est principalement due à la diminution significative de la fertilité des sols au cours de ces dernières années suite à différentes contraintes d'ordre naturel (sécheresse, salinisation des sols, etc) ou anthropique (surexploitation des terres cultivables).

Les autorités sont confrontées à un défi majeur : comment satisfaire les besoins alimentaires et domestiques de cette population dont la démographie est en constante évolution alors que les ressources naturelles s'épuisent ?

Le recours aux engrais étant relativement limité pour les populations locales (coût prohibitif) et néfaste pour l'environnement (pollution des nappes phréatiques, etc.), l'utilisation de pratiques culturales ancestrales (jachères) ou novatrices (agroforesterie) ont été encouragées afin de réhabiliter durablement les terres cultivées et augmenter la productivité des cultures. Malheureusement, ces techniques n'ont pas donné les résultats escomptés. Par exemple, du fait de la démographie galopante et le besoin croissant de terres arables, le temps de mise en jachère des sols a fortement diminué ce qui limite son effet sur la fertilité des sols. C'est ainsi que d'autres stratégies ont été envisagées dans ces zones sahéliennes dont les sols sont principalement carencés en phosphore et en azote.

Une attention particulière a été portée sur les symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes qui participent au développement du couvert végétal dans des sols carencés en éléments nutritifs. Les légumineuses ont la propriété de contracter une symbiose fixatrice d'azote avec des rhizobia et une symbiose de type fongique (symbiose ecto et/ou mycorhizienne à arbuscules).

Dans le cadre d'opérations de reboisement, certaines espèces d'acacias australiens ont été relativement privilégiées par rapport aux espèces sahéliennes (Ex : *F. albida*, *A. raddiana*, etc) en raison de leur vitesse de croissance rapide et leur forte capacité à produire de la biomasse (Donfack, 1994 ; Szott et al., 1994). Il a été démontré que la performance de ces essences exotiques pouvait être significativement améliorée en leur associant des souches de rhizobia ou de champignons mycorhiziens performants quant à leur impact sur le développement de l'arbre (Cornet et Diem., 1982 ; Galiana et al., 1994, Duponnois et Bâ, 1998 ; Duponnois et al 2000 ; 2005 ; 2006). Cette pratique de l'inoculation contrôlée repose sur la sélection de souches performantes et très compétitrices vis à vis de la microflore symbiotique du milieu. Le but recherché est donc de trouver des inocula susceptibles de se

développer massivement au sein du système racinaire de l'hôte et donc de limiter directement ou indirectement la multiplication des symbiotes natifs du milieu.

Ceci aboutit à une diminution de la richesse spécifique des communautés de symbiotes bactériens et/fongiques associées à l'essence de reboisement. Or il a été démontré que la productivité d'un écosystème était étroitement dépendante de la structure (diversité et abondance) des symbiotes mycorhiziens à arbuscules et rhizobiens (van der Heijden et *al.*, 1998 ; 2006). En ce qui concerne la symbiose ectomycorhizienne, l'importance de la diversité du cortège ectomycorhizien sur la croissance de la plante hôte et, dans le cas des légumineuses arborées, sur la fixation symbiotique de l'azote, est à l'heure actuelle, totalement inconnu.

Notre étude a pour objectif principal la connaissance de l'influence de la diversité de peuplements de symbiotes fongiques ectomycorhiziens sur la symbiose fixatrice d'azote et sur le développement chez *Acacia mangium*. Elle a pour objectifs spécifiques :

d'évaluer la croissance de la plante hôte en fonction d'une diversité croissante du cortège ectomycorhizien associé,

d'évaluer l'influence de la diversité croissante du cortège ectomycorhizien associé sur la symbiose fixatrice chez *Acacia mangium*.

Ce document comporte une synthèse bibliographique sur le sujet, le matériel et les méthodes utilisés dans de ce travail, les résultats obtenus et enfin les conclusions et les perspectives.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La symbiose fixatrice d'azote

Il existe plusieurs types de symbioses : symbiose *Anabaena-Azolla*, la symbiose *Frankia* / Plante actinorhizienne, *Rhizobium* / Légumineuses. Parmi ces symbioses une importance notoire est accordée à la symbiose *Rhizobium* / Légumineuse.

1. La symbiose *Rhizobium* – Légumineuse

L'atmosphère terrestre est constituée environ à 80% d'azote, alors que cet azote est un facteur limitant majeur de la production végétale. Ce paradoxe s'explique par le fait que l'azote moléculaire (N_2) est très stable, et seuls des organismes appartenant aux groupes des Procaryotes sont capables de réduire sous une forme combinée assimilables (Boivin et Danerie, 1998).

Il existe un certain nombre de microorganismes fixateurs d'azotes comme les algues et les bactéries. Certains d'entre eux vivent à l'état libre, mais d'autres vivent en symbiose avec des végétaux supérieurs. Les bactéries symbiotiques les plus connues sont celles de la famille de Rhizobiacées. Ces bactéries induisent la formation d'organes particuliers appelés nodosités au niveau des racines et des tiges des Légumineuses. Cette nodosité est le siège du processus de la réduction de l'azote N_2 de l'air en ammoniacque NH_4 utilisable par la plante (Boivin et Danerie, 1998). En contrepartie, la plante procure de l'énergie et des photosynthétats et constitue une niche protectrice. Cette symbiose *Rhizobium*-Légumineuse fournit chaque année à l'échelle de la planète, une quantité d'azote équivalente qui est presque à celle synthétisée dans l'industrie des engrais et joue donc un rôle écologique considérable. (http://fr.wikipedia.org/wiki/fixation_biologie_de_l'azote).

1.1. Généralités sur les rhizobia

La famille des Rhizobiacées est constituée de bactéries appartenant au règne des procaryotes. Selon Dommergues *et al.* (1999), cette famille des Rhizobiacées est un ensemble hétérogène de bactéries gram négatifs aérobies et non sporulantes.

Ces microorganismes comportent actuellement dix genres appartenant à la sous classe des α protéobactéries : *Rhizobium* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Mésorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988), *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998), *Methylobactérium* (Sy *et al.*, 2001), *Rolstonia* (Chen *et al.*, 2001), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002) et *Blastobater* (Van Berkum et Eardly,

2002) et un genre de la sous classe des β protéobactéries : *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001).

Certains rhizobiums ont une spécificité très étroite ; c'est le cas de *Azorhizobium caulinodans* (Allen et Allen, 1981) qui ne semble noduler efficacement qu'une seule espèce de légumineuse *Sesbania rostrata*. A l'inverse, on trouve des rhizobiums à large spectre d'hôte comme *Sinorhizobium sp* NGR 234 qui nodule plus de 112 genres des légumineuses ainsi que la non légumineuse *Parasponia* (Trinick, 1980).

1.1. Généralités sur les Légumineuses

Les Légumineuses constituent une famille très importante chez les Angiospermes. Cette famille est subdivisée en trois sous-familles : les Caesalpiniacées, les Fabacées et les Mimosacées (de Faria *et al.*, 1984 ; Young et Johnston, 1989 ; Käss et Wink, 1997).

Seules les légumineuses possèdent la capacité de contracter une symbiose avec les rhizobiums, à l'exception de la famille des Ulmacées avec le genre *Parasponia* (Allen et Allen, 1981). La symbiose rhizobium-légumineuses est le résultat de la formation de nodosités au niveau des racines et/ou des tiges pour certaines espèces. Cette double nodulation se rencontre chez certaines légumineuses appartenant aux genres *Neptunia*, *Sesbania* (Dreyfus et Dommergues, 1981), *Aeschynomene* (Alazard et Becker, 1985) et *Discolobium* (Loureiro *et al.*, 1994).

Le nombre d'espèces nodulantes est variable d'une sous-famille à une autre : 97 % des Fabacées, 90 % des Mimosacées et 23 % des Caesalpiniacées (de Faria *et al.*, 1989). Les légumineuses présentent une importance économique majeure (bois, aliment, propriétés médicinales, rôle écologique surtout sur la stabilisation et la fertilisation des sol).

1.3. Mécanisme d'installation de la symbiose fixatrice d'azote

Les mécanismes aboutissant à l'infection et à la formation d'une nodosité reposent sur un dialogue moléculaire qui est à l'origine de la reconnaissance entre le symbiote bactérien et sa plante hôte. Les racines des végétaux excrètent des molécules phénoliques comme les flavonoïdes et bêtaïnes (Dommergues *et al.*, 1999).

En présence d'inducteurs végétaux (flavonoïdes, bêtaïnes), les protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structures.

L'expression des gènes *nod* conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires ou facteur Nod : les Lipochito oligosaccharides qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et d'organogène des nodosités (Denarie *et al.*, 1996).

Une fois ces nodosités formées, les bactéries qui s'y trouvent se transforment en bactéroïdes. Les bactéroïdes possèdent un système enzymatique, la nitrogénase qui catalyse la réduction de N_2 en NH_4^+ assimilable par la plante.

II. La symbiose mycorhizienne

1. Les mycorhizes

Le terme mycorhize provient du grec « mukês » qui signifie champignon et « rhiza » racine. Il a été proposé pour la première fois par Frank en 1885. Il désigne des associations symbiotiques entre les racines des végétaux et certains champignons du sol. Ces unions ubiquistes et durables sont des échanges réciproques entre les deux partenaires (Smith et Read, 1997). Chaque partenaire optimise son développement grâce à cette association. Le champignon améliore la nutrition minérale de la plante hôte et bénéficie en retour des composés carbonés issus de la photosynthèse pour accomplir leur cycle biologique.

Suivant leurs caractères morphologiques et leurs structures, Peyronel *et al.* (1969) définissent deux groupes principaux d'associations mycorhiziennes : les mycorhizes à arbuscules et les ectomycorhizes (Figure1 : C et D). Il existe aussi d'autres types de mycorhizes moins représentés dans la nature : les endomycorhizes à pelotons des orchidées et des Ericacées et les ectendomycorhizes. (Figure 1 : B et E)

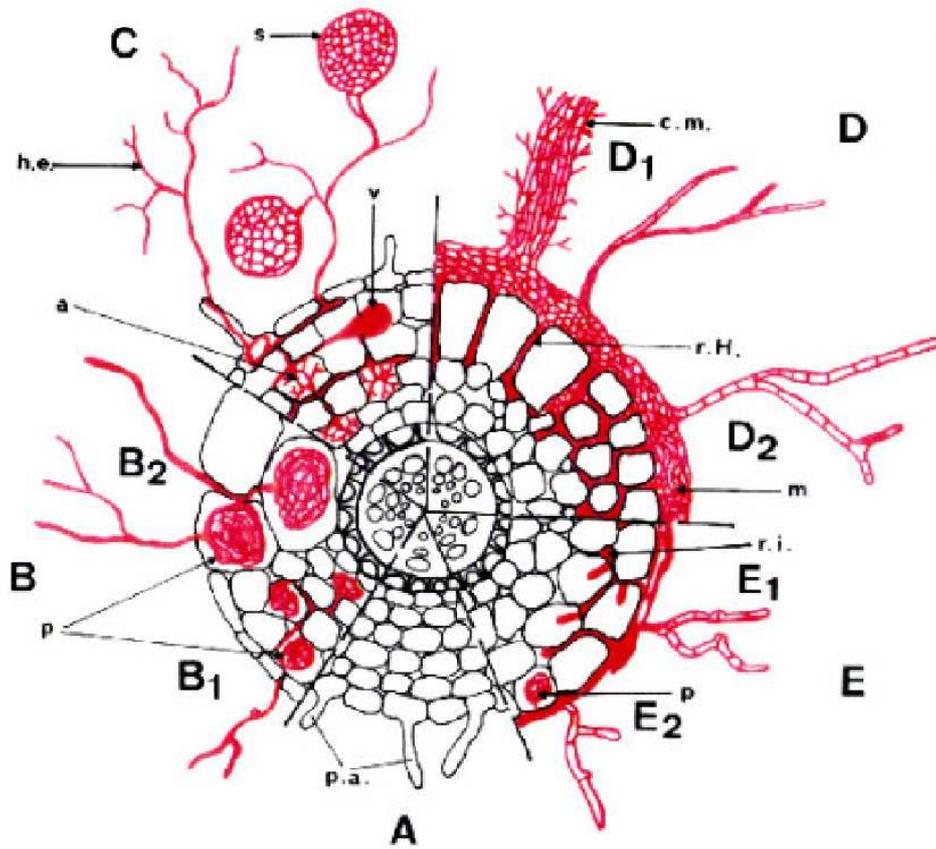


Figure 1: Représentation schématique de la structure des mycorhizes (Mousain, 1989).
 A : racine non infectée et poils absorbants (pa) ; B : endomycorhizes à pelotons des Orchidacées (B1) et des Ericacées (B2) ; C : endomycorhizes à vésicules et arbuscules, avec des spores (s), des hyphes externes (he), des arbuscules (a), et des vésicules (v) ; D : ectomycorhizes des Angiospermes (D1) et des Gymnospermes (D2), avec des cordons mycéliens (cm), un réseau de Hartig (rh), et un manteau fongique (m) ; E : ectendomycorhizes, E1 : mycorhizes "monotrophioides" avec un réseau mycélien intercellulaire (ri), E2 : mycorhizes "arbutoides" avec des pelotons d'hyphes (p).

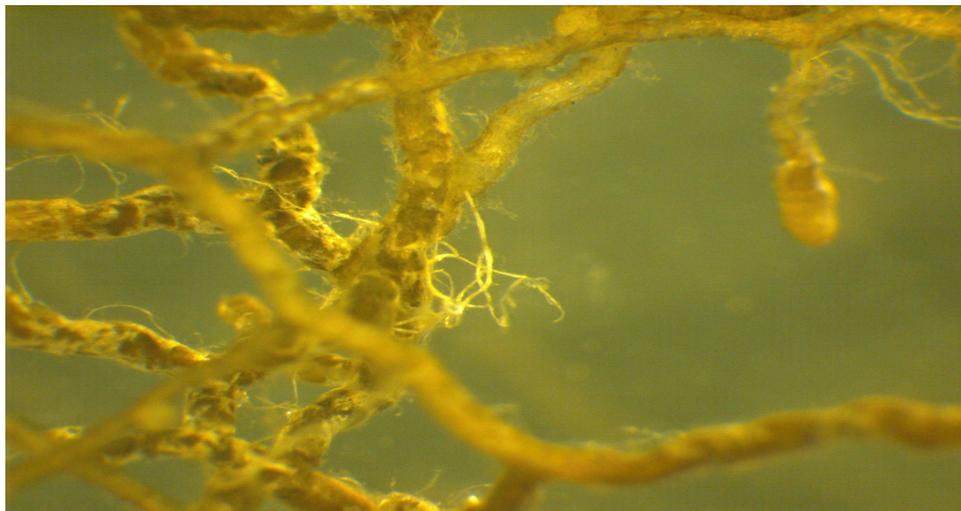


Planche 1 : Racines d'*Acacia mangium* ectomycorhizées

1.1 Les mycorhizes à arbuscules

Les mycorhizes à arbuscules sont les plus répandues et ne sont pas visibles à l'œil nu. Elles sont caractérisées par l'absence de manteau fongique autour de la racine. Très fréquentes, elles concernent 95% des taxons végétaux dont des arbres, des arbustes et des herbacées. Un traitement des racines (éclaircissement et coloration) est nécessaire pour révéler les deux structures caractéristiques : les vésicules et les arbuscules (Figure 1 C).

