



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE BIOLOGIE VEGETALE ET ENVIRONNEMENT

# THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT

En

**Spécialité : Biologie Végétale et Environnement**

**Option : Biodiversité et Gestion des Ecosystèmes**

**Impact des polluants d'origine industrielle sur le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules, sur leur diversité et sur la viabilité microbienne des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien**

Présentée par

**M<sup>lle</sup> DRIAI Sihem**

**Devant le Jury:**

Président :	BOUDELAA Mokhtar	Professeur, Université d'Annaba
Directrice de thèse :	BEDDIAR Arifa	Professeur, Université d'Annaba
Co-directrice de thèse :	LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa	Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale, France
Examinatrice :	BORDIJIBA Ouahiba	Professeur, Université d'Annaba
Examinatrice :	IGHILHARIZ Zohra	Professeur, Université d'Oran 1
Examinatrice :	NEFFAR Souad	Maitre de conférences A, Université de Tébessa

**Le 18 juillet 2016**

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce travail à mes parents*

*A mes sœurs et frères*

*A mes nièces et neveux*

*A toutes mes amies*

## **Remerciements**

*Les recherches qui font l'objet de cette thèse ont été réalisées au laboratoire de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le vivant (UCEIV) de Calais en France et au Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement (LBVE) d'Annaba en Algérie. Elles ont bénéficié d'un soutien financier dans le cadre du programme de coopération décentralisée des territoires Dunkerquois et Annabis financé par la Mutuelle des Affaires Etrangères et Européennes.*

*Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toute personne ayant participé, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse.*

*Ma vive gratitude et mes remerciements vont à Madame **Arifa Beddiar**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba et directrice de cette thèse pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour sa disponibilité, son soutien et ses précieux conseils. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse toute ma reconnaissance.*

*Mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance vont aussi à Madame **Anissa Lounès-Hadj Sahraoui**, Professeur à l'Université du Littoral Côte d'Opale en France et co-directrice de cette thèse qui m'a encadrée et m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. J'ai beaucoup apprécié votre grande disponibilité, votre rigueur et vos connaissances et compétences scientifiques. J'ai apprécié la rapidité avec laquelle vous avez lu les documents que je vous ai adressés, malgré votre emploi du temps sans doute très chargé.*

*Je remercie également Monsieur **Mokhtar Boudelaa**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, pour avoir bien voulu présider le jury de ma thèse.*

*Mes remerciements les plus distingués vont aussi à Madame **Ouahiba Bourdjiba**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, d'avoir bien voulu juger mon travail.*

*Mes vifs remerciements s'adressent, également, à Madame **Zohra Ighilhariz**, Professeur à l'Université d'Oran d'avoir accepté de juger ce rapport de thèse.*

*Je remercie également Mademoiselle **Souad Neffar**, Maître de conférences à l'Université de Tébessa d'avoir bien voulu juger mon travail.*

*J'exprime ma vive gratitude à Docteur **Yolande Dalpé**, Chercheur au Centre de recherches de l'Est sur les céréales et les oléagineux (CRECO) à Ottawa au Canada, pour l'identification des champignons mycorhiziens autochtones et pour le temps qu'elle m'a sacrifié afin de mettre à ma disposition son grand savoir dans le domaine des symbioses mycorhiziennes.*

*Mes remerciements vont également à Madame **Amel Hamza-Meddad**, Maître de conférences à l'Université Badji Mokhtar qui m'a initiée au monde de la mycorhize arbusculaire.*

*Mes remerciements vont aussi à tout le personnel du LBVE de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, en particulier, Monsieur **Tarek Hamel**, Maître assistant à l'Université Badji Mokhtar qui m'a aidée dans le prélèvement des échantillons du sol.*

*Je remercie également tout le personnel de l'UCEIV, en particulier, Monsieur **Anthony Verdin**, Madame **Natacha Bourdon** et Monsieur **Frédéric Laruelle** pour leurs aides dans les analyses chromatographiques et spectrographiques.*

*Mes remerciements vont également aux doctorants et post-doctorants de l'UCEIV : **Sonia Labidi** et **Maryline Calonne** pour m'avoir initiée à la culture in vitro des racines transformées et aux techniques d'extraction et du dosage des lipides, ainsi que **Giang, Ingrid, Karima, Christine** et **Hacène** qui ont été bienveillants à mon égard.*

*Je voudrais remercier toutes les doctorantes du LBVE, en particulier, **Hana Ziane, Hana Ksentini, Rafika Brakni** et **Asma Necib**.*

*Je remercie avec une grande émotion ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Elle m'a toujours encouragée à aller de l'avant dans la vie malgré la difficulté d'être loin de ses proches. Cette thèse est aussi la vôtre.*

---

## Résumé

Les émissions de polluants toxiques d'origine industrielle dans l'environnement peuvent avoir un impact négatif à la fois sur la santé de l'homme mais aussi sur son environnement, en particulier, sur le microbiote du sol aussi bien en termes d'abondance, de richesse, que de biodiversité. Ce qui pourrait conduire à la dégradation des écosystèmes agricoles. Parmi les microorganismes bénéfiques du sol, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) jouent un rôle majeur dans la nutrition minérale et hydrique ainsi que dans la protection des plantes contre divers stress environnementaux dont la pollution.

Ainsi, ce travail de thèse avait pour objectif principal d'étudier l'impact des rejets industriels sur le développement et la diversité des CMA, sur l'établissement de la mycorhization arbusculaire et sur la viabilité microbienne des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien. Pour cela, différentes expérimentations ont été menées avec divers modes de cultures : *in situ*, en microsomes et *in vitro*.

La première partie de cette thèse a consisté à mesurer, *in situ*, l'impact de la pollution industrielle générée par les complexe ArcelorMittal Algérie (AMA) d'El-Hadjar, Fertial (Annaba) et la Société des Ciments Hadjar-Soud SCHS (Skikda) sur la microflore bénéfique des sols agricoles (cultivés par des tomates) situés à proximité de ces complexes. Les biomasses microbiennes telluriques bactérienne et fongique (champignons mycorhiziens à arbuscules, ectomycorhiziens et saprotrophes) ont été évaluées en utilisant des marqueurs lipidiques spécifiques parmi lesquels, les acides gras associés aux phospholipides (PL) : i15 :0, a15 :0, i16 :0, i17 :0, a17 :0, cy17 :0, C18 :1 ω 7 et cy19 :0 ont été adoptés pour mesurer la biomasse bactérienne, l'ergostérol et le C18 : 2ω6,9 associé aux PL comme marqueurs des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens, et le C16 : 1ω5 associé aux PL comme marqueur des CMA. Parallèlement à cela, des isollements de spores de CMA et leur identification morpho-anatomique ainsi que la détermination de la capacité mycorhizogène des différents sols d'étude via la mesure des taux de mycorhization et du potentiel mycorhizogène infectieux du sol, ont été effectués.

Dans un deuxième temps, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet négatif des polluants sur le développement des plantes et les CMA, l'étude de l'impact d'un mélange de polluants organiques et inorganiques (le diesel), sur l'établissement d'une mycorhization arbusculaire fonctionnelle et sur la croissance des plantes a été conduite sur deux essais, l'un en microcosmes et l'autre *in vitro*.

Les principaux résultats obtenus à partir de l'ensemble de ces expérimentations ont montré que l'abondance microbienne (biomasses des CMA, des champignons ectomycorhiziens et saprotrophes ainsi que la biomasse bactérienne) est significativement plus faible dans les sols pollués par comparaison à un sol témoin non pollué prélevé d'un site non exposé aux émissions industrielles situé à Séraïdi (Annaba). De plus, la biodiversité des CMA isolés et identifiés à partir des sites pollués est moins importante comparée au site témoin. En effet, trois et cinq espèces de CMA ont été isolées des sols pollués à proximité des complexes Fertial et SCHS.

Nos résultats ont également montré des diminutions drastiques du taux de mycorhization des plants de tomate cultivés à proximité de ces sites industriels et du potentiel mycorhizogène infectieux dans les sols pollués par comparaison au sol non pollué.

Par ailleurs, les résultats des essais en microsomes et *in vitro* ont démontré que bien que le diesel affecte négativement les principaux stades de développement du CMA *R. irregularis* ainsi que la croissance de différentes plantes cultivées (tomate, blé chicorée), les CMA sont, non seulement capables d'accomplir un cycle de développement complet en présence de certaines concentrations de diesel, mais ils parviennent à protéger les plantes contre la toxicité des polluants. En effet, l'inoculation mycorhizienne de plants de tomate et de blé grâce à l'ajout d'inoculums mycorhiziens permet d'améliorer la croissance de ces plantes malgré la présence de polluants. Nous avons montré que les CMA confèrent une protection aux plantes en atténuant le stress oxydant induit par la phytotoxicité du diesel. Ceci a été mis en évidence grâce au dosage de biomarqueurs biochimiques du stress oxydant : le malondialdéhyde (marqueur de peroxydation lipidique), la peroxidase et la superoxyde dismutase (deux enzymes à activités antioxydantes).

**Mots clés :** champignon mycorhizien à arbuscules, pollution, diesel, marqueur lipidique, stress oxydant.

**Abstract**

Emissions of industrial pollutants in the environment could present a negative impact both on human health and environment, particularly, on abundance and biodiversity of soil microbiota, which could lead to the degradation of agricultural ecosystems. Among the beneficial soil microorganisms, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a major role in mineral and water nutrition as well as in plant protection against various environmental stresses including pollution.

Thus, the present thesis aims at studying the impact of industrial pollution on the microbial viability, in particular, on the development and biodiversity of AMF as well as on the establishment of the arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems of Northeastern Algeria. Several experiments were carried out *in situ*, in microsoms and *in vitro*.

The first part of this thesis consisted of measuring *in situ* the impact of industrial pollution generated by ArcelorMittal Algérie (AMA) complex of El-Hadjar, Fertial (Annaba) and the Society of Cement Hadjar Soud SCHS (Skikda) on the beneficial microflora of agricultural soils (cultivated with tomatoes). Bacterial and fungal biomasses (arbuscular mycorrhizal, ectomycorrhizal and saprotrophic) were evaluated using specific lipid markers. The phospholipid fatty acids (PLFA) i15: 0, a15: 0, i16: 0, i17: 0, a17: 0, cy17: 0, C18: 1 and  $\omega$  7 cy19: 0 were used to evaluate bacterial biomass whereas ergosterol, the PLFA C18: 2 $\omega$ 6,9 and C16: 1 $\omega$ 5 were used to quantify saprotrophic, ectomycorrhizal fungi and AMF respectively. In addition, isolation and morpho-anatomical identification of AMF spores as well as determination of root arbuscular mycorrhizal rates and soil mycorrhizal potential were performed.

Secondly, to better understand the mechanisms involved in the negative effect of pollutants on plant and AMF development, the impact of diesel (a mixture of organic and inorganic pollutants) on the establishment of the arbuscular mycorrhizal symbiosis and on plant growth was studied in microcosms and *in vitro*.

The main results showed that microbial biomass (AMF, ectomycorrhizal and saprotrophic fungi as well as bacteria) was significantly lower in polluted soils compared to control site located in Seraidi (Algérie). Furthermore, biodiversity of AMF isolated from the polluted sites is less important compared to the control site. Indeed, only three and five AMF species were isolated from polluted soil near the industrial complexes Fertial and SCHS.

Our results also showed drastic decreases in the arbuscular mycorrhizal rates of tomato plants grown near the three industrial sites as well as the arbuscular mycorrhizal potential of contaminated soils compared to unpolluted soil.

Moreover, our finding resulting from microsom and *in vitro* experiments demonstrated that although increasing diesel concentrations reduced the main stages of the AMF *R. irregularis* development and the growth of the tested different crops (tomato, chicory wheat), the fungus was not only able to fulfil its life cycle in the presence of diesel but it was also able to improve the growth and to provide protection to the plants against the diesel toxicity through oxidative stress alleviation. This result was pointed out via the assessment of biochemical biomarkers such as malondialdehyde (lipid peroxidation marker), peroxidase and superoxide dismutase (two antioxidant enzymes). Indeed, addition of mycorrhizal inoculum to tomato and wheat cultures enhances the growth of these plants despite the presence of pollutants.

**Key words :** arbuscula mycorrhizal fungus, soil pollution, diesel, lipid marker, oxidative stress.

## ملخص

انبعاث الملوثات الصناعية في البيئة يمكن ان يؤثر سلبا على صحة الانسان و البيئة في آن واحد و بالأخص على الكائنات المجهرية سواءا من حيث الوفرة، الكمية أو التنوع البيولوجي، ما يؤدي الى تدهور الانظمة الايكولوجية في الاراضي الزراعية. من بين الكائنات الحية المفيدة، تلعب الفطريات الميكوريزية الشجرية دورا كبيرا في التغذية المعدنية و في حماية النباتات ضد الكثير من انواع الاجهاد البيئي و خاصة الناتجة عن التلوث.

و هكذا، هدفت هذه الاطروحة لدراسة تأثير الإنبعاثات الصناعية الملوثة على نمو و تنوع الفطريات الميكوريزية الشجرية، على إقامة التعايش الميكوريزي و على الحيوية الميكروبية للأنظمة الايكولوجية في الأراضي الفلاحية في شمال شرق الجزائر. لأجل هذا، تم إجراء مجموعة من التجارب باستعمال تقنيات زراعية مختلفة.

الجزء الأول من هذه الأطروحة تمثل في دراسة تأثير التلوث الصناعي الناتج عن مركب ارسيلور ميتال الجزائر بالحجار، فيرتيال بعنابة و مؤسسة الاسمنت بحجار السود بسكيكدة على الكائنات المجهرية النافعة في الاراضي الفلاحية المزروعة بالطماطم و المتواجدة بجانب المصانع المذكورة. الكتلة البيولوجية البكتيرية و الفطرية (الفطريات الميكوريزية الشجرية، الاكتوميكوريزية و الفطريات الرمية) تم قياسها باستعمال احماض دسمة خاصة بكل حيث ثم اعتماد 0:15 i، a15:0، i16:0، i17:0، a17:0، cy17:0، C18:1 ω 7، cy19:0 البكتيرية، الايرجوستيرول و C18: 2ω6,9 الفوسفوليبيدي لقياس الكتلة البيولوجية للفطريات الاكتوميكوريزية و الرمية و C16: 1ω5 الفوسفوليبيدي لقياس الكتلة البيولوجية الخاصة بالفطريات الميكوريزية الشجرية.

لفهم الميكانيزمات المتدخلة في التأثير السلبي للملوثات على نمو النباتات و الفطريات الميكوريزية الشجرية، تمت دراسة تأثير مزيج من الملوثات العضوية و غير العضوية (الديازال) على إقامة تعايش ميكوريزي شجري فعال و على نمو النباتات و هذا من خلال تجربتين الأولى داخل الأصص و الثانية في المختبر.

أبرز النتائج المحصل عليها اثبتت أن الكتلة البيولوجية أقل بشكر كبير في الأتربة الملوثة منها في التراب غير الملوث المأخوذ من منطقة سرايدي البعيدة عن مصادر التلوث. فضلا عن هذا، اثبتت الدراسة أن التنوع البيولوجي للفطريات الميكوريزية الشجرية في المواقع الملوثة أقل أهمية منه في الموقع غير الملوث. في الواقع، ثلاثة و خمسة أنواع فقط تم استخراجها من الموقعين 2 و 3. نتائج بحثنا أثبتت ايضا تناقص كبير لنسبة الاستعمار الميكوريزي لنبات الطماطم المزروع بالقرب من المواقع الصناعية، بالإضافة إلى تناقص القدرة الميكوريزية عند الأتربة الملوثة مقارنة بتراب غير الملوث.

من جهة أخرى، اثبتت نتائج التجارب المقامة أنه بالرغم من أن الديازال يؤثر سلبا على أهم مراحل نمو الفطر الميكوريزي الشجري و على نمو مختلف النباتات (الطماطم، القمح و الهندباء البرية)، الفطريات الميكوريزية الشجرية ليست فقط قادرة على إكمال دورة حياة كاملة في حضور بعض التراكمات من الديزل، بل تستطيع حماية النباتات ضد سمية الملوثات. في الواقع، التطعيم الميكوريزي لنباتات الطماطم و القمح يسمح بتحسين نمو هذه النباتات بالرغم من وجود الملوثات. أثبتنا ايضا أن فطر الميكوريزي الشجري تمنح للنباتات الحماية بالتخفيف من الاجهاد التأكسدي الناتج عن سمية الديزل. تم إبراز هذه الحماية بفضل قياس كمية المألونديالديهيد و انزيمي البيروكسيداز و السوبر أوكسيد دوسميتاز.

**الكلمات المفتاحية:** فطر ميكوريزي شجري، تربة ملوثة، ديازال ، حمض دسم واسم، إجهاد تأكسدي.

---

## TABLE DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>ملخص</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES PHOTOS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET DES PLANCHES</b> .....	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>PARTIE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>5</b>
<b>I. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE A ARBUSCULES</b> .....	<b>5</b>
- La symbiose ectomycorhizienne .....	5
- La symbiose ectendomycorhizienne .....	6
- La symbiose endomycorhizienne .....	7
<b>1.1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules</b> .....	<b>8</b>
1.1.1. Taxonomie des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules.....	8
1.1.2. Cycle de développement des champignons mycorhiziens à arbuscules .....	11
<b>1.2. Bénéfices de la symbiose mycorhizienne à arbuscules</b> .....	<b>18</b>
1.2.1. Bénéfices pour le champignon mycorhiziens à arbuscules.....	18
1.2.2. Bénéfices pour la plante .....	19
<b>II. LES POLLUTIONS ANTHROPIQUES</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1. Sources de la pollution industrielle</b> .....	<b>22</b>
2.1.1. Les activités industrielles .....	23
2.1.2. La production d'énergie.....	24
2.1.3. Les activités agricoles .....	25
<b>2.2. Impact des polluants sur les microorganismes du sol</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3. Impact des polluants sur les CMA</b> .....	<b>28</b>

<b>III. LE STRESS OXYDANT .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Les espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Dommages causées par les espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3. Les systèmes antioxydants .....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Les systèmes antioxydants non enzymatiques .....	35
3.3.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques .....	36
3.3.3. Les autres peroxydases.....	38
 <b>PARTIE II MATERIELS ET METHODES .....</b>	 <b>39</b>
<b>1. Matériels biologiques.....</b>	<b>39</b>
1.1. Matériel végétal .....	39
1.2. Matériel fongique.....	40
<b>2. Les sols utilisés .....</b>	<b>41</b>
2.1. Présentation des sites de prélèvement.....	41
2.2. Prélèvement des échantillons de sol et de racines de tomate .....	42
2.3. Caractéristiques physico-chimiques des sols .....	42
2.4. Isolement et identification des champignons mycorhiziens à arbuscules autochtones des sols	43
2.5. Détermination du potentiel mycorhizogène des sols .....	44
<b>3. Dispositifs expérimentaux.....</b>	<b>46</b>
3.1. Cultures <i>in vitro</i> .....	46
3.2. Microcosmes .....	49
<b>4. Mesures des développements racinaires et fongiques .....</b>	<b>51</b>
4.1. Mesure du développement racinaire .....	51
4.2. Mesure du développement fongique .....	52
<b>5. Extraction et analyses des acides gras liés aux phospholipides (AGPL) et de l'ergostérol à partir des sols.....</b>	<b>54</b>
5.1. Extraction des acides gras liés aux phospholipides (AGPL) .....	54
5.2. Extraction de l'ergostérol.....	55
5.3. Analyses des acides gras liés aux phospholipides et de l'ergostérol.....	55
<b>6. Paramètres du stress oxydant et dosage protéique.....</b>	<b>55</b>
6.1. Extraction du contenu protéique des racines.....	55
6.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA) .....	55
6.3. Dosage de l'activité peroxidase (POD).....	56
6.4. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD).....	56
6.5. Dosage des protéines.....	57
<b>7. Analyses statistiques .....</b>	<b>57</b>

<b>PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>58</b>
<b>CHAPITRE I. BIODIVERSITE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DANS LES SOLS AGRICOLES CULTIVES PAR LA TOMATE A PROXIMITE D'INSTALLATIONS INDUSTRIELLES.....</b>	<b>58</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>58</b>
<b>2. Expression des résultats .....</b>	<b>60</b>
2.1. Caractérisation physico-chimiques des sols des sites étudiés .....	60
2.2. Caractérisation de la pollution chimique .....	60
2.3. Détermination de la biomasse microbienne du sol .....	62
2.4. Potentiel mycorhizogène du sol .....	64
2.5. Diversité et abondance des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules .....	65
2.6. Taux de mycorhization des racines des plants de tomate par les CMA autochtones.....	70
<b>3. Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>73</b>
<b>CHAPITRE II. IMPACT DE LA POLLUTION PAR LE DIESEL SUR LA MYCORHIZATION CHEZ LA TOMATE ET LE BLÉ CULTIVÉS EN MICROCOSMES....</b>	<b>75</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>75</b>
<b>2. Expression des résultats .....</b>	<b>77</b>
2.1. Taux de mycorhization racinaire.....	77
2.2. Impact du diesel sur la croissance des plantes .....	79
2.3. Impact du diesel sur les paramètres du stress oxydant.....	82
<b>3. Discussion .....</b>	<b>87</b>
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>90</b>
<b>CHAPITRE III. IMPACT DE LA POLLUTION PAR LE DIESEL SUR LE DÉVELOPPEMENT <i>IN VITRO</i> DU CMA <i>RHIZOPHAGUS IRREGULARIS</i> .....</b>	<b>92</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>92</b>
<b>2. Expression des résultats .....</b>	<b>93</b>
2.1. Test de germination des spores de <i>R. irregularis</i> en absence et en présence de diesel.....	93
2.2. Culture <i>in vitro</i> des racines de chicorée mycorhizées ou non mycorhizées par le champignon <i>Rhizophagus irregularis</i> en absence et en présence de diesel.....	96
2.3. Impact du diesel sur les paramètres du stress oxydant.....	98
<b>3. Discussion .....</b>	<b>100</b>
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>103</b>

**SYNTHESE, CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 104**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 111**

---

**LISTE DES ABREVIATIONS**


---

%	Pourcent
·OH	Radical hydroxyl
'	Minute
°	Degré
°C	Degré Celsius
µg	Micro gramme
µl	Micro litre
µm	Micro mètre
µM	Micro mole
<sup>14</sup> C	Isotope radioactif du carbone
<sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone radioactif
8-OHdG	7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine
AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGLN	Acide gras associés aux lipides neutres
AGPL	Acide gras associés aux phospholipides
AMF	<i>Arbuscular mycorrhizal fungus</i> (Champignon mycorhizien à arbuscules)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (tests des comparaisons multiples)
APX	Ascorbate peroxidases
ARN	Acide ribonucléique
As	Arsenic
AsC <sup>-</sup> H	forme ionisée
AsC <sup>·</sup> H	radical ascorbate tricarbonyle
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> (sérum albumine bovine)
BTEX	Benzène, le toluène, le éthylbenzène, le xylène
C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Acide lactique
C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Glycérol
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	Calcium nitrate tetrahydrate
CaCO <sub>3</sub>	carbonate de calcium
Cd	cadmium
CE	Conductivité électrique
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Unités Formants Colonies)
CH	Couche de la paroi hyphale
cl	centilitre
CLHP	chromatographie en phase liquide à haute performance
cm	Centimeter
cm <sup>2</sup>	Centimeter carré
cm <sup>3</sup>	Centimeter cube
CMA	Champignon mycorhizien à arbuscules
CO	Monoxyde de carbone
COV	Composés organiques halogénés volatils
Cr	Chrome

