

## TABLE DE MATIERES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES PHOTOS.....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iv
GLOSSAIRE .....	v
INTRODUCTION.....	1

## Première partie: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les plantes d'étude.....	4
I.1 Le genre <i>Acacia</i> .....	4
I.1.1 Description.....	4
I.1.2 Importances du genre <i>Acacia</i> .....	5
I.1.3 Répartition géographique.....	6
I.2 <i>Intsia bijuga</i> .....	7
I.2.1 Description d' <i>Intsia bijuga</i> .....	7
I.2.2 Importance d' <i>Intsia bijuga</i> .....	7
II. Les compartiments biologiques du sol .....	8
II.1 La rhizosphère.....	8
II.2 La mycorhizosphère.....	8
II.3. La mycosphère ou hyphosphère.....	9
III. Les microorganismes de la rhizosphère et leurs activités.....	9
a) Les bactéries.....	9
b) Les actinomycètes .....	10
c) Les champignons.....	11
d) Autres microorganismes.....	11
IV. Les activités enzymatiques du sol rhizosphérique.....	11
IV.1 Oxydoréductases (déshydrogénases, catalases, laccases).....	12
IV.2 Hydrolases (cellulases, phosphatases).....	12
IV.3 Les enzymes hydrolysant le diacétate de fluorescéine (estérases, protéases, lipases).....	13
V. La symbiose mycorhizienne.....	14
V.1 Définition des mycorhizes.....	14
V.2 Classe et type de champignons mycorhiziens.....	14
V.2.1 Les endomycorhizes.....	14
V.2.2 Les ectomycorhizes.....	15
V.3 La mycorhization contrôlée.....	19
V.3.1 Historique.....	19
V.3.2 Définition.....	19
V.3.3 Technique de mycorhization contrôlée.....	20

V.4	Intérêts de la mycorhization.....	20
-----	-----------------------------------	----

## Deuxième partie MATERIELS ET METHODES

A] IMPACTS DE LA MYCORHIZATION SUR LE DEVELOPPEMENT		
d' <i>Acacia mangium</i> ET SUR LA COMMUNAUTE MICROBIENNE DU SOL.....		22
I.	Matériel biologique.....	22
I.1.	<i>Acacia mangium</i> .....	22
I.1.1.	Description.....	22
I.1.2.	Classification.....	22
I.2.	Souches de champignons ectomycorhiziens.....	22
I.2.1.	Origine des souches.....	22
I.2.2.	Classification.....	23
II.	Mycorhization d' <i>Acacia mangium</i> .....	24
II.1.	Scarfification et mise en germination des graines d' <i>A. mangium</i> .....	24
II.2.	Préparation de l'inoculum.....	24
II.3.	Le sol de culture.....	25
II.4.	Dispositif expérimental.....	26
III.	Evaluation des résultats.....	26
III.1.	Développement de la plante.....	26
III.1.1.	Biomasse aérienne.....	26
III.1.2.	Biomasse racinaire.....	27
III.2.	Taux d'ectomycorhization.....	27
III.3.	Caractérisation morphologique des morphotypes d'ectomycorhize.....	28
III.4.	Mesure des activités microbiennes du sol.....	28
III.4.1.	Activité microbienne totale du sol mesurée par l'hydrolyse de la FDA.....	28
III.4.2.	Activités des phosphatases microbiennes du sol.....	30
III.5.	Dénombrement des microorganismes du sol.....	32
III.5.1.	Préparation et dilution du sol.....	32
III.5.2.	Ensemencement et étalement de la suspension du sol.....	33
III.6.	Analyse statistique des données.....	35
B] IMPACTS D' <i>A. mangium</i> SUR LE DEVELOPPEMENT D' <i>I. bijuga</i> via LA		
COMMUNAUTE DE CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS.....		36
I.	Structuration de la communauté de champignons ectomycorhiziens par <i>A. mangium</i> .....	36
I.1.	Sol de culture.....	36
I.2.	Culture d' <i>A. mangium</i> .....	36
I.3.	Développement d' <i>A. mangium</i> et impacts sur la microflore du sol.....	36
1.3.1.	Développement de la plante.....	36
1.3.2.	Communauté ectomycorhizienne associée à <i>A. mangium</i> .....	37
1.3.3.	Mesure de l'activité microbienne du sol.....	37
1.3.4.	Dénombrement des microorganismes du sol.....	37
II.	Développement d' <i>Intsia bijuga</i> sur sol anciennement colonisé ou non par <i>Acacia mangium</i> .....	38
II.1.	Mise en culture d' <i>I. bijuga</i> .....	38

II.1.1. Germination des graines.....	38
II.1.2. Sol de culture et mise en culture des graines.....	38
II.2. Développement d' <i>I. bijuga</i> et activités microbiennes du sol.....	38
II.2.1. Développement de la plante.....	38
II.2.2. Taux d'ectomycorhization d' <i>I. bijuga</i> .....	39
II.2.3. Activité microbienne du sol.....	39
II.2.4. Population microbienne du sol.....	40

## Troisième partie RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mycorhization d' <i>Acacia mangium</i> .....	41
I.1 Influence des souches fongiques sur le développement de la plante en condition contrôlée.....	41
I.2. Influence des souches fongiques sur le développement de la plante en condition du milieu naturel.....	44
I.3. Influence de l'inoculation sur la communauté microbienne du sol.....	44
I.3.1. Activité microbienne totale mesurée par l'hydrolyse de la FDA.....	44
I.3.2. Activités des enzymes phosphatasiques du sol.....	45
I.3.3. Flore totale cultivable du sol.....	46
I.3.4. Flore totale solubilisant le phosphate.....	47
I.3.5. Les <i>Pseudomonas</i> du groupe des fluorescents.....	47
I.3.6. Les Actinomycètes.....	47
II. Influence des communautés microbiennes générées par l'établissement d' <i>Acacia mangium</i> sur le développement d' <i>Intsia bijuga</i> .....	49
II.1. Développement préalable d' <i>Acacia mangium</i> .....	49
II.1.1. Développement d' <i>A. mangium</i> .....	49
II.1.2. Modification au niveau de la communauté microbienne du sol.....	50
II.2. Impacts de la pré-colonisation du sol.....	52
II.2.1. Impacts sur le développement d' <i>I. bijuga</i> .....	52
II.2.2. Impacts sur la communauté de champignons ectomycorhiziens associée à <i>Intsia bijuga</i> .....	53
II.2.3. Modification au niveau de la communauté microbienne du sol.....	55
II.2.4. Impacts sur les caractéristiques physico-chimiques du sol.....	57
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>65</b>
<b>ANNEXES</b>	
<b>REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques du sol de culture

**Tableau 2.** Composition de chaque échantillon pour la mesure de l'hydrolyse de la FDA

**Tableau 3.** Composition de la gamme étalon préparée à partir d'une solution standard de fluorescéine

**Tableau 4.** Composition de chaque échantillon pour la mesure des activités phosphatasiques

**Tableau 5.** Effet de l'inoculation sur le développement d'*A. mangium* et dépendance mycorhizienne de la plante vis-à-vis de chaque souche après 5 mois de culture en condition contrôlée

**Tableau 6.** Influence de l'inoculation sur le développement d'*A. mangium* en condition du milieu naturel

**Tableau 7.** Développement d'*A. mangium* cultivé sur le sol prélevé dans son site de reboisement

**Tableau 8.** Caractéristiques morphologiques des morphotypes d'ectomycorhizes observés sur le système racinaire d'*A. mangium*.

**Tableau 9.** Développement et taux d'ectomycorhization d'*I. bijuga* après quatre mois de culture sur sol préalablement colonisé ou non par *A. mangium*

**Tableau 10.** Caractéristiques morphologiques des morphotypes d'ectomycorhizes récoltés sur les racines d'*I. bijuga* cultivé sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium*

**Tableau 11.** Propriétés physico-chimiques du sol des trois traitements

**Tableau 12.** Matrices de corrélations entre les différents paramètres mesurés pour évaluer les impacts de la pré-colonisation du sol par *A. mangium*

## LISTE DES FIGURES

- Figure1.** Etapes de développement des folioles en phyllodes chez le genre *Acacia*
- Figure 2.** Répartition géographique mondiale d'*Acacia*
- Figure3.** Croissance en hauteur d'*A. mangium* sous l'influence des souches fongiques en condition contrôlée
- Figure 4.** Quantité de Fluorescéine produite pour chaque traitement
- Figure5.** Quantité des produits de l'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcalin
- Figure 6.** Numération de quelques groupes de la flore tellurique dans les traitements inoculés et les témoins
- Figure 7.** Aspect morphologique des souches microbiennes observées sur leur milieu de culture
- Figure 8.** Activité microbienne totale du sol et activité enzymatique du sol de la forêt de Tampolo sous influence d'*A.mangium*
- Figure 9.** Nombre des microorganismes du sol des différents traitements dans 5g du sol
- Figure 10.** Evolution de la hauteur d'*I. bijuga* durant les quatre premiers mois de son développement sur sol préalablement colonisé par *A. mangium* (courbe bleu) ou non (courbe rouge)
- Figure 11.** Activité microbienne totale du sol mesurée par l'hydrolyse de la FDA dans le sol témoin (To), Sol sous *I. bijuga* sans colonisation préalable par *A. mangium* (T2) et sol sous *I. bijuga* préalablement colonisé par *A. mangium* (SAM)
- Figure 12.** Activités des phosphatases alcaline et acide dans le sol témoin (To), Sol sous *I. bijuga* sans colonisation préalable par *A. mangium* (T2) et sol sous *I. bijuga* préalablement colonisé par *A. mangium* (SAM)
- Figure 13.** Nombre des microorganismes du sol dans les différents traitements du sol : sol témoin (To), Sol sous *I. bijuga* sans colonisation préalable par *A. mangium* (T2) et sol sous *I. bijuga* préalablement colonisé par *A. mangium* (SAM)
- Figure 14.** Plan factoriel à deux axes selon l'Analyse en Composantes Principales effectuées sur les impacts de la pré-colonisation du sol par *A. mangium* sur le développement d'*I. bijuga* et sur les propriétés microbiologiques et physicochimiques du sol.

## LISTE DES PHOTOS

**Photo 1.** *Intsia bijuga*

**Photo 2.** Structure anatomique des ectomycorhizes

**Photo 3.** Inoculum de champignons ectomycorhiziens sur substrat tourbe/Vermiculite

**Photo 4.** Plantules *d'A.mangium* après 5mois d'inoculation sous serre (Source auteur)

**LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>%</b>	: pourcentage
<b>°C</b>	: degré Celsius
<b>ANOVA</b>	: Analyses of variance
<b>C</b>	: Carbone
<b>C/N</b>	: Rapport carbone sur azote
<b>CNRE</b>	: Centre National de Recherche sur l'Environnement
<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>ECM</b>	: Ectomycorhize
<b>FDA</b>	: Fluorescéine Di Acétate
<b>LME</b>	: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement
<b>méq</b>	: millier équivalent
<b>min</b>	: minute
<b>ml</b>	: millilitre
<b>mm</b>	: millimètre
<b>MNM</b>	: Milieu de Norkans et Melin
<b>MVA</b>	: Mycorhize à Vésicule et Arbuscule.
<b>N</b>	: Azote
<b>nm</b>	: nanomètre
<b>pH</b>	: potentiel d'hydrogène
<b>p-NPP</b>	: para-NitroPhénylPhosphate
<b>ppm</b>	: partie par million
<b>Q.M.M</b>	: Qit Madagascar Minéraux
<b>V</b>	: Volume

## GLOSSAIRE

**Abiotique** : Se dit d'un milieu qui ne permet pas la vie, ou d'un facteur qui ne concerne pas directement la vie.

**Aborigène** : Se dit d'une personne originaire de l'endroit où elle vit, par exemple les aborigènes d'Australie sont les personnes originaires d'Australie et y vivent.

**Apex** : La pointe de la racine

**Arbuste** : végétal ligneux dont la tige n'est pas ramifiée dès la base et dont la hauteur ne dépasse pas sept mètres.

**Bactéries sulfo-oxydantes** : Bactéries qui oxydent les sulfures et utilisent l'énergie induite par cette oxydation pour incorporer le carbone minéral en carbone organique.

**Biomasse** : c'est la masse totale des organismes vivants mesurée dans une population.

**Boomerang** : une arme de jet en bois dur, coudée de façon à revenir à son point de départ, utilisée naguère pour la chasse par les aborigènes australiens, et aujourd'hui pour le jeu et la compétition.

**Carpophores** : organe de reproduction des champignons contenant des spores.

**Cladode** : du grec *kladôdēs* est un rameau aplati, simulant des feuilles. Par exemple sur les cactus du genre *Opuntia*, les articles en forme de raquette constituent des cladodes.

**Cortex** : une couche de cellules qui se trouve entre l'épiderme et la stèle.

**Exsudat** : Le résultat d'une sorte de suintement à partir de végétaux.

**Facteurs biotiques** : ils représentent l'ensemble des interactions du vivant sur le vivant dans un écosystème. Il s'agit des ressources alimentaires, des relations trophiques de prédation, compétition, parasitisme, etc.

**Ferrobactéries** : Organisme apte à utiliser le fer ferreux dans leur métabolisme.

**Fongique** : Ce qui est en rapport avec champignon.

**Forets sclérophylles** : Type de végétation dépendant des conditions climatiques caractérisées par une saison sèche marquée et des minimums de température assez accusés.

**Hétérotrophe** : Se dit d'un être vivant qui ne peut assurer sa nutrition carbonée qu'aux dépens de composés organiques déjà élaborés qu'il prélevera sur des matériaux inertes ou sur des hôtes vivants. Sont par définition hétérotrophes les êtres vivants dépourvus de chlorophylle.

**Hôte** : Individu qui héberge un parasite ou un symbiose dont il a investi les tissus. Dans le cas des champignons parasites l'hôte est toujours spolié. Dans le cas de symbioses fongiques ou bactériennes, il y a association avec l'hôte.

**Hypse** : Filament de champignon ; élément constitutif de la formation morphologique de base chez les êtres vivants.

**Inoculation** : Apport contrôlé d'un germe, bienfaisant dans une culture végétale.

**Inoculum** : mycéliums fongiques destinés à l'inoculation.

**Morphotype** : Le type morphologique des racines mycorhizées

**Mycélium** : Ensemble de fins filaments constituant la formation morphologique de base du champignon (un agrégat des hyphes). C'est un appareil végétatif d'un champignon correspondant au thalle.

**Mycorhization** : production de mycorhize.

**Mycorhize** : Symbiose entre plante et champignon.

**Phyllode** : c'est un pétiole qui, par suite de l'avortement du limbe foliaire, s'aplatit et forme une lame qui remplace la feuille.

**Pyoverdine** : Pigments hydrosolubles jaune vert qui fluorescent sous rayonnement ultraviolet (UV) à 230nm.

**Rage de dents** : douleur dentaire très violente.

**Saprophyte** : être vivant hétérotrophe qui s'alimente en matière carbonée par le biais du saprophytisme, à partir de matière organique en décomposition d'origine végétale.

**Souches** : mycéliums purifiés issus de la culture de mycorhizes.

**Spore** : cellule isolée, ou amas pluricellulaire pouvant contribuer, en germant, à la propagation d'une espèce par la voie végétative.

**Symbiose** : Vie en commun d'individus appartenant à des espèces différentes dont les organismes demeurent proches l'un de l'autre, ceci avec avantages réciproques pour les deux partenaires.

# **INTRODUCTION**

Au cours des dernières décennies, la surexploitation des ressources en bois a conduit à une dégradation spectaculaire du couvert forestier sur l'île de Madagascar. Cette surexploitation du couvert végétal engendre des perturbations intenses au niveau des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (érosion, baisse de la fertilité, etc.) limitant ainsi les processus de régénération naturelle des essences forestières endémiques de la Grande Ile. Parmi les dysfonctionnements biologiques enregistrés dans ces écosystèmes, la structure et les fonctions des communautés microbiennes des sols sont généralement profondément altérées. Ainsi, les communautés de champignons ectomycorhiziens, indispensables au développement des essences ectotrophes (Ex : *Uapaca sp*, *Intsia sp*, etc.), se trouvent fortement réduites tant au niveau de leur richesse spécifique que de leur abondance (Dickie & Reich, 2005).

Devant cette situation, des initiatives ont été prises visant plus particulièrement à restaurer le couvert végétal en privilégiant les espèces ligneuses exotiques dans le cadre de plantations forestières ou de systèmes agro-forestiers. Le choix de ces espèces a été basé sur leur vitesse de croissance assez rapide et leur aptitude à résister aux différentes contraintes environnementales. Or, il est maintenant clairement établi que l'introduction de plantes exotiques pourrait modifier la composition spécifique du couvert végétal autochtone. Certaines d'entre elles limitent le développement d'un couvert végétal autochtone, et d'autres dont entre autres les légumineuses ligneuses, créent des conditions pédoclimatiques et microbiologiques favorables à la croissance d'essences ligneuses autochtones. Dans le cadre de cette étude, nous avons pris comme modèle biologique une plante légumineuse *Acacia mangium*, une espèce d'*acacia* australien à croissance rapide introduite à Madagascar depuis des années et une essence ligneuse autochtone *Intsia bijuga*, qui est une essence socio-économiquement importante.

Dans les programmes de restauration écologique et/ou de conservation d'une couverture forestière saine entrepris surtout en milieu tropical, il apparaît que la symbiose mycorhizienne tient une position centrale. Cette symbiose constitue une relation indispensable entre les deux

partenaires : le champignon et la plante hôte. Le champignon puise chez la plante, les éléments carbonés nécessaires à son métabolisme et à sa fructification. En contrepartie, le champignon, augmentant la surface d'échange entre le sol et la racine, prélève l'eau et des éléments minéraux (phosphore, azote...) qu'il transférera à la plante hôte. Un des avantages les plus importants dont la plante peut bénéficier de cette association concerne l'amélioration de sa nutrition phosphatée et azotée.

L'hypothèse principale sur laquelle repose ce programme est la suivante : « *La mycorhization provoquerait des changements profonds au niveau de la structure et l'activité de la population microbienne du sol au profit du développement de l'arbre et des facteurs biotiques favorable à l'installation d'autres essences ligneuses autochtones* ».

Nos approches consistent, à décrire l'évolution de la structure de la communauté des champignons ectomycorhiziens et de la microflore du sol en général durant et après la mycorhization *d'Acacia mangium* puis les impacts de cette structure sur le développement ultérieur d'*Intsia bijuga*. Les différentes activités ont été réalisées en conditions contrôlées (mycorhization et élevage sous serre) et au laboratoire (production d'inoculum et évaluation de la structure de la population des champignons ectomycorhiziens) en suivant les différentes étapes ci après :

- ✓ mycorhization contrôlée *d'Acacia mangium* avec deux souches de *Pisolithus* et deux souches de *Scleroderma* de provenances différentes ;
- ✓ mycorhization *d'Acacia mangium* avec les mêmes souches fongiques mais dans les conditions proches du milieu naturel c'est-à-dire utilisant le sol sans traitement préalable ;
- ✓ plantation préalable *d'Acacia mangium* sur un sol prélevé dans une surface dégradée d'une formation naturelle à *Intsia bijuga* ;
- ✓ suivi du développement *d'Intsia bijuga* sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium*.

A chaque étape de l'étude, la caractérisation de la structure de la communauté ectomycorhizienne associée aux plantes a été suivie par la mesure du développement de la plante, des activités microbiennes et enzymatiques du sol de culture. Les travaux effectués sont présentés dans ce document en trois parties (synthèse bibliographique, matériels et méthodes, résultats) précédés par une introduction générale et sont terminés par une partie traitant la discussion et la conclusion.

Le présent travail a bénéficié des apports matériels, techniques et scientifiques du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE) et a été réalisé dans le cadre de son programme de recherche en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie-Microbiologie du Département de Biochimie de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Généralités sur les plantes d'étude

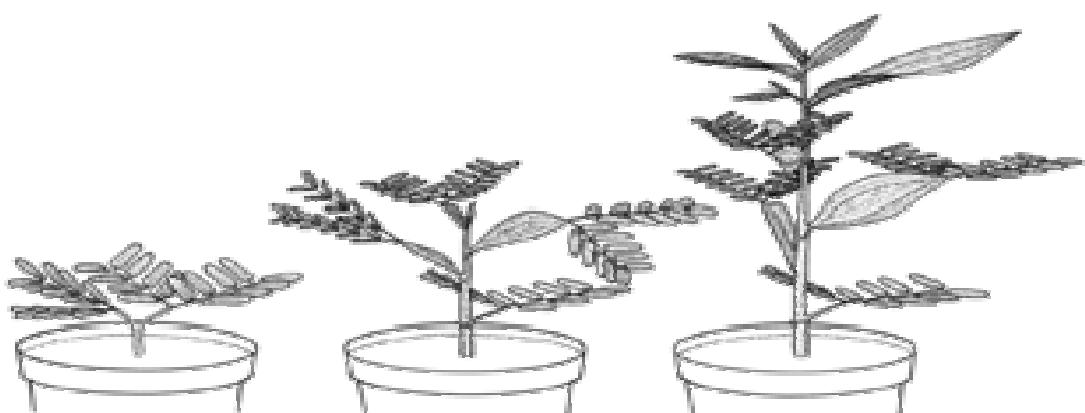
### I.1 Le genre *Acacia*

#### I.1.1 Description

*Acacia* est un genre d'arbres et arbustes appartenant à la famille des Fabacées (sous-famille des Mimosacées). Dans le langage courant, les espèces de ce genre prennent, selon les cas, l'appellation *Acacia* ou *Mimosa*. On compte plus de 1500 espèces *Acacia* à travers le monde dont près de 1000 espèces sont trouvées en Australie. C'est d'ailleurs un *Acacia* ou *Mimosa*, le mimosa doré (*Acacia pycnantha*) qui est la fleur nationale de l'Australie.

Les feuilles des *Acacias* sont composées de nombreuses paires de folioles, mais certaines espèces développent des phyllodes. Quelques unes, plus rares, n'ont pas de feuilles du tout et possèdent des tiges transformées en cladodes. Leur position verticale assure une protection contre la déshydratation et la trop grande insolition. Leurs fleurs sont régulières, généralement petites, groupées en têtes globuleuses ou en épis cylindriques. Selon les espèces, les inflorescences peuvent comporter de quelques fleurs à plus d'une centaine. En général, ils fleurissent tout au long de l'année avec une éclosion principale au printemps et une floraison de moindre importance le reste de l'année. Leurs fleurs sont en général de couleur jaune, bien qu'il existe quelques espèces aux fleurs roses. Leurs fruits sont des gousses.

Parmi ces espèces figurent *Acacia holosericea*, *Acacia mangium* et *Acacia auriculiformis*, qui peuvent s'associer en symbiose à la fois avec des champignons endomycorhiziens et ectomycorhiziens. Ces espèces d'*Acacia* sont fortement dépendantes des champignons symbiotiques pour l'absorption de certains élément nutritifs en particulier le phosphore et de rhizobia pour la nutrition azotée (Colonna et al, 1991 ; Barea et al, 1992).