Les vésicules sont un lieu de stockage de lipides nécessaires au métabolisme du champignon. Le mycélium pénètre dans les cellules des racines, franchit la paroi et repousse le plasmalemme des cellules hôte sans le traverser. Les hyphes sont logés dans l'espace périplasmique des cellules corticales. Ils passent ainsi de cellule en cellule et progressent également entre les méats.

Il a été établi que les arbuscules constituent le lieu privilégié d'échanges nutritionnels entre les deux partenaires (Smith et Read, 1997). Les champignons impliqués dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules sont des champignons inférieurs (Phycomycètes) qui appartiennent à la famille des Endogonacées (Zygomycètes). Ces champignons sont des symbiotes obligatoires et non spécifiques, ils modifient rarement l'architecture de la plante.

1.2. Les Ectendomycorhizes

Les ectendomycorhizes (Figure 1 E) possèdent à la fois des caractères d'ectomycorhizes (présence du manteau fongique et du réseau de Hartig) et des caractères d'endomycorhizes (colonisation des cellules racinaires bien organisée par le champignon). En l'absence de données cytologiques ultrastructurales, il est difficile de décrire les ectendomycorhizes. Le réseau de Hartig naît à partir des hyphes de la partie profonde du manteau. Les filaments intracellulaires sont cloisonnés et ramifiés. Chez *Monotropa*, *Sarcodes*, et *Pterospora* (Duddridge et Read, 1982 ; Robertson, 1982), des hyphes très courts pénètrent dans les cellules corticales ; ces cellules sont alors modifiées et les structures mises en place rappellent celles des cellules de transfert (Gunning et Pate, 1969).

Les champignons concernés sont des Basidiomycètes.

1.3. Les Ectomycorhizes

A la différence des mycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes sont visibles à l'œil nu grâce à la couleur du manteau fongique qui recouvre la racine nourricière (Figure 1 D) et fait disparaître les poils absorbants des racines. La symbiose ectomycorhizienne est très représentée dans les écosystèmes forestiers. Cette symbiose se rencontre fréquemment chez

les arbres des régions tempérées et boréales mais rarement chez les arbres tropicaux (Newbery *et al.*, 1988 ; Smith et Read, 1997 ; Béreau *et al.*, 1997 ; Onguene et Kuyper, 2001). Parmi les champignons ectomycorhiziens certains sont comestibles (Bâ et Thoen, 1990). Cependant certains champignons sont spécifiques d'une plante hôte et d'autres ont un spectre d'hôte très large (Thoen et Bâ, 1989). Les ectomycorhizes existent principalement chez les arbres, mais contrairement aux idées reçues, il y a plus d'espèces constituant des endomycorhizes que d'espèces formant des ectomycorhizes.

D'une manière générale, les ectomycorhizes se présentent sous la forme de racines courtes, parfois très ramifiées et complètement enveloppées à l'extérieur par un épais enchevêtrement d'hyphes du champignon symbiotique. Les champignons développent dans le sol des hyphes mycéliens qui entourent complètement les racines latérales pour former le manteau fongique. De ce dernier partent des hyphes formant un réseau dit extramatriciel qui augmente le volume de sol exploré par la plante et aussi des hyphes internes qui s'insinuent entre les cellules du cortex pour former le réseau de Hartig. Ce réseau peut se limiter à la première assise cellulaire superficielle du cortex chez les feuillus ou s'étendre jusqu'à l'endoderme chez les résineux (Voiry, 1981). C'est au niveau de ce réseau de Hartig qu'ont lieu les échanges bidirectionnels entre les deux partenaires. Les hyphes s'insinuent dans les micro porosités du sol et prélèvent efficacement des nutriments du sol en particulier le phosphore.

1.3.1. Mise en place de la symbiose ectomycorhizienne

La mise en place de l'ectomycorhize se traduit par de profondes modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques de la racine (Martin *et al.*, 2001 ; Marmeisse *et al.*, 2004). La formation de ce nouvel organe résulte de plusieurs événements touchant les deux partenaires notamment l'agrégation des hyphes formant le manteau fongique, la disparition des poils absorbants, la multiplication des racines latérales et l'allongement radial des cellules de l'épiderme (Tagu *et al.*, 2001).

En se référant aux relations existantes entre bactéries et légumineuses, il existerait des signaux moléculaires entre les deux partenaires de la symbiose (Perret *et al.*, 2000). Ce sont des molécules rhizosphériques libérées par la plante comme les flavonoïdes (Phillips et Tsai, 1992) et reconnues par les microorganismes du sol notamment les champignons mycorhiziens (Nagahashi *et al.*, 1996, Beguiristain et Lapeyrie, 1997 ; Douuds et Nagahashi, 2000 ; Tagu *et al.*, 2000). La production des hydrophobines (protéines structurales fongiques) serait l'une des premières réponses des champignons aux signaux rhizosphériques (Chabot *et al.*, 1992). Ces métabolites sécrétés par les champignons augmentent le nombre de racines latérales et

inhibent la croissance des poils absorbants (Ditengou et Layperie, 2000). Les champignons synthétisent également de l'acide indole-3-acétique (AIA) impliqué dans la mise en place de la symbiose (Marmeisse *et al.*, 2004).

Un ensemble de facteurs génétiques, trophiques et environnementaux interviendraient donc dans la différenciation de l'ectomycorhize.

Tagu *et al.* (2000) distinguent des étapes majeures dans la formation des ectomycorhizes :

- le chimiotropisme étape où les molécules spécifiques (protéines, carbohydrates) jouent un rôle important dans cette reconnaissance,
- le développement des hyphes des mycéliums à la surface des tissus racinaires,
- l'agrégation des hyphes fongiques,
- la pénétration intercellulaire qui regroupe l'ensemble des mécanismes de morphogenèse des cellules racinaires (disparition des poils absorbants, formation du réseau de Hartig et le manteau fongique).

1.3.2. Fonctionnement de la symbiose mycorhizienne

1.3.2.1 Alimentation hydrique

La symbiose ectomycorhizienne permet à la plante d'améliorer son régime hydrique grâce au réseau mycélien extramatriciel (hyphes, cordons mycéliens, rhizomorphes) qui augmentent le volume de contact entre le sol et le système racinaire (Duddridge *et al.*, 1980 ; Garbaye et Guehl, 1997). Le mycélium extramatriciel des mycorhizes est souvent considéré comme une voie de moindre résistance pour le déplacement de l'eau car les mycorhizes diminuent considérablement la résistance aux flux des solutés entre le sol et la plante (Safir *et al.*, 1971). Le mouvement de l'eau entre le champignon et la plante est assuré par des structures bien adaptées. Par exemple les rhizomorphes qui sont formés par un ensemble d'hyphes aggrégés sont comparables à des vaisseaux du xylème des végétaux supérieurs, ce qui fait de ces structures de bons conducteurs d'eau (Duddridge *et al.*, 1980).

En plus de leur rôle d'approvisionnement en eau, les ectomycorhizes sont directement impliquées dans la tolérance de la plante à la sécheresse (Morte *et al.*, 2000). Dans les sols à faible potentiel hydrique, les hyphes sont capables d'abaisser suffisamment leur potentiel osmotique pour s'alimenter en eau au bénéfice de la plante (Smith et Read, 1997) et ainsi, améliorer l'absorption et la conductivité de l'eau dans la racine (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2004). La symbiose mycorhizienne est également impliquée dans des mécanismes de contrôle de la régulation stomatique et de l'ajustement osmotique de la plante (Cromer, 1935 ; Davet,

1996). Elle permet aux plantes de mieux absorber le potassium dont le rôle osmorégulateur est bien établi (Lindhauer, 1985).

1.3.2.2 Nutrition minérale

Une fois les réserves des cotylédons épuisées, les plantes doivent directement prélever dans le sol les ressources nécessaires à leur croissance (Kitajima, 2002). Pour cela les plantes mycotrophes ont besoin de mycorhizes. La dépendance mycorhizienne des plantes est inversement corrélée avec la taille et le contenu en P des cotylédons (Allsopp et Stock, 1992 ; Zangaro *et al.*, 2003). Cette dépendance est d'autant plus importante que les sols sont pauvres en certains nutriments (Smith et Read, 1997). C'est le cas des sols forestiers en particuliers ceux des régions tropicales réputés pauvres en P et N.

La vitesse de prélèvement du phosphore étant plus rapide que la vitesse d'approvisionnement, il se crée alors une zone d'épuisement en P autour des racines. Pour corriger ce phénomène, le champignon développe un réseau mycélien capable de prélever du P au-delà de la zone d'épuisement. Ce phosphore absorbé sera accumulé sous forme d'une masse considérable (granules de polyphosphate) dans le manteau des ectomycorhizes ; ce manteau pouvant doubler sa concentration en P en 24 h (Smith et Read, 1997).

Comme pour le P, l'azote assimilable par la plante est limité dans les écosystèmes forestiers car les processus de minéralisation sont lents (Keeney, 1980 ; Read, 1991). Dans ce contexte, les ectomycorhizes permettent à la plante d'améliorer l'absorption et l'assimilation de l'azote inorganique sous forme d'ammonium et/ou de nitrate (Plassard *et al.*, 1986). Les ectomycorhizes peuvent également mobiliser des formes d'azote organiques (Boukcim et Plassard, 2003). Elles peuvent avoir un effet protecteur pour les plantes en accumulant des métaux lourds par le cordon mycélium. Cette faculté fait des ectomycorhizes de bons détoxificateurs des sols.

1.3.2.3. Production d'hormones

Depuis leur apparition, les champignons ectomycoriziens ont co-évolué avec les plantes supérieures et se sont adaptés à la vie symbiotique en produisant des régulateurs de croissance comme les auxines et les flavonoïdes pour l'établissement de la symbiose (Augé et Duan, 1991).

La symbiose mycorhizienne joue un rôle dans la synthèse des vitamines et des phytohormones (Martin *et al.*, 2001). Il existe chez les champignons une forte aptitude à produire de l'AIA (acide indole -3 acétique) et à stimuler la rhizogénèse (Marmeisse *et al.*, 2004 ; Niemi *et al.*,

2000). De ce fait, l'effet rhizogénèse de la symbiose mycorhizienne a été attribué à la production d'AIA (Gay, 1990 ; Normand *et al.*, 1996 ; Karabaghi *et al.*, 1998). Les auxines produites par le champignon interviennent dans l'établissement de l'association symbiotique en stimulant la formation de racines courtes réceptives à l'infection. Exportées vers la plante, les phytohormones ainsi synthétisées stimulent la biomasse des racines, des tiges et des feuilles. Par ailleurs la plante synthétise des molécules qui peuvent stimuler chez le champignon la formation du carpophore et la maturation des organes de reproduction (Martin *et al.*, 2001).

1.3.2.4. Protection phytosanitaire

L'association symbiotique est un moyen de lutte contre les organismes pathogènes telluriques. Cette aptitude prophylactique s'opère à travers des mécanismes nombreux et variés qui semblent agir de concert. La modification de l'environnement rhizosphérique par le symbiote fongique influence le développement des microorganismes de la rhizosphère (Smith et Read, 1997). En effet, il s'établit souvent des interactions spécifiques entre le symbiote fongique et la microflore qui peuvent réduire la sensibilité ou augmenter la tolérance des racines aux attaques des organismes pathogènes telluriques (Marx, 1969 ; Garbaye et Bowen, 1987, Garbaye *et al.*, 1992 ; Olsson *et al.*, 1996 ; Duponnois *et al.*, 2000). En effet les champignons produisent des antibiotiques et des composés phénoliques inhibiteurs des agents pathogènes (Marx, 1980 ; Duchesne *et al.*, 1989). Le manteau fongique constitue également une barrière mécanique difficile à franchir par certains microorganismes (Marx, 1972).

2. La mycorhizosphère

La symbiose mycorhizienne induit un changement dans la physiologie de la plante hôte (Linderman et Paulitz, 1990 ; Azcón- Aguilar et Bago, 1994). Cette symbiose joue également un rôle important dans la structure du sol et la stabilisation des agrégats (Tisdall et Oades, 1979 ; Miller et Jastrow, 1990). Ceci entraîne des modifications structurales des cellules racinaires et en conséquence des modifications qualitatives et quantitatives des exsudats racinaires. Ce compartiment microbien influencé par la symbiose mycorhizienne a été nommé « mycorhizosphère » (Rambelli, 1973).

3. La mycosphère

L'installation de la symbiose mycorhizienne entraîne la colonisation d'un certain volume de sol environnant par un vaste réseau d'hyphes fongiques. Cette colonisation a un

effet prononcé sur la microflore tellurique (Wilcox, 1983 ; Agerer, 1997). En effet les hyphes induisent la formation d'agrégats résultant de l'assemblage de matière organique et de particules de sol qui stimulent la prolifération microbienne (Linderman, 1988). Le volume de sol conditionné par ce réseau d'hyphes est qualifié de « mycosphère » (Gilbert et Linderman, 1971).

4. Les microorganismes non symbiotiques et la symbiose mycorhizienne

Au niveau de la rhizosphère, il existe différents groupes microbiens tels que les champignons mais surtout les rhizobactéries. Les champignons mycorhiziens interagissent avec les bactéries rhizosphériques (Linderman, 1988), dont les bactéries symbiotiques des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Azcón *et al.*, 1991), et les bactéries phytopathogènes et (Ingham et Massicotte, 1994).