---

---

CS :	Couche de la paroi sporale
Cu	Cuivre
Cu SO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	Sulfate de cuivre pentahydrate
Cy	Cyclique
i	Iso
a	Antéiso
dG	Désoxyguanosine
DHm	DésHydrogénase mitochondriale
E	Est
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
EDTA, 2 Na	Sel de sodium de l'EDTA
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
ETM	éléments traces métalliques
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
Fe	Fer
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	sulfate ferreux heptahydraté
FID	<i>Flame ionisation detector</i> (ionisation de flamme)
Fm	<i>Funneliformis mosseae</i>
g	Gramme
GC	<i>Gas chromatography</i> (chromatographie en phase gazeuse)
GR	Glutathion réductase
GR24	strigolactone synthétique
GSH	Glutathion forme réduite
GSSH	Glutathion forme oxydée
H	Hydrogène
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Acide borique
ha	Hectare
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCl	Chlorure d'hydrogène
Hg	Mercure
KCl	Chlorure de potassium
Kg	Kilogramme
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium monobasique
KI	Iodure de potassium
KNO <sub>3</sub>	Nitrate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
L.	Linné
L'	Radical lipidique
LCO	Lipo-chitooligosaccharides
LDH	Lactate DésHydrogénase
LH	Acides gras polyinsaturés
LOO'	Radical libre peroxylé
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
LSD	<i>Least Significant Difference</i>
M	Mole
m <sup>2</sup>	Mètre carré
MDA	Malondialdéhyde
mg	Milligramme

---

---

Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	Sulfate de magnesium heptahydrate
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimole
mm	Millimètre
Mn	Manganèse
Mn Cl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	Chlorure de magnésium tétrahydrate
MO	Matière organique
MPN	Most probable number
ms	Millisiemens
N	Nord
N	Azote
Na	Sodium
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	Molybdate de sodium dihydrate
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Ammoniac
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
Ni	Nikel
nm	Nanomètre
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrate
NO <sub>x</sub>	Oxydes d'azote
O <sub>2</sub>	Oxygène moléculaire
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical superoxyde
OOH	Peroxyde (d'acide gras)
P	Phosphore
P1	Parcelle 1
P2	Parcelle 2
P3	Parcelle 3
P4	Parcelle 4
Pb	Plomb
PCB	Polychlorobiphényles
PCDD/F	Polychlorodibenzodioxines/Furanes
pH	Potentiel d'hydrogène
Pi	Phosphore inorganique
PL	Phospholipides
PNUE	Programme des Nations Unies pour l'Environnement
POD	Perodydase
PPA	<i>PrePenetration Apparatus</i> (appareil de pré-pénétration)
PS I	Photo système I
rpm	<i>Rotation per minute</i> (tour par minute)
SCHS	Société des Ciments Hdjar Soud
Se	Selenium
SLs	Strigolactones
SO <sub>2</sub>	Dioxyde de soufre
SOD	Superoxyde dismutase
SSP	Super simple phosphate
STP	Super triple phosphate
SZE	Solrize
TBA	Acide thiobarbiturique
U	Unité
UV	Ultra violet

---

---

Zn	Zinc
Zn SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	Sulfate de zinc heptahydrate

---

---

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> Schéma montrant les différences entre les ecto- et les endomycorhizes (Bonfante & Genre, 2010a).....	6
<b>Figure 2</b> Principales formes de mycorhizes associées aux racines des plantes supérieures (Hallé, 2008, figure modifiée d'après Le Tacon, 1985).....	7
<b>Figure 3</b> Phylogénie des champignons basée sur la séquence de la SSU rRNA (Schüßler et al., 2001).9	
<b>Figure 4</b> Arbre phylogénique des Glomeromycota (Schüßler et Walker, 2010), modifié par Schüßler ( <a href="http://schuessler.userweb.mwn.de/geosiphon/geosiphon_home.html">http://schuessler.userweb.mwn.de/geosiphon/geosiphon_home.html</a> ) .....	10
<b>Figure 5</b> Cycle de développement des CMA (Akiyama, 2007).....	12
<b>Figure 6</b> Structures chimiques de strigolactones naturelles. (A) 5-deoxy-strigol, (B) 4 strigolactones naturelles (Akiyama et Hayashi, 2006) .....	13
<b>Figure 7</b> Structures chimiques des lipo-chitooligosaccharides (LCO). .....	14
<b>Figure 8</b> Schéma des différentes étapes de colonisation des champignons MA (adapté d'après Bonfante & Genre 2010) .....	15
<b>Figure 9</b> Formation de l'appareil présymbiotique (Parniske, 2008).....	16
<b>Figure 10</b> Les deux types de colonisation racinaires .....	17
<b>Figure 11</b> Schéma récapitulant les principaux processus d'échanges de nutriments dans l'ensemble des symbioses mycorhiziennes (Bonfante & Genre, 2010).....	18
<b>Figure 12</b> Les différentes intersections possibles entre l'axe de l'objectif du microscope et les structures fongiques dans un fragment racinaire mycorhizé par les CMA.....	53
<b>Figure 13</b> Quantité des AGPL bactériens (Gram - et Gram +) dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.....	62
<b>Figure 14</b> Teneur en acides gras associés aux phospholipides (AGPL) 16:1 $\omega$ 5 et en acides gras associés aux lipides neutres (AGLN) 16:1 $\omega$ 5 dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.....	63
<b>Figure 15</b> le rapport AGLN 16:1 $\omega$ 5 à AGPL16:1 $\omega$ 5 dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4 .....	63
<b>Figure 16</b> Quantité des AGPL 18 :2 $\omega$ 6,9 dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4 .....	64
<b>Figure 17</b> Quantité d'ergostérol dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.....	64
<b>Figure 18</b> Taux de colonisation total, arbusculaire et vésiculaire des racines des plants de tomate dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.....	70
<b>Figure 19</b> Taux de colonisation mycorhizienne de la tomate inoculée par Fm et SZE et cultivée en absence (0 %) et en présence des concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	78

<b>Figure 20</b> Taux de colonisation mycorhizienne du blé inoculé par Fm et SZE et cultivé en absence (0 %) et en présence des concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)	79
<b>Figure 21</b> Biomasses sèches des parties aériennes de la tomate mycorhizée et non-mycorhizée cultivée en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)	80
<b>Figure 22</b> Biomasses sèches des parties racinaires de la tomate mycorhizée et non-mycorhizée cultivée en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)	80
<b>Figure 23</b> Biomasses sèches des parties aériennes du blé mycorhizé et non-mycorhizé cultivé en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)	81
<b>Figure 24</b> Biomasse sèches des parties racinaires du blé mycorhizé et non-mycorhizé cultivé en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)	81
<b>Figure 25</b> Cinétique de germination des spores de <i>R. irregularis</i> cultivées pendant 30 jours en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %)	94
<b>Figure 26</b> Longueurs hyphales moyennes des spores de <i>R. irregularis</i> , après 30 jours d'incubation en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %)	94
<b>Figure 27</b> Mode de germination des spores de <i>R. irregularis</i> , observées après 30 jours d'incubation en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %)	95
<b>Figure 28</b> Taux de colonisation totale, arbusculaire, vésiculaire et hyphale des racines de chicorée mycorhizées par <i>R. irregularis</i> , cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25)	96
<b>Figure 29</b> Longueurs hyphales extraracinaires et nombre moyen de spores de <i>R. irregularis</i> , cultivé en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25)	97
<b>Figure 30</b> Concentration de MDA dans les racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées par le CMA <i>R. irregularis</i> , et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25 %)	99
<b>Figure 31</b> Activité de la SOD dans les racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées par le CMA <i>R. irregularis</i> , et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25 %)	99
<b>Figure 32</b> Activité de la POD dans les racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées par le CMA <i>R. irregularis</i> , et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25 %)	100

---

## LISTE DES PHOTOS

<b>Photo 1</b> Repiquage des racines de chicorée <i>in vitro</i> .....	48
<b>Photo 2</b> Culture en pot de la tomate mycorhizée et non mycorhizée par Fm et SZE .....	50
<b>Photo 3</b> Culture en pot du blé mycorhizé et non mycorhizé par Fm et SZE .....	50
<b>Photo 4</b> Modes de germination des spores de <i>R. irregularis</i> observés au microscope optique a : mode ramifié, b : mode linéaire.....	95

---

## LISTE DES TABLEAUX ET DES PLANCHES

<b>Tableau 1</b> Classification des Gloméromycota (Redecker & Schüßler, 2014).....	10
<b>Tableau 2</b> Nombre relatif et biomasse approximative du microbiote du sol (Metting, 1992).....	27
<b>Tableau 3</b> Tableau récapitulatif des effets des polluants sur les stades de développement des CMA (Lenoir et al. (2016).....	30
<b>Tableau 4</b> Etapes de la coloration des structures fongiques .....	45
<b>Tableau 5</b> Composition du milieu M (Bécard & Fortin, 1988).....	47
<b>Tableau 6</b> Les différents traitements de l'expérience en microcosmes .....	49
<b>Tableau 7</b> Caractérisation physico-chimique des sols des quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.....	60
<b>Tableau 8</b> Quantité des éléments traces métalliques (ETM) en mg.Kg <sup>-1</sup> de sol dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. ....	61
<b>Tableau 9</b> Nombre de Propagules dans les quatre parcelles (P1, P2, P3 et P4) .....	65
<b>Tableau 10</b> Nombre de spores de CMA identifiées dans les parcelles P1, P2, P3 et P4.....	66
<b>Tableau 11</b> Classification des espèces de CMA autochtones (www.mycobank.org).....	68
<b>Tableau 12</b> Concentration de MDA dans les feuilles et les racines de tomate mycorhizée (Fm, SZE) et non mycorhizée (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	82
<b>Tableau 13</b> Activité de la SOD dans les feuilles et les racines de tomate mycorhizée (Fm, SZE) et non mycorhizée (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	83
<b>Tableau 14</b> Activité de la POD dans les feuilles et les racines de tomate mycorhizée (Fm, SZE) et non mycorhizée (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	84
<b>Tableau 15</b> Concentration de MDA dans les feuilles et les racines de blé mycorhizé (Fm, SZE) et non mycorhizé (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	85
<b>Tableau 16</b> Activité de la SOD dans les feuilles et les racines de blé mycorhizé (Fm, SZE) et non mycorhizé (NM), et cultivé en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	85
<b>Tableau 17</b> Activité de la POD dans les feuilles et les racines de blé mycorhizé (Fm, SZE) et non mycorhizé (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %).....	86

**Tableau 18** Longueurs racinaires et biomasses sèches des racines de chicorée mycorhizées (M) ou non (NM), après 9 semaines de culture en absence ou en présence de différentes concentrations de diesel (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %)..... 98

**Planche 1** Spores de champignons mycorhiziens à arbuscules isolées des quatre parcelles P1, P2, P3 et P4..... 69

# **Introduction générale**

## INTRODUCTION GENERALE

Le sol constitue le milieu de vie permanent d'une multitude d'êtres vivants dont la plupart sont des microorganismes. La diversité des microorganismes y est considérable. Un sol peut contenir plusieurs dizaines à plusieurs centaines de milliers d'espèces bactériennes et fongiques. Dans un gramme de sol en bonne santé, les bactéries peuvent présenter jusqu'à 1 milliard d'individus et les champignons jusqu'à 1 million d'individus (Alabouvette et al., 2009), ce qui correspond à des biomasses approximatives de 3000 et 5000 Kg par hectare de sol respectivement (Metting, 1992). La distribution des microorganismes du sol est fonction, entre autres, des caractéristiques physico-chimiques de ce dernier.

Les microorganismes du sol remplissent des fonctions environnementales essentielles telles la décomposition de la matière organique, libérant ainsi, des nutriments disponibles pour les plantes. Ils jouent également un rôle crucial dans la formation des sols et leur évolution, la dégradation des polluants organiques et l'amélioration de la croissance des végétaux. Les microorganismes vivant en symbioses avec les racines des plantes jouent un rôle majeur dans la nutrition de ces dernières. Parmi les microorganismes symbiotiques, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) s'associent avec plus de 80 % des plantes terrestres (Smith & Read, 2008a). Ils sont considérés comme des acteurs clés des services écosystémiques. Grâce à leur réseau mycélien, les CMA améliorent l'absorption de l'eau et des éléments minéraux chez la plante (Paul Schreiner, 2007; Mardukhi et al., 2011; Labidi et al., 2012). Ils augmentent la tolérance des plantes vis-à-vis des stress abiotiques tels que les polluants (Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009; Lenoir et al., 2016), et biotiques tels que les agents phytopathogènes (Dalpé, 2005). Il a été également démontré que ces champignons facilitent l'installation des plantes dans les sols pollués et contribuent à l'élimination des polluants en stimulant l'activité des populations microbiennes rhizosphériques (Joner & Leyval, 2003; Verdin et al., 2006; Lenoir et al., 2016).

La FAO (*Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) définit la santé des sols comme étant: «La capacité du sol à fonctionner comme un système vivant ». La santé du sol fait référence à l'abondance, la diversité et l'activité des organismes vivants qui participent à son fonctionnement et à sa fertilité. Les sols en bonne santé maintiennent en leur sein une diversité d'organismes qui contribuent à combattre les maladies des plantes, les insectes et les adventices. Certains de ces microorganismes telluriques s'associent de façon

symbiotique aux racines et contribuent ainsi à améliorer la productivité végétale. En revanche, on considère qu'un sol est pollué lorsqu'il présente un risque pérenne, réel ou potentiel pour la santé des organismes vivants (Homme, animaux, plantes, bactéries et champignons) du fait d'une pollution résultant de dépôts de déchets, de retombées de rejets atmosphériques ou d'infiltration de substances polluantes. Un changement de l'état de santé du sol impacte négativement le fonctionnement des microorganismes vivants ce qui entraîne une diminution de sa fertilité et par conséquent, une chute de la production végétale.

Le potentiel de production des sols agricoles diminue sous l'effet de divers facteurs de dégradation du sol dont la pollution. La FAO estime que près de la moitié des sols du monde sont déjà dégradés à cause des activités anthropiques. Parmi les principales sources de contamination des sols figurent, outre les activités agricoles et urbaines, les activités industrielles telles que la métallurgie, l'industrie chimique, l'industrie minière, les activités de transport, de stockage et de distribution des produits pétroliers, ainsi que la combustion des produits pétroliers tels que le diesel.

L'accumulation dans le sol de divers polluants conduit à sa contamination et modifie ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. Les conséquences de telles perturbations entraînent bien souvent la perte irréversible de la biodiversité des microorganismes telluriques, accentuant le dysfonctionnement des écosystèmes.

La partie nord de l'Algérie, du littoral au massif montagneux de l'Atlas tellien, occupe 4 % de la superficie totale et dispose d'un tiers des superficies cultivées du pays lesquelles sont menacées par la concentration excessive de la population et des activités industrielles. Ces terres sont plus fertiles que dans le reste du pays et exploitées principalement pour la production des céréales et des plantes maraichères. Cependant, des rapports récents confirment que l'Algérie perd annuellement dans sa partie nord une superficie agricole utile de 300.000 ha à cause de facteurs naturels et anthropiques.

La région d'Annaba compte plus de 80 unités industrielles dont certaines sont implantées sur des sols agricoles connus jadis pour détenir des taux élevés de productivité. Parmi les plus grandes unités industrielles figurent le complexe Sidérurgique ArcelorMittal Algérie (AMA) d'El-Hadjar, mis en service depuis 52 ans, qui s'étend sur une superficie de plus de 832 ha de terre agricole, la Société Algérienne des Fertilisants Fertial, en activité depuis 32 ans, avec une superficie de 103 ha et la Société des Ciments de Hdjar Soud (SCHS)

implantée dans la wilaya de Skikda depuis 43 ans, sur une superficie de plus de 29 ha de terre agricole.

La plupart des études réalisées dans la région d'Annaba ont porté sur l'évaluation de la contamination par divers polluants organiques et inorganiques des eaux des oueds qui traversent les sols agricoles (Derradji et al., 2007; Chaoui et al., 2013; Zenati et al., 2013; Reggam et al., 2015). Cependant, l'étude des effets de ces polluants sur les sols eux-mêmes sont embryonnaires. C'est pourquoi, le premier objectif de la présente thèse consiste en l'évaluation de la biomasse microbienne à la fois fongique (champignons mycorhiziens à arbuscules, ectomycorhiziens et saprotrophes) et bactérienne ainsi que la diversité des CMA vivant en symbiose avec les racines de plants de tomate dans des parcelles agricoles situées à proximité des trois installations industrielles précédemment citées, et dans une parcelle témoin située à Séraïdi, en dehors de la zone industrielle.

Le second objectif de la thèse est basé sur le fait que la pollution du sol pourrait avoir des effets délétères sur les cultures agricoles. A cet effet, et grâce à un dispositif expérimental en microcosmes, une étude de l'impact d'une pollution du sol par le diesel sur la croissance de deux types de plantes cultivées dans les agro-écosystèmes Annabis (la tomate et le blé) ainsi que sur l'efficacité de l'apport d'inoculum mycorhiziens arbusculaires commerciaux dans la croissance et la protection des plantes contre la phytotoxicité du diesel est envisagée.

Enfin, le troisième objectif vise à comprendre les mécanismes fondamentaux cytologiques et biochimiques impliqués dans les effets négatifs du diesel sur le développement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules et de chacun de ses deux partenaires. Pour cela, des cultures monoxéniques *in vitro* sur le modèle *Rhizophagus irregularis*/racines transformées permettront de formuler quelques éléments de réponse.

Cette thèse est organisée en trois parties :

**La partie I** est une analyse de la littérature scientifique concernant les CMA. Les différentes sources de la pollution anthropique et ses impacts sur les communautés microbiennes du sol, notamment les CMA y sont traités. Les principaux mécanismes (stress oxydant et systèmes antioxydants) induits par les stress abiotiques, en particulier la pollution y sont également définis.

**La partie II** décrit les méthodologies expérimentales utilisées lors de ce travail pour répondre aux questions posées.

**La partie III** est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leur analyse. Elle comporte trois chapitres. Le premier porte sur l'étude de la biomasse microbienne ainsi que la biodiversité et l'abondance des CMA des sols provenant de parcelles agricoles situées à proximité de sites industriels dans la région d'Annaba et de Skikda. Le deuxième chapitre aborde l'impact de la pollution par le diesel sur la croissance de la tomate et le blé et la contribution de l'inoculation mycorhizienne arbusculaire dans la protection de ces plantes contre le stress induit par ce polluant. Le dernier chapitre est consacré à l'étude des mécanismes cytologiques et biochimiques qui pourraient être à l'origine de l'impact négatif du diesel sur l'établissement de la symbiose mycorhizienne et sur le développement de ses deux partenaires.

Enfin, ce manuscrit se termine par une conclusion générale, des perspectives donnant quelques pistes sur la poursuite de ce travail ainsi que les références bibliographiques citées dans ce manuscrit. Les différentes valorisations et communications auxquelles j'ai participé durant mes années de thèse seront présentées en annexe.

# **Partie I**

## **Synthèse bibliographique**

## **PARTIE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE A ARBUSCULES**

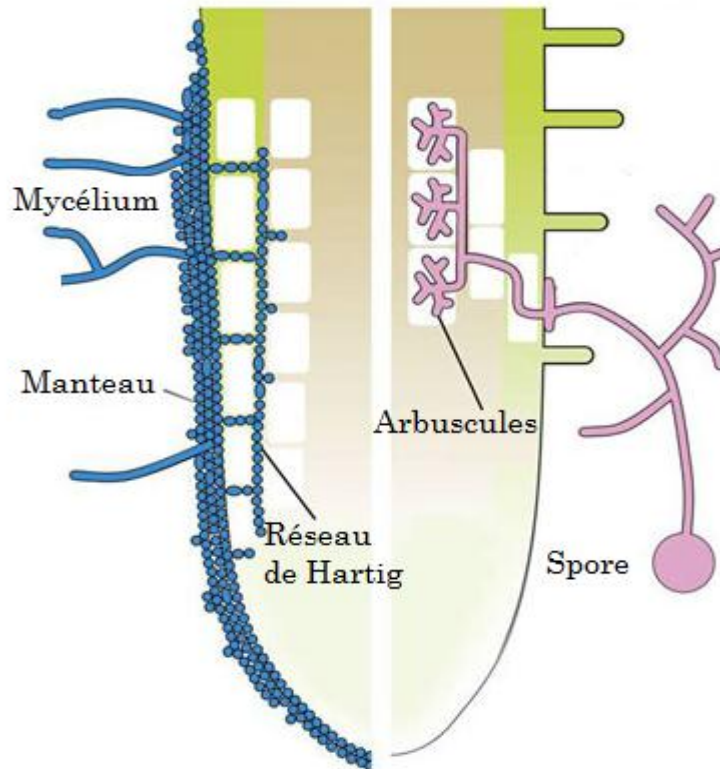
Le terme mycorhize (du grec *myco*, qui signifie champignon, et *rhiza* qui signifie racine) a été utilisé pour la première fois par le botaniste allemand Frank en 1885 pour décrire les organes mixtes racines-champignons cités par ses prédécesseurs depuis plusieurs décennies. Cependant, c'était les ectomycorhizes qui ont été d'abord reconnues comme une symbiose mutualiste entre les plantes et les champignons. En 1877, Frank a été le premier à attribuer à la mycorhize arbusculaire le statut de symbiose '*symbiotismus*' (du grec *sym* qui signifie ensemble, et *bio* qui signifie vie) comme un terme neutre n'impliquant pas de parasitisme mais qui est basé sur la coexistence régulière d'organismes différents.

La façon avec laquelle le champignon interagit avec les racines de la plante hôte, et en particulier la nature de l'interface qui se forme entre la plante hôte et le champignon confère à la mycorhize une organisation qui lui est propre. Ainsi, trois grands types de symbioses mycorhiziennes peuvent être distingués.

#### **- La symbiose ectomycorhizienne**

Les hyphes fongiques ne pénètrent pas dans les cellules mais s'insinuent dans les espaces intercellulaires épidermiques corticaux pour former un système complexe appelé réseau de Hartig (Fig. 1). Ce réseau constitue le siège des échanges nutritifs bidirectionnels entre le champignon et la plante (Burgess et al., 1994; Dell et al., 1994; Smith & Read, 1997a). Les hyphes extraracinaires recouvrent complètement la radicule pour former un manteau d'hyphes étroitement entrelacées, à partir duquel elles prolifèrent et s'étendent dans le sol à la recherche des éléments nutritifs.

Plus de 5000 espèces de champignons appartenant principalement aux Basidiomycètes, mais aussi aux Ascomycètes et Zygomycètes forment des ectomycorhizes avec les plantes des familles *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae*, et *Tiliaceae* ainsi que des espèces des *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Ericaceae*, *Juglandaceae*, et autres familles (Brundrett, 2002).



**Figure 1** Schéma montrant les différences entre les ecto- et les endomycorhizes (Bonfante & Genre, 2010a)

Bien que les espèces concernées par cette symbiose ne représentent qu'environ 3 % des espèces végétales (Riedacker, 1993), les ectomycorhizes prédominent dans les écosystèmes des régions tempérées et boréales et dans les forêts des régions tropicales et subtropicales (Smith & Read, 1997a), et présentent souvent un certain niveau de spécificité.