**Figure I.** Etapes de développement des folioles en phyllodes chez le genre *Acacia*  
(Source: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Acacia>)

### I.1.2 Importances du genre *Acacia*

#### a) Importances biologiques

Une détérioration accrue des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol est souvent le résultat des perturbations d'origine différente des écosystèmes terrestres. Le sol ainsi formé est caractérisé par une faible capacité à accueillir une couverture végétale saine et à croissance normale.

Beaucoup de programme de réadaptation, dans les secteurs dégradés des régions africaines occidentales, ont été essayés pour reconstituer des écosystèmes soutenables (Giffard, 1974). Les résultats ont montré que les arbres améliorent potentiellement les caractéristiques du sol par l'entretien de la matière organique du sol. Parmi les espèces d'arbres expérimentées, les légumineuses boisées telles que les *Acacia*, se sont montrées extrêmement importantes (Cossalter, 1986 ; Dreyfus et al, 1987 ; Giffard, 1975).

#### b) Importances socio-économique

Les graines de quelques espèces d'*Acacia* fournissent une source de nourriture précieuse pour l'homme et les animaux. Principalement, ces graines peuvent être utilisées comme additifs des farines alimentaires.

Plusieurs extraits des phyllodes ont été utilisés par les aborigènes australiens pour une large variété de buts médicinaux tels que pour soulager la rage de dents ou rhume ou pour appliquer sur les blessures et brûlures. Les branches couvertes de feuilles vertes de quelques espèces peuvent être utilisées par les gens qui souffrent d'un bois sickness.

*Acacia gummifera* fournit une gomme abondante, connue sous le nom de gomme arabique est commercialisée dans les régions de production. Cette espèce constitue également une source de bois de feu et de charbon de bois, et est utilisée pour la confection de manches d'outils et autres usages domestiques. Il est fréquent que les arbres soient mutilés par les chevaux et les moutons qui les broutent. Ainsi, les pasteurs nomades ne pourraient pas survivre au Sud du Maroc sans *A. gummifera* et ses produits (Boudy, 1950).

Différentes espèces d'*Acacia* ont fait l'objet d'utilisation intensive dans le cadre de plantation pour l'industrie papetière en Indonésie et en Thaïlande.

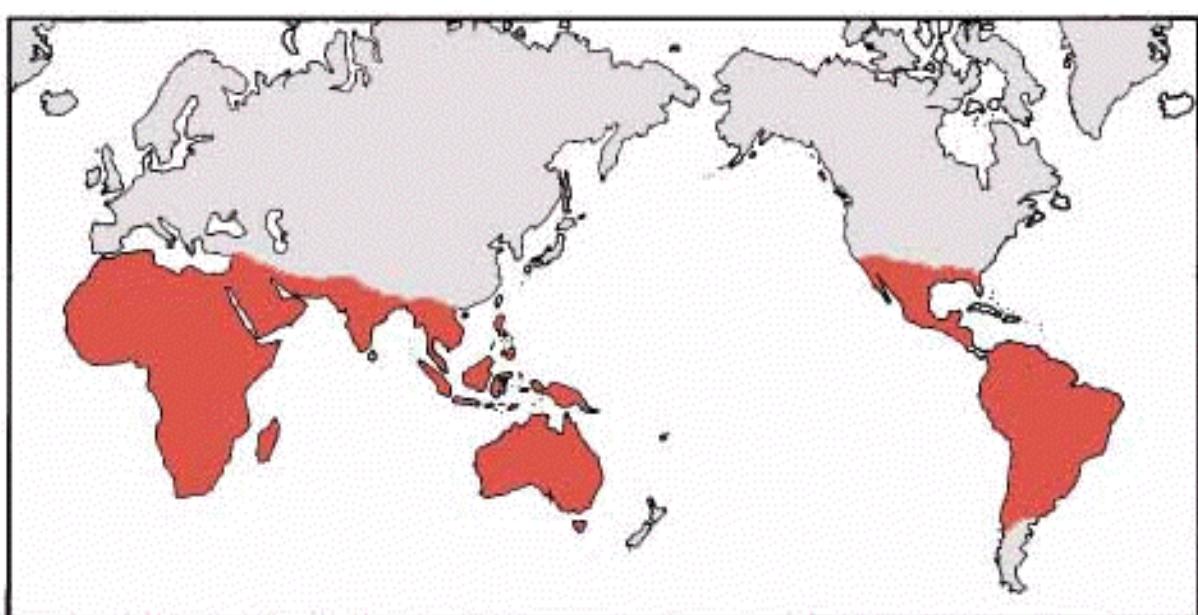
### c) Importances environnementales

Différentes espèces d'*Acacia* présentent une importance environnementale et économique considérable dans beaucoup de pays d'Afrique tropicale sèche et semi-aride (Cossalter, 1986 ; Dreyfus et al. 1987 ; Giffard, 1975).

De part leur qualité supérieure en tant que source de pâturage arboré, beaucoup d'espèces d'*Acacia* sont largement utilisées en agroforesterie sèche, ainsi que dans des programmes de conservation et de gestion durable des ressources en eau (Bhandari, 1990). C'est ainsi que ces plantes trouvent leur place dans la restauration du couvert végétal des zones sèches et semi-arides. Du point de vue écologique, plusieurs espèces de fourmis en particulier les *Crematogaster mimosae* et *Crematogaster nigriceps*, vivent en parfaite symbiose avec certaines espèces de ces plantes dont *Acacia drepanolobium*. Chacun y trouve son compte, *Acacia* fournit un nid aux fourmis (des cavités dans de grandes épines) et de quoi s'alimenter (un délicieux nectar fourni par les nectaires extra-floraux), en échange les fourmis défendent l'arbre contre les mammifères herbivores (girafe) et autres insectes.

#### I.1.3 Répartition géographique

Les *Acacias* occupent des vastes régions dans la partie sud du globe et se trouvent dans des habitats très différents. Les espèces d'*Acacia* sont abondantes dans les savanes et les régions arides de l'Australie, de l'Afrique, de l'Inde et de l'Amérique (Colonna et al, 1991 ; Barea et al, 1992), on les trouve aussi naturalisés à Madagascar, en Asie et dans la région du Pacifique. A Madagascar, les *Acacias* sont particulièrement présents dans les zones arides et semi-arides du pays.



**Figure 2.** Répartition géographique mondiale d'*Acacia*

(Source : [http://www.flora.sa.gov.au/id\\_tool.html](http://www.flora.sa.gov.au/id_tool.html))

## I.2 *Intsia bijuga*

### I.2.1 Description d'*Intsia bijuga*

*Intsia bijuga* est une plante vasculaire, dicotylédone, appartenant à la famille des Fabaceae. Ces arbres sont connus sous les noms communs de « Hintsy », « Tsararavina » ou « Harandranto » en Malagasy, faux gaiac en Français et « Merbau », « Borneo teak » ou « Moluccan ironwood » en Anglais.

Les adultes de cette plante ont une taille moyenne de 15 à 40 m de hauteur et 60 à 120 cm de diamètre. Elles présentent souvent un port ramifié et à houppier dense étalé en parasol. Leur tronc est épais avec des écorces lisses, grisâtres, à lenticelles épaisses et avec des taches blanchâtres irrégulières. Elles ont des feuilles composées et des folioles à limbe glabre. Leurs fleurs sont de couleurs blanches à 4 sépales, un pétale et 3 étamines. Leurs fruits sont des gousses comprimées, déhiscentes en deux valves et chaque fruit contient un à trois graines noires exalbuminées enveloppées dans un parenchyme pulpeux.



**Photo 1.** *Intsia bijuga* (Source : [www.ctahr.hawaii.edu](http://www.ctahr.hawaii.edu))

### I.2.2 Importance d'*Intsia bijuga*

Une des variétés très connues de *Intsia bijuga* porte les noms communs de « ipil », « merbau » ou « kwita ». Cette variété produit un des bois de construction les plus précieux du Sud Est Asiatique utilisé pour la fabrication de poteaux, de poutres, de mobilier, d'armoire et aussi pour la construction d'instrument de musique. Cet arbre, baptisé arbre officiel du territoire des Etats Unis est exploité sur le marché américain et européen pour la fabrication de parquets

et pour extraire des teintures. L'écorce et les feuilles ont des vertus thérapeutiques essentiellement contre la toux (Q.M.M, 2001, Andriamarantsoa, L., 2006).

Face à la qualité supérieure du bois d'*Intsia bijuga*, cet arbre fait l'objet d'importation dans plusieurs pays comme l'Allemagne, la Hollande où le bois est utilisé essentiellement pour la construction des maisons. Ce qui explique le statut critique de cet arbre dans certains pays en terme de disparition. Ainsi, il est enregistré comme espèce menacée en Indonésie, vulnérable aux Philippines et considéré comme une espèce presque disparue dans le Sabah (Meijer, 1997). Cette situation est due à l'insuffisance de volonté des gens à utiliser cet arbre comme plant de reboisement et au manque accru de connaissances relatives à l'écologie et aux conditions de développement de cet arbre.

## II. Les compartiments biologiques du sol

### II.1 La rhizosphère

La rhizosphère est la région du sol directement influencée par les racines. Elle représente le lieu d'échange essentiel entre la plante et le sol. On y observe une présence importante de microorganismes liés les uns aux autres par de complexes réactions de guerre et de paix. On observe souvent dans la rhizosphère une quantité de microorganismes au moins 1000 fois plus importante que dans le sol ambiant non influencé par les racines (Jacques G.F, 1999).

Une différence dans la composition des colonies bactériennes de la rhizosphère et celle d'un sol qui n'a pas été influencé par les racines de plantes vivantes est souvent observée. Les bactéries de la rhizosphère ont des besoins nutritionnels bien différents de celles qui vivent en sols ouverts (Atlas & Bartha 1987). Dans cette partie du sol s'exerce l'influence spécifique des racines sur la microflore tellurique (Soufiane, 1998 ; Campbell et al, 1990 ; Westover et al, 1997). Toutes les activités microbiennes, favorables ou non à la vie de la plante, sont rencontrées dans cette zone. Pourtant, les activités favorables au développement de la plante sont particulièrement intenses telles la solubilisation ou métabolisation des minéraux libérant des éléments nutritifs et la sécrétion d'antibiotiques.

### II.2 La mycorhizosphère

La mycorhizosphère est la rhizosphère des racines mycorhizées (Marx 1972 ; Rambelli 1973). Cette zone privilégiée héberge une population de microorganismes saprophytes, fongiques ou bactériens, en général plus abondante que dans le sol témoin éloigné des mycorhizes (Dommergues, 1978). La distribution des microorganismes dans la mycorhizosphère est très hétérogène. Pour le sapin de Douglas, la composition des populations

bactériennes dépend de l'espèce de champignons mycorhiziens impliqués dans l'association (Neal J. et al. 1964).

L'effet mycorhizosphérique se traduit souvent par une résistance plus grande des racines contre un grand nombre de parasites telluriques. Outre l'amélioration de la structure du sol, cet effet mycorhizosphérique est à la base d'une population microbienne et fongique particulière qui vit en étroite relation avec la plante.

### **II.3 La mycosphère ou hyphosphère**

Au-delà de la rhizosphère et de la mycorhizosphère, les hyphes de champignons mycorhiziens agissent comme des prolongements des racines de la plante en augmentant la surface de sol explorée. Ainsi, le volume de sol conditionné par ce réseau d'hyphes est qualifié de « mycosphère » (Gilbert & Linderman, 1971). Outre les activités d'échange qu'elles effectuent avec la plante, les hyphes du champignon mycorhizien favorisent par leurs exsudats, la formation d'agrégats résultant de l'assemblage de matière organique et de particules de sol au niveau des hyphosphères (Linderman, 1988). Ces structures stimulent également la prolifération d'une population microbienne particulière.

## **III. Les microorganismes de la rhizosphère et leurs activités**

Les microorganismes du sol rhizosphérique sont connus pour jouer des rôles essentiels dans des processus écologiques différents (Garbaye, 1991). Plus particulièrement, les phénomènes soit d'inhibition soit de stimulation régissant la structure des communautés microbiennes de cet habitat sont basés sur plusieurs mécanismes comme la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, la production d'acides organiques ou de sidérophores, la production d'antibiotiques ou de composés toxiques (Hoffmann et al, 1951 ; Anderson E.T. et al, 1994 ; Ching-Hong Yang et al, 1999 ; Patrick A.W. Van Hess et al, 2005).

Parmi les microorganismes favorisés par l'effet rhizosphérique, on peut trouver des bactéries, des champignons et des actinomycètes.

### **a) Les bactéries**

En général, les bactéries constituent les microorganismes les plus nombreux dans la rhizosphère (Morel, 1996). Leur densité varie de  $10^6$  à  $10^8$  Unité Formant Colonie/g de sol. On peut y trouver aussi bien des bactéries hétérotrophes qui participent à la dégradation des matières organiques du sol que des bactéries autotrophes comme les bactéries nitrifiantes et sulfo- oxydantes, les ferrobactéries, les bactéries hydrogéno- oxydantes qui sont capables

d'utiliser le CO<sub>2</sub> et les carbonates comme sources de carbone. Ces bactéries peuvent produire également des substances organiques dans le sol.

Le développement des bactéries *Pseudomonas* du groupe des fluorescents est particulièrement stimulé au sein de la rhizosphère. Ce sont des bactéries Gram (-) généralement mobiles par ciliature polaire, possédant souvent des inclusions de polyhydroxybutyrate pouvant donner une coloration tigrée après la technique de coloration de Gram. Ils se caractérisent par leur aptitude à synthétiser une substance appelée pyoverdine (substances de couleur bleu-vert qui fluorescent sous UV à la longueur d'onde 365 nm) surtout en situation de carence en fer. Les pyoverdines sont des sidérophores qui ont une forte affinité pour le fer (Fe <sup>+++</sup>) (Meyer et al, 1987). La production de ces sidérophores est favorisée par l'abondance de phosphate.

La présence des *Pseudomonas* fluorescents autour du mycélium extra-matriciel et des fructifications ainsi que leur rôle dans l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne ont été déjà démontrés (Duponnois et Garbaye 1991 ; Founoune et al, 2002). Les *Pseudomonas* fluorescents font partie des groupes de bactéries qui protègent les plantes contre les agents pathogènes. Ces bactéries qui agissent en tant qu'antagonistes des agents phytopathogènes sont très importantes pour l'équilibre microbien au niveau du sol (Jacques G. FUCHS, 1999).

### b) Les actinomycètes

Ce sont des microorganismes hétérotrophes à structure végétative de type mycélien. Ils sont présents en grande quantité dans le sol et plus particulièrement dans la rhizosphère. Leur densité avoisine les 10<sup>7</sup> Unité Formant Colonie/g de sol et varie selon le type de sol. Les véritables actinomycètes sont des bactéries gram (+) qui se développent en formant un mycélium (Jacques G. FUCHS, 1999). Les actinomycètes interviennent dans la dégradation des matières organiques difficiles à dégrader par les champignons et les bactéries. De plus les actinomycètes sont capables de produire des substances probiotiques dont les vitamines B1, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique (Morel, 1996 ; Dommergue et al, 1970). Ces substances sont essentielles pour la croissance et la survie de la plante. Outre la production de ces substances, la plupart des actinomycètes (50 à 75 %) produisent des antibiotiques dont les plus connues sont la streptomycine, la chlorotétracycline, l'oxytétracycline et la cycloheximide (Dommergue et al, 1970 ; Morel, 1996) qui tiennent un rôle central dans la protection de la plante contre différents pathogènes. Les actinomycètes participent également au processus d'humification par la production de composés de structure chimique voisine de celle des acides humiques (Dommergue, 1970).

Les actinomycètes au sein de la rhizosphère sont particulièrement actifs vis-à-vis de certaines activités physiologiques telles que la mobilisation des aliments minéraux, la fixation de l'azote et la sécrétion des substances de croissance ou des molécules inhibitrices du développement des microbes pathogènes des plants (Linder Man, 1988).

### c) Les champignons

Les champignons sont des microorganismes très répandus dans le sol. Au niveau de la rhizosphère, sa densité est généralement estimée à  $10^4$  à  $10^5$  /g de sol (Soufiane, 1998 ; Morel, 1996). Les champignons, que ce soient les champignons inférieurs (Zygomycètes) ou les champignons supérieurs (Ascomycètes et Basidiomycètes) se présentent généralement sous forme d'hypes et/ou de spores germés ou non dans le sol. Ces champignons interviennent dans la dégradation de certaines substances comme la lignine. Au niveau de la rhizosphère, les champignons les plus abondants sont les champignons mycorhiziens.

### d) Autres microorganismes

D'autres groupes de microorganismes du sol peuvent être trouvés dans la rhizosphère, cependant, ces microorganismes sont moins nombreux. C'est le cas des algues qui sont des microorganismes unicellulaires regroupés en colonies ou filaments. Leur densité est comprise entre  $10^4$  et  $10^5$ /g de sol. Ces algues sont constituées par les cyanophycées (algues bleues vertes) et les chlorophycées (algues vertes). Leur principal rôle est la fixation de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{N}_2$ . La fixation de  $\text{CO}_2$  peut atteindre jusqu'à 39 mg/m<sup>2</sup>/heure (Morel, 1996).

Outre les algues, la microfaune du sol, représentée essentiellement par les nématodes, peut être trouvée dans la rhizosphère. Ces derniers constituent souvent des pestes des racines des plantes (Morel, 1996). Duponnois et al en 2002 ont pu isoler et identifier trois genres de nématodes phytoparasites au niveau de la rhizosphère d'*Acacia mangium* à savoir *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Scutellonema* (S. cavenessi.)

## IV. Les activités enzymatiques du sol rhizosphérique

Les déterminations quantitatives de nombreuses activités enzymatiques du sol peuvent être effectuées à partir d'échantillons de sol. La présence et l'activité des êtres vivants dans le sol se traduisent par la synthèse d'enzymes de toutes sortes, localisées à l'intérieur des cellules (intracellulaires) ou à l'extérieur des cellules (extracellulaires), adsorbées sur les parois des microbes ou sur les minéraux argileux, ou encore formant des copolymères avec des substances humiques (Burns, 1982).

Les mesures d'activités enzymatiques sont utilisées depuis un demi-siècle pour évaluer la "fertilité" des sols (Hoffmann et Seegerer, 1951). Ces activités enzymatiques ont été utilisées ultérieurement pour étudier le fonctionnement biologique des sols après certains traitements tels que l'inoculation ou la fertilisation. Les enzymes du sol sont souvent classées dans différents groupes selon leur origine, fonctionnement et le type de substrat.

#### **IV.1 Oxydoréductases (déshydrogénases, catalases, laccases)**

Il s'agit d'enzymes de type "respiratoire", dont la plus courante est la Déshydrogénase. La mesure est parfois incluse dans des tests écotoxicologiques (Rossel & Tarradellas, 1991) pour une estimation rapide de l'activité biologique globale du sol. Toutefois, les résultats sont assez variables en fonction des conditions opératoires (Merlin & Rossel, 1992). L'activité des catalases a été parfois aussi déterminée à partir d'échantillons de sol. La mesure consiste à enregistrer la formation d'oxygène gazeux lors de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). Cependant, des réactions abiotiques sont fréquentes et peuvent sérieusement biaiser les résultats (activité physico chimique des oxydes de manganèse). Les polyphénols-oxydases interviennent dans les processus d'humification à travers la dégradation de la lignine. Cette famille d'enzymes comprend également les laccases.

#### **IV.2 Hydrolases (cellulases, phosphatasées)**

La plupart des enzymes du sol appartiennent à ce groupe et les activités qui s'y rattachent correspondent fréquemment à des transformations d'intérêt agronomique. Les cellulases sont en lien avec la dégradation des résidus de récolte, de nature essentiellement ligno-cellulosique. Les activités phosphatasiques (phosphatase acide, phosphatase alcaline, phosphodiesterases) quant à elles séparent l'ion ortho-phosphate d'une molécule organique. La synthèse de l'enzyme est inhibée par la présence en grande quantité d'ion ortho-phosphate. L'activité de l'enzyme est donc dépendante de la concentration en ions  $\text{PO}_4^{2-}$  dans le sol. Un apport d'engrais phosphatés, par exemple, entraînera une diminution de cette activité, indépendamment de l'abondance et des autres activités des populations microbiennes présentes.

L'activité phosphatasique est corrélée positivement avec la teneur en matière organique du sol. Elle semble très sensible au stockage prolongé même à basse température. Les phosphatasées sont à la fois endo- et exo-cellulaires. Elles sont localisées soit dans les cellules vivantes microbiennes ou végétales, adsorbées sur les fragments des parois cellulaires ou soit associées à des composés abiotiques du sol (argiles et composés humiques). On peut ainsi supposer que plusieurs processus sont à l'origine de la perte importante de l'activité

phosphatasique au cours du temps de stockage : la mort des cellules racinaires libérant des phosphatases ainsi facilement dénaturées, une plus grande sensibilité au stress de l'enzyme à l'état exo-cellulaire, une protection relative des liaisons argile- et acide humique-enzyme (BROHON B et al.).

Les phosphatases acides (phosphomonoesterases) sont des exo-enzymes hydrolytiques, qui libèrent le phosphore inorganique d'une gamme des substrats tels que le phosphate d'inositol, polyphosphates et sucres phosphorylés (Eleanor et Lewis, 1973 ; Tibbett et autres, 1998).

#### IV.3 Les enzymes hydrolysant le diacétate de fluorescéine (estérases, protéases, lipases)

L'utilisation des esters de fluorescéine pour une mesure d'activité enzymatique a été effectuée pour la première fois par Kramer et Guilbault (1963) où un procédé simple a été décrit pour l'analyse de l'activité de lipase en présence d'autres estérases. Ce n'était qu'en 1980 que l'utilisation des esters de fluorescéine pour la mesure d'activité microbienne a été appliquée aux échantillons environnementaux. Swisher et Carroll (1980) ont démontré que la quantité de fluorescéine produite par l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine (FDA) était directement proportionnelle à la population microbienne accroissant sur le feuillage de sapin de Douglas et depuis, une méthode normalisée a été développée. Cette méthode a été, par la suite, adaptée par Schnürer et Rosswall (1982) pour déterminer l'activité microbienne totale dans la civière de sol et de paille suite à sa capacité à hydrolyser le FDA.

La méthode consistant à mesurer l'hydrolyse de la FDA (Schnürer & Rosswall, 1982) fait intervenir plusieurs groupes d'enzymes différentes. Le diacétate de fluorescéine étant en effet hydrolysé par des lipases, des protéases, des estérases ou d'autres enzymes. Cette activité enzymatique connaît actuellement un vif intérêt et est très utilisée pour mesurer l'activité enzymatique globale de la population microbienne du sol.

L'avantage de cette méthode est due à sa mise en œuvre simple et rapide et à sa qualité acceptée pour évaluer l'activité microbienne totale. C'est pourquoi, cette méthode est actuellement applicable sur différents types de sol aussi bien tempéré que tropical.

## V. La symbiose mycorhizienne

### V.1 Définition des mycorhizes

Etymologiquement, le terme Mycorhize vient de deux mots grecs : *mukēs* (champignon) et *rhiza* (racine) traduisant l'union durable entre champignons et racines d'une plante (Dechamplain, 2002). Cette union est basée sur des échanges réciproques entre les racines des végétaux et certains champignons du sol (Smith et al, 1997). Dans certains cas, la symbiose mycorhizienne est obligatoire. Il arrive que les deux partenaires (champignons et plantes) ne se développent pas normalement dans les conditions naturelles, sans cette association mutuelle (Smith et Read 1997 et 2008).