Duponnois et Garbaye (1991) ont montré que des souches bactériennes isolées de mycorhizes et de carpophores de *Laccaria laccata*, peuvent stimuler l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne entre le Douglas [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] et des champignons appartenant au genre *Laccaria*. Ces rhizobactéries ont été nommées bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM) (Duponnois et Garbaye, 1991). Ces isolats bactériens améliorent la compétitivité du champignon inoculé vis-à-vis de la flore fongique indigène (Duponnois *et al.*, 1993 ; Thomson *et al.*, 1996).

Le concept de bactéries auxiliaires de la mycorhization a été étendu à d'autres modèles de symbiose notamment la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Perrotto et Bonfante, 1997) et d'autres modèles de symbiose ectomycorhiziennes (Frey-Klett, 1996). Ainsi, un grand nombre de BAM a été identifié. Il s'agit de bactéries à Gram positives appartenant au genre *Bacillus* et de Gram négatif appartenant plus particulièrement au groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Les bactéries auxiliaires de la mycorhization peuvent stimuler sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Duponnois et Garbaye, 1991 ; Garbaye, 1994)

Les mécanismes d'actions de ces bactéries demeurent hypothétiques Garbaye, (1994). Frey-Klett *et al* (1997) ont émis trois hypothèses basées sur le niveau d'intervention de ces souches bactériennes : au stade de reconnaissance entre le symbiote et la plante hôte, les bactéries stimulent la réceptivité des racines à la symbiose mycorhizienne et aussi au stade de pré-symbiose, en stimulant la croissance du champignon. En effet, il est en général admis que les champignons mycorhiziens peuvent difficilement dégrader les composés complexes fréquemment rencontrés dans la matière organique du sol. Ils doivent, pour se développer être

rapidement alimentés en composés simples comme le fructose issu de la plante hôte. Les bactéries auxiliaires de la mycorhization pourraient intervenir au niveau des mécanismes de reconnaissance entre la plante hôte et le champignon.

III. Interaction entre champignons

Il est généralement admis que différents champignons mycorhiziens peuvent coexister sur un même système racinaire de la plante hôte. Cordier *et al.* (1994) ont observé que les hyphes des champignons à arbuscules *Gigaspora rosea* et *Glomus* spp. peuvent se mélanger dans les espaces inter et intracellulaires, ce qui suggère qu'il n'y a pas de phénomènes d'exclusion entre ces champignons pendant la phase de colonisation. La formation plus importante d'hyphes, agglomérés en surface des racines pourrait expliquer cette prédominance de la symbiose ectomycorhizienne par rapport à la symbiose endomycorhizien (Gardner et Malajczuk, 1988 ; Lodge et Wentworth, 1990). Cette prédominance est généralement observée chez les espèces capables de maintenir un taux relativement important de l'un ou de l'autre des symbiotes fongiques.

IV. Interaction entre les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote

Les travaux sur les interactions entre les champignons mycorhiziens et les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sont nombreux et beaucoup de cas de synergie entre les effets des deux symbioses sur la croissance de la plante ont été observés (André *et al.*, 2005). Azcón *et al.* (1991) ont démontré que les champignons mycorhiziens interagissent avec les bactéries symbiotiques des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Ducouso (1990) a observé en conditions contrôlées une double symbiose avec *Bradyrhizobium* sp .et *Pisolithus* sp.

Les travaux de Bâ *et al.* (1994) ont montré que l'infection d'une racine d'*Acacia holosericea* par le champignon *Pisolithus* inhibe la multiplication des bradyrhizobia au niveau des racines mycorhizées. En revanche le nombre moyen de nodosités et les pourcentages de racines mycorhizées ne sont pas affectés par la double inoculation.

V. Caractères généraux de *Acacia mangium*

1. Caractéristiques botaniques

A. mangium est un arbre dont la hauteur peut atteindre 25 - 30 m et le diamètre du tronc 60 cm. Le tronc est droit, mais peut être légèrement cannelé à la base. Il peut dépasser la moitié de la hauteur de l'arbre. Les rameaux sont trigones, parfois légèrement farineux, mais deviennent rapidement glabres. Les feuilles possèdent des phyllodes de 21-25 cm de long, 30-95 mm de large, glabres ou légèrement pelliculeux avec trois à quatre (parfois cinq) nervures longitudinales proéminentes. Les fleurs à blanc crème sont groupées en épis lâches de 5-2 cm de long, solitaires ou en paires. Les fruits ont des gousses glabres, enroulées en amas tordus, spiralés parfois serrés, de 3-5 mm de large, valves coriacées à légèrement ligneuses. Les graines sont longitudinales, noires et brillantes. Elles peuvent atteindre 5mm de long. Les graines sont mûres en 5-6 mois.

A. mangium peut être confondu avec *A. holosericea* et *A. neurocarpa* ; mais il s'en distingue par son port d'arbre, ses phyllodes et ses rameaux glabres ; ses fleurs blanches ou crème, et ses graines avec un arille orange.

2. Aire de répartition

Son aire de répartition va de l'Australie à la Nouvelle Zélande. On trouve *Acacia mangium* aux basses altitudes (< 400m) en bordure des forêts ombrophiles du Nord Queensland, en association avec les forêts à lianes soumises aux moussons et dans les savanes boisées ouvertes dans les terres basses de Nouvelle Guinée. On trouve des peuplements isolés au Nord de l'Irian Jaya et dans les îles de Moluques.

A. mangium a été introduit dans de nombreux pays en Asie et en Afrique (Dommergues, 1999).

3. Intérêt de l'arbre

A. mangium est installé parfois sur des terrains de culture appauvris. Le bois de coeur jaune brun est dur. Ce bois est utilisé pour faire des panneaux de particules et du contreplaqué. Le bois est un bon combustible et le charbon de bois est d'assez bonne qualité. La patte à papier est de bonne qualité et aussi facile à préparer.

A. mangium est utilisé aussi pour la réhabilitation des sols grâce à sa croissance rapide et à son ombre dense. En agroforesterie, des essais d'associations avec certaines plantes comme le maïs sont très encourageants (Dupuy et N'Guessan, 1990 ; Zakra *et al.*, 1996).

Acacia mangium est utilisé comme plante d'ornement et pour les plantations d'alignements.

4. Symbiose fixatrice d'azote

A. mangium présente une faible spécificité pour la nodulation puisqu'il peut être nodulé par un grand nombre de souches de Rhizobium. Mais comme l'ont montré des expériences conduites en serre ou en pépinière (Dart et al.,1991) et au champ (Galiana et al.,1994), *Acacia mangium* présente une indiscutable spécificité pour l'effectivité.

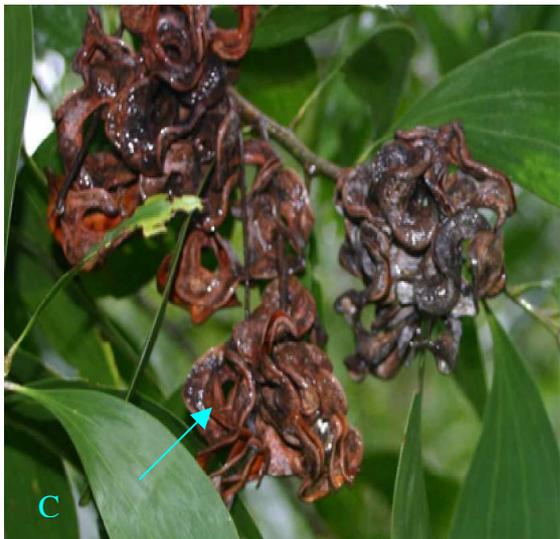


Planche 2 : *Acacia mangium* et ses caractéristiques morphologiques

A : *Acacia mangium* adulte ([http:// www.agroandino.com](http://www.agroandino.com)) ; B : graine d'*Acacia mangium* (<http://www.ftbc.job.affrc.go>) ; C : gousses d'*Acacia mangium* (<http://www.nzenzeflowerpauwels.be>) ; D : fleurs d'*Acacia mangium* ([http : www.morninggarden.com](http://www.morninggarden.com))

MATERIEL ET METHODES

I. Germination des graines de *Acacia mangium*

Les graines de *A. mangium* (Provenance Bayotte. Casamance. Sénégal) ont été désinfectées en surface par de l'acide sulfurique 95% pendant 60 min. Elles ont ensuite été abondamment rincées avec de l'eau distillée stérile puis laissées sous la hotte à flux laminaire pendant quelques heures pour éliminer l'eau de rinçage. Les graines ont été placées stérilement dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée à 0,9 % (p/v). Les boîtes ont été incubées à l'étuve (27°C) pendant 72 h pour permettre la germination. Les graines pré-germées ont été utilisées lorsque leur radicule mesurait 1 à 2 cm de long.

II. Préparation des inocula fongiques et bactériens

L'origine des champignons ectomycorhiziens est indiquée dans le tableau 1. Les souches ont été cultivées en boîte de Petri sur le milieu nutritif MNM à 25°C (Marx, 1969). Les inocula fongiques ont été préparés selon la méthode décrite par Duponnois et Garbaye (1991). Des flacons en verre (800 ml) ont été remplis par 500 ml d'un mélange vermiculite / tourbe (4/1 ; v :v) puis stériliser à l'autoclave pendant 120°C, 20 min. Après cette première stérilisation, le substrat a été humidifié par 250 ml de milieu liquide MNM. Après avoir obturé les flacons avec des bouchons de coton cardé, les flacons et leur contenu ont été une nouvelle fois autoclavés (120°C, 20 min). Après refroidissement des flacons, 10 implants fongiques prélevés à la périphérie des colonies fongiques conservées dans des boîtes de Petri ont été transférés en conditions stériles dans chaque flacon. Les bocaux ont été incubés dans une chambre de culture à 25 °C, à l'obscurité pendant 6 semaines pour obtenir une colonisation complète du substrat par les souches fongiques.

La souche de *Bradyrhizobium* Aust 13C a été isolée de nodosités récoltées dans des plantations naturelles de *A. mangium* en Australie (Galiana et al., 1994). Cette souche préalablement conservée dans des boîtes de Petri sur le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970) a été prélevée en conditions stériles pour être ensemencé dans des enlenmeyers contenant 250 ml de YMA stérilisé (120°C, 20 min). Cette culture a été incubée sous agitation, dans l'obscurité et à 25°C pour obtenir au bout de 8 jours, une concentration de 10^9 UFC ml⁻¹ (UFC : Unités Formant une Colonnie).

Tableau 1 : Origines des souches de champignons ectomycorhiziens utilisées dans l'expérience en serre.

Genres et espèces	Plantes hôtes	Pays	Auteurs
<i>Pisolithus albus</i> IR100 (Martin et al., 2002)	<i>Acacia mangium</i> Willd.	Sénégal (Casamance)	Duponnois, R. & Bâ, A.M. ⁽¹⁾
<i>Scleroderma</i> sp. SC2	<i>Uapaca bojeri</i> L.	Madagascar	Rakotoarimanga, N. ⁽³⁾
<i>Scleroderma dictyosporum</i> pat. IR109	<i>Afzelia africana</i> Sm. ex Pers.	Burkina Faso	Sanon, K. ⁽²⁾
<i>Scleroderma verrucosum</i> Bull. (Pers.) sensu Grev. IR 500	A. africana	Burkina Faso	Sanon, K.
<i>Scleroderma</i> sp. IR409	<i>A. africana</i>	Burkina Faso	Sanon, K.
<i>Scleroderma</i> sp. IR406	<i>A. africana</i>	Burkina Faso	Sanon, K.

⁽¹⁾ Université des Antilles et de la Guyane, BP 592. 97159 Pointe à Pitre, Guyane, France. ⁽²⁾ INERA, Laboratoire de Microbiologie forestière, BP 7047 Ouagadougou, Burkina Faso. ⁽³⁾ Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Centre National de Recherches sur l'Environnement, P.O. Box 1739, Antananarivo, Madagascar.

III. Expérience en serre

Des tubes en plastique (300 ml) ont été remplis avec un mélange sol sableux / inoculum fongique (9/1 ; v :v). Pour le traitement témoin (sans champignon), la quantité d'inoculum (50 ml par litre de sol) a été remplacée par 50 ml d'un mélange tourbe-vermiculite humidifié par le milieu MNM liquide. Le sol a été prélevé dans une plantation de *A. holosericea* située à Sangalkam (50 km à l'est de Dakar). Ses caractéristiques physico-chimiques étaient les suivantes : Argile : 3,6% ; Limon fin : 0,0% ; Limon grossier : 0,8% ; Sable fin : 55,5% ; Sable grossier : 39,4%, Carbone total : 0,17%, Azote total : 0,02% ; C/N : 8,5 ; Phosphore total : 39 mg.kg⁻¹ ; Phosphore assimilable (Olsen) : 4,8 mg.kg⁻¹. Avant le remplissage des pots, le sol a été homogénéisé, tamisé à 2 mm puis autoclavé (120°C, 60 min). Il a ensuite été conservé pendant 8 jours au sec pour permettre la libération de substances gazeuses toxiques pour la plante et/ou les inoculants.

Les quantités requises d'inoculum fongique pour réaliser les différentes combinaisons de souches sont indiquées dans le tableau 2. Une graine pré-germée a été plantée par pot. Les plants ont été placés dans une serre (25°C jour, 15°C nuit, photopériode : 10 H) et arrosés quotidiennement avec de l'eau déminéralisée sans ajout de fertilisant. Les pots ont été placés selon un dispositif en randomisation avec 10 répétitions par traitement. Après 8 jours de culture, l'inoculation avec Aust 13C a été réalisée à raison de 5 ml de culture par pot. Pour le traitement sans Aust 13C, 5 ml de milieu YMA ont été injectés dans chaque pot.

Tableau 2 : Quantités requises d'inoculums fongiques (ml par litre de sol) et bactérien (ml / pot) dans les différents traitements de l'expérience en serre.