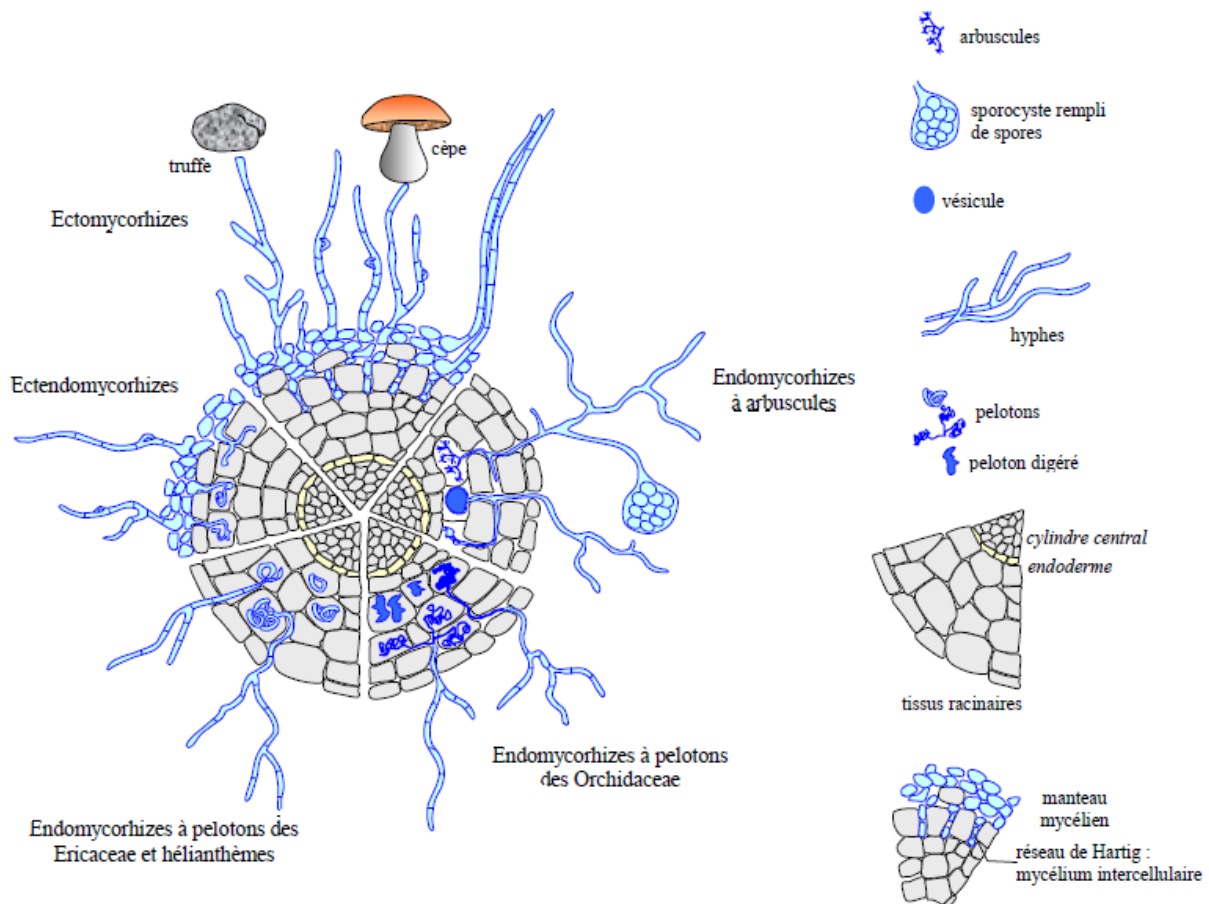
#### - La symbiose ectendomycorhizienne

Les ectendomycorhizes sont des formes intermédiaires qui possèdent à la fois les caractéristiques des ectomycorhizes, c'est-à-dire, un réseau de Hartig bien développé et un manteau fongique plus ou moins épais, ou absent dans quelques cas, et les caractéristiques des endomycorhizes soit, la pénétration à l'intérieur des cellules corticales par les hyphes (Laiho, 1965; Mikola, 1965; Yu et al., 2001). Ces derniers, présentent à l'intérieur des cellules différents degrés de prolifération. Ils sont soit très courts (mycorhizes monotropoïdes), ou sous forme de pelotons (mycorhizes arbutoïdes).

Les champignons ectendomycorhiziens appartiennent aux deux ordres d'Ascomycètes, Pezizales et Leotiales (Yu et al., 2001). Quelques espèces de Basidiomycètes peuvent former ce type de mycorhize.

### - La symbiose endomycorhizienne

A l'inverse des ectomycorhizes, les hyphes des endomycorhizes pénètrent à l'intérieur des cellules où leur prolifération conduit à la formation d'arbuscules ou de pelotons. Le réseau de Hartig et le manteau fongique sont absents, seul un lâche réseau d'hyphes extraracinaire entoure les racines. Il existe plusieurs types d'endomycorhizes qui diffèrent en de nombreux points. Les plus connus sont, les endomycorhizes à arbuscules, les endomycorhizes éricoïdes et les endomycorhizes orchidoïdes (Fig. 1).



**Figure 2** Principales formes de mycorhizes associées aux racines des plantes supérieures (Hallé, 2008, figure modifiée d'après Le Tacon, 1985)

Les mycorhizes à arbuscules représentent le type mycorhizien le plus ancestral et le plus répandu dans la flore actuelle (Smith & Read, 1997b). Elles ont d'abord été reconnues et décrites dans les dernières décennies du XIXe siècle en tant que mycorhizes endotrophiques

ou mycorhizes vésiculaires-arbusculaires (Redecker & Schüßler, 2014). Le terme vésiculaire a finalement été abandonné car il est devenu clair que certains taxa ne forment pas de vésicules. Le terme arbusculaire, retenu pour désigner ce type de mycorhizes, réfère aux structures situées à l'intérieur des cellules corticales des racines appelées arbuscules (arbres nains) (Fig. 2). La grande majorité des plantes terrestres (environ 80 % des espèces végétales) sont capables de former des mycorhizes arbusculaires (Brundrett, 2009). Seules quelques plantes ne forment pas d'associations mycorhiziennes ; les plantes vasculaires aquatiques et les membres des familles *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*, *Portulacaceae*, *Urticaceae*. Ce type de mycorhizes est assuré par un petit nombre de CMA caractérisés par leur spécificité d'association relativement faible envers leurs hôtes (Smith & Read, 1997b). Cependant il y a des différences spécifiques dans la réponse des plantes aux CMA et vis-versa (van der Heijden et al., 1998).

### **1.1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules**

Il semble que les champignons mycorhiziens à arbuscules datent de plus de 1000 million d'années. Ils ont probablement joué un rôle important dans la colonisation des milieux terrestres par les plantes grâce à leur rôle dans l'absorption des éléments nutritifs (Smith & Read, 2008a).

Leur croissance est essentiellement hypogée, mais certains CMA forment des sporocarpes, fructifient à la surface du sol (Redecker & Schüßler, 2014). La reproduction des CMA est asexuée et est assurée par les spores. Cependant, quelques groupes se reproduisent par les hyphes ou les fragments racinaires déjà colonisés. On utilise le terme propagule pour désigner ces structures puisque elles servent toutes à la propagation de l'espèce (Fortin et al., 2008). Leurs spores multinuclées et riches en globules lipidiques et protéiques sont relativement grandes. Elles se rencontrent séparées ou dans des sporocarpes (Redecker & Schüßler, 2014) avec un diamètre compris entre 22 et 1 050  $\mu\text{m}$  (Souza, 2015).

#### **1.1.1. Taxonomie des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules**

En se basant sur des analyses moléculaires, les CMA qui faisaient partie du phylum des Basidiomycètes, ont été déplacés dans un nouvel embranchement créé spécialement pour eux, les Gloméromycètes (Fig. 3) (Schüßler & Walker, 2010).

Différentes clés d'identification basées sur les caractéristiques morphologiques des spores ont été proposées. Les plus importantes étaient les clés de Trappe (1982), Hall & Fish (1979), et Schenck & Perez (1989). Walker (1983) a proposé une nouvelle terminologie pour la description des espèces sur la base des types distincts de parois formés par les spores. Une classification basée sur les caractéristiques phénotypiques (morphologie des spores et caractéristiques de mycorhization) a été plus tard proposée par Morton et Benny (1990) qui ont été les premiers à introduire l'ordre des Glomales dans les zygomycètes.

La taxonomie basée sur des analyses moléculaires, en particulier sur l'analyse de la sous unité ribosomique de l'ARN 18S, a permis de constituer l'arbre phylogénétique des Glomyromycètes (Fig. 4). Cet embranchement compte à ce jour plus de 250 espèces décrites regroupées en 4 ordres : les *Glomerales*, les *diversisporales* et deux lignées plus anciennes ; les *Paraglomerales* et les *Archeosporales* (Tab. 1). La famille *Entrophosporaceae* dont la position dans la taxonomie des CMA n'est pas encore totalement définie, est décrite comme étant une *familia incertae sedis* (famille de position incertaine) n'appartenant à aucun des 4 ordres précédemment cités (Redecker & Schüßler, 2014).

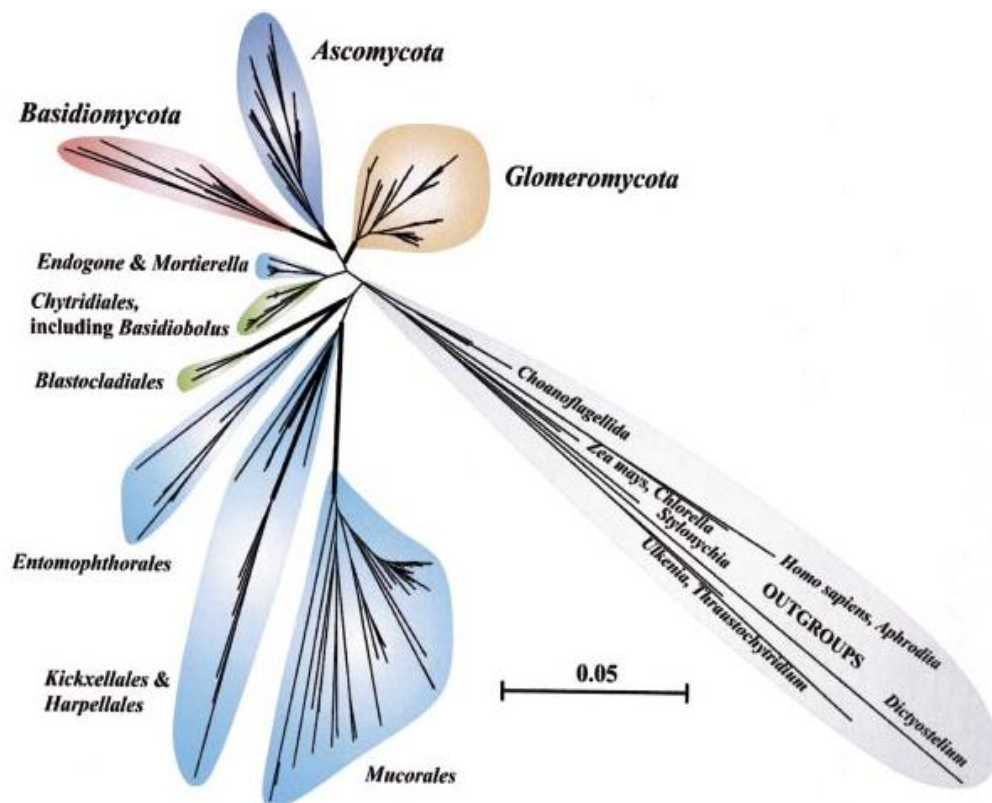
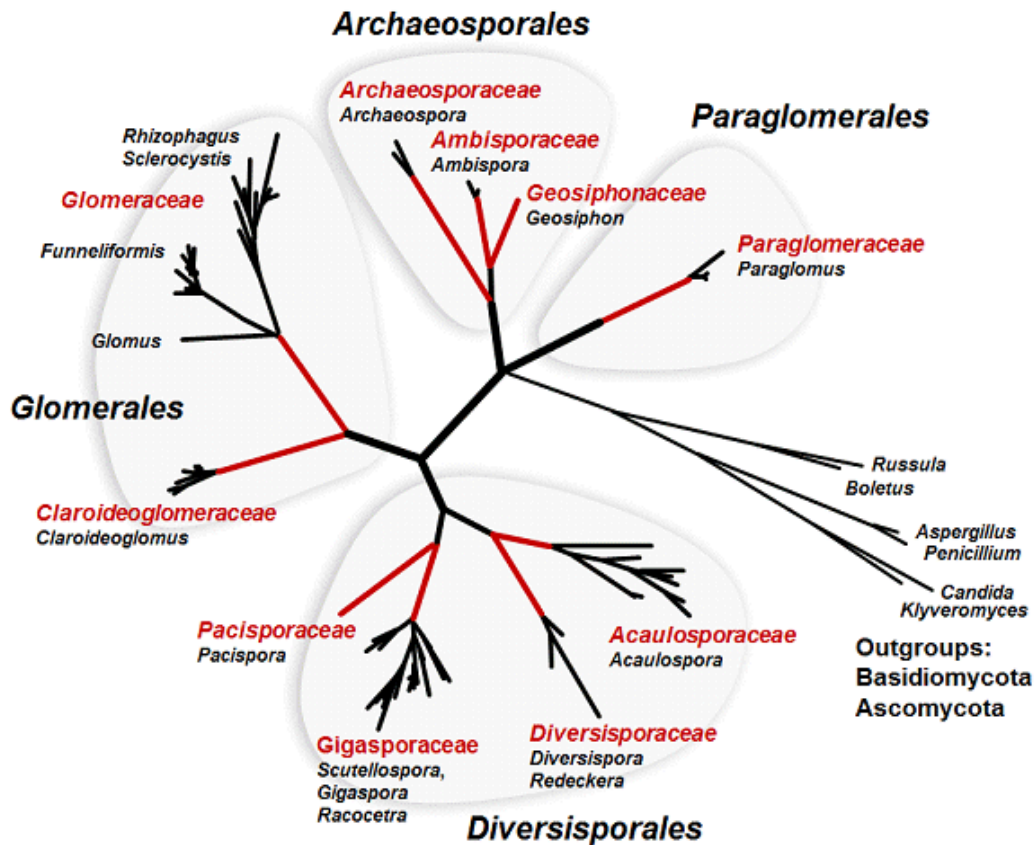


Figure 3 Phylogénie des champignons basée sur la séquence de la SSU rRNA (Schüßler et al., 2001).



**Figure 4** Arbre phylogénique des Glomeromycota (Schüßler et Walker, 2010), modifié par Schüßler ([http://schuessler.userweb.mwn.de/geosiphon/geosiphon\\_home.html](http://schuessler.userweb.mwn.de/geosiphon/geosiphon_home.html))

**Tableau 1** Classification des Glomérormycota (Redecker & Schüßler, 2014)

Ordre	Famille	Nombre approximatif d'espèces
Glomerales	<i>Glomeraceae</i>	108
	<i>Claroideoglomeraceae</i>	6
Diversisporales	<i>Diversisporaceae</i>	10
	<i>Gigasporaceae</i>	53
	<i>Acaulosporaceae</i>	38
	<i>Pacisporaceae</i>	7
	<i>Archaeosporaceae</i>	2
Archaeosporales	<i>Ambisporaceae</i>	9
	<i>Geosiphonaceae</i>	1
	<i>Paraglomeraceae</i>	3
Paraglomerales	<i>Paraglomeraceae</i>	3
Familia incertae sedis	<i>Entrophosporaceae</i>	3

### 1.1.2. Cycle de développement des champignons mycorhiziens à arbuscules

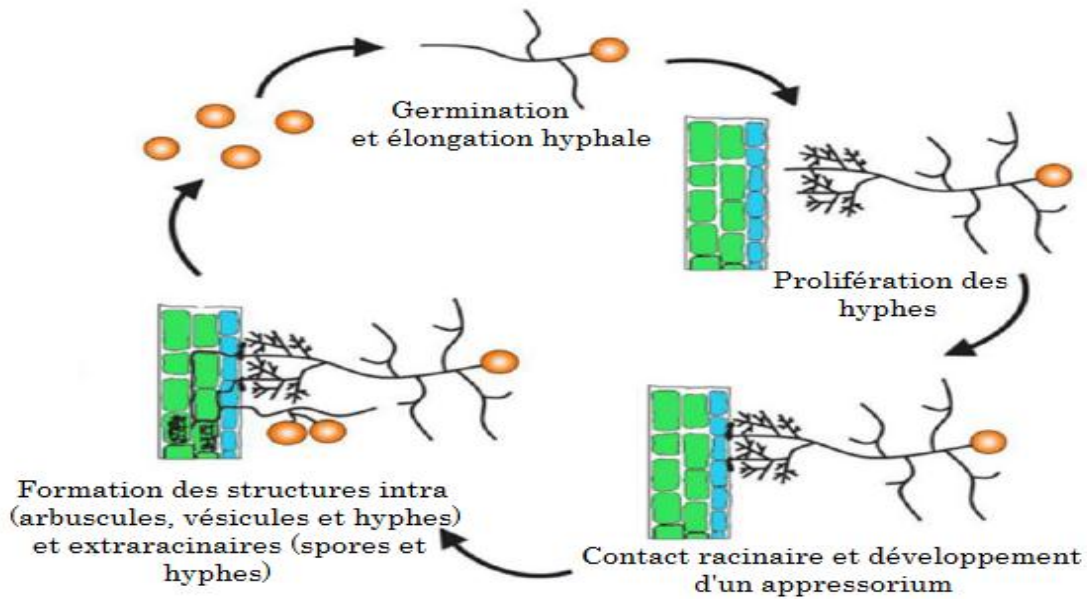
Le cycle de développement des CMA peut être divisé en deux phases : (i) la phase présymbiotique comprenant la germination des spores, la ramification et le développement des hyphes germinatives, et (ii) la phase symbiotique comprenant la prolifération des hyphes à l'intérieur des racines de l'hôte et leur expansion en dehors des racines qui est accompagnée par la formation des spores. En dehors de ces deux phases, quand les conditions sont favorables, les spores des CMA peuvent germer spontanément en absence d'une plante hôte sans avoir besoin d'utiliser leurs réserves lipidiques (Bécard et al., 2004). Durant cette phase asymbiotique, le développement du tube germinatif reste très limité. Après un certain temps, le protoplasme se rétracte dans la spore et la spore entre de nouveau en dormance. Certaines spores peuvent germer jusqu'à dix fois (Koske, 1981), ce qui conduit à suggérer que durant la phase asymbiotique, les spores des CMA économisent leurs ressources énergétiques pour conserver leur potentiel de croissance et leur capacité à survivre (Logi et al., 1998). La symbiose mycorhizienne à arbuscules est une interaction complexe et très dynamique qui nécessite un grand niveau de coordination entre les deux partenaires.

- **Stade présymbiotique**

L'interaction plante-CMA est initiée dans la rhizosphère par un dialogue chimique entre les symbiotes (Fig. 5). La perception des signaux diffus par les deux partenaires leur permet de détecter leur présence respective avant tout contact physique et conduit au développement des structures fongiques (Bonfante & Genre, 2010b).

Dans le stade de pré-contact, une reconnaissance mutuelle est caractérisée par des réponses de ramification hyphale induites par les strigolactones (SLs) (Fig. 6) d'origine végétale (Akiyama et al., 2005) et l'expression des gènes de la plante induite par des molécules diffuses de signal fongique : les facteurs Myc (Fig. 7) (Kosuta et al., 2003; Kuhn et al., 2010).

Cette phase est caractérisée par une ramification abondante du tube germinatif, augmentant la probabilité de contact avec les racines et ainsi l'établissement de la symbiose (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006).

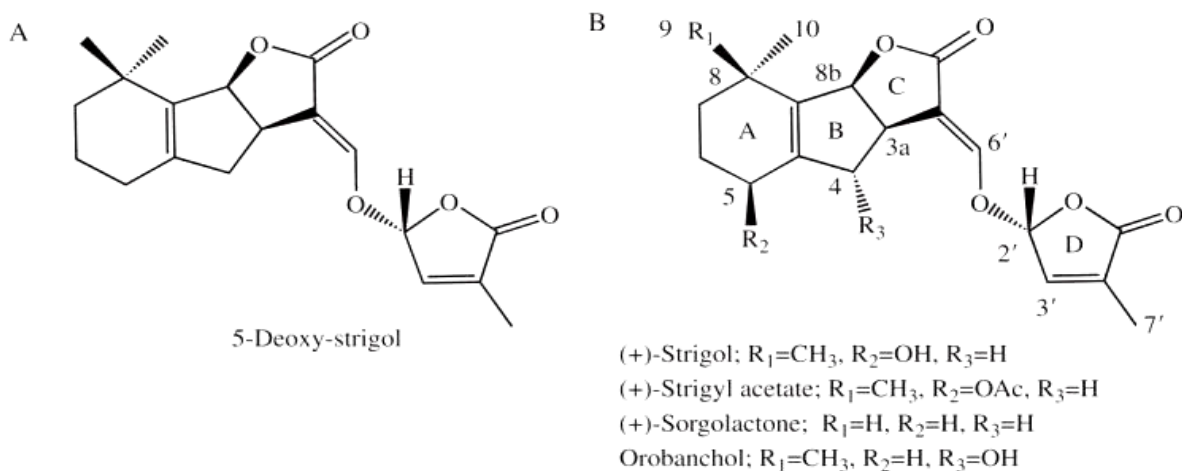


**Figure 5** Cycle de développement des CMA (Akiyama, 2007)

### *Les signaux émis par la plante*

Le CMA perçoit la présence proche d'une racine grâce aux molécules de signal diffusibles sécrétées par celle-ci (Giovannetti et al., 1993; Buée et al., 2000). L'effet stimulateur de ces molécules de signal sur les hyphes des CMA a été reconnu depuis longtemps, mais l'identité moléculaire des facteurs de ramification n'a été identifiée que récemment. Il a été trouvé que les strigolactones (Fig. 6) sécrétés par les racines de la plante sont responsables de la stimulation de la ramification (Akiyama et al., 2005) et des modifications dans la physiologie du champignon et de l'activité de la mitochondrie (Besserer et al., 2006). Le traitement des hyphes par une très faible quantité d'un strigolactone synthétique (le GR24) stimule la division nucléaire et la croissance du champignon par la stimulation du métabolisme énergétique de la mitochondrie (Buée et al., 2000; Besserer et al., 2008). En plus de leur rôle de facteur de ramification des hyphes fongiques, les strigolactones stimulent la germination des spores chez certains CMA (Besserer et al., 2006).

Il a été démontré qu'une déficience de P et de N a des effets stimulants significatifs dans la production et l'exsudation des strigolactones par la plante (Yoneyama et al., 2007; López-Ráez et al., 2008). Par exemple, il a été montré que les plantes augmentent la production des strigolactones pour promouvoir l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules sous un stress salin (Aroca et al., 2013).