### V.2 Classe et type de champignons mycorhiziens

Vers la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, la distinction des mycorhizes a été basée sur leurs critères morphologiques. Ainsi, Frank (1885) a distingué deux types : l'endomycorhizes (forme endotrophe) et l'ectomycorhizes (forme ectotrophe).

Ultérieurement, d'autres classifications sont apparues selon des critères physiologiques et écologiques. Toutefois les critères morphologiques de Frank (1885) restent toujours valables. En effet, Smith et Read en 1997 décrivent sept types de mycorhizes dont les endomycorhizes à vésicules et arbuscules, les ectomycorhizes, et les ectendomycorhizes, ainsi que des mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes, éricoïdes et orchidoïdes

#### V.2.1 Les endomycorhizes

L'endomycorhize est caractérisée par le développement du champignon à l'intérieur des cellules corticales, par l'absence de manteau fongique autour de la racine ni de manchon extérieur ni de réseau intercellulaire. Les endomycorhizes sont largement distribuées dans le monde végétal. On les rencontre essentiellement chez les plantes herbacées en général et chez plusieurs espèces ligneuses. Les endomycorhizes présentent des anatomies très variées d'où l'apparition de ces classifications dont les endomycorhizes à pelotons et les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA).

Parmi ces endomycorhizes, les mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA) sont les plus fréquentes (environ 95% des plantes vasculaires y compris de nombreuses plantes agricoles) (Smith et Read, 1997). Ainsi les champignons endomycorhiziens formant les MVA

sont des Champignons Inférieurs (Phycomycètes) à large spectre d'hôtes, qui appartiennent à la famille des Endogonacées (Zygomycètes) mycorhizant de très nombreuses espèces végétales et qui, par conséquent, peuvent se rencontrer dans des écosystèmes très divers (Morton et al, 1995).

### **V.2.2 Les ectomycorhizes**

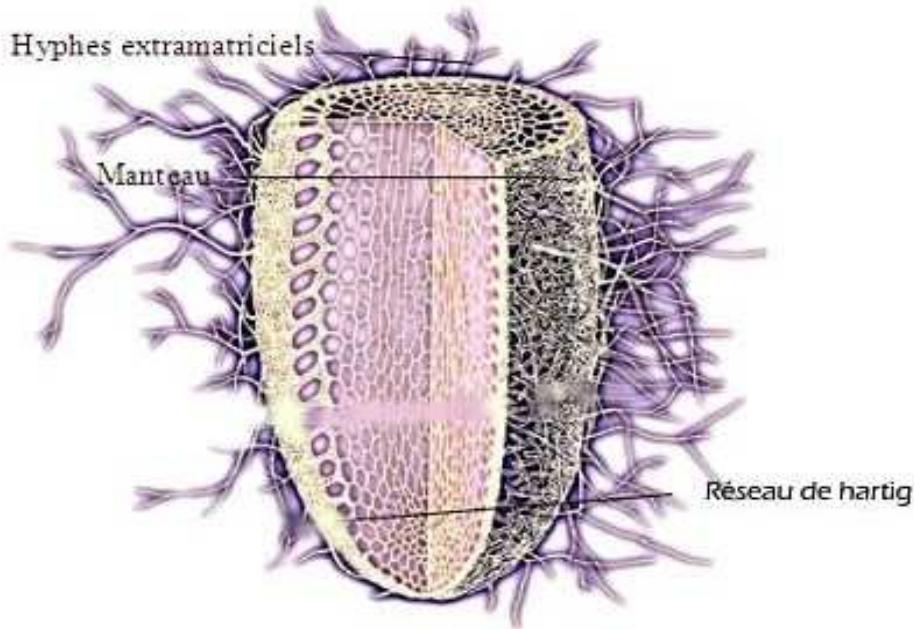
Les premières tentatives d'inoculation ectomycorhizienne datent de 1920, en Australie (MIKOLAS, 1970), où la pratique se poursuit (THOMSON et al. 1996 ; DELL et MALAJCZUK, 1997). En Europe, dans les années 1950, la mycorhization de *Pinus cembra* par *Suillus plorans* a connu des réussites considérables dans les plantations en zones alpines peu favorables en Autriche (MOSER, 1958). La production d'arbres forestiers inoculés à grande échelle a d'abord été développée aux Etats-Unis, dans les années 1980 (MARX et al. 1982). Ainsi l'utilisation de *Pisolithus arhizus* dans l'inoculation des plants de pépinière y est maintenant routinière (MARX et al. 1988).

#### **a) Description des ectomycorhizes**

Ce type de symbiose concerne environ 5% des plantes vasculaires et n'a jamais été observé chez les monocotylédones. Dans le cas de l'ectomycorhize, le champignon forme autour des racines fines un manchon compact à partir duquel les hyphes se développent tant vers l'intérieur jusqu'au cortex, formant un réseau continu appelé « réseau de Hartig » entre les cellules corticales, que vers l'extérieur jusqu'au sol environnant. L'ectomycorhize présente souvent une allure charnue et ramifiée, modification qui résulte probablement de la synthèse de phytohormone par le champignon (GAY et GEA ,1994).

#### **b) Structures et particularités des ectomycorhizes**

##### **b-1) Structure anatomique des ectomycorhizes**



**Photo 2.** Structure anatomique des ectomycorhizes

Au niveau anatomique, une structure ectomycorhizienne est constituée :

- **des hyphes extra-matriciels** qui se propagent dans le milieu extérieur en formant des connexions entre le sol et les carpophores. Elles jouent le rôle d'exploration du sol et d'absorption des éléments nutritifs.
- **du manteau** : filament mycélien formant un manchon engainant la racine. Il est constitué par un feutrage à organisation spatiale différente selon le champignon mycorhizien et selon la présence ou absence des couches externes ou internes. Les hyphes de manteau sont presque vides et aplatis dans les couches externes et ont, au contraire, dans les couches internes, les caractéristiques d'un mycélium juvénile. Le manteau joue le rôle de connexion entre le mycélium explorateur et les cellules corticales de la racine
- **des hyphes du réseau de Hartig** formées par des cellules fongiques séparant souvent la première couche des cellules corticales de la racine. Ces hyphes sont tout à fait semblables aux hyphes les plus internes du manteau, qui s'insinuent entre les cellules du cortex racinaire sans jamais pénétrer dans les cellules de l'hôte. C'est à leur niveau que s'effectuent les échanges d'éléments nutritifs (sucres, acides aminés, éléments minéraux).

Suivant l'espèce du champignon ectomycorhizien, il existe une grande variabilité de la structure du manteau et du réseau de Hartig. Le manteau et les hyphes extra matriciels varient aussi bien par leurs caractères morphologiques, structuraux que par leurs caractères anatomiques. Le réseau de Hartig, quant à lui, entoure plus ou moins les cellules corticales de la racine.

### **b-2) Particularités des ectomycorhizes**

Comparées aux endomycorhizes, beaucoup plus représentées dans le règne végétal, les ectomycorhizes ont les particularités suivantes. Chez les ectomycorhizes, seules les racines courtes spécialisées sont colonisées, le champignon ne pénètre pas les cellules corticales de la racine mais forme un réseau autour de celles-ci, et le mycélium constitue un manchon continu autour de la racine. Ce dernier caractère a une conséquence importante qui fait que le champignon est un passage obligé pour la plus grande partie des flux de matière entre le sol et la racine. C'est ainsi que la symbiose est un des facteurs-clés de l'absorption d'eau et d'ions minéraux indispensables à l'arbre.

Les ectomycorhizes se trouvent le plus souvent chez les espèces ligneuses, en particulier les essences forestières de la famille des Pinaceae, des Fagaceae, des Betulaceae et quelques essences tropicales (Garbaye, 1988)

### **c) Les champignons ectomycorhiziens**

Les champignons formant les ectomycorhizes appartiennent au groupe des champignons supérieurs tels les Basidiomycètes et les Ascomycètes (MILLER, 1982) et contiennent plus de 5000 espèces (MOLINA et al. 1992).

Les Basidiomycètes constituant des ectomycorhizes sont courants dans les forêts ou autour des arbres isolés des parcs et des jardins. Ils ont en général des aptitudes limitées à vivre en saprophytes mais acceptent un large spectre d'hôtes. Chez les Basidiomycètes, beaucoup de familles présentent une ou plusieurs espèces de champignons ectomycorhiziens.

Les familles et genres concernés sont entre autres : Amanitaceae (*Amanita*), Tricholomaceae (*Ticholoma*, *Armillaria*, *Laccaria*), Paxilacaea (*Paxillus*), Boletaceae (*Boletus*, *Leccinum*, *Suillus*), Russulacaea (*Russula*, *Lactarius*), Sclérodermacaea (*Scleroderma*, *Pisolithus*), Corticiacaea (*Piloderma*).

Chez les basidiomycètes, les spores se différencient extérieurement à l'extrémité des filaments courts appelés stérigmantes.

Chez les Ascomycètes, les familles les plus concernées sont : Elaphomycetaceae (*Elaphomyces*, *Cenococcum*), Terfeziaceae (Terfèzes), Tubéracea (Tuber).

Dès 1885, Frank et les premiers mycorhizologues estimaient déjà que les champignons ectomycorhiziens favorisaient la nutrition azotée et phosphatée des arbres associés et dépendaient des sucres synthétisés chez ces derniers pour assurer leur croissance végétative et pour accomplir leur cycle sexuel.

Physiologiquement, le champignon ectomycorhizien reçoit un apport carboné venant de la plante hôte. L'ensemble des ectomycorhizes consomme entre 10 et 40% des photosynthétats de la plante-hôte. En retour, divers rôles des champignons ectomycorhiziens ont été mis en évidence dans l'alimentation minérale de la plante. Outre les ressources minérales phosphatées et azotées solubles (MOUSAIN, 1989 ; MARTIN et LORILLOU, 1997), le champignon peut exploiter les ressources organiques du sol, notamment en sécrétant différentes enzymes tels que des protéases (NASHOLM et al. 1998) et des phosphatasées (MOUSAIN, 1989).

#### **d) Rôles des ectomycorhizes**

La symbiose ectomycorhizienne est connue plus particulièrement pour sa capacité à améliorer la nutrition phosphatée et azotée des plantes. Cette amélioration est surtout due à la capacité des hyphes fongiques à explorer une surface plus importante du sol et à mobiliser des éléments nutritifs à partir des formes peu solubles. Sur ce point, la présence des microorganismes capables de solubiliser cet élément au voisinage des mycorhizes et/ou du sol environnant pourrait constituer un facteur améliorant la nutrition en phosphate de la plante. Le phosphore est d'abord accumulé dans les hyphes qui prospectent un important volume du sol autour de la structure mycorhizienne. Cette accumulation dans les cellules fongiques se fait sous forme de polyphosphates (ASHFORD et al, 1975 ; CHILVERS et HARLEY, 1980 ; STRULLU, 1982 et 1983). Chez les plantes ectomycorhizées, une activité enzymatique plus particulièrement les activités phosphatasiques, est susceptible de jouer un rôle important dans la mobilisation des formes peu ou pas solubles de phosphore dans le sol (Bartlett et Lewis, 1973 ; Williamson et Alexander, 1975).

L'ectomycorhize joue également un rôle important dans l'absorption, le transfert ou l'immobilisation d'autres éléments minéraux du sol tels que le cuivre, le fer, zinc et potassium. Ce type de symbiose peut accumuler également dans ses cordons mycéliens des quantités considérables de métaux lourds présents en excès dans les sols acides (aluminium, cadmium, zinc). Les champignons sont de bons détoxificateurs des sols.

L'ectomycorhize protège la racine-hôte contre diverses agressions. La protection contre les microorganismes du sol (Marx, 1972) serait non seulement liée au rôle d'écran du manteau,

mais aussi à des interactions plus complexes dans la rhizosphère, amenant à une modification locale de la microflore (FREY et al. 1997).

De même, certains champignons ectomycorhiziens améliorent la réponse des arbres au stress hydrique (GUEHL et al. 1992)

Par la technique de la mycorhization contrôlée, l'ectomycorhize pourra être exploitée également pour la production commerciale de beaucoup de champignons comestibles (DANIEL et CAMACHO, 1997)

### V.3 La mycorhization contrôlée

#### V.3.1 Historique

Les premiers essais de mycorhization contrôlée en pépinière ont été réalisés vers 1920 en Australie par inoculation de semis de *Pinus radiata* avec des carpophores de *Rhizopogon luteolus*. Il a fallu attendre jusqu'aux alentours des années 1970 pour que cette technique soit développée à petite échelle aux Etats Unis par Marx, puis à grand échelle à partir de 1982 (Marx et al., 1982 et 1984). En 1996, le nombre de semis de pin inoculés artificiellement avec du *Pisolithus tinctorius* avoisinant les 18 millions. Au Canada, le premier inoculum liquide a été commercialisé en 1988 par les Laboratoires Rhizotech Inc à Saint Jean Chrysostome au Québec. On a pensé pendant plusieurs années que la mycorhization contrôlée devait être limitée aux zones dépourvues ou ayant très peu d'inoculum naturel (zones tropicales ou équatoriales- Bjorkman, 1970 ; Mikola, 1970 ; Marx, 1980 ; Delwaille et al, 1982 ; Le tacon, 1982a). Depuis quelques années, il est clairement établi qu'il est possible de trouver des voies pour améliorer la croissance des arbres forestière via la mycorhization contrôlée dans diverses conditions écologiques (Le Talcon et al, 1997)

#### V.3.2 Définition

La mycorhization contrôlée est un ensemble de technique qui consiste à optimiser l'établissement de la symbiose mycorhizienne en introduisant en pépinière des souches mycorhiziennes sélectionnées et à évaluer leur effet sur la croissance de l'hôte (Le Talcon, 1982 ; Le Talcon et al, 1986 ; Garbaye et al, 1988 ; Yazid et al, 1994). Cette technique permet à la fois de déterminer l'efficacité des souches fongiques sur la croissance de la plante et de sélectionner des champignons susceptibles d'être utilisés pour la production de plants pour le reboisement (Garbaye et al, 1988 ; Garbaye, 1990 ; Le Talcon et al, 1992 ; Le Talcon et al, 1997 ; Palardé et al, 1997, Del et al, 1997).

### V.3.3 Technique de mycorhization contrôlée :

L'inoculation en pépinière est souvent réalisée sur sol stérilisé, afin d'éliminer les compétiteurs éventuels de l'inoculum (LE TACON et al. 1986). Ainsi, avant de mélanger le sol avec l'inoculum fongique, le sol est préalablement broyé, tamisé et stérilisé pendant 40 mn à 140°C. Après la stérilisation, les caractéristiques physico-chimiques du sol sont identifiées.

La technique de préparation d'inoculum varie suivant les substrats utilisés. Duponnois et Garbaye (année) ont proposé une technique utilisant le mélange tourbe/vermiculite (4/1 ; v/v). Chaque souche de champignon est ensemencée dans des bouteilles contenant ce substrat préalablement stérilisé. Dans ce mélange tourbe-vermiculite est ajouté le milieu liquide MNM et le tout est stérilisé (120°C, 20min) avant l'ensemencement de souche. La culture est incubée à la température 28°C pendant six semaines.

L'inoculum est mélangé avec du sol préalablement stérilisé à raison de (1/10 ; v/v). La culture est arrosée au moins deux fois par semaine, selon la plante, avec de l'eau de robinet sans la fertilisée. La croissance de la plante doit être suivie aussi bien en pépinière qu'après transplantation en milieu naturel.

L'effet bénéfique de cette technique sur la croissance des plantes en pépinière et après transformation a permis de sauver plusieurs espèces d'essences ligneuses dans beaucoup de pays tempéré, surtout lorsque le champignon est adapté aux conditions écologique du site à reboiser. Chez les ectomycorhizes, l'inoculation en pépinière peut entraîner un maintien à court terme (1 à 2 ans après transplantation) de l'espèce sur le système racinaire (MARX et al., 1988 ; DANIELSON et VISSER , 1989 ; BUSCHENA et al., 1992 ; THOMSON et al., 1996 ; HONIG et al., 2000) et jusqu'à 10 ans après transplantation (GARBAYE et CHURIN, 1997 ; SELOSSE et al., 1998a et 1999).

### V.4 Intérêts de la mycorhization

Les plantes mycorhizées sont plus riches en éléments minéraux que les plantes non mycorhizées. Pour un développement égal, il faut apporter plus d'engrais aux plantes non mycorhizées qu'aux plantes mycorhizées. On distribue cette efficacité à une augmentation des surfaces absorbantes du système racinaire.

La mycorhization des plantes peut permettre une croissance normale dans des sols calcaires. En absence de mycorhization, on observe chez les plantes concernées des chloroses calciques caractéristiques (CLEMENT et al, 1977 ; LAPEYRIE, 1983). De la même façon, on a noté que la mycorhization permet le développement des plantes sur des sols fortement contaminés par des métaux lourds.

La mycorhization améliore par ailleurs l'alimentation en eau des plantes. On attribue ceci à une meilleure exploitation du sol ou à la conséquence d'une nutrition minérale améliorée (PIGOTT, 1982 ; DUDDRIDGE et al, 1982 ; SAFIR et al, 1972).

La présence de champignons symbiotiques à l'intérieur d'une racine ou à sa surface agit sur la microflore environnante. Plusieurs auteurs ont signalé une diminution due à la symbiose ectomycorhizienne des dégâts causés par des agents phytopathogènes (nématodes et champignons) (MARK ,1969 ; BONDOUX et PERRIN, 1982).

Un cortège mycorhizien optimal constituerait un engrais vert compatible avec une gestion durable de l'écosystème forestier.

## **MATERIELS ET METHODES**

## A] IMPACTS DE LA MYCORHIZATION SUR LE DEVELOPPEMENT d'*Acacia mangium* ET SUR LA COMMUNAUTE MICROBIENNE DU SOL

### I. Matériel biologique

#### I.1. *Acacia mangium*

##### I.1.1. Description

*Acacia mangium* est un arbre de la famille des légumineuses originaire de la zone Australienne (Queensland) et qui peut atteindre 30m de hauteur. Ses racines portent souvent de nombreux nodules fixateurs d'azote et des morphotypes d'ectomycorhize. Cette plante représente l'une des espèces les plus productives en zone tropicale humide et elle a été largement plantée sur des terrains peu fertiles et perturbés comme les zones abandonnées par la culture itinérante.

##### I.1.2. Classification

Règne	: Végétale
Sous règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Sous classe	: Rosidae
Ordre	: Fabales
Famille	: Fabaceae
Genre	: <i>Acacia</i>
Espèce	: <i>mangium</i>

#### I.2. Souches de champignons ectomycorhiziens

##### I.2.1. Origine des souches

Les quatre souches de champignons ectomycorhiziens utilisées ont été fournies par la collection de souches du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE. Ces souches ont été isolées à partir des carpophores récoltés dans différents écosystèmes à

Madagascar et sous des plantes déjà reconnues ectomycorhiziennes. Ainsi, deux souches de scléroderme originaires des formations forestières naturelles et deux souches de pisolithe originaires de plantation d'essences exotiques ont été utilisées.

a. *Scleroderma sp2* codé SC02-ME

**SC02-ME** est une souche de scléroderme isolée à partir d'un carpophore de petite taille et de couleur blanc grisâtre récolté sous *Uapaca bojeri* dans la forêt sclérophylle d'Arivonimamo.

b. *Scleroderma sp3* codé SC03-ME

Le carpophore, à partir duquel la souche de scléroderme **SC03-ME** est isolée, a été récolté sous *I. bijuga* dans la forêt naturelle d'Antetezana, une formation forestière de basse altitude de la côte orientale de Madagascar.

c. *Pisolithus sp1* codé Pis01-ME

La souche **Pis01-ME** a été isolée à partir de carpophore de pisolithe récolté sous une plantation homogène d'*Eucalyptus globulus* sur le haut plateau de Madagascar plus précisément à Mangamila.

d. *Pisolithus sp2* codé Pis02-ME

Dans le district de Manjakandriana, sur le haut plateau de Madagascar, des plantations mixtes d'*Eucalyptus* et de *Pinus* sont observées. La souche **Pis02-ME** a été isolée à partir d'un carpophore de pisolithe récolté sous une plantation de ce type au sud d'Ambatomena - Manjakandriana.

### I.2.2. Classification

Les quatre souches appartiennent toutes à l'ordre de Sclérodermatales selon les classifications suivantes.

**Sous embranchement :** Basidiomycotina  
**Classe** : Homobasidiomycète  
**Sous classe** : Gastéromycétidées  
**Ordre** : Sclérodermatales  
**Famille** : Sclérodermaceae  
**Genre** : *Scleroderma*  
 (SC02-ME, SC03-ME)

**Sous embranchement :** Basidiomycotina  
**Classe** : Homobasidiomycète  
**Sous classe** : Gastéromycétidées  
**Ordre** : Sclérodermatales  
**Famille** : Pisolithaceae  
**Genre** : *Pisolithus*  
 (Pis01-ME, Pis03-ME)

## II. Mycorhization d'*Acacia mangium*

La mycorhization d'*A. mangium* a été réalisée sous deux conditions bien distinctes du sol de culture. Dans un premier temps et pour déterminer la dépendance mycorhizienne de la plante, la mycorhization a été contrôlée c'est-à-dire réalisée avec du sol préalablement stérilisé. Puis et pour s'approcher de plus près des conditions du milieu naturel, l'inoculation a été faite avec du sol non stérilisé. Cette deuxième étape permettra également d'évaluer la réceptivité du sol à l'inoculation et la compétitivité des souches fongiques utilisées vis-à-vis des microorganismes natifs du sol.

### II.1. Scarification et mise en germination des graines d'*A. mangium*

Des graines d'*A. mangium*, provenant du Silo National des Graines Forestières, ont été stérilisées dans l'acide sulfurique concentré à 95% pendant 60mn. La solution d'acide sulfurique a été par la suite éliminée et les graines ont été rincées 4 à 5 fois avec de l'eau distillée stérile (140°C, 40 min) puis incubées pendant 12 h à l'obscurité dans de l'eau distillée stérile. Ces graines ont été, par la suite, transférées aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant préalablement de l'eau gélosée stérile (Agar : 10 g. l<sup>-1</sup>) puis incubées de nouveau à l'obscurité sous une température de 25°C pendant 72 h.

### II-2. Préparation de l'inoculum

Les souches de champignons ectomycorhiziens utilisés dans cette expérience sont entretenues régulièrement en culture dans des boîtes de Pétri sur milieu nutritif MNM gélosé (Marx, 1969). L'inoculum fongique a été préparé selon le protocole décrit par Duponnois & Garbaye (1991). Des bouteilles ou erlens de 1 l ont été remplis par 600ml d'un mélange tourbe – vermiculite (1/4 ; v/v) et stérilisé à l'autoclave (140° C, 40 min). Ce substrat est ensuite humidifié par 300 ml de milieu MNM liquide sans agar, bouchés hermétiquement avec du coton cardé et puis autoclavés de nouveau à 140°C pendant 40 min.

Sous hotte à flux laminaire et à une température avoisinant 25°C, le substrat est ensemencé par des implants fongiques prélevés sur des cultures préalablement préparées sur

milieu solide. Les bouteilles d'inoculum fongique sont ensuite incubées à l'obscurité sous une température de 30°C pendant une période de 6 semaines durant laquelle, la souche colonise le substrat tout entier.