Traitements	Aust13C(ml)	Inoculums fongiques					
		IR100	IR109	SC 2	IR500	IR409	IR406
Témoin NI	0	0	0	0	0	0	0
Témoin Aust 13 C (TT0)	5	0	0	0	0	0	0
TT1	5	50	0	0	0	0	0
TT2	5	25	25	0	0	0	0
TT3	5	16,6	16,6	16,6	0	0	0
TT4	5	12,5	12,5	12,5	12,5	0	0
TT5	5	10	10	10	10	10	0
TT6	5	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3

TT0 : AUST 13C ; **TT1 :** IR100 + AUST 13C ; **TT2 :** IR100 + IR109 + AUST 13C ; **TT3 :** IR100 + IR109 + SC2 + AUST 13C ; **TT4 :** IR100 + IR109 + SC2 + IR500 + AUST 13C ; **TT5 :** IR100 + IR109 + SC2 + IR500 + IR409 + AUST 13C ; **TT6 :** IR100 + IR109 + SC2 + IR500 + IR409 + IR406 + AUST 13C

IV. Paramètres mesurés

1. Croissance des plants

La croissance en hauteur des plants a été mesurée chaque mois. Après 4 mois de culture en la serre, les plants ont été dépotés et les poids secs des biomasses aériennes et racinaires produites dans chaque traitement ont été déterminés (65°C, 1 semaine). L'analyse des teneurs en N₂ et en P des parties aériennes a été réalisée par le LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques US191 IMAGO,"Instrumentation, Moyens Analytiques, Observatoires en Geophysique et Oceanographie" IRD/ Sénégal) du centre de recherche ISRA/IRD de Bel Air.

2. Mesure des taux de mycorhization et de la nodulation

Avant le séchage des parties aériennes, le système racinaire des plants ont été découpés en fragments de 1 cm et déposés dans des boîtes de Petri remplies d'eau puis observés à la loupe binoculaire (Grossissement : x 40).

Cent fragments par système racinaire ont été observés. Les taux de mycorhization ont été calculés de la manière suivante : (nombre de racines ectomycorhizées / nombre de racines non mycorhizées) x 100.

Sur chaque système racinaire, les nodosités ont été récoltées, dénombrées puis conservées à – 80°C pour être analysés ultérieurement par hybridation sur membrane.

3. Suivi de la souche *Bradyrhizobium* sp Aust 13C par hybridation sur membrane

La capacité de la souche de *Bradyrhizobium* sp. Aust 13C à noduler les plants de *A. mangium* a été évaluée par hybridation sur membrane. L'hybridation sur membrane est basée sur la possibilité d'associer par des liaisons hydrogènes deux brins d'acides nucléiques (ADN ou ARN) complémentaires. Le but de la technique d'hybridation moléculaire est de détecter spécifiquement à l'aide d'une sonde marquée une séquence d'acide nucléique dans un échantillon biologique.

Une extraction de l'ADN des nodosités récoltées sur chaque système racinaire (20 nodules par traitement) a été réalisée au préalable suivant le protocole ci-dessus :

3.1. Désinfection en surface des nodosités et extraction de l'ADN des nodosités

Les nodosités ont été d'abord rincées à l'eau stérile. Elles ont été plongées dans une solution d'hypochlorite de sodium 3,3 % pendant cinq minutes. Elles sont ensuite été

aseptisées dans de l'éthanol absolu pendant cinq minutes et enfin elles ont été replongées dans de l'eau stérile pendant cinq minutes.

Les nodules ainsi désinfectés sont broyés dans un tampon TES / Saccharose stérilisé à raison de 100µl de tampon par nodosité. Dix microlitres de lysozyme (20 mg.ml⁻¹) ont été ajoutés à chaque broyat. L'ensemble a été ensuite homogénéisé et vigoureusement agité (vortex) pendant 20s puis mis en incubation à 37°C pendant 15 min. Ensuite, 250 µl de GES (Guanidine Thiocyanate, EDTA, Sarcosine) ont été ajoutés à cette suspension. Le mélange a ensuite été homogénéisé et vigoureusement agité (vortex) pendant 20 s et mis en incubation à 65°C pendant 15 min. Puis cet homogénéisât a été centrifugé à 15000 rpm pendant 150 min à 4° c .

Le surnageant a été récupéré et l'ADN a été précipité dans 180 µl d'éthanol absolu. Afin d'assurer une extraction complète de l'ADN, les tubes contenant ces solutions ont été déposés sur une table d'agitation (faible mouvement) et laissés 3 min sur la paillasse. Le précipité a été récupéré après une centrifugation à 15000 rpm pendant 15 min à 4°C et le surnageant a été éliminé.

L'ADN a été lavé deux fois avec 500 µl d'éthanol refroidi par centrifugation à 15000 rpm pendant 15 min à 4 °c. L'ADN ainsi rincé a été séché quelques minutes en laissant les tubes sur la paillasse. L'extrait d'ADN obtenu a été dissout dans un volume de NaOH 8 mM stérilisé permettant une dissolution complète (de 50ul à 200ul).

Après extraction, l'ADN a été dénaturé pendant 10 min à 100 °C et puis placé 10 min dans de la glace plus de l'éthanol.

3.2. Préparation de la membrane

La membrane trempée dans de l'eau déminéralisée a été placée sur une table à faible agitation pendant 5 min.

L'eau déminéralisée a été ensuite remplacée par une solution de SSC (Sodium chloride – triSodium Citrate) 5X préparée à partir d'une solution SSC concentrée (20X). La membrane est alors déposée sur une table à faible agitation dans la solution de SSC 5X pendant 5 min. La membrane a été ensuite récupérée et placée sur du papier Whatman.

3.3. Dépôt des échantillons et hybridation

Pour chaque échantillon, 10 à 15 µl d'ADN ont été déposés dans un puit (trou d'environ 3 mm de diamètre matérialisé dans la membrane).

3.3.1. Préhybridation

Cette étape a pour objectif d'équilibrer la membrane avec la solution d'hybridation et de saturer tous les sites non spécifiques sur lesquels la sonde pourrait se fixer.

La membrane où ont été déposés les échantillons a été immergée dans une solution d'hybridation SSC 5X de composition : 0,5% (p/v) d'agent bloquant, 0,1 % (p/v) sel de N – laurylsarcosine Sodium (sarkosyl) (p/v), 0,02 % SDS (p/v). La membrane a ensuite été incubée dans un four à hybridation pendant 2 h à 68 ° C.

3.3.2. Hybridation au sens strict

La solution d'hybridation a été remplacée par «la solution sonde». La sonde a été dénaturée en la mettant dans un premier temps dans un bain-marie bouillant pendant 10 min, puis dans de la glace et de l'éthanol pendant 5min. La membrane a été immergée pendant une nuit dans « la solution sonde » composée par 10 ml de la « solution sonde » et 10 ml de la solution de préhybridation.

3.3.3. Lavages

Cette étape consiste à éliminer toute hybridation non spécifique et à ne garder que les hybrides sondes / cibles recherchées.

La sonde a été récupérée et la membrane lavée à l'aide de deux solutions : L1 (SSC 2X+ SDS 0,1% p/v) et L2 (SSC 0,1X p/v+ SDS 0,1% p/v). La membrane a été incubée pendant 5 min dans 50 ml de la solution L1 dans un tube à hybridation. Après 5min de lavage, cette solution a été éliminée et remplacée par 50 ml de L1 pour un deuxième lavage de 5 min. Puis la solution L1 a été éliminée et remplacée par la solution L2. La membrane a été alors soumise à deux lavages successifs dans 50 ml de la solution L2 pendant 5 min.

3.3.4. Révélation

Le principe de la révélation consiste à faire reconnaître les sondes par des anticorps ayant des sites moléculaires fluorescents. La révélation immunoenzymatique (anticorps anti-digoxigénine couplée à la phosphatase alcaline) a été réalisée par chimiluminescence (empreinte sur un film photographique X-ray).

La membrane a été rincée dans 100 ml de Tampon T1 (Tris-Hcl 100 mM + Nacl 150 mM) pendant 1min à la température ambiante. Cette solution a été éliminée et remplacée par une

solution T2 (T1 + l'agent bloquant) pour fixer les sites spécifiques. La membrane est lavée dans cette solution pendant 30 min. La solution T2 a été ensuite remplacée par une solution contenant l'anticorps, anti-digoxygénine (4 µl de l'anticorps ont été mélangés à 20 ml du tampon T1), qui se fixe sur la sonde et permet la fixation sur le film.

La membrane a été placée dans la solution contenant l'anticorps pendant 30 min à la température ambiante. Cette solution a été éliminée et remplacée par 100 ml de T1 pour un lavage de 15 min et cette opération a été effectuée deux fois pour permettre d'éliminer complètement l'anti-digoxygénine. La solution T1 éliminée, la membrane a ensuite été lavée avec 96 ml de T3 (Tris – Hcl ,100 mM et Nacl 100 mM) pendant 3 min.

Un mélange de 20 µl de CDP- Star (Boehringer Mannheim) avec 4 ml de T3 a été préparé et conservé à l'obscurité. La membrane a été transférée dans une cuvette. Cette dernière solution a été versée sur la membrane et l'incubation a été réalisée à l'obscurité pendant 5 min.

La membrane a été récupérée et placée dans un sachet en plastique. Avant la fermeture du sachet, toutes les bulles d'air ont été éliminées.

La membrane a été disposée dans une cassette et puis elle a été mise en contact avec un film X-ray (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Boehringer Mannheim) dans une salle obscure pendant 10 à 20 min.

La révélation a été faite par un rinçage dans des solutions révélatrices et fixatrices (Kodak RP X-Omat). Un rinçage dans une solution révélatrice, puis un rinçage dans de l'eau et enfin un rinçage dans une solution fixatrice ont été effectués. Le film obtenu a été séché et l'observation des puits sur la membrane donne des renseignements sur les lieux où l'hybridation s'est effectuée : noir où l'hybridation a eu lieu et blanc où elle n'a pas été réalisée.

IV. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été traitées par une analyse de variance à un facteur contrôlé et les moyennes ont été comparées 2 à 2 en utilisant le test « t » de Student. Avant leur traitement statistique, les taux de mycorhization ont été transformés par la fonction Arc sin (\sqrt{x}). Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview™.

Afin de comparer l'effet de l'inoculation multi-souches à l'inoculation mono-souche, nous avons admis que l'effet du champignon sur la croissance était proportionnel à la quantité d'inoculum mélangé au sol. En conséquence, la stimulation théorique d'une souche dans les traitements d'inoculation multiple a été calculée de la manière suivante :

$$\square (BT) = (BT_{x_{\max}} - BT_{\text{témoin}}) / (50/\text{vol. inoc.})$$

avec BT = Biomasse totale, $BT_{x_{\max}}$ = Biomasse totale mesurée avec la souche x dans le traitement mono-inoculant, $BT_{\text{témoin}}$ = valeur moyenne de la biomasse totale mesurée dans le traitement témoin (inoculation seule avec AUST 13C) et vol inoc = volume d'inoculum de la souche x utilisé dans le traitement multi-inoculant

Ainsi, pour un traitement combinant n souches, l'effet théorique obtenu sera de :

$$BT_{\text{théorique}} = \sum_{i=1,n} [\square (BT)] + BT_{\text{témoin}}$$

RESULTATS

I. Développement des plants d'*A. mangium* inoculés par une seule souche fongique et par *Bradyrhizobium* sp. AUST 13C.

Toutes les souches fongiques testées ont significativement stimulé la croissance des plants de *A. mangium* avec un effet maximal pour la souche Sc2 qui a induit une augmentation de + 80,2% et + 72,7% pour la biomasse aérienne et la biomasse racinaire, respectivement par rapport au traitement témoin (inoculé seulement par AUST 13C) (Tableau 3). La nodulation a également été significativement augmentée en présence de chaque champignon ectomycorhizien et l'effet le plus marqué a été enregistré avec la souche Sc2 (Tableau 3). Les teneurs en N et P des parties aériennes étaient significativement supérieures dans les traitements fongiques par rapport au témoin et variaient de 183,5 mg (IR 406) par plant à 509,7 mg par plant (Sc2) pour le P, de 7 mg par plant (IR 406) à 15 mg par plant (IR 500) pour l'azote (Tableau 3).

II. Développement des plants d'*A. mangium* inoculés par un nombre croissant de souches fongiques et par *Bradyrhizobium* sp. AUST 13C.

Dans l'expérience visant à tester l'effet d'un nombre croissant de souches ectomycorhiziennes sur la croissance de *A. mangium*, les valeurs obtenues atteignaient des valeurs maximales dans le traitement TT5 pour la hauteur, les biomasses aériennes, racinaires et totales (Tableau 4). Ce résultat a également été obtenu pour le nombre de nodules par plant et pour les teneurs en P et N par plant (Tableau 4). Pour les taux de mycorhization, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements exceptés pour TT4 où la colonisation racinaire par les symbiotes fongiques était significativement inférieure à celles mesurées dans les autres traitements (Tableau 4).

L'évolution mensuelle de la hauteur des plants dans les différents traitements est représentée dans la (figure2). Les courbes sont réparties en 2 groupes très distincts à savoir : le 1^{er} groupe composé par les traitements TT0 et TT1 et le 2^{ème} groupe composé par les autres traitements (Figure 2).

Tableau 3 : Effet de l'inoculation avec différentes souches fongiques et par *Bradyrhizobium sp.* AUST 13C sur la croissance et les teneurs en N et P des plants d'*A. mangium*, le développement de la nodulation et de la symbiose mycorhizienne après 4 mois de culture en serre.

	Souches de champignons ectomycorhiziens						
	Témoin	IR100	IR109	Sc2	IR500	IR409	IR406
Biomasse aérienne (mg poids sec)	160 (46) ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	487 (27) bc	385 (47) b	808 (83) d	717 (107) cd	508 (54) c	318 (36) b
Biomasse racinaire (mg poids sec)	60 (12) a	150 (23) b	123 (15) b	220 (33) c	197 (17) bc	163 (17) b	117 (9) b
Biomasse totale (mg poids sec)	220 (45) a	637 (44) c	508 (62) bc	1028 (114) d	913 (122) cd	670 (70) c	435 (45) b
Hauteur (cm)	8,6 (0,59) a	11,4 (0,55) bc	11,3 (0,84) bc	15,6 (0,90) d	12,9 (1,11) c	13,1 (0,93) cd	10,3 (0,46) b
Nombre de nodule par plant	7,3 (0,3) a	18,8 (2,5) b	21,2 (3,5) b	56,8 (12,7) c	21,3 (4,9) bc	11,1 (4,8) ab	13,8 (4,5) a
Taux de mycorhization (%)	0 a	71,0 (6,1) c	35,0 (4,2) b	46,6 (5,6) b	68,3 (4,4) c	42,8 (13,7) b	79,4 (4,4) c
Taux de P par plant (mg)	44,2 (12,6) a	209,2 (11,5) b	236,8 (28,9) b	509,7 (52,1) c	375,3 (56,1) bc	295,4 (31,3) bc	183,5 (20,7) b
Teneur en N par plant (mg)	3 (0,001) a	10 (0,001) c	9 (0,001) bc	14 (0,001) d	15 (0,002) d	11 (0,001) cd	7 (0,001) b

⁽¹⁾ Erreur standard, ⁽²⁾ Les valeurs d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test "t" de Student ($p < 0,05$).