**Figure 6** Structures chimiques de strigolactones naturelles. (A) 5-deoxy-strigol, (B) 4 strigolactones naturelles (Akiyama et Hayashi, 2006)

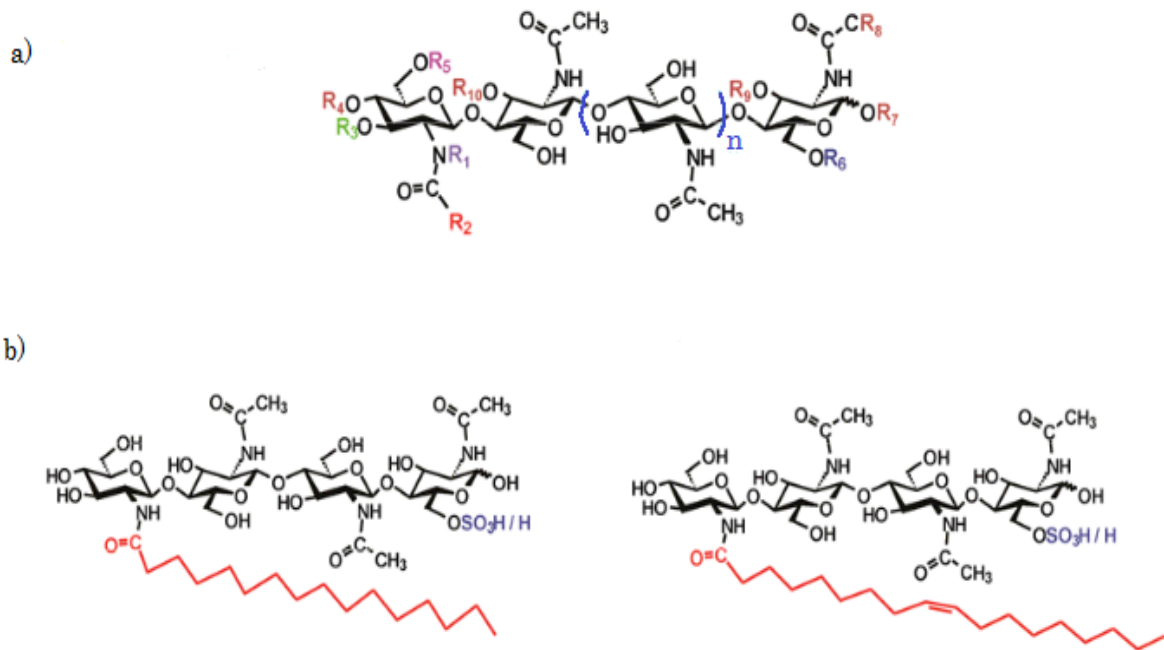
### *Les signaux émis par le champignon : Les Myc factors*

Les *Nod factors* produits par les Rhizobiums induisent de nombreuses réponses dans les racines des légumineuses. Ces réponses sont responsables de l'établissement et du développement de la symbiose Rhizobium-légumineuses. Des mutants de *Medicago truncatula* affectés dans la voie de signalisation *Nod*, se sont avérés incapables d'établir la symbiose mycorhiziennes à arbuscules, montrant le partage d'une voie SYM commune de signalisation de deux symbioses. En analogie avec les signaux rhizobiens appelés *Nod factors*, les signaux diffusibles fongiques ont été appelés *Myc factors*. (Genre et al., 2013). Pendant la croissance en direction de la racine, les CMA libèrent des *Myc factors* qui induisent la réponse des racines de la plante hôte à la symbiose ((Bonfante & Requena, 2011; Gough & Cullimore, 2011). Il semble que le *Myc factor* est un mélange de lipo-chitoooligosaccharides (LCO) sulfatés et non sulfatés (Fig. 7) (Maillet et al., 2011). Il a été démontré qu'en plus de la stimulation de l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, les *Myc factors* agissent aussi comme des régulateur de la croissance des plantes en affectant le développement des racines (Maillet et al., 2011). Les *Myc factors* pourraient donc déclencher des changements dans l'architecture racinaire pour augmenter le nombre de sites colonisés.

### *Détection des Myc factor émis par le champignon*

La détection par la plante des *Myc factors* induit la mise en place d'une régulation génétique propre à l'établissement de la symbiose. Des études sur la symbiose Rhizobium-légumineuse ont permis de caractériser plusieurs gènes essentiels pour l'initiation des deux

symbioses Rhizobium-légumineuses et endomycorhizienne (*MtDMI1*, *MtDMI2* et *MtDMI3* dans le cas de *Medicago truncatula*).



**Figure 7** Structures chimiques des lipo-chitoooligosaccharides (LCO). a) Structure générale des LCO montrant les sites des substituants chimiques (R), n est généralement 1 ou 2. b) Structure des deux Myc-LCO sulfatés ou non sulfatés majoritaires de *Rhizophagus irregularis*: LCO-IV (C :16, +/-S) et LCO-IV (C18 :1ω9, +/-S) (d'après Maillet et al., 2011).

En 2011, Maillet et al. ont montré que le champignon *R. irregularis* sécrète une faible quantité du mélange LCO appelés Myc-LCO qui stimule la mycorhization de *M. truncatula*, mais aussi de plantes non légumineuses comme *Tagetes patulaou* et les racines transformées de carotte (*Daucus carota*). Il induit également l'expression des gènes marqueurs des interactions symbiotiques et favorise la ramification des racines.

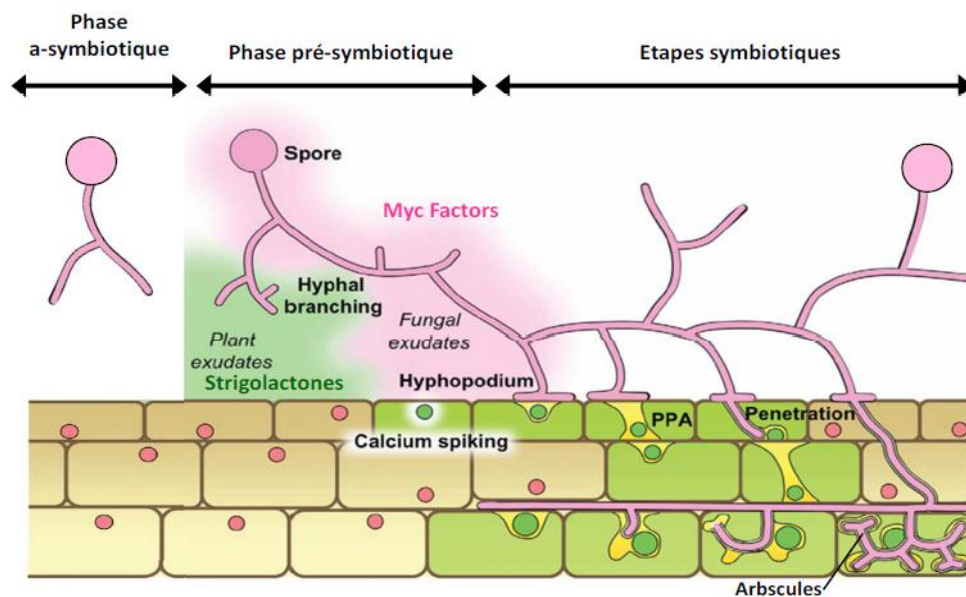
Les LCO déclenchent différentes réponses chez les racines de la plante hôte, parmi lesquelles des oscillations périodiques de la concentration en calcium au niveau des poils absorbants.

- **Stade symbiotique**

La colonisation de la racine par l'hyphe du champignon s'effectue selon un enchaînement de séquences définies que l'on peut brièvement résumer comme suit:

Les hyphes du CMA s'arrondissent et s'aplatissent sur la paroi de la racine pour former une structure particulière nommée «hyphopodium» ou appressorium (Fig. 8, 9). La formation

de cette structure indique que le champignon a reconnu une plante hôte potentielle. Durant les 4 à 6 premières heures qui suivent la formation de l'hyphopodium, un appareil de pré-pénétration (*PrePenetration Apparatus* ou PPA) se constitue (Fig. 9) (Genre et al., 2005). Le PPA est une substructure qui prédétermine le chemin de la croissance du champignon à travers la cellule végétale de la racine. La formation du PPA est précédée par la migration des noyaux des cellules végétales vers le point prévu pour l'entrée du champignon. Les noyaux se déplacent ensuite en avant du PPA comme pour guider son sens de croissance à l'intérieur de la cellule.

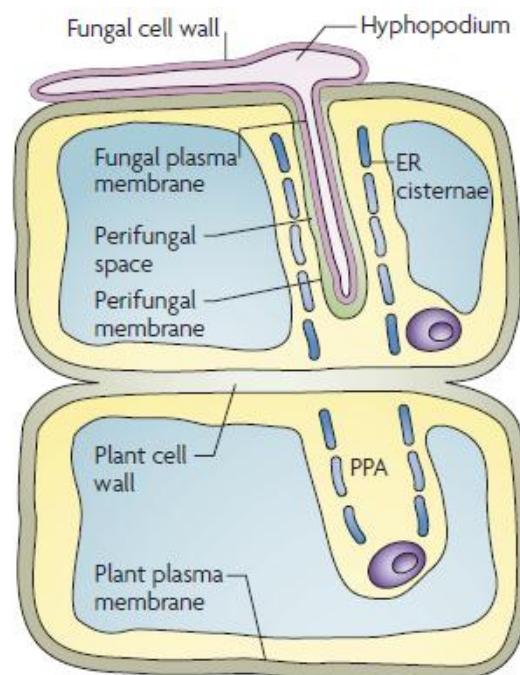


**Figure 8** Schéma des différentes étapes de colonisation des champignons MA (adapté d'après Bonfante & Genre 2010)

La phase a-symbiotique : le champignon germe et forme quelques ramifications sans l'aide ou la présence du partenaire végétal. La phase pré-symbiotique : échanges de signaux diffusibles sans contact direct entre les deux partenaires. La plante sécrète des exsudats perçus par le champignon, induisant sa ramification et son activité métabolique. Le champignon produit lui aussi des signaux perçus par les cellules racinaires, induisant des variations de teneurs en calcium dans le cytoplasme et les noyaux, ainsi que l'activation de gènes végétaux. La phase symbiotique : le champignon forme un hyphopode à la surface de l'épiderme, la plante met en place un appareil de pré-pénétration (PPA) pour guider le développement du champignon à travers les différentes couches de cellules jusqu'aux cellules du cortex interne où sont mis en place les arbuscules et où ont lieu les échanges. Ensuite le champignon peut finir son cycle de développement et former une nouvelle génération de spores.

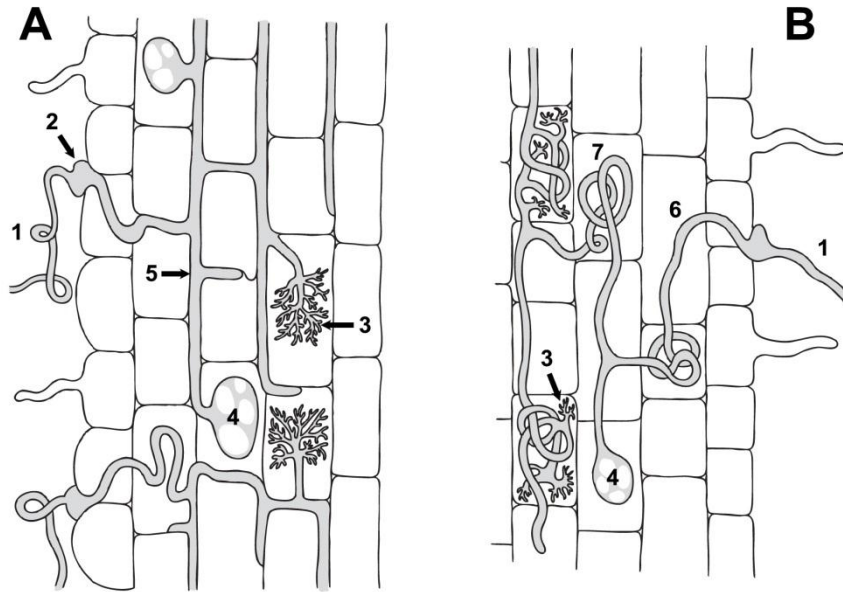
La PPA est un pont cytoplasmique épais à travers la cellule végétale. Il contient des microtubules cytosquelettiques et des microfilaments qui, ensemble avec le réticulum endoplasmique, forment un tube creux à l'intérieur du PPA. Seulement après que ce tunnel « transcellulaire » soit complet, les hyphes fongiques peuvent pénétrer les cellules de la racine jusqu'aux cellules corticales internes où le champignon forme des structures intracellulaires

hautement ramifiées en formes d'arbuscules et représentant la structure la plus importante des CMA (Parniske, 2008). Les arbuscules restent séparées du cytoplasme des cellules par une extension dérivée de la membrane plasmique, la membrane péri-arbusculaire qui entoure les ramifications hyphales constituant le site des échanges nutritionnels entre les deux partenaires (Smith & Read, 2008a). Le développement des arbuscules est accompagné par d'extrêmes changements dans la structure et les fonctions des cellules végétales. Ainsi, une cellule corticale presque entièrement remplie par une vacuole et effectuant principalement un rôle structural dans la racine, est reprogrammée par stimulation symbiotique (Harrison, 2012).



**Figure 9** Formation de l'appareil présymbiotique (Parniske, 2008)

La morphologie des structures symbiotiques intraracinaires a été classée en deux types, Paris et Arum, selon les deux plantes où ils ont été décrits pour la première fois. Dans la colonisation de type Arum, le champignon prolifère le long de la racine dans les espaces intercellulaires et l'arbuscule entre dans les cellules par les axes résultants. Dans le type Paris, le champignon diffuse de cellule à cellule, et dans de nombreux cas des pelletons d'hyphes sont formés sans ou avec des arbuscules (Fig. 10) (Bonfante & Genre, 2008). La plupart des plantes forment une structure intermédiaire entre ces deux modèles, ce qui conduit à la formulation du terme « type Arum-Paris continuum » (Dickson, 2004).

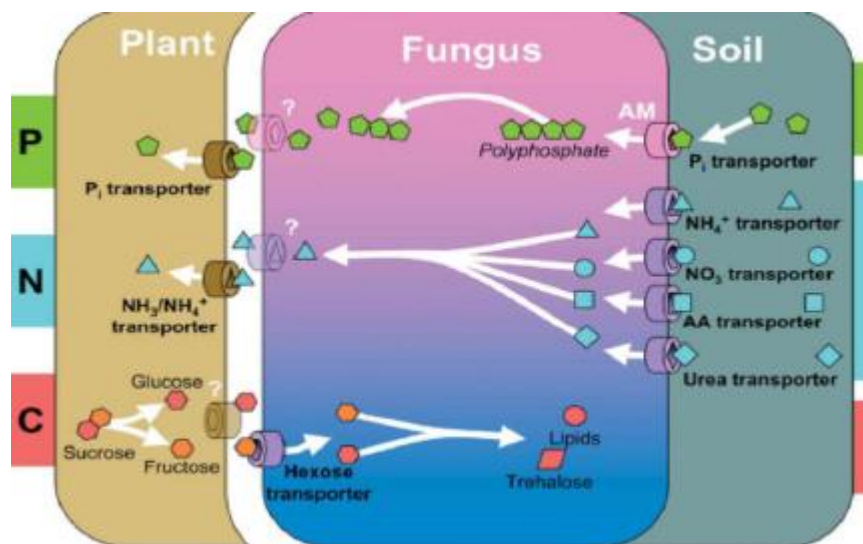


**Figure 10** Les deux types de colonisation racinaires. A : Type Arum B : type Paris. 1 : hyphe extraracinaire ; 2 : appressorium ; 3 : arbuscule ; 4 : vésicule ; 5 : hyphe intraracinaire ; 6 : hyphe intraracinaire ; 7 : peloton.

## 1.2. Bénéfices de la symbiose mycorhizienne à arbuscules

### 1.2.1. Bénéfices pour le champignon mycorhiziens à arbuscules

Les CMA sont caractérisés par un transfert bi-directionnel de nutriments. Le champignon mycorhizien (hétérotrophe) reçoit de la plante (autotrophe) des molécules carbonées issues de la photosynthèse. En échange, celui-ci lui procure les éléments minéraux (dont le phosphore et l'azote) et l'eau ainsi que d'autres nutriments puisés dans le sol (ammonium, certains oligoéléments tels le cuivre, le zinc) (Fig. 11). Les CMA dépendent entièrement de leurs partenaires pour le carbone et sont incapables de compléter leur cycle de vie en dehors de la symbiose. Des études menées dans les années 1970 en utilisant le  $^{14}\text{CO}_2$  marqué ont montré qu'une partie du  $^{14}\text{C}$  marqué passe des racines des plantes mycorhizées aux structures fongiques puis aux hyphes extraracinaires (Ho & Trappe, 1973; Bevege & Bowen, 1975; Hirrel & Gerdemann, 1979). Le carbone alloué au partenaire fongique sous forme d'hexoses est utilisé dans la croissance intra et extraracinaire du mycélium et dans la respiration. Ce transfert bidirectionnel implique donc des processus complexes au niveau de l'interface symbiotique. La localisation de ces transports, la nature des molécules transférées et les mécanismes de transfert ne sont pas encore complètement définis.



**Figure 11** Schéma récapitulant les principaux processus d'échanges de nutriments dans l'ensemble des symbioses mycorhiziennes (Bonfante & Genre, 2010). Les interfaces entre les trois compartiments sol, champignon et racine sont représentées. Le P inorganique ( $\text{P}_i$ ) et les formes d'N organique ou inorganique, telles que  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  et les acides aminés (AA), sont prélevés dans le sol par des transporteurs spécialisés localisés dans le mycélium extra-racinaire.  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  et  $\text{P}_i$  (après hydrolyse des groupements poly-phosphate (Poly-P) chez les CMA) sont importés au niveau de l'interface symbiotique au niveau des arbuscules chez les CMA vers les cellules végétales grâce à des transporteurs spécifiques. Les transporteurs d'hexoses importent le carbone (C) de la plante jusqu'au champignon.

L'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules présente un coût énergétique pour l'hôte : il a été estimé que près de 20 % du carbone fixé par la plante durant la photosynthèse est alloué au partenaire fongique sous forme de divers hexoses (glucose, mannose, galactose, fructose, xylose, saccharose) (Jakobsen & Rosendahl, 1990; Schüßler et al., 2006, 2007; Doidy et al., 2012; Helber et al., 2011). Une telle perte énergétique ne peut correspondre à un caractère sélectif adaptatif bénéfique que s'il est compensé par un apport très efficace en eau et en éléments minéraux apportés par le champignon (Walder et al., 2012). Pour éviter qu'un des deux partenaires ne prenne l'avantage sur l'autre, une régulation fine des échanges et de l'invasion des tissus par le champignon est mise en place par la plante (Kiers et al., 2011; Balzergue et al., 2011).

### 1.2.2. Bénéfices pour la plante

- **Amélioration de la croissance et de la nutrition des plantes**

La stratégie naturelle de l'acquisition des éléments nutritifs par les plantes terrestres est la symbiose avec les CMA. Le réseau hyphale externe des CMA joue un rôle important dans l'absorption des éléments nutritifs, surtout ceux de faible mobilité dans le sol comme le phosphore (P). L'amélioration de l'absorption des éléments nutritifs chez les plantes mycorhizées conduit, dans la plupart des cas, à une amélioration de la croissance végétative.

Le réseau hyphale agit comme une extension des racines de la plante hôte, améliorant son efficacité d'explorer le sol (Gilroy & Jones, 2000). La longueur des hyphes peut atteindre 111 m.cm<sup>-3</sup> de sol (Miller et al., 1995) augmentant ainsi la surface d'échange entre la plante et son environnement. Les hyphes des CMA peuvent absorber jusqu'à 80, 25, 10 % des besoins de la plantes en phosphore, azote et potassium, respectivement (Marschner & Dell, 1994).

La croissance des plantes est liée à la disponibilité du phosphore inorganique dans la rhizosphère de la plante (Holford, 1997). Le phosphore est un composant essentiel de l'adénosine triphosphate (ATP) des acides nucléiques et des phospholipides membranaires. Le phosphore est aussi inclus dans la phosphorylation des protéines qui est un mécanisme fondamental dans la modulation de l'activité des protéines. Compte tenu de la concentration très faible du phosphore dans la solution du sol qui dépasse rarement 8 µM (Barber et al., 1962), les plantes ont souvent recours aux CMA pour améliorer son absorption (Smith et al., 2000). Les hyphes mycorhiziennes extra-racinaires absorbent le phosphore et le transportent rapidement aux structures mycorhiziennes dans les racines où il sera libéré dans l'espace péri-

arbusculaire adjacent aux cellules corticales racinaires (Smith & Smith, 1990). La contribution des mycorhizes dans l'amélioration de l'absorption du phosphore a été démontrée par plusieurs auteurs (Fraga-Beddiar & Le Tacon, 1990; Marschner & Dell, 1994; Smith et al., 2011).

L'azote est un élément indispensable à la vie de la plante. Il entre dans la synthèse de nombreuses molécules telles que les phospholipides, les coenzymes, les nucléotides et les acides aminés. Les CMA prélèvent l'azote sous sa forme ammonium (López-Pedrosa et al., 2006) et acides aminés (Cappellazzo et al., 2008) en utilisant des transporteurs spécifiques localisés au niveau des hyphes extraracinaires. Il peut également accélérer la dégradation de la matière organique afin d'en augmenter la biodisponibilité pour les plantes (Hodge et al., 2001). Une fois prélevé, l'azote est transporté jusque dans les hyphes intra-racinaires sous forme d'arginine (Jin et al., 2005).

Le potassium est impliqué dans l'activation des enzymes et le transfert d'eau et des solutés dans les tissus conducteurs (xylème et phloème) des plantes ainsi que dans la régulation de l'ouverture des stomates (Mahouachi et al., 2006).

Le calcium est un composant de la structure des membranes cellulaires et joue le rôle de médiateur secondaire dans la réponse des plantes à certains stress biotiques ou abiotiques (McAinsh & Pittman, 2009).

Le magnésium est un composant essentiel des chlorophylles et joue le rôle de coenzymes ainsi qu'un rôle fondamental dans la photosynthèse et la stabilisation des nucléotides et des acides nucléiques.

Marschner & Dell (1994) et Clark & Zeto (2000) ont trouvé que les CMA peuvent améliorer la nutrition des plantes en potassium, calcium et magnésium. Toutefois, les travaux de Lambert et al. (1979) et de Buttery et al. (1988) ont montré des réponses contradictoires des plantes mycorhizées envers l'absorption de ces éléments.

- **Protection contre le stress biotique et abiotique**

Bien que la fonction principale de la symbiose mycorhizienne est l'amélioration de la nutrition minérale des plantes, cette symbiose est connue aussi pour ses rôles dans l'amélioration de la tolérance des plantes envers les stress biotiques et abiotiques. Plusieurs études ont montré le rôle joué par les CMA dans la protection des plantes sous les stress

abiotiques tels que la salinité (Giri et al., 2008), la température (Abdel Latef & Chaoxing, 2011), le calcaire (Labidi et al., 2011), la sécheresse (Ruiz-Sánchez et al., 2010) et le compactage du sol (Miransari et al., 2008). Ils sont aussi impliqués dans l'atténuation des effets néfastes des polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Verdin et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009), les fongicides (Campagnac et al., 2010) et les éléments traces métalliques (Firmin et al., 2015). De même, les CMA interviennent dans l'amélioration de la résistance à certaines maladies cryptogamiques (Dalpé, 2005).

- **Biostabilisation du sol**

Les hyphes des CMA étant présents en quantité importante dans les sols, ils peuvent atteindre  $111 \text{ m.cm}^{-3}$  de sol (Miller et al., 1995). Ils possèdent la propriété d'agir sur la macroagrégation des constituants du sol et donc sur sa stabilité (Tisdall, 1991). En effet, ces hyphes excrètent une glycoprotéine, la glomaline, permettant l'agglomération des microagrégats d'un diamètre inférieur à  $250 \mu\text{m}$  pour former des macroagrégats stables supérieur à  $250 \mu\text{m}$  (Tisdall, 1994; Wright & Upadhyaya, 1998). La concentration de la glomaline dans les sols dépend de la plante hôte et du champignon associé (Rilling et al., 2002). La stabilité du sol ainsi produite permet de lutter contre l'érosion, la perte de nutriments et de la matière organique par lixiviation, qui sont à l'origine d'une baisse de productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

## **II. LES POLLUTIONS ANTHROPIQUES**

Le mot « pollution » est apparu vers 1860 pour désigner la pollution de l'air. Il a fallu attendre plus longtemps pour parler de pollution du sol (Massard-Guilbaud, 2010). Selon la Directive Européenne 2000/60/CE du 23 octobre 2000, la pollution désigne l'introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques et/ou terrestres. Elles entraînent des détériorations aux biens matériels, une détérioration ou une entrave à l'agrément de l'environnement ou à d'autres utilisations légitimes de ce dernier.

Avec l'ère industrielle, des pollutions d'une grande ampleur ont fait leur apparition dans les écosystèmes terrestres. Ces pollutions résultent de l'infiltration de substances polluantes (fuites ou épandages de produits chimiques accidentels ou non) ou de la présence d'anciens dépôts de déchets. Certains sites sont également contaminés par les retombées de rejets atmosphériques issus de l'industrie et accumulés au cours des années.

Un sol pollué est un sol dont la teneur en substances nuisibles dépasse le niveau background et dont la quantité totale est significative. C'est aussi celui dont les composants chimiques impliquent un risque important pour la santé ou l'environnement. Trois critères peuvent caractériser un sol pollué : la teneur du sol en substances polluantes, les usages et destinations futures du sol (agriculture, habitation, industrie, etc.) et les risques pour l'homme et l'environnement.