**Photo 3:** Inoculum de champignons ectomycorhiziens sur substrat tourbe/Vermiculite

### II.3. Le sol de culture

Le sol utilisé a été prélevé à la périphérie d'une formation forestière naturelle sur le moyen Est de Madagascar. Les caractères physico-chimiques de ce sol sont donnés par le tableau ci après (Tableau 1). Le sol a été tamisé à travers un tamis de 2mm de maille et puis soit stérilisé à l'autoclave à une température de 120°C pendant 40 mn pour la mycorhization contrôlée, soit utilisé directement sans stérilisation préalable.

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques du sol de culture

	<b>pH</b>	<b>Azote totale</b> (H <sub>2</sub> O)	<b>Carbone total</b> (%)	<b>Phosphate totale</b> (ppm)	<b>Potassium</b> (méq/100g)	<b>C/N</b>
<b>Sol de culture</b>	6.15	0,084	1.47	19.3	0.043	17.5

## II.4. Dispositif expérimental

Pour les traitements inoculés, le sol préalablement stérilisé ou non a été mélangé avec l'inoculum ectomycorhizien (10%, v/v). Le mélange est distribué dans des sachets plastiques de 1 litre puis rangé sur une tablette métallique de façon randomisée. Des graines pré-germées d'*Acacia mangium* ont été repiquées à raison d'une graine par pot et 25 répétitions ont été établies pour chaque traitement. Les plantes témoins ont été plantées sur le sol stérilisé ou non mélangé avec du mélange Tourbe/Vermiculite préalablement stérilisé et sans culture fongique préalable. Les expériences ont été réalisées sous les conditions de la serre du LME où les plantes ont été arrosées deux fois par semaine avec de l'eau du robinet sans fertilisation.

## III. Evaluation des résultats

### III.1. Développement de la plante

L'évolution du développement des plantes pour chaque traitement a été évaluée en mesurant leurs biomasses aériennes et racinaires et en notant régulièrement la hauteur de chaque plante.

#### III.1.1. Biomasse aérienne

La hauteur de la tige de chaque plante, du collet jusqu'au bourgeon terminal, a été mesurée tout les 30 jours durant les 5 premiers mois de son développement.

La biomasse aérienne des plantes est constituée par l'ensemble des feuilles et des tiges au dessus du collet. Après 5 mois de culture, les parties aériennes ont été récupérées en coupant au niveau du collet. Après un léger lavage à l'eau de robinet, elles ont été enveloppées dans du

papier aluminium, puis séchées dans une étuve à 100°C pendant 24h. La biomasse aérienne est par la suite évaluée sur une balance de précision juste quelques instants après avoir sorti les échantillons de l'étuve. Cette précaution permet d'éviter d'éventuel changement de poids des échantillons dû aux conditions de conservation au laboratoire.

### **III.1.2 Biomasse racinaire**

Après cinq mois de culture, les plants ont été dépotés et leurs systèmes racinaires ont été soigneusement lavés à l'eau du robinet.

Les sols rhizosphériques sont récupérés en secouant les racines et éventuellement par rinçage à l'eau courante. Les sols ainsi obtenus sont séchés à l'air libre, puis conservés à +4°C pour des analyses microbiologiques. Après avoir effectué les observations relatives au taux de mycorhization, les systèmes racinaires ont été séchés à l'étuve 100°C pendant 24h. La biomasse racinaire est évaluée sur balance de précision juste quelques instants après avoir sorti les échantillons de l'étuve.

### **III.2. Taux d'ectomycorhization**

La mesure du taux d'ectomycorhization est effectuée sur des systèmes racinaires frais. Ces derniers sont nettoyés à l'eau courante puis placés dans une boite de pétri de manière à obtenir une répartition homogène des bouts de racines. Sous loupe binoculaire au grossissement fois 40, on choisit au hasard un champ d'observation présentant au moins 100 bouts de racine dont on compte les mycorhizés et les non mycorhizés. Au moins, trois comptages ont été effectués pour le système racinaire de chaque plante. La moyenne ainsi obtenue donne le taux d'ectomycorhization en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'ectomycorhization} = (\text{Nombre de racines ectomycorhizées} / \text{Nombre total de racines observées}) \times 100$$

La dépendance mycorhizienne exprime l'importance d'une souche mycorhizienne donnée sur le développement de la plante (Plenchette et al, 1983). Cette dépendance mycorhizienne, exprimée en pourcentage est donnée par la formule suivante.

Dépendance mycorhizienne = [(poids sec de biomasse plante mycorhizée – poids sec de biomasse plante non mycorhizée)/poids sec de biomasse plante mycorhizée] X 100

\*Le poids sec de biomasse de la plante est exprimé en gramme

### **III.3. Caractérisation morphologique des morphotypes d'ectomycorhize**

Chaque morphotype d'ectomycorhize observé sur le système racinaire de la plante a fait l'objet de caractérisation morphologique. Ainsi, les critères suivants ont été étudiés : la couleur et la texture du manteau, la présence ou absence d'hyphes extramatricielles et la présence ou absence du cordon.

### **III.4. Mesure des activités microbiennes du sol**

#### **III.4.1. Activité microbienne totale du sol mesurée par l'hydrolyse de la Fluorescéine Di Acétate (FDA)**

##### **III.4.1.1. Préparation de la solution tampon de potassium phosphate**

Une quantité de 8.7g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Riedel –De Haen.cie .ltd.Analar de sigma Aldrich) et de 1.3g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, BDH Analar) a été dissoute dans 800ml d'eau distillée stérile. Le pH a été ajusté à 7.6 avec du NaOH. Ensuite, le composé a été complété à 1l avec de l'eau distillée stérile et puis stocké dans le réfrigérateur à +4°C.

##### **III.4.1.2. Préparation du substrat : la FDA**

Le substrat de la réaction d'hydrolyse est constitué par une solution de 1mg/ml de FDA préparée avec l'acétone. Dix milligramme de FDA en poudre ont été dissoutes dans 10ml d'acétone (acétone 100%). Après agitation, le mélange a été conservé à -20°C à l'obscurité (le flacon a été recouvert par du papier aluminium).

##### **III.4.1.3 Mesure de l'activité microbienne totale du sol**

Quatre pesées de 1g du sol préalablement tamisé à 2mm de maille ont été effectuées dont le premier sert de témoin enzyme (TE) et les trois autres constituent les essais (E) de l'échantillon de manière à obtenir trois répétitions pour chaque type de sol. Le témoin substrat (TS) ne contient pas de sol. Cette quantité de l'échantillon peut varier selon la nature du sol et les matériels utilisés.

Quinze millilitre de solution tampon phosphate (pH=7, 6) ont été versés dans chaque tube et la réaction d'hydrolyse a été démarrée par l'ajout de 200 $\mu$ l du substrat (solution de FDA) dans les trois tubes pour essai et le témoin substrat tandis que le témoin enzyme reçoit la même quantité mais de l'eau distillée stérile. Après incubation pendant 1h sous une température de 30°C et sous agitation, 0,5ml de la solution a été prélevé et mélangé avec 0,5ml d'acétone dans un eppendorf pour arrêter la réaction. Les solutions ainsi obtenues ont été centrifugées pendant 5min à 10 000 tours/min puis 1ml du surnageant a été prélevé pour la lecture de la densité optique dans un spectrophotomètre à 490nm de longueur d'onde. Avant la lecture de la densité optique des échantillons, la mise à zéro de la valeur au niveau du spectrophotomètre est effectuée avec une solution standard à 0 $\mu$ l/ml de fluorescéine. La lecture de la densité optique des échantillons se fait dans l'ordre : témoin substrat, témoin enzyme et les trois essais de l'échantillon.

**Tableau 2.** Composition de chaque échantillon pour la mesure de l'hydrolyse de la FDA

	TS	TE	E1	E2	E3
<b>Tampon</b>					
Phosphate (ml)	15	15	15	15	15
FDA ( $\mu$ l)	200	-	200	200	200
Sol(g)	-	1	1	1	1
$H_2O$ ( $\mu$ l)	-	200	-	-	-

TE : témoin enzyme ; TS : témoin substrat E1, E2, E3 : Les trois essais d'hydrolyse

### III.4.1.4 Calcul du produit d'analyse

Le produit de l'hydrolyse est constitué par la fluorescéine. La détermination de la quantité de ce produit nécessite l'étalonnage d'une solution standard de fluorescéine. Etant donnée qu'à chaque valeur de DO de cette solution standard correspond une valeur exacte de quantité de fluorescéine, l'équation de la courbe de tendance des valeurs de cette gamme étalon permet de calculer les valeurs exactes des produits d'hydrolyse dans chaque échantillon.

**Tableau 3.** Composition de la gamme étalon préparée à partir d'une solution standard de fluorescéine

	N° Tube					
	0	1	2	3	4	5
Tampon phosphate (μl)	1000	990	980	970	960	950
Acétone (μl)	1000	990	980	970	960	950
Solution standard de fluorescéine (μl)	0	10	20	30	40	50

La gamme étalon est établie à partir d'une solution standard de fluorescéine préparée préalablement à partir de fluorescéine en poudre (F7505 SIGMA) et d'acétone à une concentration de 1mg/ml. La dilution étant effectuée à l'aide de l'acétone pour les autres concentrations. Les tubes contenant les mélanges doivent être bien bouchés avant de les vortexer, puis lecture de leur densité optique au spectrophotomètre à la longueur d'onde 490 nm.

### II.4.2. Activités des phosphatases microbiennes du sol

#### III.4.2.1. Préparation de tampon Mc Ilvain (citrate phosphate Buffer)

Le tampon Mc Ilvain est un mélange de la solution A et la solution B qui contiennent respectivement 19,21g d'acide citrique dans 1000ml d'eau déminéralisée et 53,65g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou 71,7g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  dans 1000ml d'eau déminéralisée. Le pH du tampon Mc Ilvain varie suivant les quantités de la solution A et de B (voir annexe 1). Pour 50ml de tampon

Mc Ilvain à pH=7 par exemple, on additionne 6,5ml de la solution A avec 43,6ml de la solution B. Cette solution à pH=7 est communément appelée « solution stock ».

Pour les deux types d'hydrolyse du phosphate faisant intervenir deux enzymes différentes à savoir la phosphatase acide et la phosphatase alcaline, le pH du tampon joue un rôle important. La valeur de ce pH est égale à 6 pour l'hydrolyse du phosphate en milieu acide et cette valeur du pH est de 11 pour l'hydrolyse du phosphate en milieu alcalin. Ainsi et pour chaque réaction, une solution tampon contenant 200ml de solution stock et 500ml d'eau déminéralisée est préalablement préparée. Chaque solution tampon est par la suite complétée à 1 litre avec de l'eau distillée et le pH est ajusté avec du HCl pour l'hydrolyse en milieu acide et avec du NaOH pour l'hydrolyse en milieu alcalin.

### **III.4.2.2. Préparation du substrat et des réactifs**

Une solution de p-Nitrophényl Phosphate (ou p-NPP) à 5mM a été utilisée comme substrat de la réaction d'hydrolyse. Cette solution a été préparée à partir du produit en pastille de p-NPP (Réf. 104-0 Sigma Phosphatae Substrate). Ainsi et pour 10ml de cette solution p-NPP à 5mM, 100mg de ce p-NPP en pastille ont été dissous dans 10ml d'eau déminéralisée. La solution ainsi préparée est conservée à l'obscurité (flacon fumé ou tube enveloppé dans du papier aluminium) et sous congélation à -20°C. Sans congélation, la solution est utilisable seulement pendant environ 24h après sa préparation.

Outre le substrat, deux autres réactifs ont été également utilisés à savoir la solution de  $\text{CaCl}_2$  à 0,5M et la solution de NaOH à 0,5M. Ces deux solutions sont préparées respectivement en dissolvant 73,5g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans 1l d'eau déminéralisée et 20g de soude (NaOH) dans 1l d'eau déminéralisée. Les deux solutions sont conservables à la température ambiante du laboratoire.

### III.4.2.3 Dosage du produit d'hydrolyse

Deux témoins à savoir le témoin substrat (TS) et témoin enzyme (TE) ainsi que trois essais (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>), ont été préparés selon le tableau ci-après (Tableau II.4). Les solutions dans chaque tube ont été bien mélangées en agitant doucement à l'aide du vortex et puis incubées pendant une heure dans une étuve réglée à 37°C toujours sous agitation. En sortant les tubes de l'étuve, la réaction d'hydrolyse a été arrêtée en ajoutant dans un premier temps 100µl de la solution CaCl<sub>2</sub> dans chaque tube suivi d'une agitation pour complexer la réaction et puis 400µl de NaOH.

**Tableau 4.** Composition de chaque échantillon pour la mesure des activités phosphatasiques

	TS	TE	E1	E2	E3
<b>Tampon</b>					
Phosphate (µl)	400	400	400	400	400
p-NPP (µl)	100	-	100	100	100
Sol (mg)	-	100	100	100	100
H <sub>2</sub> O (µl)	-	100	-	-	-

La lecture de la densité optique se fait à la longueur d'onde 400nm en prenant comme référence un témoin blanc H<sub>2</sub>O. La lecture a été toujours effectuée en commençant par les témoins puis par les essais.

## III.5. Dénombrement des microorganismes du sol

### III.5.1. Préparation et dilution du sol

Pour chaque traitement, le sol intimement lié au système racinaire a été récolté pour des analyses microbiologiques. Le sol a été par la suite tamisé à 2mm. Le dénombrement des

microorganismes a été effectué par la méthode classique de dilution en cascade et étalement sur milieu de culture solide approprié. Une solution stérile (120°C, 20min) de sulfate de magnésium ( $MgSO_4$  0,1M) a été utilisée pour la dilution en cascade. Ainsi, la solution mère est composée de 5g de sol et 45ml de la solution de sulfate de magnésium soit une dilution de un dixième. Sous hotte à flux laminaire, une série de dilution est par la suite préparée à partir de cette solution mère.

### **III.5.2. Ensemencement et étalement de la suspension du sol**

Une quantité précise (100 $\mu$ l) de solution diluée est ensemencée et étalée dans des boîtes de Pétri contenant préalablement d'un milieu de culture solide approprié aux différents micro-organismes à énumérer. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dilution.

#### **III.5.2.1. Dénombrement des *Pseudomonas* du groupe des fluorescents**

Cent microlitre de chaque dilution (de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé King B (King et al, 1954) préalablement stérilisé (120°C, 20 min). Le milieu King B est un milieu riche en Phosphate favorisant ainsi la production de sidérophore comme acide organique. La composition du milieu se trouve dans l'annexe 2. Les boîtes ensemencées sont incubées à l'obscurité dans une étuve à 30°C pendant 48 heures. Au bout de 48 h, les bactéries produisant le sidérophore de couleur jaune bleu fluorescent sont visibles sous lumière ultra violette de longueur d'onde 254 nm.

Les bactéries fluorescentes ont été récupérées à l'aide des cure-dents stériles (120°C, 20 min) et repiquées sur un milieu de culture neuf de King B. Les souches isolées et purifiées sont conservées à - 80°C dans du milieu de culture liquide de King B auquel du glycérol a été additionné à raison de 20%.

### **III.5.2.2. Flore totale cultivable du sol**

La flore totale cultivable du sol regroupe les microorganismes susceptibles de se développer sur un milieu de culture contenant dans la plupart des cas des éléments nutritifs essentiels. Dans notre cas, le dénombrement de ces microorganismes a été effectué sur milieu TSA (Tryptic soy Agar) avec lequel 2% d'agar a été ajouté. Cent microgramme de la solution diluée du sol ont été également étalés sur des boites de pétri contenant préalablement du milieu TSA stérile. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dilution. Les boites ensemencées ont été incubées à l'obscurité dans une étuve à 30°C. La lecture a été faite après 24h, 48h et 72h d'incubation et toutes les colonies formées ont été dénombrées.

### **III.5.2.3. Flore solubilisant le phosphate**

La flore capable de solubiliser le phosphate a été dénombrée sur le milieu TCP contenant comme seule source de phosphate : le Phosphate de Calcium Tricalcique (TCP). Cent microlitre de la solution diluée du sol ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu TCP préalablement stérilisé. Pour 1l du milieu TCP, la préparation est la suivante : dans un erlen contenant 800 ml d'eau distillée placé constamment sous agitation sont introduits 5g de NH<sub>4</sub>Cl, 1g de NaCl et 1g de MgSO<sub>4</sub>. Le pH est ajusté à 7,2 en utilisant du KOH (0,1M). Puis on y ajoute sous agitation 10g de glucose, 20g d'agar, 4g de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Le volume est ajusté à 1000 ml avec de l'eau distillée et la solution est enfin autoclavée pendant 20 minutes à 120°C.

La capacité des bactéries à solubiliser le phosphate est visualisée par l'apparition de halos translucide autour des souches après deux jours de culture alors que le reste du milieu reste opaque.

### III.5.2.4. Actinomycètes

Ce sont des micro-organismes saprophytes à parois Gram (+). La plupart des actinomycètes produisent des antibiotiques (Domergue et *al*, 1970 ; Morel, 1996) et se développent lentement sur milieu gélosé. Dans notre cas, le milieu de culture utilisé pour le dénombrement des Actinomycètes a été le milieu Waksman (Waksman, 1961). La composition de ce milieu Waksman est donnée en annexe 2. Cent microlitre de la solution diluée du sol ont été étalées sur des boites de pétri contenant préalablement le milieu Waksman stérilisé. Les cultures ont été incubées dans une étuve à 30°C. La lecture a été effectuée après 7 jours d'incubation.

### III.6. Analyse statistique des données

Les données obtenues ont été traitées par analyse de variance (ANOVA). L'objectif de cette méthode d'analyse est de rechercher le traitement qui a un effet significatif à un risque ou à un seuil de probabilité donné. Au cas où des différences significatives auraient été observées, le test de Newman-Keuls a été utilisé pour distinguer les groupes de moyenne statistiquement homogène. Dans notre cas, le logiciel STATISTICA a été utilisé pour les analyses de variance. La méthode classique d'Analyse en Composante Principale (ACP) permet de projeter sur des axes les traitements d'inoculations selon les valeurs des variables étudiées. Dans notre cas, l'ACP a été réalisée avec le logiciel SPAD (Species Prediction and Diversity Estimation) créé par l'université de Taiwan.

## B] IMPACTS D'*A. mangium* SUR LE DEVELOPPEMENT D'*I. bijuga* via LA COMMUNAUTE DE CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS

### I. Structuration de la communauté de champignons ectomycorhiziens par *A. mangium*

#### I.1. Sol de culture

Le sol de culture utilisé pour tous les traitements provient de la station forestière de Tampolo située dans la côte Est de Madagascar. Le sol a été prélevé à la périphérie de la forêt où la dégradation de la formation forestière est assez avancée. Dans cette partie de la station forestière, les arbres sont remplacés en grande partie soit par des arbustes ou des strates herbacées de différente composition soit par des plantations d'essences exotiques telles que les *Eucalyptus*, *Pinus* ou *Acacias*.

Avant utilisation, le sol a été broyé et tamisé avec un tamis de 2mm de mailles. Ce substrat est par la suite mélangé avec du sable préalablement stérilisé à raison de 50%. Le mélange a été directement partagé dans des pots en plastique de 1l sans stérilisation.

#### I.2. Culture d'*A. mangium*

Cent pots plastiques de 1l remplis par le sol sableux décrit ci dessus ont été utilisés. Ces pots ont été partagés en deux lots de 50 pots chacun. Le premier lot a reçu des graines pré-germées d'*Acacia mangium* tandis que le deuxième, laissé sans plante, servira de témoin. Les cultures ont été placées en randomisation complète et entretenues sous la serre du LME/CNRE dans les conditions suivantes : lumière naturelle d'environ 12 heures par jour, température du jour environ 28°C et température de la nuit environ 18°C. Les cultures ont été arrosées avec de l'eau du robinet deux fois par semaine sans les fertiliser

#### 1.3. Développement d'*A. mangium* et impacts sur la microflore du sol

##### 1.3.1. Développement de la plante

La hauteur des plantules d'*A. mangium* a été mesurée mensuellement. Après 3 mois de culture, dix plants ont été choisis au hasard pour la mesure de la biomasse aérienne et racinaire. Les parties aérienne et racinaire ont été récoltées, emballées séparément dans du papier

aluminium puis séchées à l'étude 100°C pendant 24 h. Le poids sec de chaque partie est par la suite mesuré à l'aide d'une balance de précision.

### **1.3.2. Communauté ectomycorhizienne associée à *A. mangium***

Avant l'évaluation de la biomasse racinaire, le pourcentage de la colonisation de champignons ectomycorhiziens au niveau du système racinaire de chaque plante a été évalué. Pour cela, le nombre de racines courtes ectomycorhizées et non mycorhizées a été dénombré sous loupe binoculaire (grossissement X 40). Au moins, 100 bouts de racines choisis au hasard ont été examinées pour chaque plante. Le taux d'ectomycorhization est exprimé par le nombre de racine mycorhisée X nombre total de racine examinée/100. A partir des critères morphologiques tels que la couleur du manteau, la présence ou non des hyphes extra matriciels et la présence ou non de cordon, les morphotypes d'ectomycorhizes ont été groupés. Ces critères permettront de décrire la structure de la communauté de champignons ectomycorhiziens au niveau du système racinaire.

### **I.3.3. Mesure de l'activité microbienne du sol**

L'activité de trois enzymes du sol, la phosphatase acide et alcaline et l'enzyme hydrolysant la fluorescéine di-acétate, a été mesurée dans le sol de chaque traitement selon les méthodes déjà décrites auparavant (Paragraphe III.4). Les produits de l'hydrolyse à savoir la fluorescéine et le phosphate ont été évalués par spectrophotométrie respectivement sous longueur d'onde 490nm et 400 nm.

### **I.3.4. Dénombrement des microorganismes du sol**

La flore totale cultivable du sol ainsi que la population d'actinomycètes et des *Pseudomonas* du groupe des fluorescents ont été dénombrés dans le sol des deux traitements. La population de ces trois groupes de microorganismes a été évaluée respectivement sur milieu TSA (Tryptic Soy Agar), milieu Waksman et milieu King B selon la technique de suspension – dilution et d'étalement sur milieu solide de l'échantillon décrite auparavant (paragraphe III.5). La flore totale cultivable a été dénombrée après 24, 48 et 72 h de culture. La population de

*Pseudomonas* fluorescent a été évaluée sous lumière ultraviolette 254nm après 48h de culture tandis que les actinomycètes ont été dénombrés 7 jours après ensemencement. L'approche adoptée pour la mise en évidence de ces trois groupes de microorganismes du sol est déjà décrite auparavant (paragraphe III.5).

## **II. Développement d'*Intsia bijuga* sur sol anciennement colonisé ou non par *A. mangium***

### **II.1. Mise en culture d'*I. bijuga***

#### **II.1.1 Germination des graines**

La levée de dormance des graines d'*I. bijuga* a été effectuée manuellement. Les graines ont été grattées au niveau du tégument à l'aide d'une lime. Puis elles ont été lavées avec de l'eau de robinet pour enlever les débris et rincées à l'eau distillée stérile. Les graines rincées ont été incubées dans de l'eau distillée stérile pendant 24h sous la température ambiante du laboratoire. Les graines ont été par la suite transférées dans du sable stérile (140°C pendant 40mn) et incubées à l'obscurité jusqu'à ce que les germes atteignent 3 à 4cm de longueur.