Tableau 4 : Effet de l'inoculation par un nombre croissant de souches fongiques et par *Bradyrhizobium* sp. AUST 13C sur la croissance et les teneurs en N et P des plants d'*A. mangium*, le développement de la nodulation et de la symbiose mycorhizienne après 4 mois de culture en serre.

	Combinaisons d'inocula fongiques						
	TT0 ⁽¹⁾	TT1	TT2	TT3	TT4	TT5	TT6
Biomasse aérienne (mg poids sec)	160 (45) ⁽²⁾ a ⁽³⁾	487 (27) b	902 (163) cd	805 (85) c	1175 (176) cd	1227 (45) d	1137 (105) cd
Biomasse racinaire (mg poids sec)	60 (12) a	150 (23) b	282 (41) c	220 (25) bc	280 (50) c	330 (44) c	297 (38) c
Biomasse totale (mg poids sec)	220 (55) a	637 (44) b	1185 (204) cd	1025 (110) c	1455 (215) c	1557 (85) d	1435 (132) d
Hauteur (cm)	8,6 (0,59) a	11,4 (0,55)	16,2 (0,57) b	15,3 (0,53) b	19,6 (0,43) c	21,2 (0,42) d	17,4 (0,74) b
Nombre de nodules par plant	7,3 (0,3) a	18,8 (2,5) b	39,2 (1,1) cd	33,2 (4,1) c	89,0 (23,1) de	132,5 (20,9) e	91,5 (13,8) e
Taux de mycorhization (%)	0	71,0 (6) ab	74,4 (3,4) b	75,1 (0,5) b	68,8 (1,8) a	76,9 (2,6) b	78,4 (1,4) b
Teneur en P par plant (µg)	44,2 (12,6) a	209,2 (11,5) b	565,9 (102,1) c	648,8 (68,6) c	1108,9 (165,9) d	1283,9 (47,1) d	1074,9 (99,5) d
Teneur en N par plant (mg)	3,3 (0,96) a	10,5 (0,58) b	18,5 (3,34) c	18,3 (1,93) c	25,1 (3,74) cd	29,2 (1,07) d	25,5 (2,35) d

⁽¹⁾ **TT0** : AUST 13C ; **TT1** : IR100 + AUST 13C ; **TT2** : IR100 + IR109 + AUST 13C ; **TT3** : IR100 + IR109 + SC2+ AUST 13C ; **TT4** : IR100 + IR109 + SC2 + IR500 + AUST 13C ; **TT5** : IR100 + IR109 + SC2 + IR500 + IR409 + AUST 13C ; **TT6** : IR100 + IR109 + SC2 + IR500 + IR409 + IR406 + AUST 13C.

⁽²⁾ Erreur standard, ⁽³⁾ Les données d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test "t" de Student (p < 0,05).

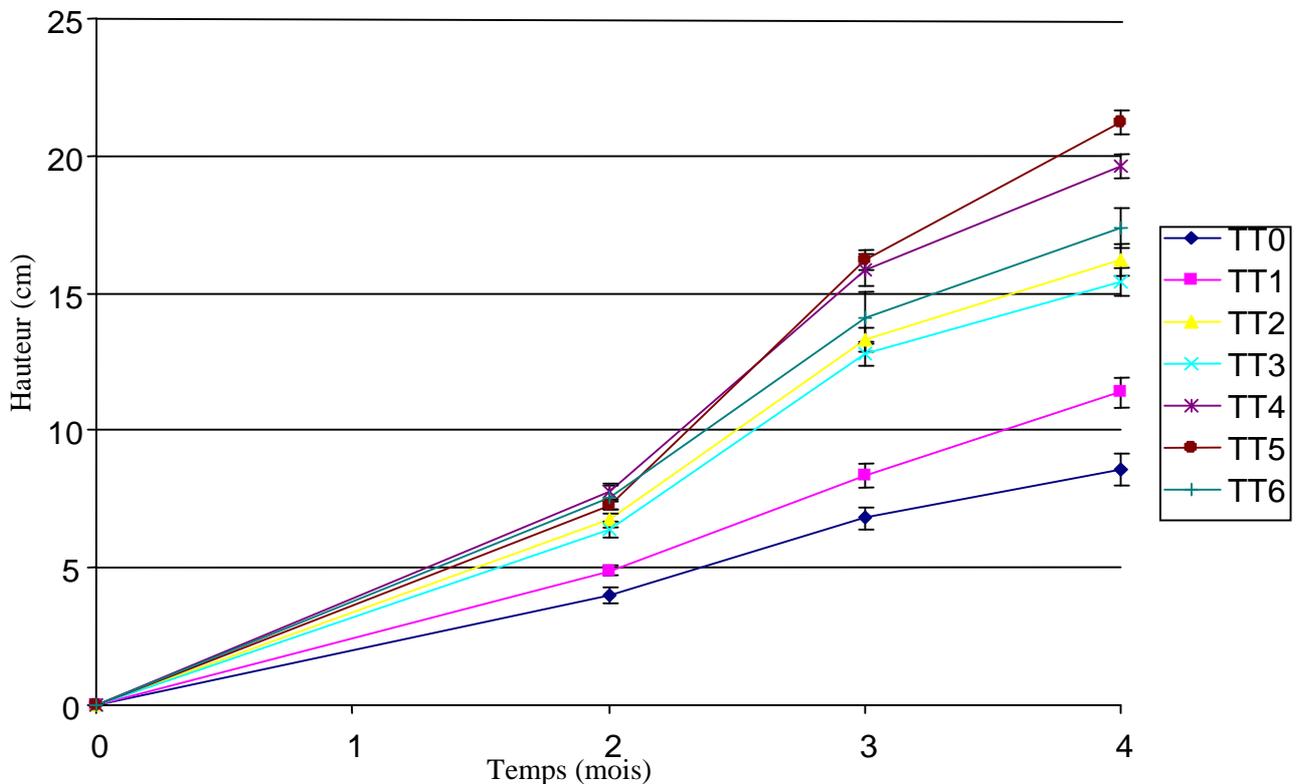
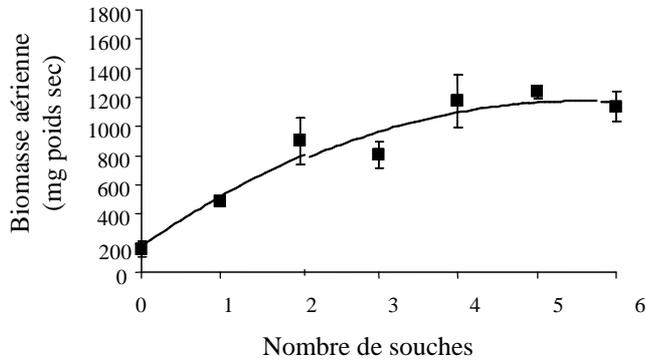


Figure 2 : Evolution de la hauteur des plants de *A. mangium* en fonction du nombre de souches de champignons ectomycorhiziens inoculés aux plants. Légende : voir tableau 4.

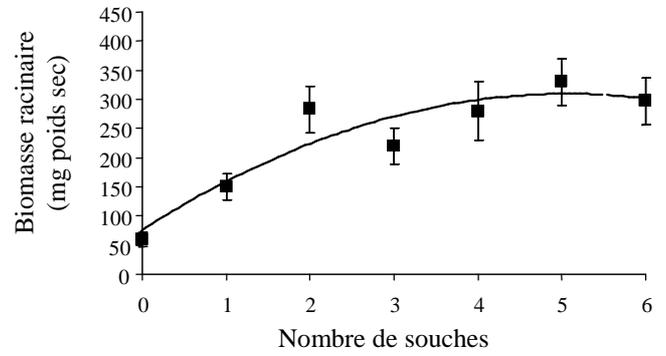
Les tests de régression effectués entre le nombre de souches inoculées et les paramètres mesurés sur les plantes montrent que la croissance de *A. mangium*, la nodulation, la mycorhization sont significativement dépendants du nombre de souches inoculées. En effet, plus le nombre d'inoculants fongiques augmente, plus les valeurs obtenues (biomasse, nombre de nodules par plant, taux de mycorhization, teneurs en P et N des feuilles) sont élevées.

Les courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et différents paramètres de croissance des plants d'*A. mangium* (biomasse aérienne, racinaire, totale), le nombre de nodules par plant, le taux de mycorhization et la teneur en P des parties aériennes sont présentées dans la (figure3). Ces courbes atteignent un plateau lorsque quatre souches sont inoculées (biomasses) ou cinq pour la teneur en P des feuilles. En ce qui concerne le nombre de nodules par plant, ce nombre augmente considérablement ce qui laisse supposer que la nodulation est extrêmement dépendante de la diversité des souches de champignons ectomycorhiziens inoculées.

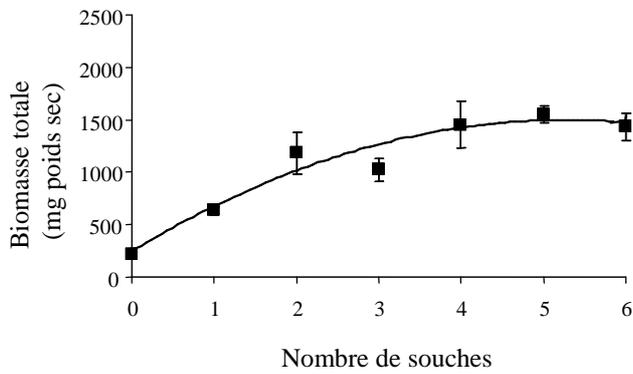
(A)



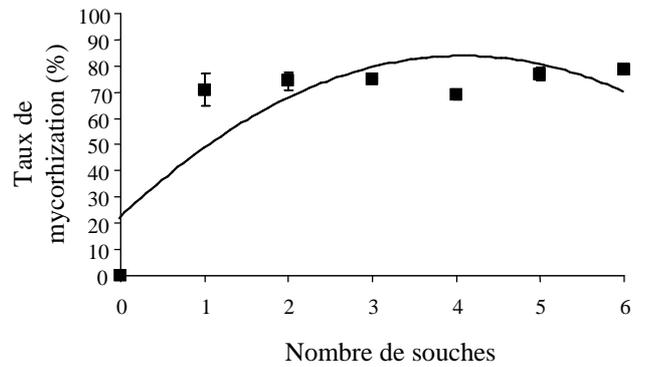
(B)



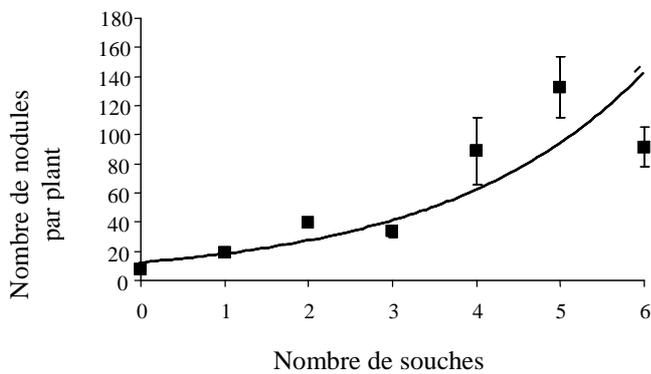
(C)



(D)



(E)



(F)

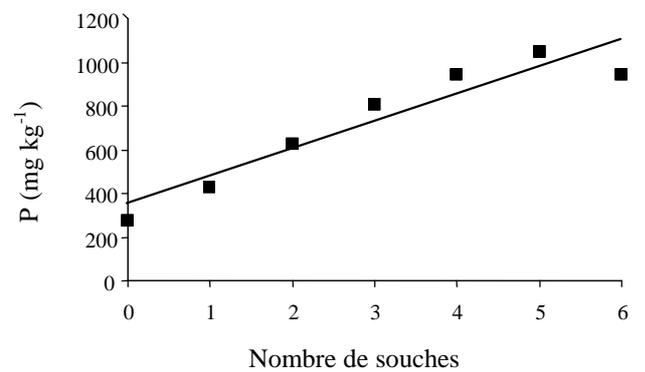


Figure 3. Courbes de régression entre le nombre de souches inoculées et la croissance des plants, la nodulation du système racinaire et la teneur en P des parties aériennes.

Tableau 5 : Equation et coefficient de régression des courbes calculées entre le nombre de souches de champignons ectomycorhiziens inoculés et les différents paramètres mesurés sur les plants d'*A. mangium* après 4 mois de culture en serre.

Paramètres mesurés	Equations	Coefficients de régression (<i>r</i>)	Probabilités (<i>p</i>)
Biomasse aérienne (mg poids sec)	$y = -35,23 x^2 + 378,6 x + 164,6$	0,85	< 0,0001
Biomasse racinaire (mg poids sec)	$y = -9,09 x^2 + 92,4 x + 72,8$	0,74	< 0,0001
Biomasse totale (mg poids sec)	$y = -44,3 x^2 + 471,1 x + 237,3$	0,84	< 0,0001
Hauteur (cm)	$y = 1,37 x + 7,36$	0,76	< 0,0001
Nombre de nodules par plant	$y = 11,47 e^{0,4189 x}$	0,89	< 0,0001
Taux de mycorhization (%)	$y = -3,69 x^2 + 30,2 x + 21,68$	0,79	< 0,0001
Teneur en P des parties aériennes (mg kg ⁻¹)	$y = -22,5 x^2 + 263,6 x + 224,85$	0,99	< 0,0001
Teneur en N des parties aériennes (%)	$y = 0,0002 x^2 + 0,034 x + 2,08$	0,65	0,0014

La comparaison des biomasses totales théoriques et biomasses totales mesurées dans l'expérience en serre montre que l'effet positif obtenu dans les différents traitements multi-inoculants est très supérieur à celui susceptible d'être obtenu en additionnant l'impact potentiel de chaque souche (mesuré dans l'expérience mono-inoculant) sur la croissance des plants de *A. mangium* (Figure5).