### **2.1. Sources de la pollution industrielle**

La source de la contamination du sol par les polluants inorganiques et organiques peut être naturelle et anthropique. Elle résulte principalement des activités humaines pour les polluants organiques tandis que, pour les éléments traces métalliques (ETM), l'impact anthropique serait au plus équivalent voire inférieur à celui des processus naturels tels que l'érosion éolienne de sites riches en ETM les éruptions volcaniques. (Feidt, 2012).

Les principales sources anthropiques sont : (i) les activités des industries chimiques et minière et les dépôts atmosphériques au voisinage des sites industriels, (ii) la production d'énergie, et (iii) les activités agricoles telles que l'épandage des boues d'épuration et l'utilisation des engrais phosphatés.

### 2.1.1. Les activités industrielles

La pollution issue des activités industrielles comprend toute la gamme de substance indésirables et de perte que ces activités génèrent. Ces substances peuvent être émises dans l'air, rejetées dans les eaux de surface, déposées dans des sites d'enfouissement, épandues sur les sols, incinérées, injectées sous terre, recyclées ou brûlées pour produire de l'énergie.

Ces sources libèrent dans les sols des substances chimiques organiques telles que les hydrocarbures aliphatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, le xylène (BTEX), les polychlorobiphényles (PCB), les composés organiques halogénés volatils (COV), ou inorganiques telles que les ETM, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine et/ou à la qualité de l'environnement.

Parmi les industries les plus polluantes figure l'exploitation des mines et le traitement des minerais qu'elle implique, la production et le recyclage du plomb et les industries pétrochimiques. Ces industries larguent dans l'atmosphère et dans le sol une multitude de polluants dont les plus importants sont :

- **Les éléments traces métalliques ou ETM** : Ils proviennent principalement de la métallurgie, de l'industrie du textile, de l'imprimerie, de la peinture, du bois (agents antibactériens), ou encore dans l'industrie chimique (catalyseurs).

- **Les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène)** : Ce sont des hydrocarbures aromatiques monocycliques utilisés comme solvants dans l'industrie chimique et cosmétique, dans l'imprimerie, ou générés par les industries de traitement du charbon (cokéfaction)..., ou encore présents dans les combustibles et carburants.

- **Les hydrocarbures aliphatiques (fraction C10-C40)** : Dérivés du pétrole, ils sont présents dans les combustibles, carburants, lubrifiants (huiles minérales) et goudrons, ou générés par les activités de transport, de stockage et de distribution des produits pétroliers.

- **Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)** : Les HAP sont synthétisés lors de la combustion incomplète de la matière organique ou bien lors de la formation de fossiles (pétrole et charbon). Ces composés peuvent être libérés dans l'environnement par des phénomènes naturels comme les feux de forêt, les éruptions volcaniques. Ils sont aussi générés par des réactions géologiques associées à la formation de fuel fossile et minéral (Wilson & Jones, 1993).

• **Les composés organiques halogénés volatils (COV) :** Les COV anthropiques sont émis lors de phénomènes de combustion mais aussi par le raffinage du pétrole, l'évaporation de solvants, de carburants, ou encore des procédés chimiques.

• **Les polychlorobiphényles (PCB) :** Utilisés comme huile de transformateurs et de condensateurs, comme fluides caloriporateurs et hydrauliques, comme plastifiants, lubrifiants, dans les peintures, les vernis, les encres etc.

• **Les cyanures :** Utilisés comme intrants dans des procédés de traitement de surface, de galvanoplastie, de traitement de minerais, ou générés comme sous-produits indésirables de la cokéfaction, des usines à gaz, de la chimie du charbon ou du pétrole (plastiques, pesticides, teintures), ou encore présents dans les eaux de lavage des hauts fourneaux etc.

### 2.1.2. La production d'énergie

La production et l'utilisation en masse des énergies a une responsabilité très importante dans la contamination de l'environnement par d'innombrables substances toxiques. Les énergies polluent non seulement au bout de la chaîne, lors de leur utilisation, mais aussi au début de la chaîne, lors de leur exploitation ainsi que lors de leur transport. La plus grande partie de la pollution est provoquée par l'utilisation de cette énergie. Cette pollution est provoquée par l'opération de transformation de la matière, le produit fini (mazout, gaz, bois, etc.) en énergie finale (chaleur, électricité, déplacement). En suivant les différentes étapes de la chaîne de production et d'utilisation des combustibles fossiles, on peut citer les principaux facteurs d'impacts sur l'environnement et, en particuliers les principales émissions de pollution.

• **Extraction des combustibles :** L'exploitation minières de charbon et l'extraction de pétrole ou de gaz ont un impact sur l'environnement. Il peut en résulter une pollution terrestre importante, ou massive. En outre, dans le cas du pétrole et du gaz, un grand risque d'incendie existe, qui transforme la pollution terrestre en pollution atmosphérique (Gardel, 2013).

• **Préparation et acheminement des combustibles :** Certaines opérations de traitement, comme le raffinage par exemple, s'accompagnent du rejet dans l'environnement de composés organiques gazeux et de liquides (phénols, produits ammoniacaux...). Le fonctionnement du système d'extraction, de préparation et de transport nécessite une quantité importante d'énergie, d'où la combustion d'une partie de cette énergie. Cette combustion génère des émissions atmosphériques de polluants (Bobin et al., 2012).

• **Fuites au long des filières d'approvisionnement** : Des déversements dans l'environnement d'hydrocarbures liquides tels que le diesel, ainsi que des pertes d'hydrocarbures volatils surviennent à toutes les étapes de la filière pétrolière, en particulier lors des stockages.

• **Rejet dans l'environnement des produits de combustion** : Dans la combustion, les combustibles sont pour l'essentiel convertis en produits gazeux rejetés dans l'atmosphère. Dans la mesure où les combustibles contiennent du soufre (essence et diesel par exemple), la combustion produit aussi du dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>). Suivant les conditions de combustion, il y a oxydation d'une partie de l'azote de l'air et production d'oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) (Loranchet, 1992; Stellman, 2000).

Les produits de combustion rejetés dans l'atmosphère contiennent aussi, en proportions variables, des composés résultant d'une oxydation incomplète du combustible (monoxyde de carbone CO), des imbrûlés (particules de carbone), des hydrocarbures volatils, en particulier des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et d'autres composés organiques volatils (COV) tels que des aldéhydes, des éléments minéraux inclus dans le combustible brut (As, Cr, Cd, Hg, etc.) ou des éléments ajoutés (Pb), etc.

### 2.1.3. Les activités agricoles

Les activités agricoles peuvent engendrer une pollution ponctuelle ou diffuse du sol provenant de mauvaises pratiques de fertilisation ou de traitement phytosanitaire, ou encore de manipulations accidentelles des produits phytosanitaires.

Certaines substances potentiellement toxiques, présentes dans les pesticides et les engrais chimiques, peuvent contaminer les sols de différentes façons ; soit par accumulation à la surface ou dans les horizons du sol, soit après assimilation par les microorganismes du sol qui les transforment en de nouveaux métabolites parfois aussi toxiques voir plus pour la flore, la microfaune ou la microflore du sol.

Les métaux lourds peuvent s'accumuler dans les sols suite à l'épandage de fumier liquide et solide, ainsi que les engrais inorganiques (Atafar et al., 2010). L'application de nombreux biosolides, tels que les effluents d'élevage, les compostes et les boues des stations d'épuration sur les sols agricoles conduit à leur contamination par divers polluants inorganiques (Basta et al., 2005) et organiques. La chaux et les engrais superphosphates contiennent également des ETM tels que le cadmium. La présence du cadmium dans certains

engrais (en particulier dans les engrais phosphatés) constitue un grand risque pour l'environnement en raison de la toxicité de ce métal et de sa capacité à s'accumuler dans le sol ainsi que dans les tissus des plantes et des animaux. Des produits contenant du cuivre, de l'arsénique et du plomb sont aussi utilisés en tant que pesticides et insecticides.

Les fertilisants chimiques utilisés dans l'agriculture intensive afin d'augmenter la croissance et le rendement des cultures pose de sérieux problèmes pour l'environnement et la santé humaine et animale. Ils entraînent la contamination des eaux par une concentration élevée en nitrates et phosphates (Lacroix, 1995; Calvet, 2003). En effet, moins de la moitié de l'azote appliqué est absorbée par les plantes, le reste est perdu dans l'air, dissous dans les eaux de surface ou évacué dans les eaux souterraines (, Programme des Nations Unies pour l'Environnement, PNUE, 2000)

La teneur en métaux lourds des eaux usées, des excréta et des boues provenant des sources domestiques sont généralement suffisamment faibles pour permettre leur utilisation pour la fertilisation des cultures (Jiménez et Wang, 2006).

Les polluants organiques (polychlorodibenzodioxines/furanes (PCDD/F), polychlorobiphényles (PCB), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)) sont lipophiles, toxiques et de persistance variable selon les familles. Une importante partie de ces polluants est bioaccumulable et se dégrade lentement. Les polluants métalliques, quant à eux, sont des éléments non lipophiles, de toxicité variable selon les molécules et les doses administrées. Ces polluants ne se dégradent pas biologiquement comme certains polluants organiques, et ils se bioaccumulent au niveau des chaînes alimentaires (Breton et al., 2008).

## **2.2. Impact des polluants sur les microorganismes du sol**

Les activités industrielles passées et actuelles sont à l'origine des pollutions de l'écosystème terrestre en libérant des substances toxiques et des particules polluantes dans l'environnement (Asubiojo et al., 1991; Shukurov et al., 2014; Yang et al., 2009). Cette pollution devient de plus en plus importante lorsqu'elle implique des conséquences directes ou indirectes sur l'environnement et sur la santé publique (Baize, 1997).

Le sol est le milieu de vie le plus favorable des micro-organismes vu sa richesse en éléments nutritifs nécessaires à leur croissance. Un gramme de sol agricole peut contenir jusqu'à plusieurs milliards d'Unités Formantes Colonies (CFUs, Colony Forming Unit) de

micro-organismes appartenant à des milliers d'espèces (Rosselló-Mora & Amann, 2001) (Tab. 2).

**Tableau 2** Nombre relatif et biomasse approximative du microbiote du sol (Metting, 1992)

Organismes	Nombre		Biomasse Kg.ha <sup>-1</sup>
	Par m <sup>2</sup>	Par gramme	
Bactérie	10 <sup>13</sup> -10 <sup>14</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	300-3000
Actinomycètes	10 <sup>12</sup> -10 <sup>13</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	300-3000
Champignons	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	500-5000
Microalgues	10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>	10-1500

Les microorganismes sont le premier biota qui subit les impacts directs et indirects des polluants du sol. Des concentrations élevées d'ETM peuvent avoir des effets toxiques sur les organismes vivants (Bruins et al., 2000). Plusieurs études ont montré que la pollution du sol peut diminuer la biomasse et les activités des microorganismes du sol ce qui conduit à la modification des processus biologiques du sol tels que la fixation de l'Azote et la dégradation de la matière organique (Brookes, 1995; Bååth et al., 1998; Chen et al., 2014). La concentration des ETM peut provoquer des dommages au niveau des enzymes et par conséquent leur inactivation (Bruins et al., 2000). En outre, les ETM modifient les structures conformationnelles des acides nucléiques et des protéines, et forment ainsi des complexes avec des molécules de protéines qui les rendent inactifs. Ces effets entraînent une rupture de l'intégrité des membranes cellulaires microbiennes ou la destruction de l'ensemble de la cellule (Bong et al., 2010). Les ETM forment également des précipités ou des chélates avec des métabolites essentiels (Sobolev & Begonia, 2008).

Plusieurs classes de composés organiques sont toxiques vis-à-vis des microorganismes puisqu'ils altèrent leurs membranes cellulaires. Ainsi, l'effet toxique de la plupart des polluants organiques hydrophobes est provoquée par des effets généraux non spécifiques, sur la fluidité de la membrane en raison de leur accumulation dans la bicouche phospholipidique. La contamination du sol par les produits pétroliers a un impact négatif sur l'écosystème terrestre et sur les microorganismes vivants. Sawulski et al. (2014) ont montré que la contamination du sol par les HAP affecte significativement la diversité des communautés bactériennes et fongiques. Sutton et al. (2013) ont également observé un effet négatif de la pollution par le diesel sur la diversité microbienne quelle que soit la structure du sol. Les

résultats obtenus par Zhang et al. (2006) indiquent qu'il y a divers effets toxiques des résidus du pétrole brut sur la croissance et la reproduction des bactéries telluriques. Les activités enzymatiques des micro-organismes du sol sont aussi perturbées en présence des produits pétroliers tels que le diesel et le kérosène (Alrumman et al., 2015).

L'utilisation des pesticides affecte les micro-organismes non cibles en interférant avec les processus vitaux tels que la respiration, la photosynthèse et les réactions de biosynthèse, ainsi que la croissance et la division cellulaire (DeLorenzo et al., 2001). Dans un premier temps, l'application de pesticides diminue le nombre et l'activité microbienne, mais comme le produit chimique persiste, les microorganismes développent une forme de tolérance / résistance à ces produits. Bünemann et al. (2006) ont signalé que la pratique conventionnelle d'engrais et l'application de pesticides peuvent affecter certains groupes d'organismes dans le sol.

### **2.3. Impact des polluants sur les CMA**

Les polluants organiques et inorganiques pourraient avoir des effets délétères sur la structure, la formation et la fonction des CMA telles que la germination des spores, le taux de colonisation et la croissance hyphale. Les polluants organiques affectent l'activité des CMA en affectant le transfert du carbone de la plante vers le champignon, tandis que les ETM inhibent directement l'activité des CMA (Wang et al., 2006).

Plusieurs études ont montré que les stades de développement des CMA (germination, élongation des hyphes extraracinaires et sporulation) pourraient être négativement influencés en présence des polluants d'origine industrielle (Lenoir et al., 2016b) (Tab. 3). Il a été démontré que la germination des spores de CMA et l'élongation des hyphes germinatives sont inhibées en présence de divers HAP (Alarcón et al., 2006; Franco-Ramírez et al., 2007; Verdin et al., 2006), de fongicides (Calonne et al., 2010; Twanabasu et al., 2013; Venedikian et al., 1999; Zocco et al., 2008) et d'ETM (Pawłowska & Charvat, 2004). Cet effet négatif sur la germination et l'élongation des hyphes germinative pourrait se répercuter par la suite sur la colonisation racinaire. En effet, une réduction du taux de mycorhization a été observée chez des plantes cultivées en présence d'ETM (Del Val et al., 1999; Firmin et al., 2015; Kumar et al., 2015; Sun et al., 2016), de diesel (Hernández-Ortega et al., 2012; Tang et al., 2009), d'HAP (Debiane et al., 2009; Gaspar et al., 2002; Leyval & Binet, 1998) et de fongicides (Calonne et al., 2010; Campagnac et al., 2010). La diminution du taux de colonisation est due à l'effet négatif des polluants sur le CMA soit pendant les stades pré-symbiotiques par

l'inhibition de la germination et de l'élongation des hyphes germinatives et donc la non détection d'une racine hôte, soit pendant le stade symbiotique par la perturbation du processus de colonisation racinaire (Bolgiano et al., 1983; Debiane et al., 2009; Estaun, 1990). En parallèle à cela, une diminution du taux d'arbuscules et de vésicules dans les racines mycorhizées a été observée en présence de divers HAP (Aranda et al., 2013; Rabie, 2005; Verdin et al., 2006), de fongicides (Sainz et al., 2006; Calonne et al., 2010; Campagnac et al., 2008; Zocco et al., 2011) et d'ETM (Citterio et al., 2005; Ruscitti et al., 2011). L'effet négatif des polluants sur les spores et les hyphes extraracinaires d'un part et sur la colonisation racinaires d'autre part peut diminuer la capacité des CMA à produire de nouvelles spores extra et intra-racinaires. Une diminution de la sporulation des CMA a été observée en présence des fongicides (Campagnac et al., 2008, 2010; Sainz et al., 2006) des ETM (Pawlowska & Charvat, 2004; Zarei et al., 2008) et des HAP (Alarcón et al., 2006; Debiane et al., 2008, 2009; Verdin et al., 2006).

Cependant, plusieurs autres études ont montré un meilleur développement des CMA en présence des polluants (Koomen et al., 1990; Shetty et al., 1994). Ce phénomène pourrait être une forme de défense afin de minimiser les effets négatifs du polluant (Bartolome-Esteban & Schenck, 1994; Pawlowska & Charvat, 2004). En présence de substances toxiques, les champignons ont la capacité de changer leur architecture hyphale en favorisant la croissance linéaire des hyphes germinatives au détriment de la croissance ramifiée. Cardenas-Flores et al. (2011) rapportent qu'en présence de fongicides, les spores du CMA germent selon un mode linéaire. Selon Fomina et al. (2003), ce changement pourrait constituer un moyen pour minimiser le contact entre le champignon et le polluant et atteindre des milieux moins pollués. De plus, une amélioration de la colonisation racinaire par les CMA en présence des ETM cuivre et arsenic a été également rapportée par Todeschini et al. (2007) et Bona et al. (2011).

**Tableau 3** Tableau récapitulatif des effets des polluants sur les stades de développement des CMA (Lenoir et al. (2016))

Type de stress	CMA	Culture	Stade de développement affecté					Références
			Germination	Elongation des hyphes germinatives	Colonisation racinaire	Elongation des hyphes extraracinaires	Sporulation	
ETM	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Claroideoglossum etunicatum</i>	<i>In vitro</i>	x	x			x	(Pawłowska & Charvat, 2004; González-Guerrero et al., 2005)
	<i>Claroideoglossum etunicatum</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i>	En pot (contamination artificielle)			x		x	(Andrade et al., 2005; Citterio et al., 2005; Nogueira et al., 2002; Abdel Latif & Chaoping, 2011)
	<i>Glomus sp.</i> , <i>Acaulospora sp.</i> , <i>Scutellospora sp.</i>	<i>In situ</i>			x		x	(Del Val et al., 1999; Zarei et al., 2008, 2010)
diesel	<i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Funneliformis constrictum</i>	En pot (contamination artificielle)		x	x		x	(Kirk et al., 2005; Tang et al., 2009)
pétrole	<i>Funneliformis mosseae</i> ,	En pot (contamination artificielle)			x			(Franco-Ramírez et al., 2007)
fongicides	<i>Funneliformis mosseae</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>In vitro</i>	x	x	x		x	(Campagnac et al., 2008, 2009, 2010; Venedikian et al., 1999; Zocco et al., 2008; Calonne et al., 2010, 2012; Twanabasu et al., 2013)

	<i>Funneliformis caledonium</i>	En pot (contamination artificielle)			x				(Huang et al., 2007, 2009)
	<i>Glomus, Gigaspora, Scutellospora</i>	En pot (contamination historique)				x		x	(Sainz et al., 2006)
	<i>Glomus monosporum, Funneliformis mosseae</i>	<i>In situ</i>	x		x				(Dodd & Jeffries, 1989)
HAP	<i>Funneliformis caledonium, Gigaspora margarita, Rhizophagus irregularis, Claroideoglomus lamellosum, Rhizophagus proliferus, Funneliformis mosseae, Glomus ambisporum, Scutellospora heterogama, Rhizophagus custos</i>	<i>In vitro</i>	x	x	x	x		x	(Alarcón et al., 2006; Aranda et al., 2013; Debiane et al., 2008, 2009, 2011; Liu et al., 2004; Verdin et al., 2006)
	<i>Funneliformis geosporum, Funneliformis mosseae, Claroideoglomus etunicatum</i>	En pot (contamination artificielle)	x	x	x		x	x	(Gaspar et al., 2002; Rabie, 2004, 2005; Wu et al., 2009)
	<i>Funneliformis mosseae</i>	En pot (contamination historique)			x				(Leyval & Binet, 1998)

### III. LE STRESS OXYDANT

#### 3.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Le stress oxydant est un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), et la capacité de l'organisme à contrebalancer ou détoxifier leurs effets néfastes (Mittler, 2002).

Les ERO sont des formes réduites de l'oxygène ( $O_2$ ) possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique (Gardès-Albert & Jore, 2005). Elles résultent soit de l'activation de l' $O_2$  qui donne l'oxygène ( $O_2$ ), soit du transfert de un, deux ou trois électrons de l' $O_2$  pour former respectivement un radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et un radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) (Mittler, 2002). La concentration des ERO et leur influence sur le métabolisme cellulaire sont régulées entre autres par l'intervention d'enzymes anti-oxydantes comme par exemple la superoxyde dismutase, les peroxidases et les catalases.

Les ERO se forment dans les cellules à la suite de nombreux processus tels que les stress biotiques ou abiotiques, et les déséquilibres rédox. Chez les plantes, les ERO sont produites principalement dans le chloroplaste (Asada, 2006). En effet, lors de la photosynthèse, deux processus principaux consomment de l'oxygène. Le premier, est la réduction directe de l'oxygène moléculaire par la chaîne de transfert des électrons du photosystème I (PS I). Le second processus, qui constitue la première étape de la photorespiration, est l'activité oxygénase de la ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase (Arora et al., 2002). Les ERO sont également produites dans les mitochondries et les peroxysomes au niveau de la chaîne respiratoire et de l'oxydation du glycolate au cours de la photorespiration (Mittler, 2002; Rhoads et al., 2006).

#### 3.2. Dommages causées par les espèces réactives de l'oxygène

Lorsque la quantité d'ERO générée dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, la toxicité des ERO s'exprime par de nombreux aspects, en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse (Arora et al., 2002; Langebartels et al., 2002). Cette toxicité s'explique par la réactivité des ERO, notamment

celle de l'·OH envers les macromolécules biologiques ( Farmer & Mueller, 2013; Møller et al., 2007).

- **Dommages causés sur les lipides**

Les dommages causés sur les membranes sont localisés principalement au niveau des lipides membranaires. L'oxydation de ces derniers par les ERO est appelée peroxydation des lipides ou lipoperoxydation. Le maintien de la composition lipidique des membranes est important car il contrôle leur perméabilité et leur efficacité en tant que barrière semi-perméable. Des modifications au niveau des lipides membranaires peuvent induire un changement au niveau de la perméabilité sélective des biomembranes (Meharg, 1993).

La peroxydation des lipides altère la structure et donc la fonctionnalité des membranes (membranes cytoplasmiques et membranes des organites) avec des modifications des potentiels transmembranaires, des flux ioniques, des transports transmembranaires, l'inactivation de récepteurs, la dérégulation des systèmes messagers.

L'oxydation des acides gras polyinsaturés (LH) est une réaction en chaîne qui se subdivise en trois phases : initiation, propagation et terminaison.

### ***L'initiation***

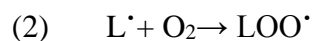
L'attaque par le radical hydroxyle d'un LH conduit à la formation d'un radical lipidique (L·) et à la stabilisation d'·OH en H<sub>2</sub>O (réaction (1)).



Il est possible que d'autres radicaux puissent également initier la peroxydation lipidique.

### ***La propagation***

Le radical lipidique (L·), formé lors de l'initiation, fixe très rapidement l'oxygène moléculaire à l'état normal et forme un radical libre peroxy (LOO·) instable (réaction (2)) qui peut réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras insaturé pour former un peroxyde (acide gras OOH) (réaction (3)).



Les peroxydes peuvent également se décomposer pour former un radical alcoyle (LO<sup>•</sup>) et hydroxyle (<sup>•</sup>OH). Le radical alcoyle réagit avec d'autres substrats, aussi il y a propagation de la réaction en chaîne.

### ***La terminaison***

Au cours de la dernière phase, deux cas de figures peuvent se présenter selon la position du LOO<sup>•</sup> sur la chaîne de carbone. Si ce dernier est positionné à la fin du système de doubles liaisons, il sera réduit en hydroperoxyde lipidique (LOOH). En revanche, si le radical LOO<sup>•</sup> est situé au milieu de la chaîne d'acides gras, une cyclisation avec la double liaison adjacente aura lieu.