#### **II.1.2 Sol de culture et mise en culture des graines**

Les deux lots de sol utilisés auparavant lors des expérimentations sur *A. mangium* ont été utilisés. Le sol anciennement colonisé par *A. mangium* sert à évaluer les impacts de la communauté de champignons ectomycorhiziens associés à cet arbre exotique sur le développement d'*I. bijuga*. Le deuxième lot de sol où *A. mangium* n'a pas été planté servira de témoin.

Une graine pré-germée d'*I. bijuga* a été plantée dans chaque pot plastique de 1L. Vingt cinq répétitions ont été effectuées par traitement. Les pots ont été placés en randomisation totale et entretenus sous la serre du LME/CNRE avec environ 12h de lumière naturelle par jour, à 28°C de température moyenne du jour et 18°C de température moyenne de la nuit. Les plants ont été arrosés deux fois par semaine avec de l'eau du robinet sans les fertiliser.

### **II.2. Développement d' *I. bijuga* et activités microbiennes du sol**

### **II.2.1. Développement de la plante**

Le développement d'*I. bijuga* a été évalué par la mesure régulière de la hauteur des plantes et la détermination de la biomasse aérienne et racinaire à la fin de l'expérimentation. La longueur de la tige, du collet jusqu'au bourgeon terminal a été mesurée une fois par mois et à un intervalle de temps régulier. Après trois mois de culture, la biomasse aérienne et racinaire de chaque plante a été évaluée. La partie aérienne des plantes a été récoltée, emballée dans du papier aluminium et mise à sécher à l'étuve à une température de 100°C pendant 24h. Le système racinaire, soigneusement prélevé, a d'abord fait l'objet de l'évaluation du taux de mycorhization. Ce système racinaire a été par la suite mis à sécher selon la technique citée ci-dessus. Le poids de chaque partie (aérienne et racinaire) est évalué à l'aide d'une balance de précision.

### **II.2.2. Taux d'ectomycorhization d'*I. bijuga***

Le taux d'ectomycorhization de chaque plante est évalué sur au moins 100 bouts de racine choisie au hasard. Le nombre de racine courte mycorhisée et des bouts de racines non mycorhizées a été déterminé sous loupe binoculaire sous grossissement X40. Le pourcentage d'ectomycorhization est par la suite donné par la formule : nombre de racines mycorhizées X nombre totale de racines examinées /100. En adoptant des critères morphologiques tels que la couleur du manteau, la présence ou non des hyphes extra matriciels et la présence ou non de cordon, les morphotypes d'ectomycorhizes ont été groupés. Ces critères permettront de décrire la structure de la communauté de champignons ectomycorhiziens au niveau du système racinaire.

### **II.2.3. Activité microbienne du sol**

Au niveau du sol de chaque traitement, l'activité microbienne totale du sol mesurée par sa capacité à hydrolyser le FDA et l'activité de la phosphatase acide et alcaline ont été évaluées selon la technique décrite auparavant (Paragraphe III.4.). Les résultats ont été exprimés par la quantité de produit d'hydrolyse par gramme de sol et par unité de temps.

#### **II.2.4. Population microbienne du sol**

La flore totale cultivable du sol ainsi que la population d'actinomycètes et de *Pseudomonas* du groupe des fluorescents a été évaluée dans le sol de chaque traitement. L'approche adoptée est décrite au paragraphe précédent (paragraphe III.5). La flore totale cultivable du sol a été dénombrée sur milieu TSA après 24, 48 et 72 h de culture et incubation à 30°C. Le milieu Waksman a été utilisé pour évaluer la population d'actinomycètes et le milieu King B pour les *Pseudomonas* du groupe des fluorescents.

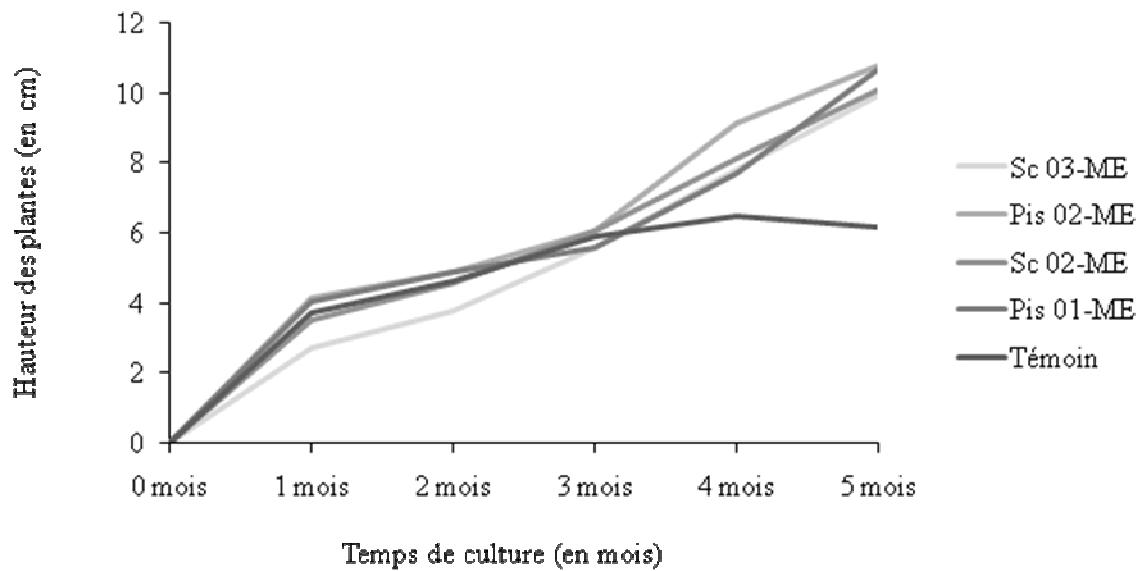
## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. Mycorhization d'*Acacia mangium*.

### I.1 Influence des souches fongiques sur le développement de la plante en condition contrôlée.

Des différences significatives ont été observées entre le développement des plantes inoculées et non inoculées (témoin) d'une part et entre les plantes inoculées par différentes souches d'autre part (Tableau 5 et Figure 3).

Jusqu'au deuxième mois de culture, aucune différence n'a été observée au niveau de la hauteur des plantes inoculées et non inoculées. A partir du deuxième mois, une croissance en hauteur des plants d'*A.mangium* inoculés par les différentes souches de champignons ectomycorhiziens a été remarquée par rapport aux 4plants témoins. La figure ci-après (Figure 3) montre la capacité de chaque souche à stimuler la hauteur de la plante hôte durant les cinq premiers mois de son développement. Après cinq mois de culture, les plants inoculés ont des hauteurs plus de deux fois plus importantes que celles des plants témoins. Ainsi, l'inoculation avec les souches de *Pisolithus* (Pis 02-ME et Pis 01-ME) a permis d'obtenir la hauteur la plus élevée des plantes. Les deux souches de Scleroderme (Sc 02-ME et SC 03-ME) quant à elles ont également amélioré la hauteur des plantes. Pourtant, la hauteur des plants inoculés par ces deux dernières souches bien que plus élevée par rapport aux plants témoins, reste inférieure à celles des plantes inoculées par les souches de *Pisolithus*. D'une manière générale, la croissance en hauteur des plants inoculés reprend une vitesse élevée au moment où celle des plants témoins commence à ralentir. Ces deux phénomènes se produisent à partir du deuxième mois de culture.



**Figure 3.** Croissance en hauteur d'*A. mangium* sous l'influence des souches fongiques en condition contrôlée



**Photo 4.** Plantules d'*A.mangium* après 5 mois d'inoculation sous serre (Source auteur)

Au bout du cinquième mois de culture, la biomasse des plants inoculés présente des différences hautement significatives par rapport à celle des plants témoins. Ainsi, ces différences ont été beaucoup plus remarquées au niveau de la biomasse racinaire où les plants inoculés ont

des biomasses d'environ dix fois plus importantes que celles des plants témoins. Cependant aucune différence significative n'a été enregistrée entre les poids secs des racines des plantes inoculées par les quatre souches ectomycorhiziennes utilisées. Quant à la biomasse aérienne, outre la différence entre le témoin et les traitements inoculés, l'influence de chaque souche ectomycorhizienne au niveau du développement de la partie aérienne de la plante a montré également des différences significatives. Ainsi, la souche de *Pisolithus* Pis 02-ME a permis d'obtenir le développement le plus élevé de la partie aérienne des plantes (Tableau 5).

**Tableau 5.** Effet de l'inoculation sur le développement d'*A. mangium* et dépendance mycorhizienne de la plante vis-à-vis de chaque souche après 5 mois de culture en condition contrôlée

	Traitements				
	Témoin	Pis02-ME	Pis01-ME	Sc02-ME	Sc03-ME
Biomasse aérienne (mg poids sec)	61.88 a	459.540 c	379.5 bc	293.78 b	387.2 bc
Biomasse racinaire (mg poids sec)	13.96 a	90.66 b	102.78 b	135.02 b	160.5 b
Taux d'ectomycorhization (%)	-	50 a	55 a	45.59 a	50.79 a
Dépendance ectomycorhizienne (%)	-	86,71 a	84,66 a	81,19 a	86,33 a

Pour chaque paramètre mesuré, les données dans la même ligne suivies par les mêmes lettres (a ou b) n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls ( $P < 0.05$ ).

Les observations effectuées au niveau du système racinaire des plantes ont permis d'évaluer le taux de colonisation des racines par les souches de champignons ectomycorhiziens. Le taux d'ectomycorhization a été élevé (environ 50%) pour toutes les quatre souches utilisées (Tableau 5). Aucune différence significative n'a été décelée entre le taux d'ectomycorhization obtenu avec les quatre souches. Par contre, *A. mangium* a montré une dépendance ectomycorhizienne élevée vis-à-vis de toutes les quatre souches utilisées. Cette dépendance qui

exprime l'importance de la souche sur le développement de la plante, atteint plus de 80% pour toutes les souches (Tableau 5).

### **1.2. Influence des souches fongiques sur le développement de la plante en condition du milieu naturel.**

Le résultat de l'influence des souches fongiques sur le développement d'*A.mangium* en condition du milieu naturel est récapitulé dans le tableau 6 ci-après. Les résultats confirment la capacité des quatre souches ectomycorhiziennes à améliorer le développement d'*A. mangium* déjà observée en condition contrôlée. Pourtant, une nette amélioration du développement de la plante a été observée avec la souche Sc03-ME sous cette deuxième condition utilisant des sols non stérilisés. Ce qui permet de penser à la grande capacité d'adaptation de cette souche aux conditions abiotiques et biotiques définies par le sol.

**Tableau 6.** Influence de l'inoculation sur le développement d'*A. mangium* en condition du milieu naturel

	Traitements				
	Témoin	Pis02-ME	Pis01-ME	Sc02-ME	Sc03-ME
Biomasse aérienne (mg poids sec)	62.92 a	461.36 c	380.23 bc	298.68 b	429.34 c
Biomasse racinaire (mg poids sec)	11.06 a	84.33 b	99.18 b	128.27 b	182.25 c
Hauteur (cm)	8.2a	12.84b	12.01b	17.36b	10.5b
Taux d'ectomycorhization (%)	-	52.70 a	58.43 a	49.13 a	57.28 a

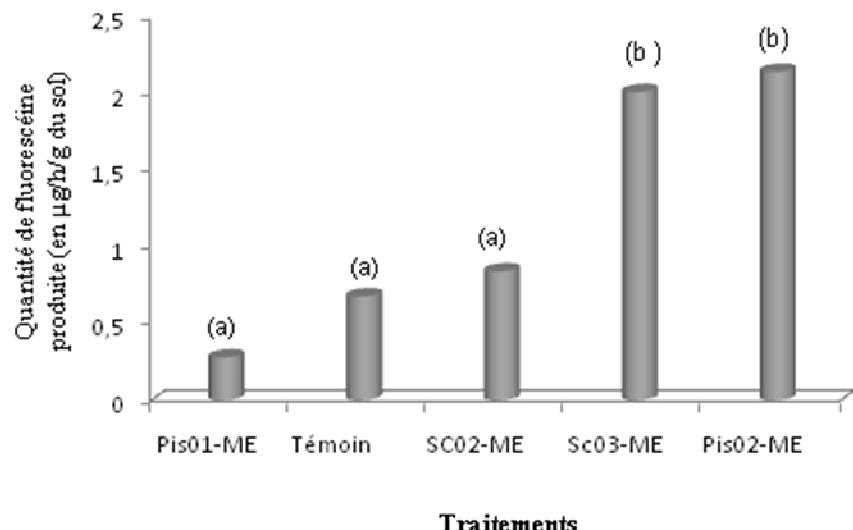
Pour chaque paramètre mesuré, les données dans la même ligne suivies par les mêmes lettres (a ou b) n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls ( $P < 0.05$ ).

### **I.3. Influence de l'inoculation sur la communauté microbienne du sol**

#### **I.3.1. Activité microbienne totale mesurée par l'hydrolyse de la FDA**

Après 4 mois d'inoculation d'*A. mangium* par les quatre souches ectomycorhiziennes (Pis 01-ME, Sc02-ME, Sc03-ME, Pis02-ME), la quantité de fluorescéine produite par

l'hydrolyse de la FDA effectuée par chaque échantillon de sol est donnée par la figure ci après (Figure 4). L'inoculation par la souche Sc03-ME ou Pis02-ME a permis d'obtenir des quantités de produit d'hydrolyse (Fluorescéine) trois fois plus élevées que celles des traitements témoins. Avec les deux autres souches, aucune différence significative n'a été observée quant à la quantité de fluorescéine produite par rapport à celle obtenue avec les témoins. Étant donné que dans cette réaction d'hydrolyse, la quantité du produit d'hydrolyse exprime l'activité microbienne totale au niveau du sol, les souches Sc03-ME et Pis02-ME ont donc nettement stimulé l'activité totale des microorganismes après leur introduction dans le sol. Toutefois, ces données ne renseignent pas sur les groupes ou les types de microorganismes stimulés.

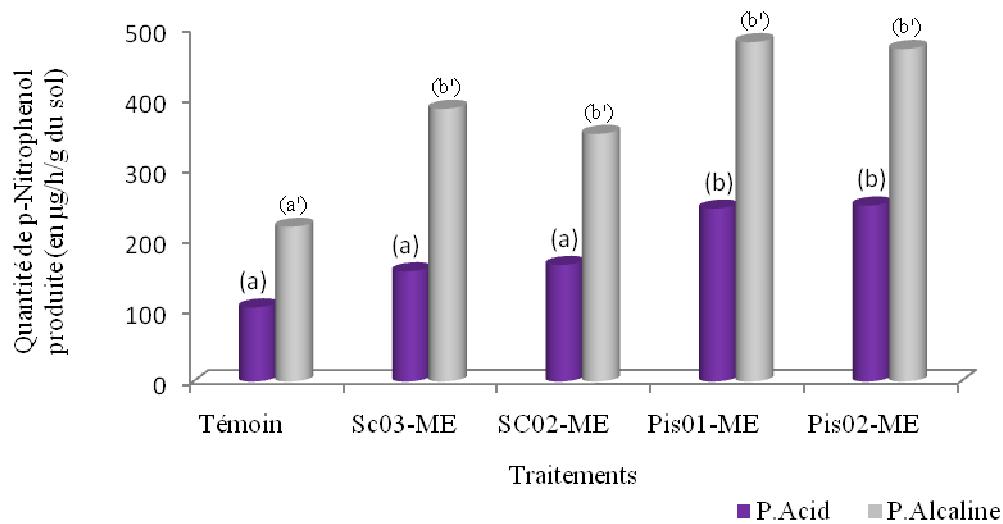


**Figure 4.** Quantité de Fluorescéine produite pour chaque traitement  
(Les traitements suivis d'une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls)

### I.3.2. Activités des enzymes phosphatasiques du sol

Les activités des deux enzymes (phosphatase alcaline et phosphatase acide) ont été toutes bien décelées dans tous les traitements *d'Acacia mangium* en culture. Pour toutes les souches de champignons ectomycorhiziens utilisées, la quantité du produit de l'hydrolyse obtenu (p-Nitrophenol) a été élevée par rapport à celle observée chez les traitements témoins et cette

quantité a été plus élevée chez l'hydrolyse en milieu alcalin que celle en milieu acide. Ainsi et par rapport au témoin, la quantité de p-Nitrophenol produite est significativement élevée chez tous les traitements inoculés en milieu alcalin alors que cette quantité n'a été significativement élevée que chez les traitements inoculés par les deux souches de *Pisolithus* (Pis 01-ME ou Pis02-ME) en milieu acide.



**Figure 5.** Quantité des produits de l'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcalin (Les traitements suivis d'une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls)

### I.3.3. Flore totale cultivable du sol

La flore totale cultivable représente tous les microorganismes (champignons et bactéries) capables de pousser sur le milieu TSA durant les trois premiers jours qui suivent l'ensemencement (Figure 6). Les résultats ont montré que l'inoculation avec la souche Pis01-ME a généré une population microbienne cultivable significativement importante par rapport aux restes des traitements. Le nombre des colonies formées par cette population a été même significativement faible par rapport à celui observé chez les témoins pour les traitements inoculés par les deux souches de *Pisolithus*. Pour la souche de *Pisolithus* Pis02-ME, l'inoculation n'a pas d'effet significatif sur le nombre de la flore totale cultivable du sol par rapport au témoin.

#### **I.3.4. Flore totale solubilisant le phosphate**

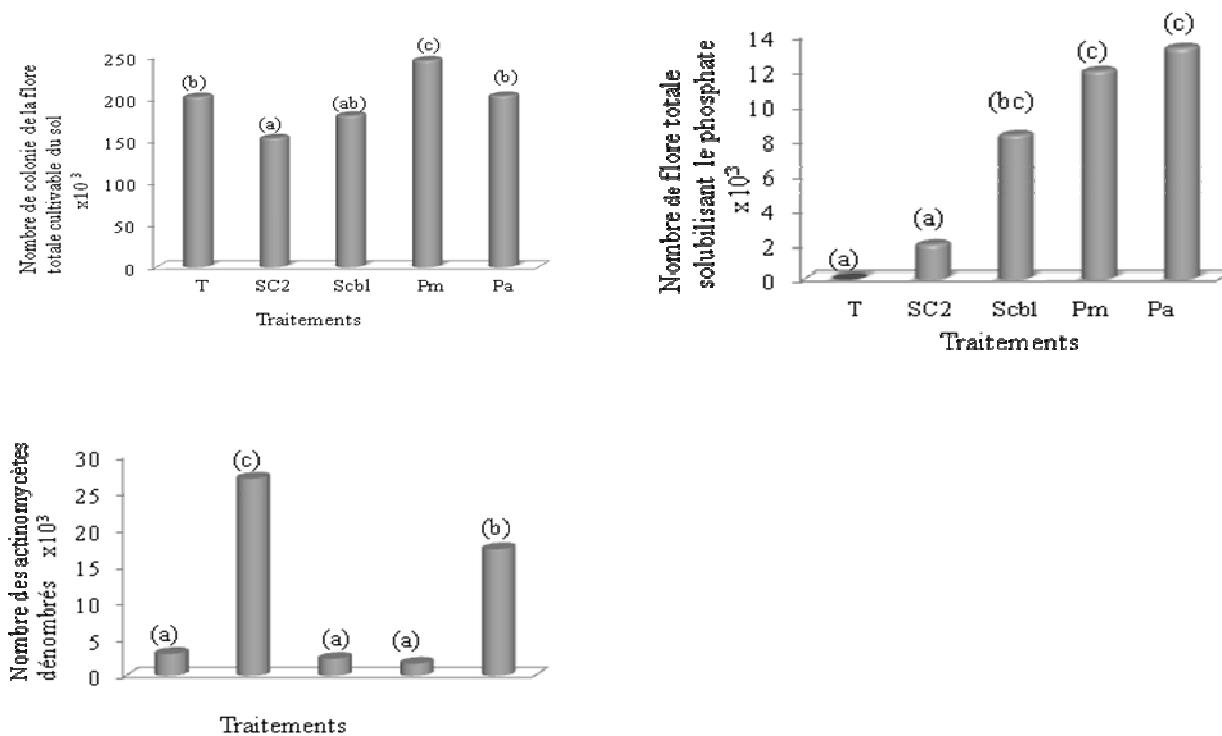
La flore totale solubilisant le phosphate se différencie des autres flores par leurs aptitudes à former un halo translucide autour des colonies dans le milieu de culture approprié. Cette flore est absente dans le traitement témoin de cette expérience et est présente dans les traitements inoculés avec les souches fongiques au niveau desquelles, la différence entre le nombre de microorganismes solubilisant le phosphate est significatif. Le nombre de ces microorganismes est plus faible dans le traitement avec la souche Sc02-ME et augmente avec les souches Pis01-ME et Pis02-ME (Figure 6).

#### **I.3.5. Les *Pseudomonas* du groupe des fluorescents**

Les *Pseudomonas* de groupe fluorescent ont été rarement présents dans tous les traitements inoculés ou témoins. Seuls les traitements avec les souches Sc02-ME et Pis02-ME ont vu la présence de ces microorganismes en nombre très faible.

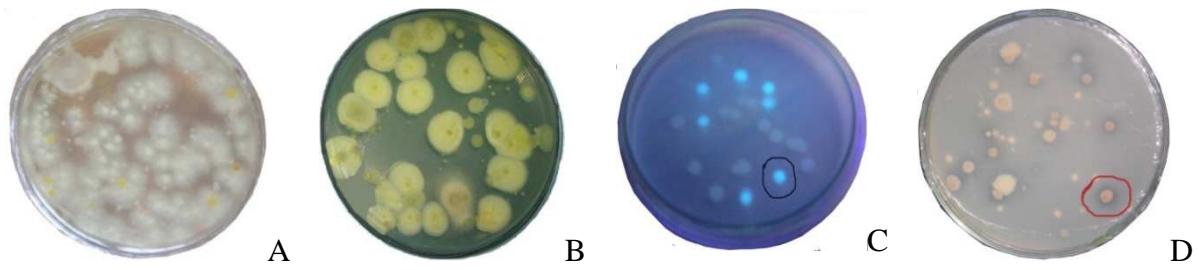
#### **I.3.6. Les Actinomycètes**

Les résultats ont montré que le nombre des actinomycètes présents dans les traitements avec les souches Sc03-ME, Pis01-ME et les témoins ne présente pas de différence statistiquement significative. Tandis que chez les traitements avec les souches Pis02-ME et Sc02-ME, le nombre des actinomycètes est significativement supérieur à celui des autres traitements (Figure 6).



**Figure 6.** Numération de quelques groupes de la flore tellurique dans les traitements inoculés et les témoins

(Les traitements suivis d'une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls)



A : Flore totale sur milieu TSA  
B : Actinomycète sur milieu Waksman  
C : Pseudomonas fluorescent sur milieu King B  
D : Flore totale solubilisant le phosphore sur milieu TCP

**Figure 7.** Aspects morphologiques des souches microbiennes observées sur leur milieu de culture respectif

## II. Influence des communautés microbiennes générées par l'établissement d'*Acacia mangium* sur le développement d'*Intsia bijuga*

### II.1. Développement préalable d'*Acacia mangium*

#### II.1.1. Développement d'*A. mangium*

Le développement et le taux d'ectomycorhization d'*A. mangium*, après trois mois de développement sur le sol prélevé dans la station forestière de Tampolo, est donné par le tableau suivant (Tableau 7).