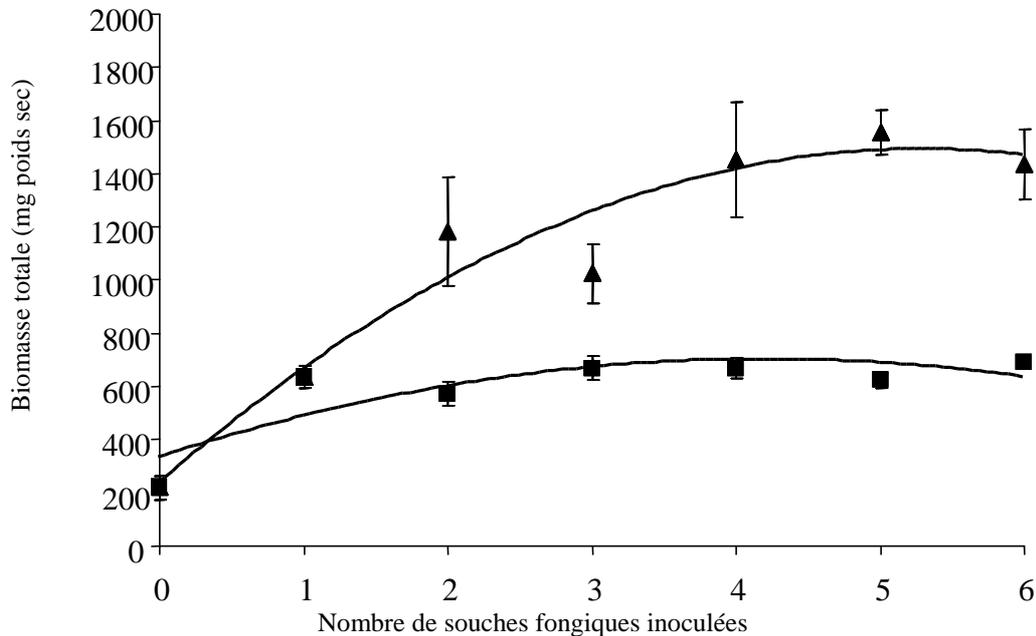


Figure 4 : Comparaison de l'effet théorique de l'inoculation fongique sur la biomasse totale des plants versus l'effet mesuré dans l'expérience en serre après 4 mois de culture. ■ : Biomasse totale théorique ; ▲ : Biomasse totale mesurée

III. Mesure de la capacité de nodulation de AUST 13C dans les différents traitements

La distribution de Aust13C dans les nodosités récoltés dans chaque traitement et analysée par hybridation sur membrane (planche 3) montre des répartitions significativement différentes entre les traitements ($\chi^2 = 16$; $p = 0,0137$) (Figure 4).

Les pourcentages d'occupation des nodules par Aust 13C diminuent progressivement jusqu'au traitement TT5 (bien que les différences ne soient pas significatives) alors que, pour le traitement TT6, la totalité des nodules ont été formés par Aust 13C (Figure 4).

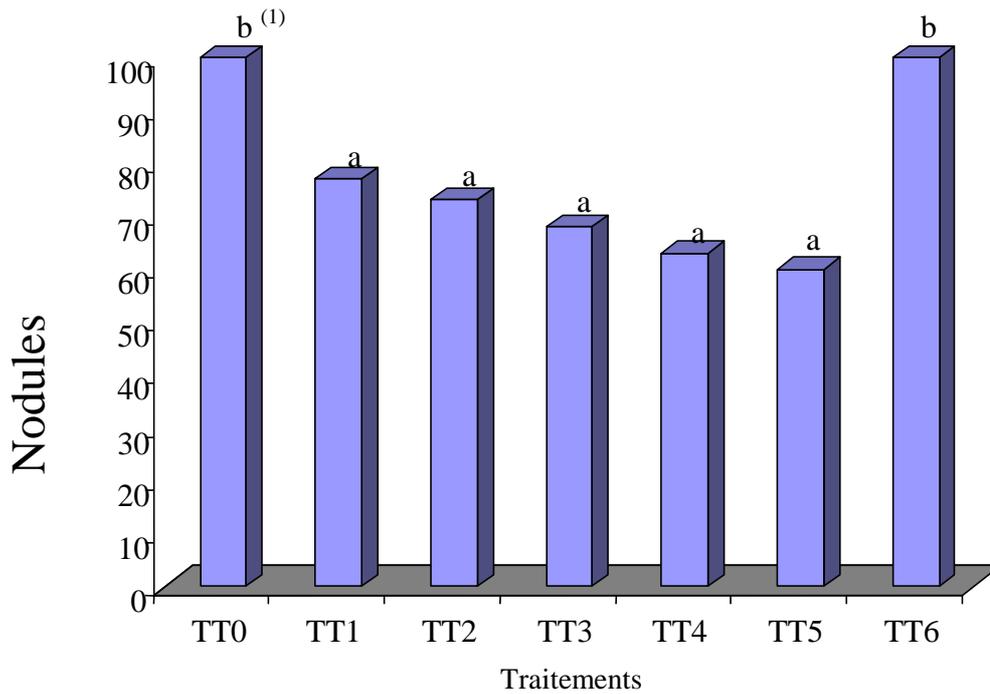


Figure 5 : Pourcentages de nodules formés par *Bradyrhizobium sp.* AUST 13C dans les différents traitements. ⁽¹⁾ Les colonnes indexées par une même lettre ne sont significativement différentes d'après le test du Khi2.

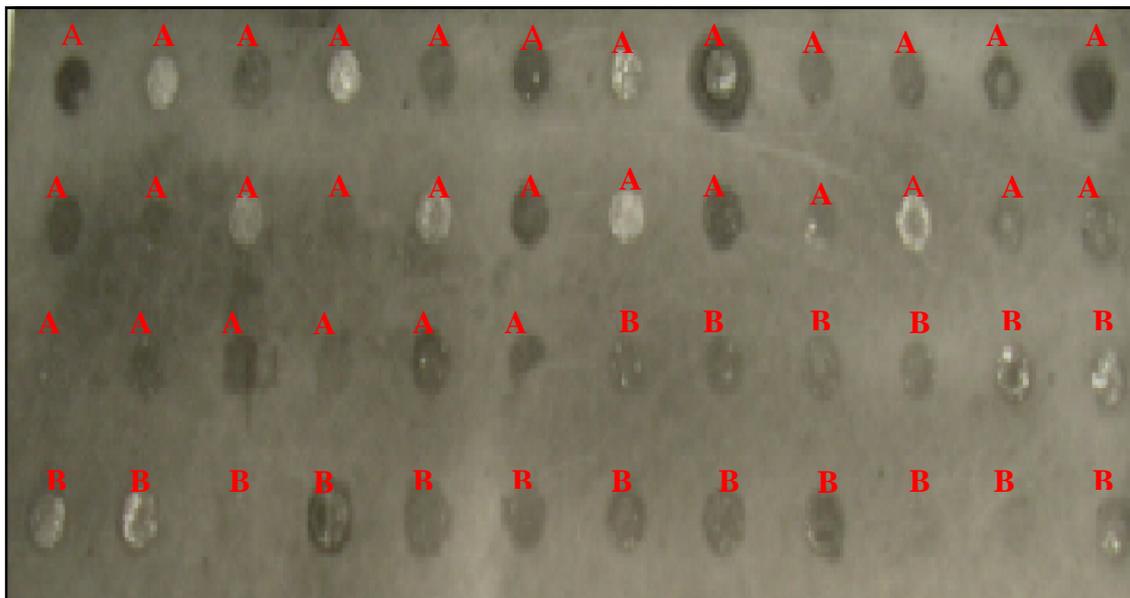


Planche 3 : Hybridation sur membrane d'ADN extrait de nodules d'*Acacia mangium* avec la Sonde Aust 13C. Points noirs : sites où l'hybridation s'est effectuée, points clairs : sites où l'hybridation n'a pas eu lieu.

A : Inoculé avec *Pisolithus alba* (IR100) + Aust 13C ; B : Inoculé avec *Sclerotinia dictyosporum* + Aust 13C

DISCUSSION

L'inoculation d'*Acacia mangium* par des souches fongiques en présence d'une Bradyrhizobium Aust13C augmente significativement la croissance des plantes inoculées. Cette croissance est en fonction du nombre de souches inoculées (figures 2 et 3A,3B, et 3C). La différence significative de croissance entre les plantes inoculées et les plantes non inoculées s'explique par le fait que les Rhizobium et les champignons améliorent la croissance des plantes associées et ceci a été démontré chez les Acacias australiens comme *A. mangium* par Cornet et Diem 1982 ; Galiana et al. 1994 ; Duponnois et al. 2000. Des résultats similaires ont été trouvés avec le *Pisolithus. albus* strain IR100 André et al (2005) avec le *P.albus* COI024 Duponnois et al (2000) mais aussi avec le *Scleroderma verrucosum* IR500 et le *Scleroderma dictyosporum* IR109 Duponnois et Plenchette (2003).

Cette différence de croissance entre plantes inoculées et plantes non inoculées, est liée au fait que les microorganismes symbiotiques champignons et rhizobium améliorent la nutrition de la plante hôte. Cela a été confirmé par Cornet et Diem 1982, Cornet et al 1982, Bâ et al 1996 et enfin par Duponnois et al. 2001. En concordance avec nos résultats, le tableau 3 et 4 montre bien que l'inoculation augmente significativement la teneur en phosphore des plants. Et la figure 3 F montre bien que le taux de phosphore des parties aériennes augmente en fonction du nombre de souches inoculées ; cela explique d'une partie l'augmentation de la croissance en fonction du nombre de souches inoculées. La valeur maximale été observée avec l'inoculation par cinq souches (figure3F). Or, Bolan 1991 a trouvé que les champignons ectomycorhiziens améliorent la fertilité des sols en accroissant la concentration en éléments minéraux. Et ainsi, ils améliorent la croissance de la plante hôte en augmentant la disponibilité de certains éléments comme le phosphore qui est un facteur limitant de la croissance des plantes des zones tropicales Duponnois et al,(2005).

Dans le cas des mycorhizes à vésicules et arbuscules des résultats similaires ont été trouvés par Van der Heijden et al,(1998) ; ces derniers ont démontré que la diversité des champignons arbusculaires augmente le taux de phosphore dans les parties aériennes des plantes. Les résultats de Van der Heijden et al,(1998) ont montré aussi que la productivité et la diversité d'un écosystème sont étroitement liées à la diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules présents dans le milieu. Cette action positive des champignons mycorhiziens à arbuscules sur la diversité de l'écosystème a été démontré par d'autres auteurs comme Grime et al.,1987, Clays et Holah,1999 ; Rudgers et al.,2004 et cela peut être dû par une action synergique des champignons.

Cette augmentation de la croissance des plantes inoculées est aussi liée à la mycorhization. Le tableau 3 et 4 montrent que le système racinaire des plants inoculés est plus développé que celui des plants non inoculés. Cette amélioration du développement des plants inoculés peut s'expliquer par l'important développement du système racinaire (Rovira,1972) et également par l'importance du volume de sol colonisé grâce aux hyphes.

Si on admet que l'effet du champignon sur la croissance était proportionnel à la quantité d'inoculum mélangé au sol, on trouve que l'effet théorique de l'inoculation fongique sur la biomasse totale des plants est inférieur à l'effet mesuré dans l'expérience en serre (figure 5). Cela peut s'expliquer par une action synergique entre les souches fongiques co-inoculées à la plante.

A côté de la croissance, l'inoculation améliore aussi le taux de nodulation des plants. La nodulation plus importante pour les traitements avec inoculum s'explique par la présence d'une Bradyrhizobium qui a la capacité de s'associer avec *A mangium* et former des organes particuliers les nodosités. Le tableau 4 et la figure 3D montrent que la nodulation a significativement augmentée en présence des champignons. Les valeurs maximales ont été atteintes dans le traitement TT5. Cet effet positif des champignons sur la nodulation observée dans nos résultats a été démontré par plusieurs auteurs chez les endomycorhizes Duponnois et Planchette (2003), avec *Glomus intraradices*, Senghor (1998) avec le *G. fasciculatum* de même que Cornet et Diem avec le *G. mossea* (1982).

Par ailleurs il est connu que les champignons ectomycorhiziens accroissent le nombre de nodules par plante chez les espèces australiennes comme *A. holosericea* et *A. mangium* (Founoune et al. 2000 a,b, c ; Duponnois et al. 2002 ; Duponnois et Planchette 2003). L'effet positif des mycorhizes sur la nodulation peut être expliqué par la croissance importante du système racinaire favorisant une colonisation massive suivie d'une infection des racines par les rhizobia. En outre, les mycorhizes modifient la fonction du système racinaire particulièrement dans l'excrétion d'exsudats racinaires et de ce fait, ils peuvent modifier la communauté microbienne (effet mycorrhizosphère) Katznelson et al. (1962), Linderman (1988). En plus les hyphes extraracinaires des champignons ectomycorhiziens influencent la composition chimique, le pH du milieu en y sécrétant des substances chimiques. (Frey et al. 1997 ; Caravaca et al.2000). Toutes ses modifications physiques et chimiques facilitent le développement des Bradyrhizobium et par conséquent accroissent le processus de la nodulation.

Nos résultats montrent que le nombre de nodules obtenus augmentent en fonction du nombre de souches fongiques inoculées à la plante (figure 3 E et tableau 4). La valeur maximale a été

obtenue dans le traitement TT5. Cela peut être dû au fait que la formation et le fonctionnement des nodules dépendent des champignons mycorhiziens (Reddel et Warren 1986). Car ces derniers améliorent le prélèvement du phosphore ce qui accroît la nodulation et la fixation d'azote (Cornet et Diem 1982).

Les mesures de la capacité de nodulation par AustT 13C ont montré que pour les traitements TT6 et TT0 la totalité des nodules ont été formés par AustT 13 C (figure 4). Par contre on remarque que les pourcentages d'occupation des nodules par AustT 13C diminuent progressivement à partir du TT1 jusqu'au traitement TT5 (mais les différences ne sont pas significatives). Ceci peut être expliqué par l'absence de la souche AustT 13C dans les nodules ou par la présence dans l'extrait d'ADN de débris accrochant la sonde ce qui empêchera l'hybridation avec AustT 13 C.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude qui a porté sur deux points ; d'abord sur l'évaluation de la croissance de la plante hôte en fonction d'une diversité croissante de champignons ectomycorhizien associé a montré que la diversité du cortège mycorhizien a une influence directe ou indirecte sur la croissance de *Acacia mangium*. Mais l'effet de chaque champignon pris isolément a été testé. Cet effet a montré que toutes les souches fongiques stimulées significativement la croissance de *Acacia mangium*. Un effet maximal a été noté pour la souche *Scleroderma sp* SC2 qui améliore significativement la biomasse aérienne et la biomasse racinaire de *A.mangium*.