- **Dommages causés sur les protéines**

Les protéines sont particulièrement sensibles à l'action des ERO. Ces derniers agissent sur les chaînes latérales de certains acides aminés, comme c'est le cas pour les acides aminés de nombreuses enzymes et protéines de transport comportant un groupement sulphydryle (-SH) (Stadtman & Levine, 2000).

L'oxydation protéique conduit à l'addition de groupes carbonyles, la formation des liaisons croisées et la fragmentation des chaînes peptidiques, ce qui induit une modification de la conformation des protéines et provoque une modification de l'activité biologique (activités enzymatiques, transduction de signal ou système de transport). L'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (Stadtman & Levine, 2000). De nombreux autres acides aminés sont également susceptibles d'être oxydés par les ERO.

Le dommage oxydatif des protéines peut même contribuer au dommage secondaire comme l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN et la perte de fidélité des ADN polymérase (Aruoma, 1998).

- **Dommages causés sur l'ADN**

L'action des ERO sur l'ADN se traduit par l'addition des bases et des groupes de sucres, cassures au niveau de la simple et double hélice ainsi que la formation des liaisons croisées avec d'autres molécules (Beckman & Ames, 1998). La thymine et la guanine sont plus susceptibles aux modifications suivies de la cytosine et l'adénine. Les ERO peuvent

également induire différentes perturbations au niveau des groupes thiols du fuseau mitotique. Ils ont par conséquent des effets sur la mitose et sur le partage des chromosomes, aboutissant à des aberrations chromosomiques (Patra et al., 2004).

L'hydroxylation de la désoxyguanosine (dG) en position 8 est un des dommages les plus fréquents de l'ADN et forme l'adduit oxydatif appelé 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Lors de la réplication de l'ADN, cet adduit peut s'apparier non seulement avec la cytosine, mais aussi avec l'adénine et d'autres bases. Ces mauvais appariements engendrent une mauvaise lecture des bases avoisinantes (Nishimura, 2006) et par conséquent, entraînent des erreurs dans la synthèse de certaines molécules ou une inhibition de certaines enzymes.

### **3.3. Les systèmes antioxydants**

Afin de se protéger des dommages causés par le stress oxydant, les végétaux supérieurs utilisent des systèmes de protection et de détoxification appelé systèmes antioxydants qui sont de deux types: non enzymatiques et enzymatiques (Ahmad et al., 2008).

#### **3.3.1. Les systèmes antioxydants non enzymatiques**

- **Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide dont la fonction thiol lui confère un rôle d'antioxydant, voire, de réducteur, qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles. C'est l'antioxydant majeur des cellules végétales. On le retrouve dans différents compartiments cellulaires tels que le cytosol, les chloroplastes, le réticulum endoplasmique, les vacuoles et les mitochondries (Jiménez et al., 1997). Ce composé joue de nombreux rôles dans les défenses des plantes contre les stress biotiques et abiotiques. Une stimulation de la biosynthèse du glutathion en conditions de stress est fréquemment observée et son accumulation permet de compenser la diminution de l'efficacité d'autres antioxydants (Shao et al., 2007).

Le glutathion participe au contrôle du niveau de l' $H_2O_2$  (Alscher et al., 2002). Cependant la réduction de l' $H_2O_2$  par le glutathion n'est pas la voie de dégradation privilégiée dans la cellule végétale. La détoxification de cet oxydant est principalement réalisée par la réduction de l'acide ascorbique qui doit donc être continuellement sous sa forme oxydée.

- **L'acide ascorbique (vitamine C)**

La vitamine C est une molécule hydrosoluble au fort pouvoir réducteur mais très sensible à la lumière et à la chaleur. Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky et al., 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AsCH<sup>-</sup>) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AsCH<sup>•</sup>).

- **L' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E)**

La vitamine E synthétisée dans les chloroplastes, a la capacité de capter et de stabiliser par résonance l'électron célibataire des radicaux libres. Ainsi, ce composé peut limiter la peroxydation des acides gras polyinsaturés en réagissant avec le radical LOO<sup>•</sup> selon la réaction suivante  $\alpha\text{T-OH} + \text{LOO}^{\bullet} \rightarrow \alpha\text{T-O}^{\bullet} + \text{LOOH}$  (Girotti, 1998). Le radical produit peut être régénéré en  $\alpha\text{T-OH}$  par le cycle ascorbateglutathion (Munné-Bosch, 2005). Ce composé peut aussi réduire <sup>1</sup>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former l' $\alpha$ -tocophérolquinone (Wise and Naylor, 1987).

### 3.3.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les plantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (APX) (Mates et al., 1999; Sharma et al., 2012). La balance entre l'activité de la SOD et de l'APX ou de la CAT est cruciale pour que la quantité de radicaux O<sub>2</sub><sup>-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit stable (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004). Elle est aussi importante pour limiter la formation d'OH<sup>-</sup>, très toxique (Mittler, 2002).

- **La superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD fait partie de la famille des métallo-enzymes. Elle peut être classée en trois groupes selon le métal utilisé en co-facteur: Fe-SOD (localisée principalement dans les chloroplastes), Mn-SOD (située principalement dans les mitochondries) et Cu-Zn SOD (présente principalement dans les chloroplastes, le cytosol et potentiellement dans la paroi) (Arora et al., 2002; Grene, 2002).

Le rôle majeur de la SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (réaction (4)). Cette réaction utilise alternativement la réduction et l'oxydation du métal associé à l'enzyme (Scandalios, 1993).



- **L'ascorbate peroxydase (APX)**

L'APX est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes des plantes qui détoxifie l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (réaction (5)) et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en  $\text{H}_2\text{O}$ , utilisant l'ascorbate pour la réduction (Abdul Jaleel et al., 2009).

Différentes isoformes d'APX sont actives dans les chloroplastes, cytosol et microsomes. Dans les chloroplastes, le cycle acide ascorbique/glutathion constitue une importante voie de détoxification pour la dégradation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'autres radicaux réactifs de l'oxygène (Sgherri et al., 2003). Il est supposé que l'augmentation de la voie enzymatique acide ascorbique/glutathion et spécialement celle de l'APX, confère une résistance générale à l'ensemble des contraintes environnementales (De Gara et al., 2000).



- **La catalase (CAT)**

Essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, la CAT est capable de transformer le l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et en  $\text{O}_2$  (réaction (6)). Cette enzyme est abondante dans les glyoxysomes des lipides de stockage des tissus en germination de l'orge, où elle dégrade l' $\text{H}_2\text{O}_2$  formé pendant la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Fazeli et al., 2007). Elle est abondante aussi dans les peroxysomes de feuilles de plantes où elle supprime l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit au cours de la photorespiration par la conversion du glycolate en glyoxylate (Jayakumar et al., 2008). Ceci est également dû au fait qu'il y ait prolifération des peroxysomes au cours du stress, ce qui pourrait aider à la récupération de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui peut diffuser à partir du cytosol (Abdul Jaleel et al., 2009).

D'autres CAT sont situées dans les tissus vasculaires et peuvent être impliquées dans la protection contre le stress environnemental (Fu and Huang, 2001). Les différentes affinités de l'APX et de la CAT pour l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivement de l'ordre  $\mu\text{M}$  et  $\text{mM}$ , suggèrent que l'APX est chargée d'une régulation plus fine des ERO que la CAT, cette dernière pouvant être responsable de l'élimination d'un excès d'ERO en condition de stress (Mittler, 2002).



### **3.3.3. Les autres peroxydases**

La glutathion peroxydase (GPX) est une autre enzyme capable de détoxifier l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . Elle utilise directement le glutathion réduit (GSH) comme agent réducteur, son cycle est proche de celui de l'ascorbate-glutathion où la GSH est régénérée à partir du glutathion oxydé GSSH par la glutathion réductase (GR). Il existe également une autre peroxydase, ne possédant pas de substrat spécifique, est aussi capable de former  $\text{H}_2\text{O}$  à partir du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Elle est en général appelée gaïacol peroxydase car le gaïacol est utilisé dans les expérimentations comme substrat universel (Chaoui et al., 1997; Blokhina et al., 2003).

**Partie II**  
**Matériels et méthodes**

## PARTIE II MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Matériels biologiques

#### 1.1. Matériel végétal

##### 1.1.1. Matériel végétal utilisé pour l'expérience *in vitro*

L'expérience *in vitro* a été menée sur des cultures axéniques de racines de chicorée (*Cichorium intybus* L.) de la variété Orchies, transformées par *Agrobacterium rhizogenes* (Fontaine et al., 2004) et colonisées ou non par le CMA *Rhizophagus irregularis*. Les graines de chicorée, ayant données les plantules et les racines qui ont servies à la transformation, proviennent de la société Florimond-Desprez et ont été fournies au laboratoire de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) dans le cadre d'un programme d'amélioration des plantes. *Cichorium intybus* L. est une espèce diploïde ( $2n = 8$ ) dont la taxonomie établie par Cronquist en 1981 est la suivante:

Espèce végétale	La chicorée
Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Trachéobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Sous famille	<i>Cichorideae</i>
Genre	<i>Cichorium</i>
Espèce	<i>Cichorium intybus</i> L.

##### 1.1.2. Matériel végétal utilisé pour l'expérience en microcosme

L'expérience en microcosme a été menée sur deux plantes : la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) et le blé dur (*Triticum durum* Desf.) dont la taxonomie établie par Cronquist en 1981 est la suivante.

Espèce végétale	Le blé dur	La tomate
Règne	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Trachéobionta</i>	<i>Trachéobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Commelinidae</i>	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Cyperales</i>	<i>Solanales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>	<i>Solanaceae</i>
Sous famille	<i>Pooideae</i>	
Tribu	<i>Triticeae</i>	
Genre	<i>Triticum</i>	<i>Solanum</i>
Espèce	<i>Triticum durum</i> Desf.	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

## 1.2. Matériel fongique

La souche de champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) utilisée lors des études *in vitro* est *R. irregularis*, référencée DAOM 197198 (Schüßler & Walker, 2010).

Pour l'expérience en microcosme, deux inoculums commerciaux composés de fragments de racines colonisées et de propagules de CMA ont été utilisés. Les deux inoculums sont composés de:

- *Funneliformis mosseae* (souche FR140, MycoAgro Laboratory, Bretenière, France).
- Un mélange de *Glomus sp.* (SolRize Pro<sup>®</sup> inoculums, Agrauxine, Saint Evarzec, France).

Selon la classification de (Schüßler & Walker, 2010) les CMA utilisés appartiennent à :

Espèce fongique	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>
Règne	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Division	<i>Glomeromycota</i>	<i>Glomeromycota</i>
Classe	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Glomeromycetes</i>
Ordre	<i>Glomerales</i>	<i>Glomerales</i>
Famille	<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomeraceae</i>
Genre	<i>Rhizophagus</i>	<i>Funneliformis</i>
Espèce	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>

## 2. Les sols utilisés

### 2.1. Présentation des sites de prélèvement

Quatre parcelles agricoles (P1, P2, P3 et P4) cultivées avec de la tomate ont été choisies pour l'étude de la biodiversité des CMA et la viabilité microbienne des sols. P1, P2 et P3 se trouvent à proximité de trois grandes usines actives depuis plus de 30 ans. La parcelle P4 se trouvant dans un site non industriel a été choisie comme parcelle témoin.

La parcelle P1 (altitude: 12 m, latitude: 36°47'N, longitude: 7°43'E) se situe à 0,5 km à l'est du complexe sidérurgique ArcelorMittal Algérie (AMA) d'El-Hadjar (le plus grand en Afrique d'une superficie de 832 hectares) inauguré en 1964 dans la commune de Sidi Ammar au sud d'Annaba. La capacité de production d'acier liquide du complexe est passée ces dernières années de 1 million à 500 000 tonnes/an. Une opération de réhabilitation du complexe est lancée en octobre 2015 en vue de porter la production annuelle à 2 millions de tonnes.

La parcelle P2 (altitude: 6 m, latitude: 36°51'N, longitude: 7°45'E) se situe à 0,5 km au sud-ouest de la Société Algérienne des Fertilisants Fertial fondée en 1984 à l'est de la wilaya d'Annaba. L'usine s'étend sur une superficie de 103 hectares et produit de :

- L'ammoniac, avec une capacité de production annuelle de 330 000 tonnes.
- L'acide nitrique, avec une capacité de production annuelle de 264 000 tonnes.
- Le calcium ammonitrate, avec une capacité de production annuelle de 330 000 tonnes.
- L'urée ammonitrate, avec une capacité de production annuelle de 240 000 tonnes.
- Les engrais phosphatés simples, super triple phosphate (STP), les engrais complexes et le Sulfazote, avec une capacité de production annuelle de 330 000 tonnes.
- Les engrais phosphatés simples, super simple phosphate (SSP), avec une capacité de production annuelle de 330 000 tonnes.

La parcelle P3 (altitude: 30 m, latitude: 36°45'N, longitude: 7°18'E) se situe à 0,5 km au sud-ouest de la Société du Ciment de Hadjar Soud (SCHS) fondée en 1973 au sud-est de la wilaya de Skikda. La superficie de l'assiette du terrain de la cimenterie est de plus de 29 hectares. La cimenterie est constituée de deux lignes de fabrication avec une capacité contractuelle de production de 900 000 tonnes de clinker et de ciment.

La parcelle P4 (altitude: 792 m, latitude: 36°54'N, longitude: 7°40'E) se situe à Séraïdi à plus de 8Km des sources de pollution au nord d'Annaba.

## **2.2. Prélèvement des échantillons de sol et de racines de tomate**

Les prélèvements du sol et des racines de tomate ont été effectués pendant la saison estivale (Juillet 2012). Le sol a été collecté de l'horizon 0-20 cm de la rhizosphère de la tomate au niveau de trois points différents de chaque parcelle. Après tamisage à 2 mm, une partie du sol a été séchée à l'air libre pour servir à l'isolement des spores de CMA, aux dosages physico-chimiques et à l'étude du potentiel mycorhizogène du sol. Une autre partie a été conservée à -20 °C pour servir au dosage de la biomasse microbienne. Parallèlement à cela, des racines de tomate ont été prélevées et utilisées fraîches pour la détermination de leurs taux de colonisation par les CMA.

## **2.3. Caractéristiques physico-chimiques des sols**

Le dosage de l'azote, phosphore et potassium ainsi que la détermination de la structure des sols ont été effectués par le laboratoire d'analyses des sols Horizon (Annaba, Algérie). Le pH, la conductivité électrique (CE), la matière organique (MO) et le calcaire total ( $\text{CaCO}_3$ ) ont été mesurés au Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement (LBVE).

### **2.3.1. Détermination du pH des sols**

La mesure du pH a été effectuée selon la méthode décrite par Pauwels (1992), sur une suspension 1/2,5 de sol/eau distillée au moyen d'un pH mètre à lecture directe de précision 0,01.

### **2.3.2. Détermination de la conductivité électrique**

La conductivité électrique permet d'obtenir une estimation globale en sels solubles d'un sol. La mesure a été effectuée sur un extrait 1:5 sol:eau distillée agitée pendant 1 heure à l'aide d'un conductimètre de précision 0,01. La CE est exprimée en millisiemens par centimètre (ms/cm).

### **2.3.3. Détermination de la matière organique**

La matière organique a été mesurée par incinération. Les échantillons de sol ont été placés pendant une nuit (16 heures) dans un four à moufle à 375 °C. La perte de poids, après calcination, nous donne la matière organique.

### **2.3.4. Détermination du calcaire total**

La détermination du calcaire total a été effectuée par titration.

### **2.3.5. Dosage des polluants**

Les métaux lourds ont été analysés au Laboratoire Horizon par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer 3110). L'ammonium et l'ammoniac ont été analysés par spectrophotométrie (DIN 38406-E5).

## **2.4. Isolement et identification des champignons mycorhiziens à arbuscules autochtones des sols**

### **2.4.1. Isolement des spores**

100 g de sol prélevé de chaque parcelle, séché à l'aire libre et tamisé à 2 mm a servi pour l'isolement des spores de CMA. La technique utilisée pour cette fin est celle du tamisage humide décrite par Gerdemann & Nicolson (1963). La technique consiste à soumettre à un jet d'eau l'échantillon de sol déposé sur une série de tamis à mailles décroissantes (250, 125, 100 et 40 µm) disposés respectivement l'un au dessus de l'autre dans l'ordre ci-dessus mentionné. Les particules de sol retenues dans chaque tamis sont transférées dans un bécher puis observées à la loupe binoculaire. Les spores prélevées à l'aide d'une micropipette, sont conservées à 4 °C dans des tubes Eppendorf contenant de l'eau distillée stérile.

### **2.4.2. Observation microscopiques des spores**

Après avoir isolé les différents types de spores correspondants à chaque parcelle, ces dernières ont été séparées en groupes, sous binoculaire, selon leur forme et leur dimension. Ces groupes de spores ont été placés entre lame et lamelle dans une goutte du réactif de Melzer pour les observer au microscope optique et en déterminer les différentes espèces. La détermination des espèces des CMA grâce aux caractéristiques morphologiques des spores est la méthode la plus utilisée. Il faut toujours commencer par mesurer au microscope (G 100x) le

diamètre de la spore, celui de l'hyphe suspenseur ainsi que l'épaisseur de la paroi de la spore. Ensuite, la spore doit être écrasée pour déterminer le nombre de couches constituant la paroi de la spore ainsi que leur aspect. Enfin, grâce aux caractéristiques morphologiques, les espèces fongiques ont été déterminées en ayant recours à la collection des CMA décrits dans le site de la collection de culture internationale des champignons mycorhiziens à arbuscules et à (vésicules) (*International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi*: <http://invam.caf.wvu.edu/>) et celui créé par Janusz Blaszowski ([www.agro.ar.szczecin.pl](http://www.agro.ar.szczecin.pl)).

## 2.5. Détermination du potentiel mycorhizogène des sols

Le potentiel mycorhizogène du sol reflète la richesse du sol en propagules (spores, mycélium, racines colonisées, fragments) susceptibles de générer une mycorhization (Gianinazzi-Pearson et al., 1985). Pour évaluer le potentiel mycorhizogène des quatre sols, la technique du nombre le plus probable MPN de l'anglais *Most Probable Number* (Alexander, 1965) a été utilisée. Cette technique adaptée aux CMA par (Porter, 1979) consiste à préparer des dilutions successives de sol

### 2.5.1. Préparation du dispositif

Les dilutions ont été réalisées au nombre de cinq en homogénéisant du sol non stérilisé (inoculum) contenant les CMA de chaque échantillon de sol étudié mélangé avec du sol stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

Les dilutions ont été préparées comme suit :

- Dilution  $10^{-1}$  : 30 g de sol non stérile + 270 g de sol stérile = 300 g (1).

A partir de ces 300 g de mélange, 250 g ont été répartis dans les cinq répétitions à raison de 50 g par pot. Des 50 g restants, 30 g ont servis d'inoculum pour la dilution qui suit ( $10^{-2}$ ).

- Dilution  $10^{-2}$  : 30 g (1) + 270 g de sol stérile = 300 g (2).

- Dilution  $10^{-4}$  : 30 g (2) + 270 g de sol stérile = 300 g (3).

- Dilution  $10^{-4}$  : 30 g (3) + 270 g de sol stérile = 300 g (4).

- Dilution  $10^{-5}$  : 30 g (4) + 270 g de sol stérile = 300 g (5).

Les dilutions ont été mises dans des pots de 100 ml à raison de cinq répétitions par niveau de dilution, des témoins de sol stérile ont été prévus. Le maïs a servi de plante piège pour la mycorhization. Après avoir été désinfectées par immersion dans l'alcool (70 %) pendant 5 minutes puis rincées abondamment à l'eau distillée, les graines de maïs sont mises à germer à l'obscurité à 25 °C dans des boîtes de Pétri contenant de la vermiculite stérile imbibée d'eau distillée stérile. Les graines pré germées ont été repiquées dans les pots auparavant préparés à raison d'une plantule par pot et placées dans une chambre de culture pendant 6 semaines. Les conditions de culture sont maintenues à une température 18/24 °C jour/nuit, une humidité relative de 43 %, photopériode de 12h/12 h et une intensité lumineuse de 800 lux. L'arrosage a été fait trois fois par semaine à l'eau distillée.

### 2.5.2. Coloration et observation des systèmes racinaires

Après six semaines de culture, les systèmes racinaires sont récoltés et colorés selon la méthode décrite par Phillips & Hayman (1970). Pour chaque dilution de sol, la présence ou l'absence de mycorhization est ensuite évaluée sous microscope (G 40x) et le nombre de plantes mycorhizées est noté. Le tableau 4 illustre les différentes étapes de la coloration des racines.

**Tableau 4** Etapes de la coloration des structures fongiques

Etape	Réactif	Durée	Température
1. Eclaircissement	KOH 10 %	20 minutes	90 °C
2. Rinçage	eau distillée	suffisamment	ambiante
3. Acidification	HCl 1 %	5 minutes	ambiante
4. Coloration	bleu de Trypan 0,05 % (dans l'acide lactique (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ) + glycérol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ) + eau distillée)	20 minutes	120 °C
5. Décoloration et conservation	acide lactique 50 %	suffisamment	ambiante

### 2.5.3. Calcul du potentiel mycorhizogène

Cette estimation se fait par l'intermédiaire de la table d'Alexander (1965) à partir des racines mycorhizées ou non mycorhizées obtenues pour chacun des niveaux de dilutions et

pour les cinq répétitions. La lecture de la table se fait en définissant la dilution la moins concentrée (p1) pour laquelle la mycorhization est observée dans les cinq répétitions et si ce cas ne se présente pas on prend celle où on trouve le maximum de plantes mycorhizées. Le nombre de plants colonisés dans les deux dilutions successives représente donc le p2 et le p3. Les trois valeurs p1, p2 et p3 seront reportées sur la table pour en déduire un nombre qui servira à la détermination du MPN pour 30 g de sol initial, en multipliant ce nombre par le facteur de dilution de p2, le nombre de propagules par kilogramme de sol est alors calculé.

### **3. Dispositifs expérimentaux**

#### **3.1. Cultures *in vitro***

L'impact du diesel sur les deux partenaires de la symbiose mycorhiziennes, à savoir les racines de chicorée transformées par *Agrobacterium rhizogenes* et le CMA *R. irregularis*, a été évalué *in vitro*. Les deux expériences ont été réalisées à l'UCEIV à Calais en France. La première expérience comporte 6x2 traitements avec un traitement témoin (0 %) et cinq concentrations de diesel (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1%) croisés avec deux types de racines : mycorhizées (M) ou non mycorhizées (NM). La deuxième expérience comporte un traitement témoin (0 %) et quatre concentrations de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1%).

##### **3.1.1. Milieu de culture**

Le milieu de culture utilisé lors des expériences *in vitro* est le milieu minimum M (Tab. 6) solidifié par 0.3 % (p/v) de phytigel (Sigma, St. Louis, MO, USA) et autoclavé pendant 20 minutes à 120 °C et à une pression de 1 bar. Le milieu est adapté à la fois au développement des racines de chicorée transformées et au développement de certains CMA (Bécard & Fortin, 1988). Ce milieu est caractérisé par une structure transparente qui permet d'effectuer les observations liées à certains paramètres de la symbiose mycorhizienne.

##### **3.1.2. Introduction du diesel dans les milieux de culture**

Le diesel a été stérilisé par filtration à 0.25 µm sous une hotte à flux horizontal et ajouté au milieu M pour obtenir les différentes concentrations finales de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 et 1%. Le milieu témoin a consisté en un milieu M sans diesel.