**Tableau 7.** Développement d'*A. mangium* cultivé sur le sol prélevé dans son site de reboisement

Temps de culture	3 mois
<b>Biomasse aérienne (mg)</b>	36,44
<b>Biomasse racinaire (mg)</b>	7,18
<b>Taux de ECM (%)</b>	47,2

Les observations effectuées au niveau du système racinaire des plantes ont permis d'identifier quatre morphotypes d'ectomycorhizes à savoir le morphotype marron (MT - M), le morphotype beige foncé (MT - B), le morphotype marron foncé (MT - MF) et le morphotype blanc (MT - Bl). Les caractéristiques morphologiques et anatomiques de ces morphotypes sont données dans le tableau ci après (Tableau 8).

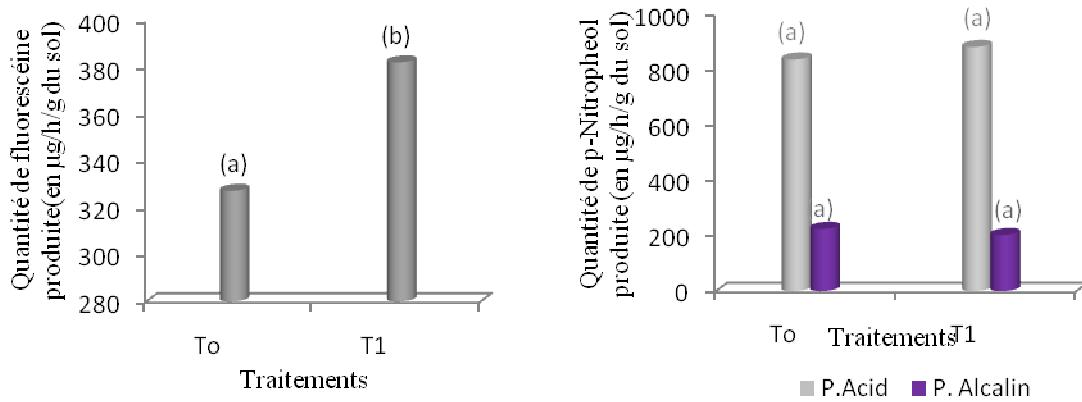
**Tableau 8.** Caractéristiques morphologiques des morphotypes d'ectomycorhizes observés sur le système racinaire d'*A. mangium*.

Morphotype	MT - M	MT - B	MT - MF	MT - Bl
Couleur du manteau	Marron	Beige foncé	Marron foncé	Blanc
Texture du manteau	Lisse	Lisse	Poilue	Lisse
Ramification	Absence	Absence	Absence	Absence
Cordon	Présence	Absence	Présence	Présence
Hyphe extramatricielle	Abondante, en forme de coton et de marron	Réduite, en forme de coton et de couleur beige0.	Réduite, en forme de coton et de couleur marron	Abondante, sous forme de feutrage et de couleur blanche

### II.1.2. Modification au niveau de la communauté microbienne du sol

#### II.1.2.1. Activité microbienne totale du sol et activité enzymatique

L'implantation d'*A. mangium* sur le sol de la forêt de Tampolo a fortement modifié l'activité microbienne totale du sol mesurée par l'hydrolyse de la FDA. Ainsi, cette implantation a significativement augmenté l'activité microbienne totale du sol. Tandis que la présence d'*A.mangium* n'a pas d'influence significative sur l'activité phosphatasique du sol. Il a été seulement remarqué que la quantité de p- Nitrophenol produite en milieu acide est plus élevée que celle produite en milieu alcalin.

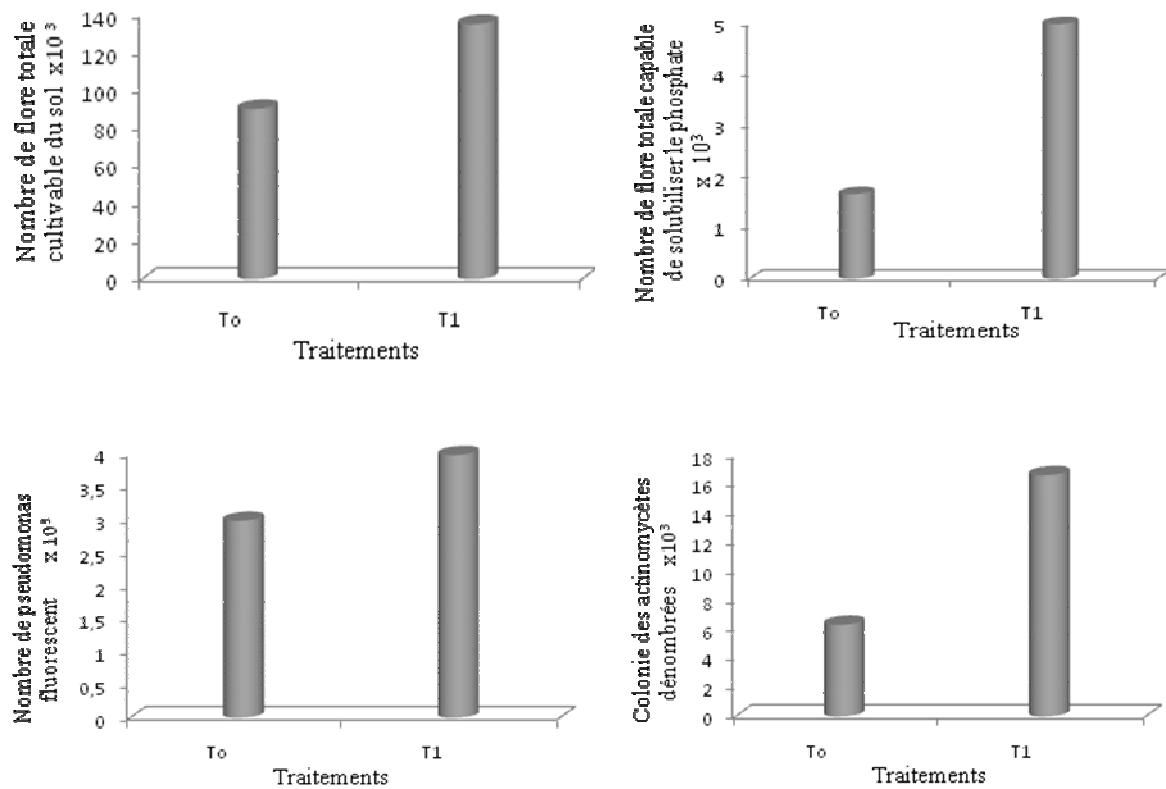


**Figure n°8.** Activité microbienne totale et activité enzymatique du sol de la forêt de Tampolo sous l'influence d'*A.mangium* avec T0 : sol sans plante (témoin) et T1 : sol sous *Acacia mangium*

(Les traitements suivis d'une même lettre (a ou b) constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls).

### II.1.3.2. Dénombrement des microorganismes du sol

Au bout de trois mois de culture d'*A.mangium*, le dénombrement des microorganismes (flore totale cultivable du sol, flore totale solubilisant le phosphate, actinomycètes et pseudomonas du groupe des fluorescents) a montré que l'implantation de cet arbre a également fortement modifié la population de ces microorganismes. Ainsi, comparé à ceux observés chez les traitements témoins, le développement en nombre de ces microorganismes est plus de trois fois pour les actinomycètes et plus de deux fois pour la flore totale solubilisant le phosphate. Le nombre des colonies a été également supérieur à ceux des témoins pour les autres microorganismes. Toutefois, cette augmentation n'a pas été statistiquement significative.



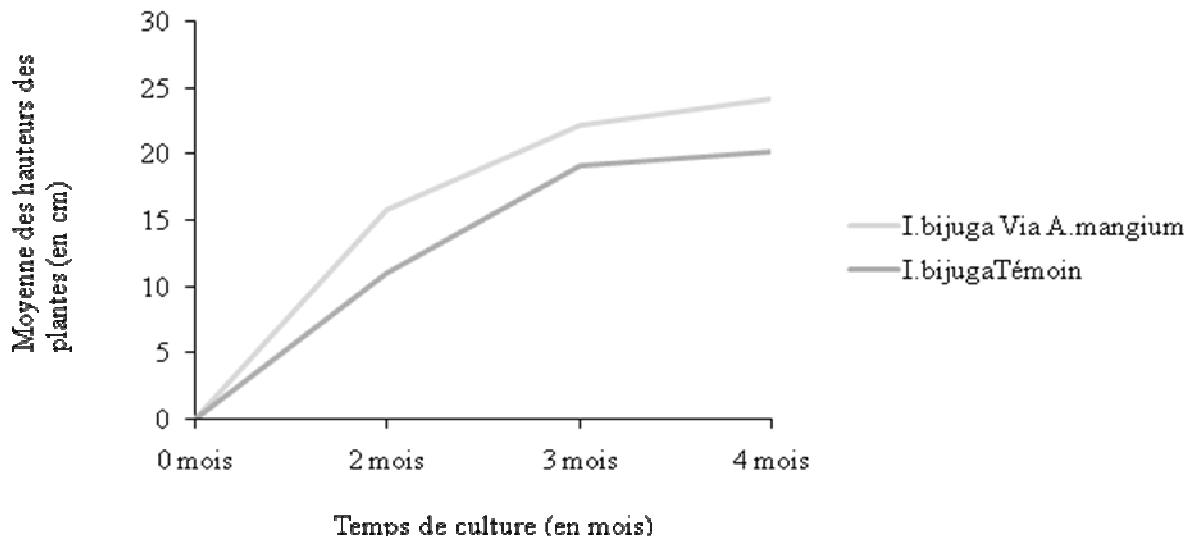
**Figure 9.** Nombre des microorganismes du sol des différents traitements dans 5g du sol

## II.2. Impacts de la pré-colonisation du sol

### II.2.1. Impacts sur le développement d'*I. bijuga*

L'évaluation du développement d'*I. bijuga* a été effectuée en mesurant la hauteur de chaque plante, la biomasse racinaire et aérienne. La croissance en hauteur d'*I. bijuga*, suivie dès le 2<sup>ème</sup> jusqu'au 4<sup>ème</sup> mois de culture, a montré que cet arbre se développe mieux sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium* que sur le sol témoin. La différence entre les deux traitements a été observée dès la première mesure (Figure 10).

Les biomasses (aériennes et racinaires) d'*I. bijuga* cultivé sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium* ont été significativement élevées comparées à celles des témoins. Cette augmentation est plus de deux fois pour les deux types de biomasse (Tableau 9).



**Figure 10.** Evolution de la hauteur d'*I. bijuga* durant les quatre premiers mois de son développement sur sol préalablement colonisé par *A. mangium* (courbe bleu) ou non (courbe rouge)

**Tableau 9.** Développement et taux d'ectomycorhization d'*I. bijuga* après quatre mois de culture sur sol préalablement colonisé ou non par *A. mangium*

	Hauteur (cm)	Biomasse aérienne (g)	Biomasse racinaire (g)	Taux d'ectomycorhization (%)
<i>I. bijuga</i> témoin	20.23 a	1.01 a	0.22 a	42.33 a
<i>I. bijuga</i> via <i>A. mangium</i>	24.20 a	2.07 b	0.69 b	75.66 b

Les traitements dans la même colonne suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène selon le test de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ )

## II.2.2. Impacts sur la communauté de champignons ectomycorhiziens associée à *Intsia bijuga*

Après l'observation des racines à la loupe binoculaire, trois morphotypes ont été observés sur le système racinaire des plantes élevées sur le sol anciennement colonisé par *A. mangium* dont le morphotype marron, morphotype beige foncé et le morphotype marron foncé. Le morphotype marron est plus abondant que le beige foncé et ce dernier est à peu près le même

nombre que le marron foncé. Les caractéristiques morphologiques et anatomiques de chaque morphotype sont présentées dans le tableau 10. Au niveau du système racinaire des plants témoins, on n'a observé que le morphotype marron et beige.

**Tableau 10.** Caractéristiques morphologiques des morphotypes d'ectomycorhizes récoltés sur les racines *d'I. bijuga*

Morphotype	MT – M <sup>(*)</sup>	MT – B <sup>(*)</sup>	MT - MF
Couleur du manteau	Marron	Beige foncé	Marron foncé
Texture du manteau	Lisse	Lisse	Poilue
Ramification	Absence	Absence	Absence
Cordon	Présence	Absence	Présence
Hyphe extramatricielle	Abondante, en forme de coton et de couleur marron	Réduite, en forme de coton et de couleur beige	Réduite, en forme de coton et de couleur marron

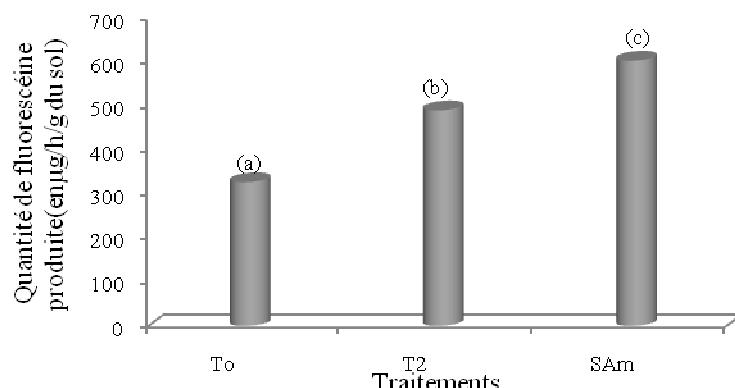
<sup>(\*)</sup>Ces deux morphotypes n'ont pas été observés sur les plantes témoins cultivées sur sol non colonisé préalablement par *A. mangium*

Aussi bien pour les plants témoin que pour les plants cultivés sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium*, le taux d'ectomycorhization a été toujours de plus de 40% (Tableau 9). Par contre, cette colonisation préalable du sol par *A. mangium* a significativement amélioré le taux d'ectomycorhization d'*Intsia bijuga*. Cette nette amélioration du taux d'ectomycorhization a engendré également une stimulation significative du développement de la plante. Ainsi, la biomasse aérienne et racinaire des plants a été plus de deux fois supérieur à celles des plants témoins (Tableau 9).

### II.2.3. Modification au niveau de la communauté microbienne du sol

#### II.2.3.1. Activité microbienne totale du sol mesurée par l'hydrolyse de la FDA

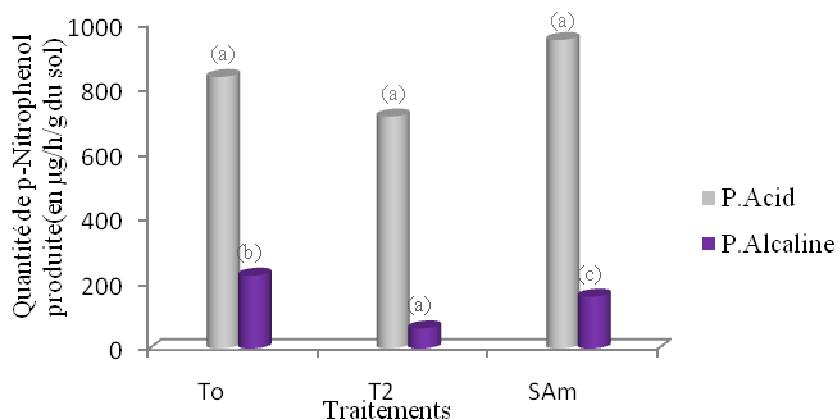
La quantité de fluorescéine produite augmente progressivement du sol témoin (To) jusqu' au sol où *I. bijuga* a été installé (Figure 11). Entre les deux traitements de sol où *I. bijuga* a été installé, une différence significative a été observée selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05. La quantité de fluorescéine produite a été significativement élevée au niveau du sol préalablement colonisé par *A. mangium*.



**Figure 11** Activité microbienne totale du sol mesurée par l'hydrolyse de la FDA dans le sol témoin (To), Sol sous *I. bijuga* sans colonisation préalable par *A. mangium* (T2) et sol sous *I. bijuga* préalablement colonisé par *A. mangium* (SAM)

#### II.2.3.2. Activités des enzymes phosphatasiques du sol

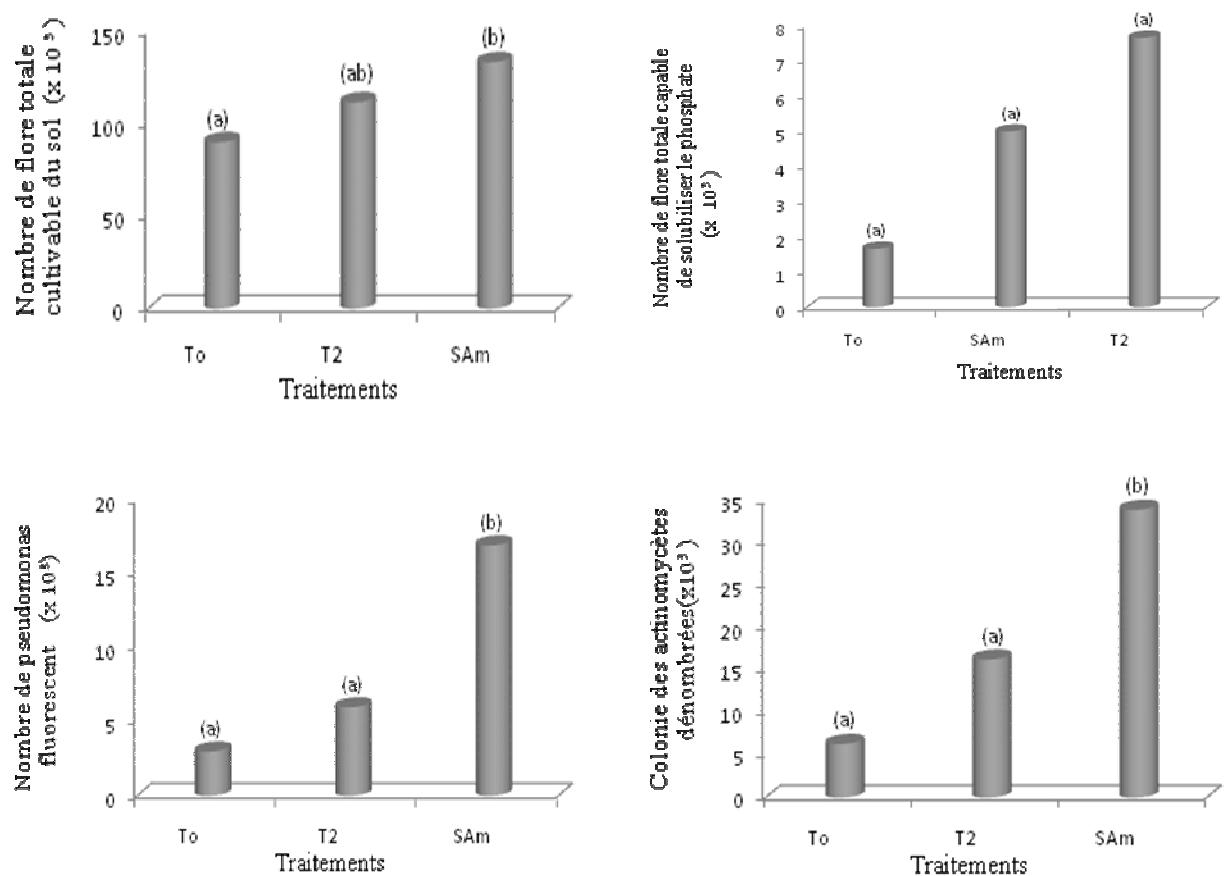
Pour les deux enzymes hydrolysant le phosphate, la production de p-Nitrophenol, produit final des réactions d'hydrolyse, ne présente pas de différence significative entre les trois traitements du sol en milieu acide. Par contre, l'activité de la phosphatase alcaline diminue significativement après colonisation du sol par *A. mangium* avant d'augmenter suite à l'installation d'*I. bijuga*.



**Figure 12.** Activités des phosphatases alcaline et acide dans le sol témoin (To), Sol sous *I. bijuga* sans colonisation préalable par *A. mangium* (T2) et sol sous *I. bijuga* préalablement colonisé par *A. mangium* (SAm)

#### II.2.3.3. Flore totale cultivable, *Pseudomonas* du groupe des fluorescent, flore totale solubilisant le phosphate et Actinomycètes du sol

Dans les trois traitements de sol (To, T2 et SAm), seule l'installation d'*I. bijuga* stimule significativement le développement de cette flore totale cultivable de sol (Figure 12). Le même résultat a été observé pour la population de *Pseudomonas* du groupe des fluorescent et d'actinomycètes. Pour la flore capable de solubiliser le phosphate, le nombre de ces microorganismes, qui augmente du sol témoin vers le sol sous *A. mangium* et sous *I. bijuga*, ne présente pas de différence significative entre les trois traitements de sol (Figure 13).



**Figure 13.** Nombre de microorganismes du sol dans les différents traitements du sol : sol témoin (T0), Sol sous *I. bijuga* sans colonisation préalable par *A. mangium* (T2) et sol sous *I. bijuga* préalablement colonisé par *A. mangium* (SAm)

#### II.2.4. Impacts sur les caractéristiques physico-chimiques du sol

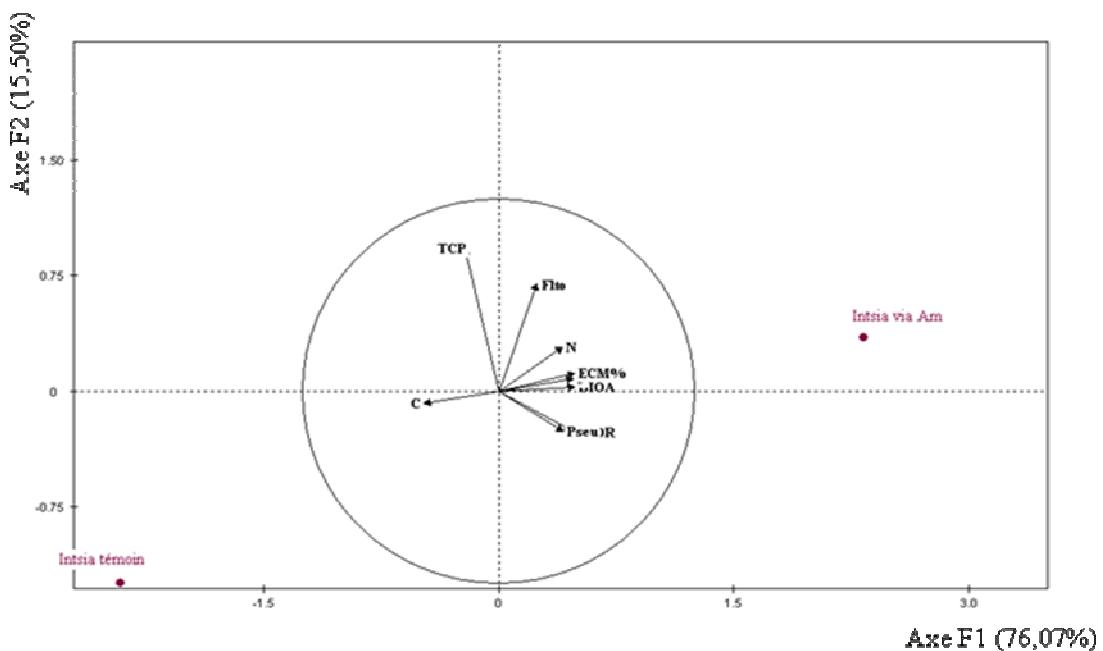
Au niveau des propriétés physico-chimiques du sol de culture, la quantité de phosphate, de Potassium et d'Azote au niveau du sol préalablement colonisé par *A. mangium* suivi de l'installation d'*I. bijuga* est nettement supérieure à celle du sol témoin. Par contre, le sol de ce traitement a vu la diminution de la quantité de carbone totale (Tableau 11). Le traitement n'a pas d'effet significatif sur le pH du sol.