L'inoculation avec une diversité de champignons augmente la croissance de la plante hôte. Les résultats ont montré que plus le nombre de souches fongiques inoculées à *A. mangium* augmente plus la croissance de cette plante est importante. La croissance maximale étant obtenue avec cinq souches.

Pour les traitements mono-inoculés, les taux de mycorhization les plus importants ont été trouvés avec les souches suivantes, le *Pisolithus alba* (IR100), le *Scleroderma verrucosum* Bull. (Pers.) sensu Grev. IR 500 et le *Scleroderma sp* (IR406). La combinaison d'inocula fongiques a amélioré la mycorhization mais il y'a pas de différence significative entre les différentes combinaisons.

Le taux de phosphore a augmenté aussi en fonction du nombre de souches fongiques inoculées et la valeur la plus importante a été obtenue avec le traitement TT5 inoculation avec cinq souches de champignons. On note aussi une augmentation significative du taux d'azote pour les traitements pluri- inoculés.

La nodulation chez *Acacia mangium* a été améliorée par l'inoculation avec un complexe de souches fongiques. Plus le nombre de souches de champignons augmente, plus le nombre de nodules augmente. La valeur maximale a été notée pour le traitement TT5 (combinaison de cinq souches fongiques).

Pour la confirmation des résultats, les travaux ont été conduits en buse mais aussi une transplantation aux champs est prévue.

Une étude permettant la sélection des souches serait nécessaire pour mettre en une place des combinaisons d'inocula fongiques plus performantes.

Il serait aussi intéressant d'évaluer si l'effet du champignon sur la croissance était proportionnel à la quantité d'inoculum.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agerer, R. 1997. Studies on ectomycorrhizas. XXIV. Ectomycorrhizas of *chroogomphus helveticus* and *C. rutillis* (Gomphidiaceae, Basidiomycètes) and their relationship to those of *Suillus* and *Rhizopogon*. *Nova Hedwigia*, 50 : 1-63. In : Smith S. E. & Read, D. J. (Ed.). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London. 2nde édition. 605 pages.
- Alazard, D. et Becker, M. 1985. Stem and root nodulation in *Aeschynomene spp.* . *App. Environ. Microbiol.*, 50 : 732-734.
- Allen, O. N. et Allen, E. K. 1981. *The leguminosae : A source book of charecteristic, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, Madison.
- Allsopp, N. et Stock, W. D. 1992. Mycorrhizas, seed size and seedling establishment in low nutrient environment. *In* : Read DJ, Fitter DH, Alexander IJ (eds.). *Mycorrhizas ecosystems*. CAB International, Wallingford, UK ; pp. 59-64.
- André, S., Neyra, M. et Duponnois, R. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis changes the colonization pattern of *Acacia tortilis spp.raddiana* rhizosphère by two strains of rhizobia. *Microbial Ecology*, 45 : 137-144.
- André, S., Galiana, A., Le Roux, C., Prin, Y., Neyra, M. et Duponnois, R. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis enhanced the efficiency of two Bradyrhizobium inoculated on *Acacia holosericea* plant growth. *Mycorrhiza*, 15 : 357-364.
- Augé, R. M. et Duan, X. 1991. Mycorrhizal and non-hydraulic root signals of soil drying. *Plant of soil*, 97 : 821-824.
- Assigbetse, K., Gueye, M., Thioulouse, J. and Duponnois, R. 2005. Soil bacterial diversity responses to root colonization by an ectomycorrhizal fungus are not root-growth dependent. *Microbial Ecology*, 50: 350-359.
- Azcon, R., El-Atrach, F., Barea, J. M. 1988. Influence of mycorrhiza vs. soluble phosphate on growth and N₂ fixation (¹⁵N) in alfalfa under different levels of water potential. *Biol Fertil Soils* 7 : 28–31.
- Azcón, R., Rubio, R. et Barea, J. M. 1991. Selective interactions between differents species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N₂-fixation(¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist*, 117 : 399-404.
- Azcón-Aguilar, C. et Bago, B. 1994. Physiological charecteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. In : Gianinazzi, S. and Schüepp, H. (Ed.), *Impact of arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and naturel Ecosystems*. ALS, Bikhâuser, Basel. 47-60 pp.
- Bâ, A. M., Thoen, D. 1990. Fisrt syntheses of ectomycorrhiza between *Afzelia africana* (*Ceasalpinioideae*) and native fungi from West Africa. *New Phytol*, 114 : 99-103.
- Bâ, A. M., Balaji, B. et Piché, Y. 1994. Effect of time of inoculation on in vitro ectomycorrhizal colonisation and nodule initiation in *Acacia holosericeae* seedlings. *Mycorrhiza*, 4 : 109-119.

- Béguiristain, T., Lapeyrie, F. 1997. Host plant stimulate hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hypae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytologist*, 136 : 525-532.
- Béreau, M., Gazel, M. et Garbaye, J. 1997. Les symbioses mycorhiziennes des arbres de la forêt tropicale humide de Guyane française. *Canadian Journal of Botany*, 75 : 711-716.
- Bogeat-Triboulot, M. I., Bartoli, F., Garbaye, J., Marmeisse, R., Tagu, D. 2004. « Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings » *Plant and soil*, 267 : 213-223.
- Boivin, C. et Denarie, J. 1998. La symbiose rhizobium –Legumineuses : Gènes et signaux de nodulation en perspectives. *Bull. Soc. Fr. Microbio*, 13 (3).
- Boukcim, H. et Plassard, C. 2003. Juvenile nitrogen uptake capacities and root architecture of two open-pollinated families of *Picea abies*. Effect of nitrogen source and ectomycorrhizal symbiosis. *J. Plant Physiol*, 160 : 1211-1218.
- Caravaca, F., Garcia, C., Hernandez, M. T., Roldan, A. 2002. Aggregate stability changes after organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halepensis*. *Appl Soil Ecol*, 19 : 199-208.
- Chabot, S., Bel-rhlid, R., Chênevert, R. et Piché, Y. 1992. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora Margarita* Beker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*, 122 : 408-417.
- Chen, W. X., Yan, G. H., Li, J. L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 38 : 392-397.
- Chen, W. M., Leevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M. et Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51 : 1729-1735.
- Cordier, C., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 1994. An immunological approach for the study of spatial relationships between arbuscular mycorrhizal fungi in planta. In : integrated systems from genes to plant development. Proc. 4th E.S.M. Granada 11-14 July 1994, pp 25-30. European Commission Report EUR 16728 EN.
- Cornet, F. et Diem, H. G. 1982. Etude comparative de l'efficacité des souches de *Rhizobium* d'*Acacia* isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium-Glomus mossae* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. *Bois et forêts des Tropiques*, 198 : 3-15.
- Cromer, D. A. N. 1935. The significance of the mycorrhiza of *Pinus radiata*. *Bull. For. Bur. Aust*, 16 : 1-19.
- Dart, P., Umali-Garcia, M., Almendras, A. 1991. Role of symbiotic associations in nutrition of tropical acacias. In : Turnbull JW (éd) *Advances in tropical Acacia research*, pp 13-19.

Canberra : ACIAR

Davet, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, 383p.

de Faria, S. M., Franco, A. A., de Jesus, R. M., Menandro, M. de S., Baitello, J. B., Mucci, E. S. F., Dobereiner, J. et Prent, J. I. 1984. New nodulating legume trees from South- East Brazil . *New Phytol.* 98 : 317-328.

de Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I. et Sutherland, J. M. 1989. Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytol.* 111 : 607-619.

De La Cruz, R. E. and Garcia, M. U. 1991. Nitrogen fixation and mycorrhizae in Acacias on degraded grasslands. In: Awang, K., Taylor, D.A. (Eds.). *Tropical Acacias in East Asia and the Pacific*. Winrock International, Bangkok, Thailand, pp. 59-71.

de Lajudie, P., Laurent – Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collin, M. D., Krester, K., Dreyfus, B., Gillis, M. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Bacteriol.* 48 : 1277- 1290.

Denarie, J., Debelle. F., Prome, J. C. 1996. Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Ann. Rev. Biochem.*, 65 : 503-535.

Ditengou, F. A. et Lapeyrie, F. 2000. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not symbiotic auxins in eucalypt seedlings. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13 : 151-158.

Dommergues, Y., Duhoux, E. et Diem, H. G. 1999 . Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec références particulières aux zones subhumides ides et arides. Ed. CIRAD, ESPACES, FAO, et IRD, Paris (France), 499p.

Donfack, P. 1994. Typologie de la végétation des jachères (Cameroun). Rapport Scientifique. Raccourcissement de temps de jachère, biodiversité et développement durable en Afrique Centrale (Cameroun) et en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Mali). ORSTOM. 73-93pp.

Douds, D. D. et Nagashashi, G. 2000. Signaling and recognition evnts prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi. In : Podila, G. k. and Douds, D. D. (Eds.). *Current advances in Mycorrhizae Research*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul – Minnesota. 11-18 pp.

Dreyfus, B. L. et Dommergues, Y. R. 1981. Nodulation of Acacia species by fast-and slow-growing tropical strains of Rhizobium. *App. Environ. Microbiol.* 41 : 97-99.

Dreyfus, B., Garcia, J. l., Gillis, M. 1988. Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp .nov., a stem – nodulating nitrogen –fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 : 89-98.

- Duchesne, L. C., Ellis, B. E. et Peterson, R. L. 1989. Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Puxillus incolutus* : contribution of oxalic acid. *Can. J. Bot.*, 67 : 2726-2730.
- Ducouso, M. 1990. Importance des symbioses racinaires pour l'utilisation des Acacias en Afrique de l'Ouest. Thèse de l'université Claude Bernard Lyon 1. 205 pages.
- Duddridge, J. A., Malibari, A. et Read, D. J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, 287 : 834-836.
- Duddridge, J. A., Read, D. J. 1982. An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Monotropa hypopitys* L. *New Phytol.*, 92 : 203-214.
- Duponnois, R. et Garbaye, J. 1991. Mycorrhiza helper bacteria associated with the Douglas fir *Laccaria laccata* symbiosis : effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Annales des Sciences Forestières*, 48 : 239-251.
- Duponnois, R., Garbaye, J. 1991. Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir - *Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Ann. Sci. For.* 48 : 139-251.
- Duponnois, R., Garbaye, J., Bouchard, D. et Churin, J. L. 1993. The fungus specificity of mycorrhization helper bacteria (MHBs) used as an alternative to soil fumigation for ectomycorrhizal inoculation of bare-root Douglas-fir planting stocks with *Laccaria laccata*. *Plant and soil*, 157 : 257-262.
- Duponnois, R., Bâ, A. M. 1998. Growth stimulation of *Acacia mangium* Willd by *Pisolithus* sp. in some senegalese soils. *For. Ecol. Manag.*, 119 : 209-215.
- Duponnois, R., Founoune, H., Lesueur, D., Thioulouse, J., Neyra, M. 2000. Ectomycorrhizal of six *Acacia auriculiformis* provenances from Australia, Papua New Guinea and Senegal in glass house conditions : effet on the plant growth and on the multiplication of plant parasitic nematodes. *Aust J Exp Agric*, 40 : 443-450.
- Duponnois, R., Founoune, H., Bâ, A. M., Plenchette, C., El jafaari, S., Nyera, M., Ducouso, M., 2000. Ectomycorrhization of *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don by *Pisolithus* spp. in Senegal : effet on plant growth and on the roots- knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Ann. Sc. For.*, 57 : 345-350
- Duponnois, R., Plenchette, C., Bâ, A. M. 2001. Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *G. aggregatum* in Senegal. *Eur J Soil Biol* 37:181–186.
- Duponnois, R., Founoune, H. and Lesueur, D. 2002. Influence of the controlled dual ectomycorrhizal and rhizobial symbiosis on the growth of *Acacia mangium* provenances, the indigenous symbiotic microflora and the structure of plant parasitic nematode communities. *Geoderma*, 109: 85-102.
- Duponnois, R. et Plenchette, C. 2003. A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza*, 13 : 85-91.

Duponnois, et al. 2005. Inoculation of *Accia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in semiarid site in Senegal : growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation : Forest Ecology and management. 207 : 351-362.

Dupuy, B. et N'Guessan Kanga, A. 1990. La sylviculture d'*Acacia mangium*. Bois For Trop, 225 : 24-32.

Founoune, H., Duponnois, R., Bâ, A. M. 2002. Ectomycorrhization of *Acacia mangium*, Willd. and *Acacia holosericea*, A. Cunn. ex G. Don in Senegal. Impact on plant growth, populations of indigenous symbiotic microorganisms and plant parasitic nematodes, 50 : 325-332.

Frank, A. B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. Berichte der Detsche Botanische Gesellschaft, 3 : 128-45.

Frey-Klett, P. 1996. Ecologie d'un *Pseudomonas fluorescens* auxiliaire de la mycorrhization. Thèse de doctorat de l'Université de Paris XI. 123 p.

Frey, P., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Berge, O. and Heulin, T. 1997. Metabolic and genotyping fingerprinting of fluorescent *Pseudomonas* associated with the Douglas fir -*Laccaria biclor* mycorrhizosphere. Applied and Environnemental Microbiology 63 : 1852-1860.

Galiana, A., Prin, Y., Mallet, B., Gnahoua, G. M., Poitel, M., Diem, H. G. 1994. Inoculation of *Acacia mangium* with alginate beads containing selected strains of *Bradyrhizobium sp* under field conditions : long – term effect on plant growthand persistence of introduced srains in soil. Appl. Environ Microbiol, 60 : 3975-3980.

Galiana, A., Balle, P., N'Guessan Kanga A, Domenach AM 2002. Nitrogen fixation estimated by the ¹⁵N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. Inoculated with *Bradyrhizobium sp.* and grown in silvicultural conditions. Soil Biol Biochem 34 : 251–262.

Garbaye, J. 1994. The role of ectomycorrhizal symbiosis in the resistance of forests to water stress. Outlook on Agriculture, 29 : 63-69.