**Tableau 5** Composition du milieu M (Bécard & Fortin, 1988)

Solution mère	Concentration
1. Macroéléments	
Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	73,1 (g/l)
KNO <sub>3</sub>	08,0 (g/l)
KCl	06,5 (g/l)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	00,48 (g/l)
2. Microéléments	
Mn Cl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,6 (g/l)
Zn SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,265 (g/l)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,150 (g/l)
Cu SO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0,013 (g/l)
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,0024 (mg/l)
3. Na FeEDTA	
EDTA, 2 Na	916 (mg/500 ml)
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	684 (mg/500 ml)
4. Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	
5. KI	0,075 (g/l)
6. Vitamines	
Glycine	300 (mg/l)
Thiamine hydrochloride	10 (mg/l)
Pyridoxine hydrochloride	10 (mg/l)
Acide nicotinique	50 (mg/l)
Myo Inositol	5 (mg/l)

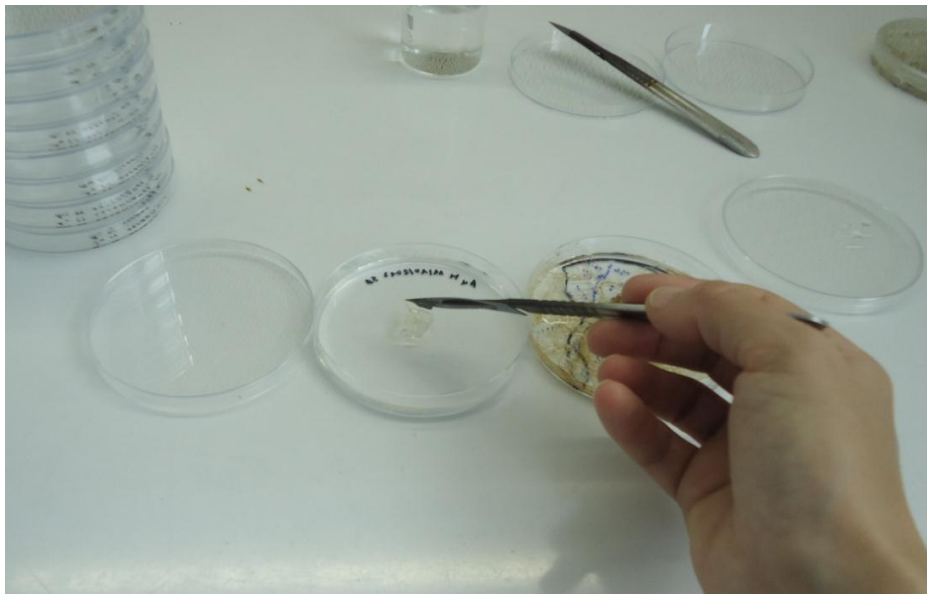
Le pH est ajusté à 5,6 (KOH) puis ajustement à 1L d'eau distillée

### 3.1.3. Cultures monoxéniques des racines de chicorée mycorhizées ou non par le CMA *R. irregularis*

25 mL de milieu contenant les différentes concentrations de diesel (0 ; 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 %) ont été coulés de façon stérile dans des boîtes de Pétri standards mono-compartmentées (9 cm de diamètre). Le coulage du milieu a été fait sous hotte à flux laminaire horizontal, à l'aide de pipettes en plastique stériles. Il faut signaler que tout le long

de l'opération du coulage, le milieu a été agité par un agitateur magnétique stérile afin d'assurer l'homogénéité du mélange milieu M/diesel.

Après refroidissement du milieu de culture dans les boîtes de Pétri, des cubes de gélose (1 cm<sup>2</sup> de surface) contenant des racines de chicorée mycorhizées avec *R. irregularis* (M) ou des racines non mycorhizées (NM) prélevés de cultures racinaires âgés de 6 semaines ont été déposés sur le milieu M contenant ou non les différentes concentrations de diesel (photo 1). Dix boîtes ont été préparées par traitement : cinq boîtes pour les racines mycorhizées et cinq autres pour les non mycorhizées. Les boîtes ont été incubées à 27 °C à l'obscurité pendant 9 semaines.



**Photo 1** Repiquage des racines de chicorée *in vitro*

#### **3.1.4. Test de germination des spores du CMA *R. irregularis***

Afin de compléter l'étude de l'effet des différentes concentrations de diesel sur le développement du CMA *R. irregularis*, un deuxième essai *in vitro* a été installé. Une spore de *R. irregularis* a été déposée par boîte de 5,5 cm, sur le milieu de culture M contenant les différentes concentrations en diesel (0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %). Cinquante boîtes ont été préparées par traitement. Les boîtes ont été placées en incubation à 27 °C et à l'obscurité pendant un mois. Un suivi de la germination des spores a été effectué toutes les 48 heures sous loupe binoculaire (G 40x) pendant la première semaine d'incubation. Ensuite, une fois

par semaine, la germination des spores a été examinée et la longueur des hyphes germinatives a été mesurée.

### 3.2. Microcosmes

Une expérience en microcosmes avec des plants de tomate et de blé dur cultivés sur un sol contaminé artificiellement par le diesel et inoculés ou non par deux inoculum Fm et SZE composés respectivement du CMA *F. mosseae* et d'un mélange de *Glomus* sp. a été installé dans une chambre de culture au laboratoire de l'UCEIV. Cet essai comporte 9 traitements pour chaque plante, les traitements sont récapitulés dans le tableau 7, chaque traitement a été répété cinq fois.

**Tableau 6** Les différents traitements de l'expérience en microcosmes

Dose de diesel (%)	Inoculation	Non inoculé	Inoculé par Fm	Inoculé par SZE
0		x	x	x
0,25		x	x	x
1		x	x	x

Le sol utilisé dans cet essai provient d'un site non contaminé dans la commune de Fouquières-Lès-Lens située dans la région du Nord-Pas-de-Calais-Picardie. Le sol a été mis dans deux sacs en plastique spécial pour deux cycles d'autoclavage espacés de 24 h. Chaque cycle a duré une demi-heure, à une température de 121 °C et sous une pression de 1 bar. Le sol a été laissé sécher pendant une semaine, puis il a été tamisé à 2 mm. Le diesel a été mélangé avec le sol pour l'obtention des concentrations 0 ; 0,25 et 1 % (cl de diesel/g de sol). Le sol a été mélangé et tamisé à 2 mm sous hotte aspirante tout les jours pendant deux semaines pour s'assurer de l'homogénéité du mélange diesel/sol et l'évaporation des composants non stables contenus dans le diesel.

Ensuite, le sol a été réparti dans 90 pots contenant chacun 270 g de sol (9 traitements x 5 répétitions/plante). Pour les traitements mycorhizés, 10 g par pot d'inoculum mycorhiziens (Fm ou SZE) ont été ajoutés. Alors que pour les traitements non mycorhizés, 10 g par pot d'inoculum autoclavé dans les mêmes conditions que le sol ont été ajoutés.

Avant le semis, les graines de tomate et de blé ont été désinfectées à l'éthanol 70 % (v/v) pendant 5 minutes et rincées trois fois avec de l'eau distillée puis mises à germer dans de la vermiculite à 28 °C à l'obscurité. Après germination des graines, 5 plantules de tomate ont été transférées dans la moitié des 90 pots, le même nombre de plantules de blé ont été transférées dans l'autre moitié des pots. Les pots ont été placés dans une chambre de culture avec une photopériode de 12 h jour à 24 °C ; 12 h nuit à 18 °C ; une humidité de 43 % ; et une lumière de 800 lux d'intensité (photo 2 et 3). Les plantes ont été arrosées 3 fois par semaine avec de l'eau distillée. Les plantes ont été récoltées après 12 semaines de culture.



**Photo 2** Culture en pot de la tomate mycorhizée et non mycorhizée par Fm et SZE



**Photo 3** Culture en pot du blé mycorhizé et non mycorhizé par Fm et SZE

## 4. Mesures des développements racinaires et fongiques

### 4.1. Mesure du développement racinaire

#### 4.1.1. Longueur racinaire

Après 9 semaines d'incubation, les longueurs racinaires ont été déterminées selon la méthode décrite par Declerck et al. (2003). La technique consiste à comptabiliser sous loupe binoculaire (G 40x) le nombre d'intersections des racines sur un quadrillage circulaire et à appliquer la formule de Newman (1966) :  $L = (\pi \times N \times A)/2H$ , où :

L : longueur racinaire (m)

N : nombre d'intersections

A : surface totale du quadrillage (=58,088cm<sup>2</sup>)

H : somme de la longueur des lignes du quadrillage (=119,2cm)

#### 4.1.2. Biomasse sèche

- **Essai *in vitro***

Après 9 semaines d'incubation, les racines de chicorée mycorhizées ou non, cultivées en absence ou en présence de diesel, ont été récupérées après solubilisation des milieux de culture dans du tampon Tris HCl (50 mM, pH=7.5) + EDTA (10 mM) v/v sous agitation magnétique pendant 15 minutes à température ambiante. Après filtration et rinçage à l'eau distillée, les racines ont été récupérées et conservées dans du papier aluminium à -80°C, puis lyophilisées. Après 48 h de lyophilisation, la masse sèche a été déterminée par pesée des papiers aluminium préalablement tarés.

- **Essai en microsomes**

Après récolte des plantes de tomate et de blé, les racines ont été bien rincées puis séparées des parties aériennes. Ensuite, les deux parties aériennes et racinaires ont été placées dans une étuve à 70 °C pendant 72 h pour les dessécher. La biomasse sèche en gramme a été déterminée par pesage des échantillons à l'aide d'une balance de précision 0,01.

## **4.2. Mesure du développement fongique**

### **4.2.1. Cinétique de germination des spores de *R. irregularis***

La germination des spores sur milieu M sans ou avec les différentes concentrations en diesel a été suivie par observation sous loupe binoculaire (G 40x) toutes les 48 heures pendant la première semaine d'inoculation. Ensuite, une fois par semaine la germination des spores a été examinée. Une spore est dite germée lorsqu'un tube germinatif commence à être aperçu.

Les taux de germination ont été calculés comme suit :

Taux de germination = (Nombre de spores germées x 100)/ Nombre de spores

### **4.2.2. Longueur des hyphes de *R. irregularis***

La longueur des hyphes fongiques du CMA a été estimée en appliquant la méthode décrite par Declerck et al. (2003) et en appliquant la formule de Newman (1966).

### **4.2.3. Détermination du mode de germination des spores de *R. irregularis***

Le mode de germination des spores de *R. irregularis* a été déterminé après 30 jours d'incubation dans le milieu M contenant ou pas les différentes concentrations de diesel. Les spores peuvent présenter deux modes de germination ramifié ou linéaire. Dans la germination ramifiée, les filaments d'hyphes se ramifient et divergent dans toutes les directions, tandis que dans la germination linéaire, le tube germinatif ne forme pas plus de 3 courtes ramifications.

### **4.2.4. Nombre de spores de *R. irregularis***

Le nombre de spores produites par les racines mycorhizées par le CMA *R. irregularis* a été déterminé sous loupe binoculaire en additionnant le nombre de spores comptabilisées dans chaque case du quadrillage circulaire.

### **4.2.5. Test de viabilité des spores**

Les spores non germées ont été récupérées puis rincées avec de l'eau distillée stérile et repiquées sur un milieu M sain. Après une semaine d'incubation à 27° C à l'obscurité, les spores germées ont été comptées sous microscope optique (G 100x).

#### 4.2.6. Détermination du taux de colonisation racinaire par les CMA

Pour détecter la colonisation des racines par les CMA, cinq systèmes racinaires de chaque traitement ont été examinés. Les racines ont été colorées selon la technique décrite par Phillips & Hayman (1970).

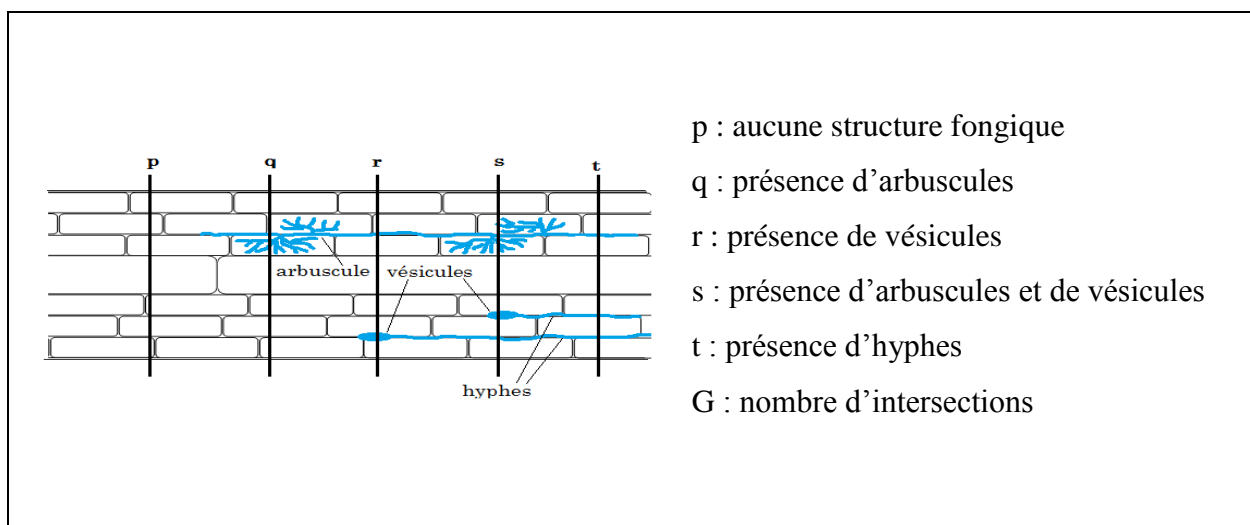
Les taux de mycorhization ont été déterminés par la méthode de McGonigle et al. (1990). Cette technique consiste à placer entre lame et lamelle 20 fragments racinaires colorés ayant chacun 1 cm de longueur. L'observation des différentes intersections pouvant exister entre l'axe de l'objectif et le fragment de racine colorée a été faite au microscope optique (G 400x). Trois lectures par fragment ont été réalisées et cinq lames par traitement ont été préparées. Au total, au moins 100 fragments racinaires ont été utilisés pour chaque traitement (Fig. 12).

Le pourcentage de colonisation total = (nombre d'intersections observées – nombre d'intersections sans champignon)\*100 / nombre d'intersections.

$$\text{Taux total H} = 100 \cdot (G-p)/G$$

$$\text{Taux d'arbuscules A} = 100 \cdot (q+s)/G$$

$$\text{Taux de vésicules V} = 100 \cdot (r+s)/G$$



**Figure 12** Les différentes intersections possibles entre l'axe de l'objectif du microscope et les structures fongiques dans un fragment racinaire mycorhizé par les CMA

## **5. Extraction et analyses des acides gras liés aux phospholipides (AGPL) et de l'ergostérol à partir des sols**

### **5.1. Extraction des acides gras liés aux phospholipides (AGPL)**

#### **5.1.1. Extraction des acides gras**

Les AG sont extraits selon la méthode de Bligh & Dyer modifiée par (Frostegård et al., 1991). 10 ml de la solution Bligh and Dyer (250 ml de chloroforme + 500 ml de méthanol + 200 ml de tampon citrate) ont été ajoutés à 5 g de sol lyophilisé. Après agitation pendant 15 secondes, les tubes sont laissés au repos pendant 2 h à température ambiante. Les échantillons ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes et le surnageant a été transféré à un autre tube à essai (50 ml). Le sol a été rincé avec 5 ml de la solution Bligh & Dyer, le tube a été agité pendant 15 secondes et les échantillons centrifugés à 3000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant a été ajouté au tube de 50 ml. La phase contenant les lipides a été séparée en ajoutant 4 ml de chloroforme et 4 ml de tampon citrate. Après agitation pendant 1 minute, les échantillons sont laissés au repos toute la nuit à température ambiante. La phase supérieure a été transférée vers un tube à essai en verre (15 ml), puis évaporée sous azote à 40 °C.

#### **5.1.2. Trans-estérification**

20 µl de standard interne C9:0 méthylé (0,25 µg/µl) ont été ajoutés à chaque échantillon. Après évaporation sous azote, les échantillons ont été dissouts dans 1 ml de Toluène/Méthanol (1:1) et le mélange a été bien vortexé. 1 ml de KOH (0,2M) préparé dans du méthanol le jour même a été ajouté aux échantillons. Ces derniers ont été incubés à 37 °C dans un bain-marie pendant 15 minutes. Les échantillons ont été laissés se refroidir pendant 20 minutes. 2 ml d'Hexane/Chloroforme (4:1) + 0,3 ml d'acide acétique (1M) + 2 ml d'eau ultra pure ont été ajoutés aux échantillons. Après agitation, les échantillons ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes. La phase supérieure de chaque échantillon a été transférée dans un tube en verre (15 ml) avec une pipette Pasteur et évaporés sous azote sans chauffer. Les échantillons secs ont été dilués dans 100 µl d'Hexane et agités pendant quelques secondes, puis ils ont été ensuite transférés dans de petits vials et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

## 5.2. Extraction de l'ergostérol

L'ergostérol a été extrait à l'abri de la lumière en ajoutant 5 ml de méthanol à 4 g de sol lyophilisé. Après agitation de 1 minute, les échantillons sont laissés toute la nuit à température ambiante puis incubés le lendemain à 70 °C pendant 90 minutes. Ils sont ensuite refroidis dans un bain de glace. 1 ml d'eau distillée et 2 ml de cyclohexane sont ajoutés et les échantillons sont agités pendant 20 secondes, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes. La phase supérieure a été jetée et la phase restante a été rincée deux fois avec 1.5 ml de cyclohexane et évaporée sous azote à 40 °C.

## 5.3. Analyses des acides gras liés aux phospholipides et de l'ergostérol

L'analyse des AG a été réalisée à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse Perkin Elmer Autosystem, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) (Norwalk, CT) et d'une colonne capillaire EC-1000 (Alltech) (30m x 0,53mm i.d.). Le gaz vecteur est l'Hydrogène (3,6 ml.min<sup>-1</sup>). Après analyses, les échantillons sont évaporés sous azote et conservés au congélateur. L'extrait final de l'extraction de l'ergostérol a été analysé en utilisant un chromatographe à phase gazeuse Perkin Elmer Autosystem équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID) (Norwalk, CT) et d'une colonne capillaire HP5. La concentration d'ergostérol est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage de différentes dilutions.

## 6. Paramètres du stress oxydant et dosage protéique

### 6.1. Extraction du contenu protéique des racines

Entre 8 et 30 mg des échantillons ont été broyés à l'aide d'un mortier dans de l'azote liquide, puis suspendus dans 1 mL de tampon phosphate (10 mM). Après centrifugation (3 min/1000 g) à 4 °C, 2,5 µl de 2,6 di\_tert-butyl-4-methylphenol (2,5 g/L d'éthanol) ont été ajoutés à 250 µL du surnageant pour éviter l'oxydation du malondialdéhyde (MDA). Le reste du surnageant a été utilisé pour déterminer l'activité totale de la SOD et la peroxydase (POD).

### 6.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La production du MDA a été évaluée grâce à la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). 200 µl de l'extrait végétal ont été mélangés avec 1 ml de HCl (0.1 N) et extraits deux fois avec 3 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange a été ensuite agité pendant 5

minutes puis centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes. La phase organique a été prélevée et évaporée sous azote. Après évaporation, l'extrait a été resuspendu dans 100 µl de méthanol. Le système analytique comporte une pompe Jasco PU-980, une colonne Nucleosil (C18, 150 x 4.6 mm, 5µm particle size), un injecteur automatique (Rheodyne 7725), un détecteur à UV (=532 nm) et un intégrateur Shimadzu CR3A (Vasse Industries, Lille, France). La phase mobile est constituée d'un mélange de méthanol et de tampon phosphate dans les proportions suivantes 60/40 (v/v). Le tampon phosphate est un mélange de tampon phosphate (50 mM) et de méthanol 60/40 (v/v) ajusté au pH 6,8 avec du KOH (1 M). Le tetraethoxypropane (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) a été utilisé comme standard, et l'acide thiobarbiturique (TBA) comme réactif du dosage du MDA. 100 µl des solutions standards et de l'extrait méthanolique ont été injectés dans le système CLHP, et le produit MDA-TBA a été détecté.

### **6.3. Dosage de l'activité peroxidase (POD)**

L'activité de la POD a été déterminée selon la méthode décrite par Mitchell et al. (1994) qui utilise le BTS 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) comme donneur d'électrons. Pour chaque échantillon, 5µL du surnageant précédemment obtenu ont été mélangés à 995 µL du mélange réactionnel. Pour chaque échantillon, le témoin est constitué de 5 µL d'échantillon mélangé avec 995 µL de mélange réactionnel sans le substrat de la réaction enzymatique, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La formation de radicaux cationiques a été mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 412 nm ( $\epsilon = 32400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) grâce à un lecteur de microplaque avec spectrophotomètre UV/Visible intégré (Multiscan GO, ThermoScientific, France) pendant 20 minutes. L'activité spécifique a été mesurée en unité/mg de protéines.

### **6.4. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD)**

L'activité totale de la SOD a été déterminée à partir de 20 µL de surnageant en utilisant le kit (19160 SOD) commercialisé par Sigma-Aldrich (3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA), selon les instructions du fabricant. La SOD a été quantifiée grâce à une gamme étalon réalisée avec des concentrations croissantes de solution standard SOD allant de 0,001 U/mL à 200 U/mL. La lecture a été réalisée grâce à un lecteur de microplaque avec spectrophotomètre UV/Visible intégré (Multiscan GO, ThermoScientific, France) à 450 nm. L'activité enzymatique a été exprimée en U/µg de protéines.

## 6.5. Dosage des protéines

Les concentrations des protéines totales ont été déterminées selon la méthode de Smith et al. (1985) à l'aide d'un lecteur de microplaque avec spectrophotomètre UV/Visible intégré (Multiskan GO, Thermo Scientific, France). La teneur en protéines a été mesurée en utilisant un kit commercial (BCA kit de dosage de protéines, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et la BSA (albumine du sérum bovin) comme standard.

## 7. Analyses statistiques

Le logiciel utilisé pour l'analyse statistique des résultats est STATGRAPHICS (*Manugistic Inc. Rockville, MD, USA*).

Le test de l'homogénéité de la variance de Levene a été vérifié avant l'utilisation des tests des comparaisons multiples (ANOVA).

Les différences entre le témoin (0 %) et les différentes concentrations de diesel et celles entre le contenus en acides gras spécifiques aux bactéries et en ergostérol ont pu être analysées grâce au test LSD (*Least Significant Difference*) avec un risque d'erreur de 5 %.

Les différences entre les taux de germination des spores en absence et en présence de diesel ont pu être analysées grâce au test  $\chi^2$  disponible sur le site de l'université de Jussieu : <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/chideux>. La P valeur utilisée est 0,05.

Toutes les données exprimées en pourcentage ont été transformées en coordonnées angulaires (arcsinus de la racine carrée :  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ ), afin de pouvoir réaliser le test LSD avec un risque d'erreur de 5 %.

# **Partie III**

## **Résultats et discussion**

## **PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION**

### **CHAPITRE I. BIODIVERSITE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DANS LES SOLS AGRICOLES CULTIVES PAR LA TOMATE A PROXIMITE D'INSTALLATIONS INDUSTRIELLES**

#### **1. Introduction**

La santé des sols est définie comme étant la capacité continue du sol à fonctionner comme un écosystème vivant. Un équilibre entre les différentes composantes chimiques, physiques et biologiques, notamment microbienne contribue à maintenir la santé des sols. Ainsi, parmi les indicateurs biologiques qui pourraient être utilisés pour évaluer la santé et la qualité des sols, la biomasse microbienne (bactérienne et fongique saprotrophe et mycorhizienne) est considérée comme un bon marqueur (Rosa & Sobral, 2008). En effet, les microorganismes constituent d'excellents indicateurs de la santé du sol car ils répondent rapidement aux changements des écosystèmes dans le sol (Masto et al., 2009). Les microorganismes telluriques participent à la décomposition de la matière organique du sol; en outre, ils sont les principaux moteurs de tous les cycles de nutriments. Ils jouent également un rôle crucial dans l'amélioration de la structure du sol, la dégradation des polluants et l'amélioration de la croissance des plantes. Ainsi, un bon fonctionnement des microorganismes du sol se traduit généralement par un bon fonctionnement de l'écosystème (Brookes, 1995; Wagg et al., 2014) et donc une bonne santé du sol.