**Tableau 11.** Propriétés physico-chimiques du sol des trois traitements

<b>Traitements</b>	<b>Caractéristiques physico-chimiques</b>					<b>K (mEq/100g)</b>	<b>C/N</b>
	<b>pH (Eau)</b>	<b>N (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>P -ppm)</b>			
To	6.15	0.084	1.47	19.3	0.043	17.5	
T2	5.50	0.092	1.52	21.4	0.041	16.5	
SAM	5.58	0.093	1.35	34.7	0.054	14.5	

Après analyse en composantes principales des paramètres mesurant les impacts de la colonisation préalable du sol par *A. mangium* sur le développement d'*I. bijuga* et sur les propriétés microbiologiques et physico-chimiques du sol, des corrélations positives ou négatives ont été observées entre certains paramètres. Ainsi, sur un plan factoriel à deux axes, l'analyse en composantes principales effectuée sur ces paramètres montre que tous les paramètres mesurés sauf la quantité de carbone totale au niveau du sol et la flore solubilisant le phosphate, contribuent à la constitution de l'axe F1 qui absorbe 76,07% des informations du tableau des données. Ces paramètres caractérisent donc les modifications induites par la pré-colonisation du sol par *A. mangium* sur le développement d'*I. bijuga* et sur les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol. Par contre, cette même analyse montre que la quantité de carbone totale au niveau du sol et la communauté de la flore solubilisant le phosphate constituent deux paramètres dont leur évolution n'a pas été positivement corrélée avec la pré-colonisation d'*A. mangium* (Figure 13).

Le tableau des matrices de corrélations ci après (Tableau 12) entre les différents paramètres montre également que le taux d'ectomycorhization, la biomasse racinaire, la biomasse aérienne, la population de *Pseudomonas* du groupe des fluorescents et la quantité de phosphate au niveau du sol évoluent dans le même sens. Ces paramètres étant négativement corrélés avec la quantité de carbone total au niveau du sol. Quant à la quantité d'azote au niveau du sol, elle est particulièrement corrélée avec le taux d'ectomycorhization d'*I. bijuga* sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium*.



TCP : Flore solubilisant le phosphate

Flto : Flore totale cultivable

Pseu : *Pseudomonas* fluorescent

ECM : taux d'ectomycorhization

N : Azote totale

C : Carbone total

BIOA : Biomasse aérienne

BIOR : Biomasse racinaire

**Figure 14.** Plan factoriel à deux axes selon l'Analyse en Composantes Principales

effectuées sur les impacts de la pré-colonisation du sol par *A. mangium* sur le développement d'*I. bijuga* et sur les propriétés microbiologiques et physicochimiques du sol.

**Tableau 12.** Matrices de corrélations entre les différents paramètres mesurés pour évaluer les impacts de la pré-colonisation du sol par *A. mangium*.

	ECM%	Bio.A	Bio.R	Pseu	TCP	Flo t	N	P	C
<b>ECM (%)</b>	1,00								
<b>Biomasse aérienne</b>	1,00	1,00							
<b>Biomasse racinaire</b>	0,91	0,94	1,00						
<b>Pseudomonas fluorescent</b>	0,76	0,78	0,90	1,00					
<b>Flore TCP</b>	-0,34	-0,42	-0,66	-0,62	1,00				
<b>Flore totale</b>	0,53	0,47	0,38	0,48	0,31	1,00			
<b>N totale</b>	0,90	0,88	0,69	0,44	-0,09	0,34	1,00		
<b>P totale</b>	0,98	0,98	0,88	0,80	-0,35	0,48	0,87	1,00	
<b>Ctotal</b>	-0,98	-0,98	-0,88	-0,77	0,36	-0,48	-0,86	-0,99	1,00

## DISCUSSION

L'objectif de cette étude était (i) de mettre en évidence l'influence de quatre souches de champignons ectomycorhiziens sur le développement d'une plante exotique, *A. mangium* et puis (ii) de décrire les impacts de la colonisation préalable du sol par cette plante sur le développement d'une essence ligneuse autochtone, *Intsia bijuga*.

Dans la première partie de l'étude dont les activités visent principalement à décrire les impacts de la mycorhization sur le développement d'*A. mangium*, la croissance de la plante, le taux d'infection du système racinaire par les champignons ectomycorhiziens, ainsi que la présence et l'activité globale de quelques groupes de bactéries bénéfiques à la croissance de la plante ont été évalués. Nos résultats ont montré que toutes les souches fongiques utilisées ont amélioré le développement d'*A. mangium* pendant les premiers mois de sa croissance. Cette stimulation de la croissance de la plante a été plus intense avec les souches de *Pisolithus* (Pis01-ME et Pis 02-ME) où on a enregistré des taux de mycorhization supérieur à 50%. Travaillant sur la même espèce d'*acacia* Australien, Duponnois et Bâ (1999) ont déjà identifié une souche de *Pisolithus* originaire de l'Afrique de l'Ouest capable d'améliorer le développement de la plante sur différents sols pauvres en éléments nutritifs. Par contre, l'effet positif des souches de *Pisolithus* isolées à partir de carpophores récoltés à Madagascar sur le développement d'*A. mangium* est démontré pour la première fois par nos résultats. De même, l'importance des souches de *Scleroderma* sur le développement de cette essence exotique a été rarement étudiée à Madagascar. Il a été pourtant rapporté que ces souches de *Pisolithus* récoltées dans la Grande île améliorent également le développement d'une autre espèce d'*acacia* Australien, l'*A. crassicarpa* (Ducoussou et al. 2004).

Dans des conditions voisines du milieu naturel, c'est-à-dire en utilisant des sols non stérilisés préalablement, nos résultats ont montré que l'influence de chaque souche sur le développement de la plante n'a pas changé. Cette expérience qui visait à étudier la compétitivité de chaque souche fongique vis-à-vis des microorganismes natifs du sol a permis de mesurer la

capacité d'adaptation de chaque souche aux conditions du milieu naturel ainsi que ses impacts sur le fonctionnement et la structure de la population microbienne du sol. Ainsi, il a été démontré par nos résultats que la mycorhization de la plante a modifié le fonctionnement de la communauté microbienne du sol. En travaillant sur différents compartiments du sol mycorhizosphérique, Ramanankierana et al (2006) ont déjà montré que la présence des hyphes du champignon mycorhizien stimule l'activité globale des microorganismes du sol. De plus, ces mêmes auteurs ont démontré que le champignon mycorhizien sélectionne la population microbienne au niveau de chaque compartiment. Dans notre cas, il a été clairement démontré que la mycorhization a fortement augmenté l'activité globale de la population microbienne du sol et l'activité de certaines enzymes du sol dont les phosphatases. Ces données nous permettraient de suggérer que cette activation de la population microbienne par la mycorhization a d'autres significations dont entre autres la libération du phosphore à partir des formes stables due à la stimulation de l'activité phosphatasique. Cette forte activité phosphatasique pourrait être à l'origine de l'amélioration de la nutrition minérale de la plante en mettant à sa disposition une quantité suffisante et plus accessibles de nutriments. Kucey et al (1989) ont déjà montré que le phosphore libéré sous l'action des microorganismes solubilisant le phosphate est rendu disponible pour la plante. De plus, Frank (1885) estimait que les champignons ectomycorhiziens favorisaient la nutrition phosphatée et azotée des arbres, en particulier dans les sols forestiers où la disponibilité en éléments minéraux est faible. Travaillant sur le couple *Pisolithus tinctorius* et *Pinus caribea*, Kabre (1982) a pourtant montré que la flore microbienne native du sol au Sud du Sénégal a inhibé l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Par contre, il a été également démontré que certains microorganismes du sol tels que les *Pseudomonas* du groupe des fluorescents facilitent l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Duponnois et Garbaye 1991). Ainsi, la réussite de la restructuration de la population microbienne du sol dépend surtout de la compétitivité de la souche de champignon ectomycorhizien utilisée et de la réceptivité du sol à la symbiose mycorhizienne.

Au niveau quantitatif, la mycorhization avait beaucoup d'influence sur la communauté microbienne cultivable du sol. L'effet de chaque souche fongique a été différent l'une de l'autre. Ainsi, le développement de la flore totale cultivable du sol a été fortement stimulé par la souche de *Pisolithus* Pis 01-ME. Par contre, le traitement utilisant cette souche de *Pisolithus* a engendré la plus faible activité globale des microorganismes du sol mesurée par l'hydrolyse de la FDA. Ce qui permet de suggérer que l'activité microbienne globale ne dépend pas forcément de la quantité de microorganismes présent dans le sol. Les enzymes intervenants dans l'hydrolyse de la FDA telles que protéases, lipases et estérases qui sont des enzymes extracellulaires, sont produites par une grande partie des groupes microbiens fonctionnels au niveau du sol mais non pas par tous les microorganismes du sol (Guilbault and Kramer, 1964; Rotman and Papermaster, 1966). Il est donc probable que la souche de *Pisolithus* Pis 01-ME a stimulé le développement d'autres microorganismes que ceux qui produisent des enzymes phosphatasiques. Concernant toujours cette stimulation sélective de la communauté microbienne du sol par la mycorhization, d'autres groupes fonctionnels tels que les *Pseudomonas* du groupe des fluorescents et des actinomycètes ont été également identifiés comme des groupes favorisés par la mycorhization. Les *Pseudomonas* sont connus surtout par leur capacité à faciliter la reconnaissance entre la plante et les champignons mycorhiziens (Duponnois et Garbaye, 1991) ainsi que leur aptitude à inhiber le développement de certains agents phytopathogènes (Jaques G. et Fuchs, 1999). Dans nos résultats, la présence des *Pseudomonas* a été enregistrée dans tous les traitements mycorhizés.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons pris comme objectif la description des impacts de la pré-colonisation du sol par *A. mangium* sur le développement d'*Intsia bijuga*. Étant donné que les deux essences ligneuses sont toutes associées aux champignons ectomycorhiziens, les études ont été focalisées sur la communauté de ces champignons mycorhiziens ainsi que sur le fonctionnement des microorganismes associés à cette symbiose.

Nos résultats ont montré que mesuré au niveau de la biomasse aérienne et racinaire d'*I. bijuga*, la pré-colonisation du sol par *A. mangium* a significativement amélioré le développement de cette essence autochtone. De plus, des morphotypes d'ectomycorhize associés à la fois à l'essence autochtone (*I. bijuga*) et à l'essence pré-colonisatrice (*A. mangium*) ont été remarqués. Le partage de symbiotes fongiques partagés entre différentes espèces de plante a été déjà rapportée en milieu tempéré (Ishida et al., 2007 ; Dickie et al., 2005 ; Richard et al, 2009). Ces études ont surtout mentionné l'importance des symbiotes communs sur la succession végétale notamment sur la régénération d'essences forestières en milieu dégradé dans le cas où l'autre espèce végétale est une espèce arbustive pionnière. Par contre, peu d'études ont été entreprises sur les symbiotes communs entre essences ligneuses. Dans la plupart des cas, les essences exotiques sont connues surtout pour leur caractère dominant vis-à-vis du développement des essences endémiques ou autochtones. Pourtant, nos résultats illustrent le contraire en montrant l'effet positif de l'envahissement du sol par l'essence exotique *A. mangium* sur le développement d'*I. bijuga*. Il a été clairement établi par nos résultats que la restructuration de la communauté de champignons ectomycorhiziens par *A. mangium* a été à l'origine de cette amélioration du développement d'*I. bijuga*. Gurney et Lawton (1996) ont déjà montré que certaines plantes sont capables de modifier les caractères physico-chimiques et microbiologiques de leur habitat. Ce processus facilite par la même occasion l'établissement d'autres plantes par le phénomène appelé « nurshing » (Jones et al., 1997) dont le développement dépend entièrement de diverses associations qu'elle peut établir avec les microorganismes symbiotiques de la rhizosphère (Pugnaire et Haase, 1996).

Pour mieux comprendre le mécanisme de cette « facilitation » du développement d'*I. bijuga* par l'espèce exotique, nous avons investi également sur les autres aspects microbiologiques accompagnant la restructuration de la communauté ectomycorhizienne au niveau de la rhizosphère. Ainsi, il a été nettement démontré qu'un fonctionnement microbien intense a accompagné cette nouvelle communauté ectomycorhizienne activée par *A. mangium*.

L'activité microbienne globale du sol et le développement des microorganismes cultivables du sol sont particulièrement stimulés. Pourtant, d'autres groupes fonctionnels de la flore rhizosphérique à savoir les *Pseudomonas* fluorescents, les bactéries solubilisant le phosphate ont connu également un développement considérable suite à la réactivation et restructuration de la communauté ectomycorhizienne.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Pour conclure, les souches fongiques utilisées à savoir les souches de *Pisolithus* et *Scleroderma*, collectées et isolées à Madagascar, ont des effets positifs sur le développement d'*Acacia mangium*. De plus, l'approche que nous avons adopté pour décrire l'importance de l'effet mycorhizosphérique d'*A. mangium* sur le développement d'*I. bijuga* nous a permis de démontrer clairement que la pré-colonisation du sol par cette essence exotique a stimulé de manière significative le développement de l'essence autochtone par structuration de la communauté ectomycorhizienne et ses microorganismes associés. Certes les méthodes utilisées ont été limitées aux méthodes classiques de la microbiologie telle que la culture microbienne et la spectrophotométrie. Pourtant, les résultats obtenus ont permis de tracer, dans l'avenir, des voies de recherches intéressantes relatives

- ❖ aux mécanismes microbiologiques des effets négatifs ou positifs des plantes exotiques sur le développement d'essences autochtones ou endémiques.
- ❖ à la gestion de la fertilité du sol via les connaissances relatives à la mobilisation des éléments nutritifs au niveau du sol impliquant les microorganismes mycorhizosphériques.
- ❖ aux importances des microorganismes mycorhizosphériques dans la politique de développement durable et respectueux de l'environnement.
- ❖ à l'étude des effets d'*Acacia mangium* planté en permanence avec *Intsia bijuga*.

## **ANNEXES**

## Annexes

### Annexe 1 : Les mélanges des deux solutions A et B avec les pH correspondants

<b>A(X)</b>	<b>B(Y)</b>	<b>pH</b>
44,6	5,4	2,6
42,2	7,8	2,8
39,8	10,2	3
37,7	12,3	3,2
35,9	14,1	3,4
33,9	16,1	3,6
32,3	17,7	3,8
30,7	19,3	4
29,4	20,6	4,2
27,8	22,2	4,4
26,7	23,3	4,6
25,2	24,8	4,8
24,3	25,7	5
23,3	26,7	5,2
22,2	27,8	5,4
21	29	5,6
19,7	30,3	5,8
17,9	32,1	6
16,9	33,1	6,2
15,4	34,6	6,4
13,6	36,4	6,6
9,1	40,9	6,8
6,5	43,6	7

## **Annexe 2 : Composition du milieu de culture**

**TSA (Tryptic Soy Agar):** c'est un milieu préalablement préparé de la marque DIFCO

Composition de TSA :

Peptone de caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
pH	7 ,3
Eau distillée	1000ml

## **Milieu King B:**

Polypeptone	20g
Glycerol	10g
Phosphate bipotassique	1,5g
anhydre	
Sulfate de magnésium7H <sub>2</sub> O	1,5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

## **Milieu de Norkrans et Melin(MNM) modifié par Marx :**

CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,05g
NaCl	0,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,15g
Citrate ferrique 1%	1,2ml
Thiamine hydrocharidacée 1mg/ml	1ml
Extrait de malt	3g
Glucose	10g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

**Milieu Waksman:**

Glucose	20g
Casitone	5g
NaCl	5g
Beef extract	3g
Agar	20g
E.D qsp	1000ml

**Milieu TCP (phosphate tricalcique):**

NH <sub>4</sub> Cl	5g
NaCl	1g
MgSO <sub>4</sub>	1g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	4g
Glucose	10g
Agar	20g
E.D qsp	1000ml

### **Annexe 3 : Méthode de calcul des activités enzymatiques**

Cette méthode est applicable à toutes les mesures de l'hydrolyse de FDA et les activités phosphatasiques de n'importe quel sol.

#### **1. Hydrolyse de FDA**

Le FDA ou Fluorescéine Diacétate est un de substrat de plusieurs groupes d'enzymes présent dans le sol tels les protéases, les lipases, les estérases et autres enzymes. L'activité de ces enzymes a comme conséquence d'hydrolyser le FDA sans couleur en fluorescéine de couleur vert jaunâtre. L'intensité de cette couleur indique la quantité des molécules de FDA hydrolysée et l'activité globale de l'enzyme dans l'échantillon du sol. La quantification de l'activité enzymatique est exécutée en évaluant l'intensité de la formation de couleur en utilisant la spectrophotométrie de longueur d'onde 490 nanomètre. La quantité de produit d'analyse (Fluorescéine) est déterminée en utilisant un étalonnage d'une solution standard de fluorescéine.

#### **Résultat de lecture de DO à 490 nm : (DOlu)**

	T	Scbl	SC2	Pa	Pm
TE	0,02	0,012	0,024	0,037	0,012
E1	0,068	0,088	0,058	0,082	0,028
E2	0,029	0,083	0,043	0,149	0,016
E3	0,047	0,122	0,076	0,152	0,021

$$TS=0.008$$

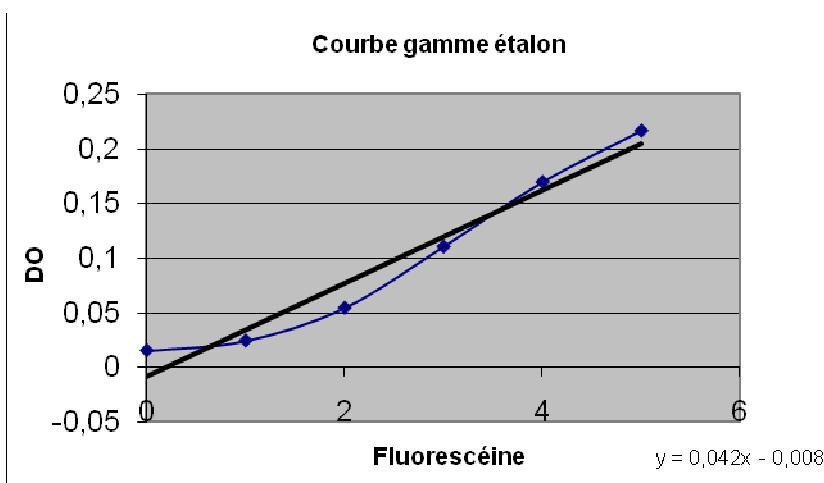
#### **Calcul du DO réel selon la formule $DO_{Or} = DO_{lu} - (TE+TS)$**

	T	Scbl	SC2	Pa	Pm
E1	0,04	0,068	0,026	0,037	0,008
E2	0,001	0,061	0,011	0,104	0
E3	0,019	0,0102	0,044	0,107	0,001

### Calcul de l'activité enzymatique A en utilisant la courbe de la gamme étalon

#### Résultat de lecture de DO de la gamme étalon à 490nm

Fluorescéine ( $\mu\text{g}$ )	0	1	2	3	4	5
DO à 490nm	0,015	0,024	0,054	0,11	0,169	0,216



D'après la courbe de la gamme étalon on en déduit une équation  $y=0,0427x - 0,0089$  avec  $y= \text{DO}_{\text{réel}}$  et  $x= A$

Donc,  $A = (\text{Dor} + 0,0089) / 0,0427$  ; A correspond à la quantité de fluorescéine produite (en  $\mu\text{g}$ ).

	T	Scbl	SC2	Pa	Pm
A1	1,145	1,8	0,817	1,074	0,395
A2	0,231	1,637	0,466	2,644	0,208
A3	0,653	2,597	1,238	2,714	0,231

### Enlèvement de dilution

0,5ml du volume total (15,2ml) a été prélevé pour la lecture de DO qui a donné les valeurs de A. Ainsi 0,5ml donne A ( $\mu\text{g}$ ) et 15,2ml donne F= quantité de fluorescéine dans 1g du sol.

	T	Scbl	SC2	Pa	Pm
F1	34,808	54,72	24,8368	32,6496	12,008
F2	7,0224	49,7648	14,1664	80,3776	6,3232
F3	19,8512	78,9488	37,6352	82,5056	7,0224
Moyenne	20,5605333	61,1445333	25,5461333	65,1776	8,4512

### 2. Activité phosphatasique

Le phosphore est un macroélément nécessaire à la croissance des plantes. Il est présent dans le sol sous la forme de phosphates et la concentration de phosphore dans le sol forestier est en général très faible. Des enzymes (phosphatasées) localisées soit dans les cellules microbiennes et végétales soit exo cellulaire, rendent disponible le phosphore par la plante. Ces enzymes se présentent sous deux formes dans le sol: les phosphatasées alcalines, les phosphatasées acides selon le pH de sol. La quantité des produits (p-Nitrophenol) d'hydrolyse par ces enzymes dans le sol a été mesurée à l'aide de spectrophotométrie de longueur d'onde 400nm. On a pris comme exemple de calcul le phosphatasée acide.

#### Résultat de lecture de DO à 400nm : (DO lu)

	T	Scbl	Sc2	Pa	Pm
TE	0,111	0,089	0,06	0,074	0,044
E1	0,199	0,255	0,201	0,265	0,174
E2	0,215	0,217	0,283	0,298	0,229
E3	0,242	0,236	0,208	0,269	0,22

TS = 0,101

#### Calcul du DO réel selon la formule DOr = DO lu - (TE+TS)

	T	Scbl	Sc2	Pa	Pm
E1	0	0,065	0,04	0,09	0,029
E2	0,003	0,027	0,122	0,123	0,084
E3	0,03	0,046	0,047	0,094	0,075

### **Calcul de la quantité de p-Nitrophenol (en µg) pour chaque DOr**

Pour cela 10µg de p-Nitrophenol correspond à une DO r de 0,420

	T	Scbl	Sc2	Pa	Pm
E1	0	1,547	0,952	2,14	0,69
E2	0,071	0,642	2,904	2,928	2
E3	0,714	1,095	1,119	2,238	1,785

Ces valeurs obtenues sont les quantités de p-Nitrophenol contenues dans la quantité du sol mélangé dans les réactifs. Cette quantité du sol est variable suivant leur type et pour cette expérience elle est de 20mg. La quantité du produit par gramme du sol est récapitulée dans le tableau suivant.