Garbaye, J. et Bowen, G. D. 1987. Effect of different microflora on the success of mycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res, 17 : 941-943.

Garbaye, J., Churin, J. L. et Duponnois, R. 1992. Effects of substrate sterilization, fungicide treatment, and mycorrhization helper bacteria on ectomycorrhizal formation of pendunculate oak (*Quercus robur*) inoculated with *Laccaria laccata* in two peat bare-root nurseries. Biology and Fertility of Soils, 13 : 55-57.

Garbaye, J. et Guehl, J. M. 1997. Les rôles des ectomycorrhizes dans l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers. Rev. For. Fr, 49 : 110-120.

Gardner, J. H. et Malajczuk, N. 1998. Recolonisation of rehabilitated bauxite mine sites in Western Australia by mycorrhizal fungi. Forest Ecology and Management, 24 : 27-42.

Gay, G. 1990. Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root

- formation in de-rooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Can. J. Bot.*, 68 : 1265- 1270.
- Gilbert, R. G. et Linderman, R. G. 1971. Increased activity of the soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rofsii* an soil. *Can. J. Microbiol.*, 17 : 557-562.
- Gunning, B. E. S., Pates, J. S. 1969. « Transferts Cells » - Plant cells with wall ingrowths specialized in relation to short distance transport of solutes – their occurrence, structure and development. *Protoplasma*, 68 : 107 –133.
- Ingham, E. R. & Massicotte, H. B. 1994. Protozan communities around conifer roots colonized by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 5 : 53-61.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet – Marel, J. C., Gillis, M. 1997. Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium hualini*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium méditerranéum*, and *Rhizobium trianshanense* to *Mesarhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47 : 895-898.
- Jordan, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 : 136-139
- Jordan, D. C. 1984. « *Rhizobiaceae* conn 1938 , 321 AL » in Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 1 st éd . (N. R) Krieg, (J.G) Holt éd. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 234 - 256.
- Katznelson, H., Rouatt, J. W., Peterson, E. A. 1962. The rhizosphere effect of mycorrhizal and non – mycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Can J Bot.*, 40 : 377-382.
- Karabaghi-Degron, C., Sotta, B., Bonnet, M., Gay, G. et Le Tacon, F. 1998. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway, 140 : 723-733.
- Käss, E. et M. Wink. 1997. Phylogenetic relationship in the Papilionoideae (Family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS1 and ITS2). *Molec. Phylogen. And Evolution*, 8 : 65-88.
- Keeney, D. R. 1980. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems : a literature review. *For. Sci.*, 26 : 159-171. Nitrate assimilation by maritime pine and ectomycorrhizal fungi in pure culture. In : *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., Eds.); pp. 383-388. INRA, Paris.
- Kitajima, K. 2002. Do shade-tolerant tropical tree seedlings depend longer on seed reserves. Functional growth analysis of three *Bignoniaceae* species. *Functional Ecol.*, 16 : 433- 444.
- Lapeyrie, F. 1990. The role of ectomycorrhizal fungi in calcareous soil tolerance by 'symbiocacicole' woody plants. *Annales des Sciences Forestière*, 21 : 579-589.
- Linderman, R. G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora : the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78 : 366-371.

Linderman, R. G. et Paulitz, T. C. 1990. Mycorrhizal-rhizobacterial interactions. In : Biological control of soil-borne pathogens. Hornby, D. (Ed.), Wallington, C.A.B. International. 261-283 pp.

Lindhauer, M. G. 1985. Influence of K nutrition and drought on water relation and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Zeitung Pflanzenernähr. Bodenk*, 148 : 654-669.

Lodge, D. J. et Wentworth, T. R. 1990. Negative associations among VA-mycorrhizal fungi and some ectomycorrhizal fungi unhabiting the same root system. *Oikos*, 57 : 347-356.

Loureiro, M. F., de Faria, S. M., James, E. K., et Franco, A., 1994. Nitrogen-fixing stem nodules of legumes, *Discolobium pullulement*, Benth. *New phytology*, 128 : 283-295.

Marmeisse, R., Guidot, A., Gay, G., Lambilliotte, R., Sentenac, H., Combier, J. P., Melayah, D., Fraissinet-Tachet, L. et Debaud, J. C. 2004. *Hebeloma cylindrosporum* – model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New. Phytol*, 163 : 481-498.

Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C. et Lapeyrie, F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis : signals and communication genes. *New Phytol*, 151 : 145-154.

Marx, D. H. 1969. The influence of ectotropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections : I . Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59, 153 –163.

Marx, D. H. 1972. Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annu. Rev. Phytopathol*, 10 : 429-454.

Marx, D. H. 1980. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and re-isolation. *Can. J. For. Res*, 11 : 168-174.

Miller, R. M. et Jastrow, J. D. 1990. Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interaction with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem*, 22 : 579-584.

Moreira, F. M. S., Silva, M. F., Faria, S. M. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol*, 121 : 563-570.

Morte, A., Diaz, G., Lovisolo, C. et Schubert, A. 2000. Effet of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavaryi*. *Mycorrhiza*, 10 : 115-119.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. et Boivin -Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the subclass of protoeubacteria. *Nature*, 411 : 948-950.

Mousain, D. 1989. Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, USTL Montpellier II, 279 p.

- Nagahashi, G., Abney, G. et Doner, L. 1996. A comparative study of phenolic acids associated with cell walls and cytoplasmic extracts of host and non-host roots for AM fungi. *New Phytologist*, 109, 433- 455.
- Newberry, D., Alexander, I. J., Thomas, D. W., Gartlan, J. S. 1988. Ectomycorrhizal rain-forest legumes and soil phosphorus in Korup National Park, Cameroon. *New phytologist*, 109 : 433-455.
- Niemi, K., Salonen, M., Ernsten, A., Heinonen-Tanski, H. et Häggman, H. 2000. Application of ectomycorrhizal fungi in rooting of Scots pine fascicular shoots. *Can. J. For. Res*, 30 : 1221-1230.
- Normand, L., Bärtschi, H., Debaud, J. C. et Gay, G. 1996. Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebelom cylindrosporium*. *Physiol. Plant*, 98 : 759-766.
- Olsson, P. A., Chalot, M., Baath, E., Finlay, R. D. et Soderstrom, B. 1996. Ectomycorrhizal mycelia reduce bacterial activity in a sandy soil. *FEMS, Microbiology Ecology*, 21 : 77-86.
- Onguene, N. A. et Kuyper, T. W. 2001. Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *Forest Ecology and Management*, 140 : 277-278.
- Parniske, M. 2000. Intracellular accommodation of microbes by plant: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol* 3 : 320–3208.
- Perret, X., Staehelin, C. et Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 64 : 180-201.
- Perroto, S. et Bonfante, P. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi : close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol*, 5 : 496-501.
- Peyronel, B., Fassi, B., Fontana, A., Trappe, J. M. 1969. Terminology of mycorrhizae *Mycologia*, 61 : 410-411.
- Plassard, C., Scheromm, P. et Lamas, H. 1986. Nitrate assimilation by maritime pine and ectomycorrhizal fungi in pure culture. In : *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (Gianinazzi- Pearson, V. and Gianinazzi, S., Eds.) ; pp. 383-388. INRA, Paris.
- Phillips, D. A. et Tsai, S. M. 1992. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbe. *Mycorrhizae*, 1 : 55-58.
- Rambelli, A. 1973. The rhizosphere of mycorrhizae. In : *Ectomycorrhizae their Ecology and Physiology*. Marks, G.G. and Kozlowski, T.T. (Eds.), Academic press, New York. 299-349pp.
- Read, D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47 : 376-389.
- Reddel, P., Warren, R. 1986. Inoculation of *Acacia* with mycorrhizal fungi : potential benefits. In : Turnbull JW (ed) *Australian Acacia in developing countries*. ACIAR, Canberra, pp 50-53.

- Riva, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis M., Dazzo, F. B., Martínez-Molina, E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L. f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 : 5217-5222.
- Robertson, D. C., Robertson, J. 1982. Ultrastructure of *Pterospora andromedea* Nuttall and *Sarcodes sanguinea* Torrey mycorrhizas. *New Phytol.*, 62 : 539-551.
- Safir, G. R., Boyer, J. S. et Gerdemann, J. W. 1971. "Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean." *Science* 172 : 581-583.
- Smith, S. E. et Read, D. J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, 2nd ed., London. 605 pages.
- Strullu, D. G. 1989. Mycorrhizes et culture in vitro. In : Les mycorrhizes des arbres et des plantes cultivées. Strullu, D. G., Tec. et Doc., Lavoisier Editions, Paris, 250p.
- Sy, A., Griand, E., Neyra, M., Gillis, M., Boivin - Masson, C., et Dreyfus, B. 2001. Methotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes *J. Bacteriol.*, 183 : 214-220.
- Szott, L. T., Palm, C. A. et Davey, C. B. 1994. Biomass and litter accumulation under managed and natural tropical fallows. *Forest Ecology and Management*, 67 : 177-190.
- Tagu, D., Lapeyrie, F., Ditengou, F., Lagrange, H., Laurent, P., Missoum, N., Nehls, U. et Martin, F. 2000. Molecular aspects of ectomycorrhiza Development. In : Podila, G.K. and Douds D.D (Eds.). *Current advances in Mycorrhizae Research*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul – Minnesota. 69-89pp.
- Tagu, D., Rampant, P. F., Lapeyrie, F., Frey-Klett, P., Vion, P. et Villar, M. 2001. Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus* spp.) cross. *Mycorrhiza*, 10 : 237-240.
- Thoen, D. et Bâ, A. M. 1989. Ectomycorrhizas and putative ectomycorrhizal fungi of *Afzelia africana* Sm. and *Uapaca guineensis* Müll. Arg. in southern Senegal. *New Phytol.*, 113 : 549-559.
- Thomson, B. D., Hardy, G. E. St. J., Malajczuk, N. et Grove, T. S. 1996. The survival and development of inoculant fungi on the roots of out planted *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant and soil*, 178 : 247-253.
- Tisdall, J. M. et Oades. 1979. Stabilization of soil aggregations of a silty clay loam soil by mycorrhizal onion roots. *Soil Sci. Am. J.*, 50, 1494-1499.
- Trinick, M. J. 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.*, 49 : 39-53.

- Van Berkum, P. et Eardly, B. D. 2002. The aquatic budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68 : 1132-1236.
- Van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. et Sanders, I. R. 1998. Mycorrhiza fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396 : 69-72.
- van der Heijden, M. G. A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T. R., Rutten, M., van Logtestijn, R. et Staehelin, C. 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56 : 178-187.
- Van Rhijn, P., Fang, Y., Galili, S., Shaul, O., Atzon, N., Wininger, S., Eshed, Y., Lum, M., Li, Y. To .V., Fujishige, N., Kapulik, Y., Hirsch, A. M. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and Rhizobium-induced nodules may be conserved. *Plant Biol* 94 : 5467-5472
- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacterial International Biological Programme. Handbook , vol.15. Blackwell, Oxford .
- Voiry, H. 1981. Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le Nord-Est de la France. *European Journal of Forest Pathology*, 11 : 284-299.
- Wilcox, H. E. 1983. Fungal parasitism of woody plant roots from mycorrhizal relationships to plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 21 : 221-242.
- Young, J. P. W. et A. W. B. Johnston. 1989. The evolution of specificity in the legume - rhizobium symbiosis. *Tree*, 4 : 341-349.
- Zangaro, W., Nisizaki, S. M. A., Domingos, J. C. B. et Nakano, E. M. 2003. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. *J. Trop. Ecol*, 19 : 315-32.
- Zakra, N., Domenach, A. M., Sangaré, A. 1996. Bilan positif de l'association cocotier /acacias pour la restitution de l'azote, de la potasse et du magnésium. *Plantations, recherche, développement*, 3 : 39-48.

ANNEXE

I. Milieu pour les cultures de champignons

1. Milieu MNM (Melin et Norkrans modifié par Marx en 1969)

(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25 g
Extrait de malt	3 g
Glucose	10 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,15 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,05 g
NaCl	0,025 g
Thamine HCl (1 mg/ml)	1 ml
Citrate ferrique (1 %)	1,2 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH	5,5
Stérilisation	20 min à 120°

II. Milieu pour les cultures de bactéries

2. Milieu de culture YMA (Yeast mannitol Agar)

Mannitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Glutamate de Sodium	0,5 g
NaCl (Solution à 50mg/ml)	1 ml
Solution T (MgSO ₄ , 7H ₂ O, 10g/l)	10 ml
Solution U (CaCl ₂ , 40g/l)	1 ml
Solution V (FeCl ₃ , 4g/l)	1 ml
Extrait de Levure	1 g
H ₂ O	qsp 1 L
Agar (pour milieu gélosé)	20 g
pH	6,8
Stérilisation	20 min 120°

III. Solutions pour l'extraction des nodules

TES : Tampon de broyage (TES/Saccharose)

Trizma Base	20mM
EDTANa ₂	1mM
NaCl	50mM
Saccharose	8%p/v
pH	8,0
Conservé à 4° C	

Lysozyme

Lysozyme	20mg/ml
Tris – HCL	10mM
EDTANa ₂	1mM
Conservé à –20° C	

GES (Guanidine thiocyanate, EDTA, Sarcosine)

Guanidine thiocyanate	0,5mM
EDTANa ₂	100mM
N-Lauryl sarcosine	1%p/v
pH	8,0

IV. Solutions pour l'hybridation**1. Solution de préhybridation**

5X SSC	
agent bloquant	0.5% p/v
N-laurylsarcosine Sodium salt	0.1 % p/v
SDS	0.02 % p/v
Nacl	750mM
Citrate de Sodium	75mM

Tampon 1

Tris HCL	0,1M
Nacl	0,15M
pH	7,5

Tampon 2 (T1 + agent bloquant)**2. Solution d'hybridation (solution sonde)**

Solution de préhybridation	10ml
Sonde	10ml

3. Solutions de lavage pour la révélation**L1 :**

2x SSC	
Nacl ,	300mM
Citrate de Sodium	30mM
SDS	0,1% p/v

L2 :

Tris HCL	0,1M	0,1x SSC	
Nacl	0,15M	Nacl	15mM
Agent bloquant	0,5%	Citrate de Sodium	1,5mM
pH	7,5	SDS	0,1% p/v

Tampon 3

Tris HCL	0,1M
Nacl	0,1M
pH	9,5