	T	Scbl	Sc2	Pa	Pm
E1	0	77,35	47,6	107	34,5
E2	3,55	32,1	145,2	146,4	100
E3	35,7	54,75	55,95	111,9	89,25

# **REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE**

- Adam, G. and H. Duncan. (2001).** Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33:943-951.
- Amadou Hamadoun Babana (2003).** Mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) physiology. Marks, G.C. & Kozlowski, T.T. (eds), Academic press, New York. 299-349pp.
- Andriamiarantsoa, L., (2006).** Test d'aptitude symbiotique de trois souches de champignons ectomycorhizogènes d'*Intsia bijuga* du foret de Mandena (Taolagnaro).DEA, physiologie végétale, Université d' Antananarivo, 57p.
- Ashford A.E., ling lee M. Chilvers G.A. (1975).** Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas: a cytochemical demonstration. *New Phytol.*, vol. 74, pp. 447-453.
- Australian National Botanic Gardens (ANBG) (2008).** The Genus *Acacia*: *Acacias* of South Australia. [[http://www.flora.sa.gov.au/id\\_tool.html](http://www.flora.sa.gov.au/id_tool.html)](Consulté le 05/12/2008), 241 ko.
- Barea, J.M., Azcón, R., and Azcón-Aguilar, C. (1992).** Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. In *Methods in Microbiology*. Norris, J.R., Read, D.J., and Varma, A.K. (eds). London, UK: Academic Press, pp. 391–416.
- Bjorkman E. (1970).** Forest tree mycorrhiza the conditions for its formation and the significance for tree growth and afforestation. *Plant and Soil* 32: 589-610.
- Blaser, J. (1993).** Choix des essences pour la sylviculture a Madagascar. Akon'ny ala. Numéros 12 et 13. Département des Eaux et Forêts de l'Ecole supérieure des sciences agronomiques. Antananarivo. Madagascar. World.
- Burns R.G. (1982).** Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14, pp 423-428.
- Buschena C.A., Doudrick R.L and Anderson N.A. (1992).** Persistence of *Laccaria* spp. as ectomycorrhizal symbionts of container-grown black spruce. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 1883-1887.
- Campbell R. and Greaves M.P (1990).** Anatomy and community strure of the rhizosphère. In Lynch J.M. The rhizosphere: p11-34. (Wiley series in Ecological and applied Microbiology).

- Chilvers G.A., HARLEY J.L. (1980).** Visualization of phosphate accumulation in beech mycorrhizas. *New Phytol.*, vol. 84, pp. 319-326.
- Clément, A., Garbaye, J. et Le Tacon, F. (1977).** Importance des ectomycorhizes dans la résistance au calcaire du Pin noir (*Pinus nigra* Arn ssp. *nigricans* Host). *Oecol. Plant.*, 12 : 111-131.
- Colonna J.P., Thoen D., Ducoussو M. and Badji S. (1991).** Comparative effects of *Glomus mosseae* and P fertilized on foliar mineral composition of *Acacia senegal* seedlings inoculated with *Rhizobium*. *Mycorrhiza* 1, pp. 35-38.
- Conservation Monitoring Centre (1998).** *Intsia bijuga*. In: IUCN 2004. 2004 IUCN Red List of Threatened Species.
- Cossalter C., (1986).** Introducing Australian *Acacias* in dry, tropical Africa. In: Turnbull J.W. (Ed.) Australian *acacias* in developing countries. Proceedings of an International Workshop at the Forestry Training Center, Gympie, Australia 1986. ACIAR, Camberra, pp. 118-122.
- Danielson R.M. and Visser S. (1989).** Host response to inoculation and behaviour of introduced and indigenous ectomycorrhizal fungi of Jack pine grown on oil-sands tailings. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 1412-1421.
- Dechamplain and Gosselin L. (2002).** Les champignons mychoriziens, Juillet 2002, [<http://pistes.org/apprped/app/activites/mycorhizes.pdf>],
- Dell, B. & Malajczuk, N. (1997).** L'inoculation des eucalyptus introduits en Asie avec des champignons ectomycorhiziens Australiens en vue d'augmenter la productivité des plantations. *Revue Forestière française*. N° spéciale, 174-184.
- Delwaulle J.C., Garbaye J., and Okombi G. (1982).** Stimulation de la croissance initiale de *Pinus caribaea* Morelet dans une plantation du Congo par le contrôle de la mycorhization. *Bois et Forêts des Tropiques* 196: 25-32.
- Dickie A. and Reich Peter B. (2005).** Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Department of Forest Resources, University of Minnesota, St Paul, MN, USA. Journal of Ecology* 2005 93, 244-255
- Dommergues, Y. et Mangenot, F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris.

- Dommergues, Y. (1978).** "Mycorrhizes et fixation d'azote". O.R.S.T.O.M.
- Dreyfus B., Diem H.G, Freire J., Keya S.O., Dommergues Y.R., (1987).** Nitrogen fixation in tropical agriculture and forestry. In: Dasilva E.J., Dommergues Y.R., Nyns E.J., Ratledge C. (Eds.). Microbial technology in the developing world. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-7.
- Ducoussو M . (2004a).** Relative infectivity of two *Pisolithus* spp. strains inoculated to the nitrogen-fixing legume tree *Acacia crassicarpa* A. Cunn. ex Benth. in a field experiment in Madagascar.
- Ducoussо M., Galiana A., Chaix G. and Prin Y.(2004b).** Relative infectivity of two *Pisolithus* spp. Strains inoculated to the nitrogen-fixing legume tree *Acacia crassicarpa* A. Cunn. Ex Benth. in a field experiment in Madagascar. *European Journal of Soil Biology* 40: 105 – 111.
- Duponnois, R., Garbaye, J. (1991).** Mycorrhization 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., Bâ, A. & Mateille, T.(1999).** Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. *Nematology*, 1 : 95-101
- Duponnois R., Founoune H., Lesueur D.(2002).** Influence of the controlled dual ectomycorrhizal and rhizobal symbiosis on the growth of *Acacia mangium* provenances, the indigenous symbiotic microflora and the structure of plant parasitic nematode communities , Dakar Senegal ,*Geoderma* 109 ,85– 102.
- Founoune, H., Duponnois R. and 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. *Journal of Arid Environments* 50: 325-332.
- Founoune, H., R. Duponnois. Bâ, A.M., Sall, S., Branget, I., Lorquin, J., Neyra, M. & Chotte, J.L (2002).** Mycorrhiza helper bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *acacia holosericea* with *pisolithus alba*. *New Phytologist* 153: 81-89.
- Founoune, H., R. Duponnois. (2002).** Interactions between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent pseudomonads on *Acacia holosericea* : isolation of mycorrhiza helper bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 37-46.
- Frank A. B. (1885).** Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährungt gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. Deutsch. Bot. Ges*; 3: 27-33.

- 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 bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1852-1860.
- Garbaye, J (1988).** Growth response of eucalyptus in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and management*. 24, 151-157.
- Garbaye, J., Delwaille, J.C. and Diangana, D. (1988).** Growth response of eucalyptus in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and management*. 24, 151-157.
- Garbaye, J. (1990).** Les problèmes posés par la mycorhization contrôlée du chêne. *Rev. For. Fr.* XLII-1 : 35-47.
- Garbaye, J. (1991).** Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia*, 47, 370-375.
- Garbaye, J., Churin, J.-L.,(1997).** Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *For. Ecol. Manage.* 98, 221±228.
- GAY G., GEA L. (1994).** Rôle de l'auxine fongique dans la formation des ectomycorhizes. *Acta Botanica Gallica*, vol. 141, n° 4, pp. 491-496.
- Gea L, Normand L, Vian B, Gay G. (1994).** Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-over producer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. *New Phytologist*.
- Giffard P.L., (1974).** L'arbre dans le paysage sénégalais. *Sylviculture en zone tropicale sèche*, Centre Technique Forestier Tropical, Dakar, Sénégal.
- Giffard P.L. (1975).** Les gommiers, essences de reboisement pour les régions sahéliennes. *Bois For Trop* 161:3-20.
- Gilbert, R.G. and Linderman, R.G. (1971).** Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rofsii* an soil. *Can. J. Micorbiol.* 17, 557-562.
- Guehl J.-M., Garbaye J. and Wartinger A. (1992).** The effect of ectomycorrhizal status on plant water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. In: read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. & Alexander I.J. (eds). *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB international, Oxon, UK.
- Guilbault G.G. and Kramer D.N. (1964).** Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha- and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Anal. Chem.* 36: 409 – 412.
- Gurney, W.S.C., and Lawton, J.H. (1996).** The population dynamics of ecosystem engineers. *Oikos*, **76**: 273–283.

- Hassan B. (2001).** Ectomycorhization de *Cedrus atlantica* en conditions contrôlées : efficacité de deux formes d'inoculum mycélien.
- Hoffmann E. and Seegerer A. (1951).** Soil enzymes as factors of fertility. *Naturwissenschaften*, 38, pp 141-142.
- Jacques G. FUCHS, Biophyt SA. (1999).** Les produits biologiques: bien les connaître pour mieux les utiliser. Cours dispensé les 18 & 19 janvier 1999 à Paris organisé par AGREF-Formation.
- Jones Randall L., (1997).** « Creating and using a corpus of spoken German », in A. Wichmann et al. (eds.), *Teaching and Language Corpora*, London, Longman 1997, pp. 146-56.
- Kabre A. (1982).** Mycorhization de *Pinus caribaea* (Morelet) var. *Hondurensis* dans difféHrents sols due SeHneHgal. Thèse de Docteur IngeHnieur. Université Nancy 1. 145 pp.
- King E.O, Ward M.K and Raney D.E (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44:301–307.
- Kucey, R.M.N. and Leggett, M.E. (1989).** Increased yields and phosphorus uptake by Westar canola (*Brassica napus* L.) inoculated with a phosphatesolubilizing isolate of *Penicillium bilaji*. *Canadian Journal of Soil Science* 69:425-432.
- Lapeyrie F. (1983).** Recherches préliminaires sur le rôle des ectomycorhizes dans l'implantation d'Eucalyptus delegatensis en France. Thèse de Docteur-Ingénieur - Lyon I : Université Claude Bernard. 175 p.
- Le Tacon F. (1982a).** *Perspective de la maîtrise de la mycorhization en sylviculture*. In Gianinazzi S. (Ed) Les mycorhizes: biologie et utilisation. INRA Press, Paris, France. pp. 273-283.
- Le Tacon, F., Delmas, J., Gleyze, R. and Bouchard, D. (1982).** Influence du régime hydrique du sol et de la fertilisation sur la fructification de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* vitt) dans le Sud-Est de la France. *Acta oecologica applicata*. Vol 3, 291-306.
- Le Tacon F. et Bouchard, D. (1986).** Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursey soil. *Acta Oecologica, Oecologica applicata*. 7, 389-402.

- Le Tacon F. (1992).** *Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe.* In Mycorrhizas in ecosystems (édité par DJ Read, DH Lewis, AH Fitter & IJ Alexander). CAB International, Wallingford, p. 119-154.
- Le Tacon F (1997).** Mycorhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Rv. For. Fr.* **XLIX.** 131-154.
- Linderman, R.G. (1988).** Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora : the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology.* **59**, 153-163.
- Marc André SELOSSE, Février (2001).** Apport des techniques génétiques et moléculaires à la connaissance des communautés et des populations des champignons ectomycorhiziens in : *LEJEUNIA*, revue botanique.
- Marx, D.H. (1969).** The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of roots to pathogenic infection. 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 infection. *Annals Rev Phytopathol* **10**: 429-454
- Marx D.H. (1980).** *Ectomycorrhiza fungus inoculations: a tool for improving forestation practices.* In: Mikola P. (Ed) Tropical Mycorrhiza Research. Oxford University Press, Oxford. pp.13-71.
- Marx D.H., et al., (1982).** Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forest Science* **28**: 373-400.
- Marx D.H., Cordell C.E. and Kenney D.S. (1984).** Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. *Forest Science Monograph* **25**. 101 p.
- Marx D.H., Cordell C.E. and Clark A. III. (1988).** Eight years performance of loblolly pine with *Pisolithus* ectomycorrhizae on a good-quality forest site. *Southern Journal of Applied Forestry* **12**: 275-280.
- Meijer, W., (1997).** Personal communication to Amy MacKinven.

- Meyer et al., (1987).** Siderophores of pseudomonas biologicals properties./ IN : Winkelmann D van der Helm and Neilands J.B. Iron transport in microbiens, plants and animals, VCHI Verlagsgesellschaft, Weinheim. 188-205.
- Mikola, P. (1970).** Mycorrhizal inoculation in afforestation. In : International Review of Forestry Research (Ed by J.A. Romberger & P. Mikola). Academic press, New York and London. 3, 123-196.
- Miller, O. K., (1982).** Taxonomy of ecto and ectendomycorrhizal fungi. In: Methods and principles in mycorrhizal research(ed. N.C. Schenk). American Phytopathology Press, Dt Paul, Minesota p510-517.
- Molina R., Massicotte H. and Trappe J. M. (1992).** Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community–ecological consequences and practical applications. Pages 357–423 in M. F. Allen, editor. Mycorrhizal functioning. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- Morel, R. (1996).** Les sols cultivés. 2è edition. Lavoisier, Paris.
- Morton J.B., Bentivenga S.P. and Bever J.D. (1995).** Discovery, measurement and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany* **73**: S23-S32.
- Moser, M., (1958).** Die kunstliche Mycorrhizaimpfung an Forstplanzen. Forstwiss centralbl. 77:32-40
- Mousain D. (1989).** Étude de la nutrition phosphate de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse d'état, Université de Montpellier II (U.S.T.L.), Montpellier, 234 p.
- Näsholm T.(1998).** Boreal forest plant stake up organic nitrogen. *Nature* **392**: 914-916.
- Neal Jr., J.L., Bollen, W.B. and Zak, B. (1964).** Rhizosphere microflora associated with mycorrhizae of Douglas fir. *Can. J. Microbiol.* **10**, 259–265.
- Palardé J. ; Pera, J. & Alvarez I.F. (1997).** La mycorhization contrôlée du Douglas dans le Nord de l'Espagne. Premiers résultats en plantation. *Revue forestière française*. N° spéciale : 163-173.
- Pigott C. (1982).** Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr.in dry soils. *New Phytologist* **92**: 513–517.

- Plenchette C., Fortin J .A. et Furlan V., (1983).** Growth response of serval plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and soil*, 70, pp. 199-209.
- Pugnaire, F.I., Haase, P., Puigdefa' bregas, J., (1996).** Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology* 77, 1420–1426.
- Ramanankierana H. (2005).** La symbiose mycorhizienne dans la domestication de Uapaca bojeri (Euphorbiaceae), plante ligneuse endémique de Madagascar. [Thèse de doctorat]. Université d'Antananarivo ; 138p.
- Ramanankierana N., Rakotoarimanga N., Thioulouse J., Kisa M., Randrianjohany E., Ramaroson L. and Duponnois R. (2006).** The ectomycorrhizosphere effect influences functional diversity of soil microflora. *International Journal of Soil Sciences* 1: 8 – 19.
- Rambelli, A. (1973).** The Rhizosphere of mycorrhizae. In : Ectomycorrhizae, their ecology
- Randolph R. (2006).** Species Profiles for Pacific Island Agroforestry ([www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org)): *Intsia bijuga* (vesi).
- Ratahiriarisoa Dina. (2007).** Etude comparative de l'influence de la symbiose mycorhizienne, du phosphate naturel et des amendements organiques sur la qualité microbiologique du sol et la croissance du *Lycopersicum esculentum*. DEA Biotechnologie, Université d'Antananarivo, 55p.
- Robin Duponnois, (2000).** Ectomycorrhization of *Acacia holosericea* a. cunn. ex g. don by *pisolithus* spp. in Senegal: effect on plant growth and on the root-knot nematode *meloidogyne javanica*.
- Rotman B. and Papermaster B.W. (1966).** Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55: 134 – 141.
- Rossel, D.; Tarradellas, J. (1991).** Dehydrogenase activity of soil microflora: significance in ecotoxicological tests. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6, 17-33.
- Safir, G.R., Boyer, J.S. and Gerdemann, J.W. (1972).** Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Plant Physiology*, 49: 700-704.
- Schnurer, J. and Rosswall. T. (1982).** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1256-1261.
- Selosse M.A., Jacquot D., Bouchard D., Martin F. and LeTacon F. (1998).** Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the

- ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Molecular Ecology* 7: 561-573.
- Selosse, M.-A., Martin, F. & Le Tacon, F. (1999)** Structure and dynamic of artificially introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. discrete genotypes in a European Douglas fir plantation. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2006-2014.
- Smith, S.E. and Read, D.J. (1997)**. Mycorrhizal symbiosis. Academic press, 2nd eds. London. 605 pages.
- Strullu D.G. (1982)**. Les mycorhizes. I. L'association mycorhizienne. — *Comptes rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*, vol. 68, n° 5, pp. 344-360.
- Strullu D.G., Harley J.L., Gourret J.P., Garrec J.P. (1983)**. A note on the relative phosphorus and calcium contents of metachromatic granules in *Fagus* mycorrhiza. *New Phytol.*, vol. 94, pp. 89-94.
- Strullu.D.G**, Mycorhizes et culture in vitro p145-164. In : **AUGE.R et al, 1989**. La culture in vitro et ses applications horticoles ,3è édition ; H vidalie rue Lavoisier, paris cedex 08.
- Subba Rao N.S, (1999)**. Soil microbiology (Fourth Edition of Soil Microorganisms and plant Growth).
- Swisher, R., and G. C. Carroll. (1980)**. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microb. Ecol.* 6:217-226.
- Tibbett M, Grantham K, Sanders FE, Cairney JWG (1998a)** Induction of cold active phosphomonoesterase activity at low temperature in psychrotrophic ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. *Mycol Res* 102 :1533-1539.
- Thomson, B.D., Hardy, G.E.St.J., Malajczuk, N. and Grove, T.S. (1996)**. The survival and development of inoculant fungi on the roots of outplanted *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant and Soil*, 178, 247-253.
- Trouillet Ananda (2004)**. Impact de la symbiose ectomycorhizienne sur l'altération du phosphore naturel sur les *Acacia holosericea*. Rapport de stage en Agronomie.
- UNEP World Conservation Monitoring Centre**. Tree Conservation Information Service. [http://www.unep-wcmc.org/trees/trade/int\\_bij. 05 September 2007](http://www.unep-wcmc.org/trees/trade/int_bij. 05 September 2007).
- Waksman S.A. (1961)**. The actinomycetes. Classification, identification and description of genera and species. Baltimore Williams & Wikins, 1961; vol.2.
- Westover K.M., A.C. Kennedy A.C., Kelleys S.E. (1997)**. Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *Journ of Ecol*; 85: 863-873.

**Williamson B., Alexander I.J. (1975).** Acid phosphatases localized in the sheath of beech mycorrhiza. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 7, pp. 195-198.

**Yazid S. M., Lee S. S. & Lapeyrie F. (1994).** Growth stimulation of Hopea spp. (Dipterocarpacea) seedlings following ectomycorrhizal inoculation with an exotic strain of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Ecology and Management*. Volume 67, 339 – 343.

**EFFETS MYCORHIZOSPHERIQUES D'*Acacia mangium* : IMPACTS SUR LA STRUCTURE  
ET L'ACTIVITE DE LA POPULATION MICROBIENNE DU SOL ET SUR LE  
DEVELOPPEMENT D'UNE ESSENCE AUTOCHTONE, *Intsia bijuga*.**

---

**RESUME**

La dépendance ectomycorhizienne *d'Acacia mangium* a été étudiée vis-à-vis de deux souches de Sclérodermes (SCO2-ME, SCO3-ME) et deux souches de *Pisolithus* (Pis 01-ME, Pis 02-ME) sur un sol provenant d'une formation forestière dégradée de moyen Est de Madagascar. Les quatre souches fongiques ont amélioré significativement le développement *d'Acacia mangium* et la souche de *Pisolithus* Pis 02-ME, en particulier, a stimulé la croissance en hauteur de la plante plus de deux fois par rapport aux plants témoins. L'effet positif de la souche *Pisolithus* récolté à Madagascar sur le développement *d'Acacia mangium* est démontré pour la première fois par nos résultats. Les quatre souches fongiques utilisées ont présenté une forte compétitivité vis-à-vis de la microflore native du sol.

Dans la deuxième partie du travail l'influence de la pré-colonisation du sol par *Acacia mangium* sur le développement d'une essence autochtone, *Intsia bijuga* a été évaluée. Après quatre mois de culture, le développement *d'Intsia bijuga* est nettement amélioré sur le sol préalablement colonisé par *A. mangium* que sur le sol témoin. Cette nette amélioration du développement *d'Intsia bijuga* a été accompagnée par un taux d'ectomycorhization élevé. D'une manière générale, l'activité de la communauté microbienne totale du sol a été fortement stimulée par la pré-colonisation *d'Acacia mangium*. Cette stimulation de l'activité microbienne du sol couplée avec une structuration de la communauté de champignons ectomycorhiziens a été à l'origine du développement amélioré *d'Intsia bijuga*. En effet, il a été démontré que les deux plantes partagent les mêmes symbiotes fongiques.

**Mots clés :** *Acacia mangium*, Ectomycorhize, *Intsia bijuga*, microorganismes du sol, Hydrolyse de la Fluorescéine Di-Acétate, Phosphatases

**MYCORHIZOSPHERIC EFFECT OF *Acacia mangium*: IMPACTS ON THE STRUCTURE AND  
ACTIVITY OF MICROBIAL POPULATION OF SOIL AND ON AN ESSENCE AUTOCHTONE  
DEVELOPMENT, *Intsia bijuga*.**

---

**ABSTRACT**

Ectomycorrhizal dependency was studied through two *Scleroderma* (SCO2-ME, SCO3-ME) and two *Pisolithus* (Pis 01-ME, Pis 02-ME) strains on a soil sample from degraded forest land of the middle East part of Madagascar. Obviously these four fungal strains improved the development of *Acacia mangium* but compared with the references plants the best result was recorded with Pis 02-ME. The positive effect of *Pisolithus* strains collected from Madagascar has been demonstrated in this research in order to study the growing process of *Acacia mangium*. The competition between the four fungal strains and the indigenous soil microorganisms is strong.

At the second part of this work, the impact of pre-colonization of *Acacia mangium* on the development of autochthonous essence *Intsia bijuga* was evaluated. After four months of plantation, the growing process of *Intsia bijuga* was progressed properly on the soil which was colonized beforehand by *Acacia mangium*. This clear improvement of the growth of *Intsia bijuga* is accompanied by a high rate of ectomycorrhization. Generally the pre-colonization of *A. mangium* stimulate greatly microorganisms community activities. Both microorganisms activities and ectomycorrhizal fungi establishment increase the growth of *Intsia bijuga*. Consequently, it is proved that *A. mangium* and *Intsia bijuga* share the same fungal symbiont.

**Key words:** *Acacia mangium*, Ectomycorrhizae, *Intsia bijuga*, microorganismes of soil, Hydrolysis of the Fluorescein Di-Acetate, Phosphatases.

**Nom** : ANDRIANANDRASANA  
**Prénoms** : Martial Doret  
**E-mail** : [martialdoreta@yahoo.fr](mailto:martialdoreta@yahoo.fr)

**Encadreur** : Dr RAMANANKIERANA Heriniaina  
**Co-encadreur** : Dr RAMAMONJISOA Daniel