Les activités industrielles contribuent à la pollution de l'atmosphère en libérant des produits chimiques et des particules polluantes dans l'air. Une partie importante des émissions atmosphériques industrielles finit par être déposée à la surface du sol et conduit à sa contamination (Asubiojo et al., 1991; Shukurov et al., 2014; Yang et al., 2009; Zhang et al., 2013). Cette pollution du sol d'origine principalement anthropique pourrait compromettre la viabilité du sol et son bon fonctionnement en impactant la biodiversité microbienne tellurique (Abaye et al., 2005; Hu et al., 2007). Plusieurs études ont montré que la pollution du sol peut diminuer la biomasse et les activités des microorganismes du sol ce qui conduit à la modification des processus biologiques du sol tels que la fixation de l'Azote et la dégradation

de la matière organique (Bååth, 1989; Brookes, 1995; Chen et al., 2014). Une diminution de la diversité et du nombre de spores des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) dans les sols contaminés par les ETM a été rapportée par Del Val et al. (1999), Zarei et al. (2008) et Krishnamoorthy et al. (2015). De plus, la diminution de la diversité des CMA et / ou du potentiel mycorhizien du sol peut avoir des effets négatifs sur l'établissement et la productivité des plantes (van der Heijden et al., 1998; Gattai et al., 2011; Hart and Reader, 2002; Munkvold et al., 2004).

La structure de la communauté microbienne peut être utilisée comme un bon indicateur des effets toxiques des polluants car il est possible de détecter une altération dans la communauté microbienne avant même que la performance globale du système du sol soit altérée, d'où la nécessité d'un moyen qui donne une indication sur la biomasse et la viabilité microbienne. L'un des moyens permettant d'évaluer la biomasse microbienne est la quantification des marqueurs lipidiques spécifiques. Il s'agit de l'analyse des acides gras associés aux phospholipides (AGPL) i15: 0, a15: 0, i16: 0, i17: 0 et a17: 0 spécifiques des bactéries Gram-positive, les AGPL 18:1 $\omega$ 7, cy17: 0 et cy19:0 spécifiques des bactéries Gram-négative, le C16: 1 $\omega$ 5 associé aux phospholipides (PL) et aux lipides neutres (NL) spécifiques des CMA, l'ergostérol et le C18: 2 $\omega$ 6,9 associé aux PL spécifiques des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens (Frostegård et al., 1991). Cette technique permet de caractériser la communauté microbienne directement dans son habitat naturel, sans avoir recours à des techniques traditionnelles d'isolement (Bååth et al., 1998). Elle permet également de fournir des informations sur des groupes particuliers de microorganismes présents dans le sol. Les changements dans les profils des AGPL révèlent des changements dans la structure globale des communautés microbiennes (Frostegård et al., 2011).

Ainsi, ce travail avait pour objectif d'évaluer l'impact de la pollution industrielle sur la viabilité des microorganismes telluriques en évaluant la biomasse microbienne tellurique fongique (CMA, ectomycorhiziens et saprotrophes) et bactérienne, le potentiel mycorhizogène du sol et la diversité des CMA dans trois parcelles agricoles cultivées par des tomates situées à proximité de trois sites industriels du Nord-est d'Algérie, le Complexe Sidérurgique ArcelorMittal Algérie (AMA) d'El-Hadjar, la Société Algérienne des Fertilisants Fertial et la Société du Ciment de Hadjar Soud (SCHS) et dans une parcelle témoin située dans une zone non industrialisée à Séraïdi.

## 2. Expression des résultats

### 2.1. Caractérisation physico-chimiques des sols des sites étudiés

Les sols des parcelles P1, P2 et P3 correspondant respectivement aux sites AMA, Fertial et SCHS, se caractérisent par un pH alcalin (7,9 ; 8,38 et 8,19) tandis que le sol de la parcelle témoin P4 se caractérise par un pH faiblement alcalin (7,01). La conductivité électrique de la solution aqueuse des quatre sols est faible allant de 0,16 à 0,35 mS/cm. indiquant une faible salinité des sols. Les quatre parcelles sont faiblement calcaires (1,37 - 1,98 %) et riches en azote (46 -154,5 mg.Kg<sup>-1</sup>), en phosphore (11,3 – 135,6 mg.Kg<sup>-1</sup>) et en potassium (155 - 725 mg.Kg<sup>-1</sup>). La teneur en matière organique des quatre parcelles est relativement faible allant de 0,85 à 1,79 %. Les sols des parcelles P1 et P4 ont une structure limono argileuse tandis que les sols des parcelles P2 et P3 ont une structure argileuse et limoneuse (Tab. 7).

**Tableau 7** Caractérisation physico-chimique des sols des quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.

Parcelles	P1	P2	P3	P4
	limono	argileuse	limoneuse	Limono
Paramètres	argileuse			argileuse
pH <sub>eau</sub>	7,9±0,026	8,38±0,04	8,19±0,015	7,01±0,09
CE (mS/cm)	0,24±0,01	0,16±0	0,3±0	0,35±0,01
MO (%)	1,05±0,03	1,75±0,19	0,85±0,1	1,79±0,12
CaCO <sub>3</sub> tot (%)	1,44±0,01	1,98±0	1,46±0	1,37±0
Argile (%)	36	44	10	15
Limon (%)	32	20	50	34
Sable (%)	32	36	40	51
N Total (mg.Kg <sup>-1</sup> )	68	154.50	95.50	46
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	12.85	135.60	11.35	97.95
K total (mg.Kg <sup>-1</sup> )	300	725	400	155
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) (mg.Kg <sup>-1</sup> )	7.50	16	6.55	4.70
Ammoniac (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) (mg.Kg <sup>-1</sup> )	07	15.25	5.70	04

### 2.2. Caractérisation de la pollution chimique

Les teneurs maximales autorisées en éléments métalliques dans les sols agricoles fixées par la norme AFNOR NFU 44-041 ont été considérées comme valeurs seuils dans notre étude.

La teneur du sol de la parcelle P1 en ETM (Plomb, Chrome et Nickel) est élevée (1154,2 ; 203 et 136,3 mg.Kg<sup>-1</sup>) et dépasse largement la valeur seuil. Dans le sol de la parcelle P2, les teneurs des deux ETM, Plomb et Manganèse, dépassent légèrement la valeur seuil. Elles sont de 120,99 et 314,57 mg.Kg<sup>-1</sup> de sol. La parcelle P3 est caractérisée par la présence de teneurs élevées en ETM (Plomb, Cuivre, Zinc, Manganèse, Chrome et Nickel) comparées à celles admises par la norme. Ces teneurs ont atteint respectivement les valeurs de 632,12 ; 512,38 ; 977,36 ; 1120,36 ; 233 et 183,69 mg.Kg<sup>-1</sup> de sol. Dans le sol de la parcelle témoin P4 la teneur en Plomb (121,29 mg.Kg<sup>-1</sup>) dépasse légèrement la valeur seuil autorisée dans les sols agricoles (Tab. 8).

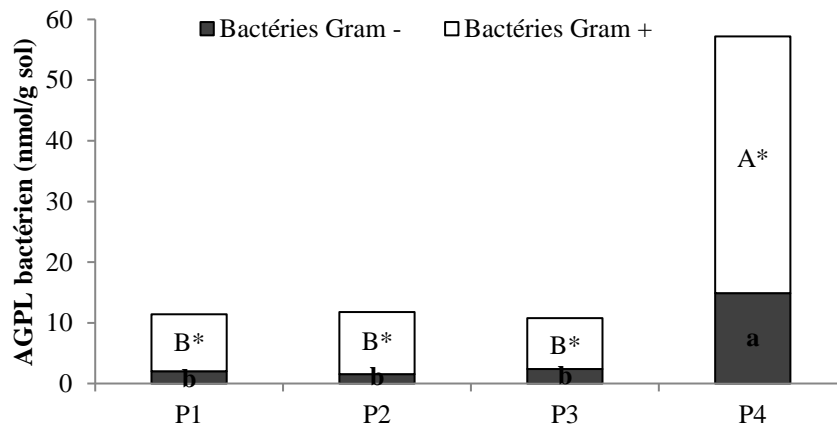
**Tableau 8** Quantité des éléments traces métalliques (ETM) en mg.Kg<sup>-1</sup> de sol dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4.

Parcelles	P1	P2	P3	P4	Norme (mg.Kg <sup>-1</sup> de sol)
Pb	1154.2	120.99	632.12	121.29	100.0 (AFNOR N F U 44-041)
Cd	1.254	0.45	0.89	0.39	2.00 (AFNOR N F U 44-041)
Fe	5104	771.33	1002.17	185.6	4000.0 (AFNOR N F U 44-041)
Cu	21	27.57	512.38	6.26	100.0 (AFNOR N F U 44-041)
Zn	133.4	281.25	977.36	289.96	300.0 (AFNOR N F U 44-041)
Mn	290	314.57	1120.36	174	300.0 (AFNOR N F U 44-041) >8000 (Kabata-Pendias, 2000)
Cr	203	106.32	233	95.65	150.0 (AFNOR N F U 44-041)
Se	0.12	0.13	0.15	0.12	10.00 (Baize, 2002)
Hg	0.15	0.08	0.1	0.07	1.00 (Arrêté 08/01/1998. ineris.fr)
Ni	136.3	24.57	183.69	28.34	50.00 (AFNOR N F U 44-041) 100.0 (Baize, 1997 et 2002)

### 2.3. Détermination de la biomasse microbienne du sol

#### 2.3.1. Teneur des sols en acides gras associés aux phospholipides (AGPL) spécifiques des bactéries

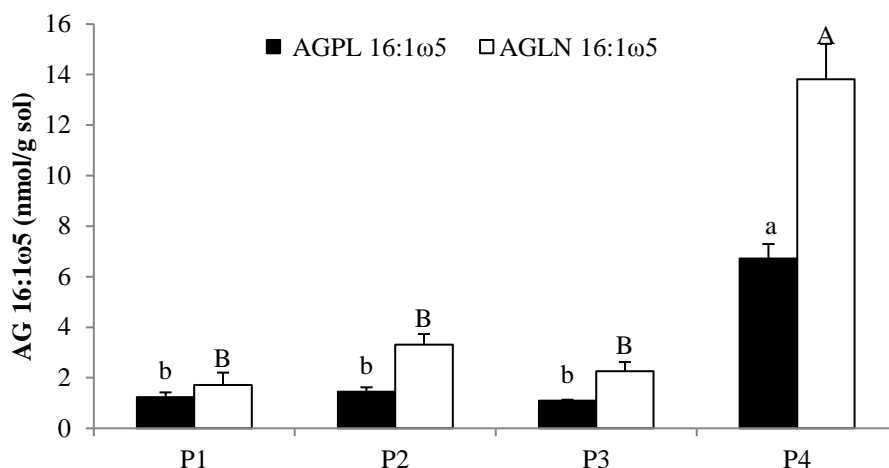
Les quantités des AGPL spécifiques des bactéries Gram-positives i15: 0, a15: 0, i16: 0, i17: 0 et a17: 0 et Gram-négatives 18:1 $\omega$ 7, cy17: 0 et cy19:0 montrent des différences significatives dans les parcelles P1, P2 et P3 comparées avec la parcelle P4 (Fig.13). D'une manière générale, la quantité de la biomasse bactérienne Gram-positives a été plus élevée que celle des bactéries Gram-négatives dans les quatre parcelles. Par comparaison à P4, les quantités des AGPL spécifiques aux bactéries Gram-négatives ont été entre 84 et 90 % plus faibles dans les parcelles P1, P2 et P3, tandis que celles spécifiques aux bactéries Gram-positives étaient de 76 à 80 % plus faibles dans les mêmes parcelles P1, P2 et P3 (Fig. 13). Le rapport de la biomasse champignon/bactérie a été de 0,15 et 0,11 dans les parcelles P3 et P4 respectivement, il diminue dans P1 et P2 pour atteindre une valeur de 0,04 et 0,08 respectivement.



**Figure 13** Quantité des AGPL bactériens (Gram - et Gram +) dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre P1, P2 et P3 par comparaison avec P4 selon le test LSD ( $P < 0,05$ ).

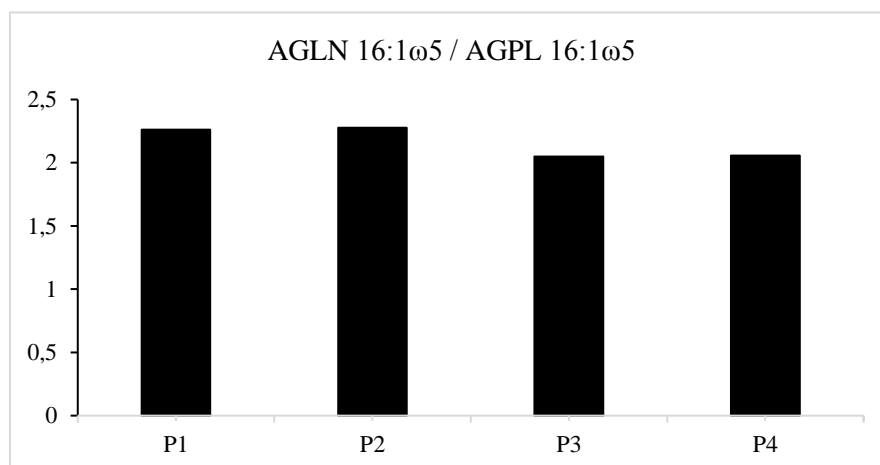
#### 2.3.2. Teneur des sols en acides gras 16:1 $\omega$ 5 associés aux phospholipides (AGPL) et aux lipides neutres (AGLN) spécifiques des champignons mycorhiziens à arbuscules

La quantité des AGPL 16:1 $\omega$ 5 a été en moyenne six fois plus faible dans les parcelles P1, P2 et P3 comparée à la parcelle témoin P4. De même, la quantité d'AGLN 16:1 $\omega$ 5 a été significativement faible dans les parcelles P1, P2 et P3 par comparaison à la parcelle P4, où elle baisse de 88, 76 et 84 % respectivement (Fig. 14).



**Figure 14** Teneur en acides gras associés aux phospholipides (AGPL) 16:1 $\omega$ 5 et en acides gras associés aux lipides neutres (AGLN) 16:1 $\omega$ 5 dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre P1, P2 et P3 par comparaison avec P4 selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

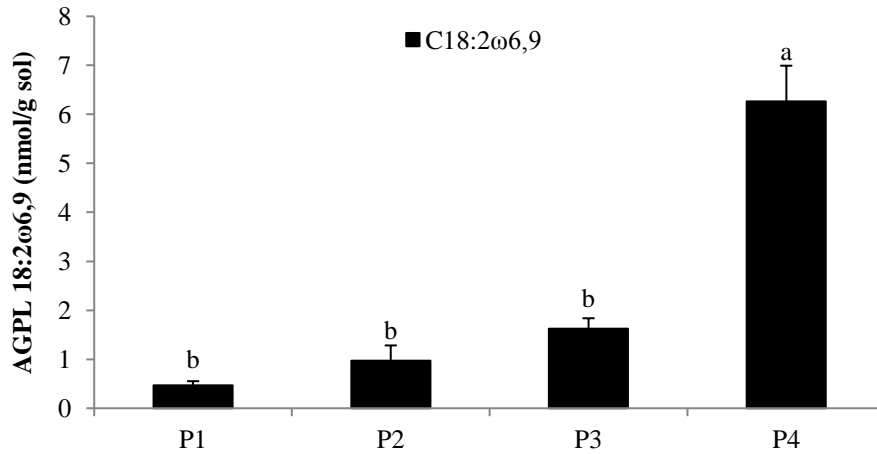
Le rapport AGLN 16:1 $\omega$ 5 à AGPL 16:1 $\omega$ 5 a été compris entre 2,05 et 2,27 dans les quatre parcelles (Fig. 15).



**Figure 15** le rapport AGLN 16:1 $\omega$ 5 à AGPL16:1 $\omega$ 5 dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre P1, P2 et P3 par comparaison avec P4 selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

### 2.3.3. Teneur des sols en acides gras 18:2 $\omega$ 6,9 associés aux phospholipides spécifiques des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens

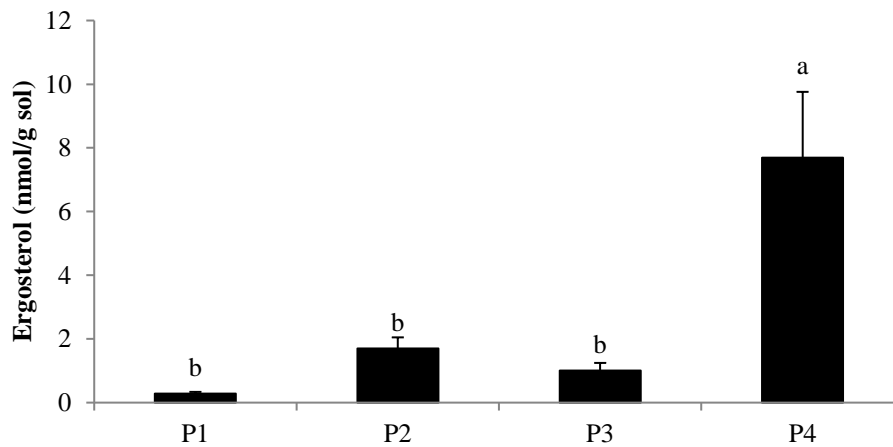
Les résultats montrent une différence significative entre la quantité d'AGPL 18:2 $\omega$ 6,9 dans les parcelles P1, P2 et P3 et celle estimée dans la parcelle P4. La diminution est de 92, 84 et 74 % dans les parcelles P1, P2 et P3 respectivement (Fig. 16).



**Figure 16** Quantité des AGPL 18 :2 ω 6,9 dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre P1, P2 et P3 par comparaison avec P4 selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

#### 2.3.4. Teneur des sols en ergosterol spécifiques des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens

La quantité d'ergostérol a été 27, 5 et 8 fois plus faible dans les parcelles P1, P2 et P3 respectivement, comparée à la parcelle P4 (Fig. 17).



**Figure 17** Quantité d'ergostérol dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre P1, P2 et P3 par comparaison avec P4 selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

#### 2.4. Potentiel mycorhizogène du sol

Le potentiel mycorhizogène du sol a été estimé pour les quatre parcelles. Le nombre de propagules a été plus faible dans les parcelles P1, P2 et P3 par rapport à celui calculé pour la parcelle témoin P4. Dans la parcelle P1, le potentiel mycorhizogène a été six fois plus faible par comparaison à la parcelle témoin P4. Une baisse de 12 et 13 fois a été observée dans les parcelles P2 et P3 respectivement (Tab. 9)

**Tableau 9** Nombre de Propagules dans les quatre parcelles (P1, P2, P3 et P4)

	P1	P2	P3	P4
Propagules/Kg sol	1300	700	666	8666

### 2.5. Diversité et abondance des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules

En se basant sur les caractéristiques morphologiques des spores isolées à partir des quatre parcelles (Planche 1), 13 espèces de CMA (*Funneliformis mosseae*, *Funneliformis geosporum* –like, *Septoglosum constrictum*, *Septoglosum deserticola*, *Rhizophagus clarus*, *Rhizophagus irregularis*–like, *Scutellospora calospora*, *Acaulospora laevis*-like, *Acaulospora* sp, *Entrophospora infrequens*, *Pacispora scintillans*-like, *Glomus rubiforme*, *Claroideoglosum lamellosum*) appartenant à cinq familles (*Glomeraceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Pacisporaceae*) ont été identifiées (Tab. 10, 11). La parcelle P3 située à proximité de la SCHS, compte le nombre de spores le plus faible, 20 spores/100 g de sol, ce qui correspond à 5 % du nombre total des spores collectées dans les quatre parcelles. Les espèces de CMA identifiées dans le sol de la parcelle P3 appartiennent aux deux genres *Funneliformis* et *Septoglosum* de la famille *Glomeraceae*. Le nombre des spores augmente pour atteindre 40 spores/100 g de sol dans la parcelle P2 située à proximité de la Société des Fertilisants d'Algérie Fertial, caractérisée par des teneurs élevées en Pb et en Mn et 136 spores/100 g de sol (Tab. 10) dans la parcelle P1 située à proximité du Complexe Sidérurgique AMA caractérisée par une teneur très élevée en Pb (1154,2 mg.Kg<sup>-1</sup>) et des teneurs en Cr et en Ni qui dépassent les valeurs seuils. Les spores isolées de la parcelle P2 appartiennent aux deux familles de CMA : *Glomeraceae* et *Gigasporaceae* et aux quatre genres : *Funneliformis*, *Scutellospora*, *Rhizophagus*, et *Septoglosum*, tandis que celles issues de la parcelle P1 font partie de trois familles : *Glomeraceae*, *Gigasporaceae* et *Acaulosporaceae* et cinq genres : *Acaulospora*, *Funneliformis*, *Scutellospora*, *Rhizophagus*, et *Septoglosum*. Le nombre de spores le plus élevé a été noté dans la parcelle P4 (216 spores/100 g de sol). Les spores identifiées dans cette parcelle P4 appartiennent aux quatre familles de CMA *Glomeraceae*, *Acaulosporaceae*, *Pacisporaceae* et *Claroideoglomeraceae* et sont représentées par sept genres : *Funneliformis*, *Septoglosum*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Pacispora*, *Glomus* et *Claroideoglosum*.

La famille *Glomeraceae* compte le nombre de spores le plus élevé avec 71 % du nombre total. Elle est représentée par ses quatre genres *Funneliformis*, *Septogloimus*, *Rhizophagus* et *Glomus* dans les quatre parcelles. Les familles *Gigasporaceae* et *Acaulosporaceae* représentent un pourcentage de 15 et 8 % du nombre total des spores, respectivement. Les spores de la famille des *Gigasporaceae* ont été identifiées dans les sols des parcelles P1 et P2, tandis que les spores de la famille des *Acaulosporaceae* ont été identifiées dans les parcelles P1 et P4. Les spores des familles *Pacisporaceae* et *Claroideoglomeraceae* identifiées exclusivement dans la parcelle témoin P4 ne représentent que 5 et 1 % du nombre total des spores identifiées dans les quatre parcelles. 68 et 31 % des spores identifiées dans les parcelles polluées appartiennent aux familles *Glomeraceae* et *Gigasporaceae* respectivement.

**Tableau 10** Nombre de spores de CMA identifiées dans les parcelles P1, P2, P3 et P4

Espèces de CMA	P1	P2	P3	P4
	(Nombre de spores /100 g de sol)			
<i>Funneliformis mosseae</i>	46	nd	4	88
<i>Funneliformis geosporum</i> -like	12	4	10	nd
<i>Septogloimus constrictum</i>	12	2	6	62
<i>Septogloimus deserticola</i>	2	nd	nd	nd
<i>Rhizophagus clarus</i>	14	18	nd	nd
<i>Rhizophagus irregularis</i> -like	nd	4	nd	nd
<i>Scutellospora calospora</i>	48	12	nd	nd
<i>Acaulospora laevis</i> -like	nd	nd	nd	30
<i>Acaulospora sp</i>	2	nd	nd	nd
<i>Entrophospora infrequens</i>	nd	nd	nd	2
<i>Pacispora scintillans</i> -like	nd	nd	nd	20
<i>Glomus rubiforme</i>	nd	nd	nd	10
<i>Claroideogloimus lamellosum</i>	nd	nd	nd	4
Total (nombre de spores /100 g de sol)	136	40	20	216
Nombre d'espèces	7	5	3	7
Nombre de genres	5	4	2	7
Nombre de familles	3	2	1	4

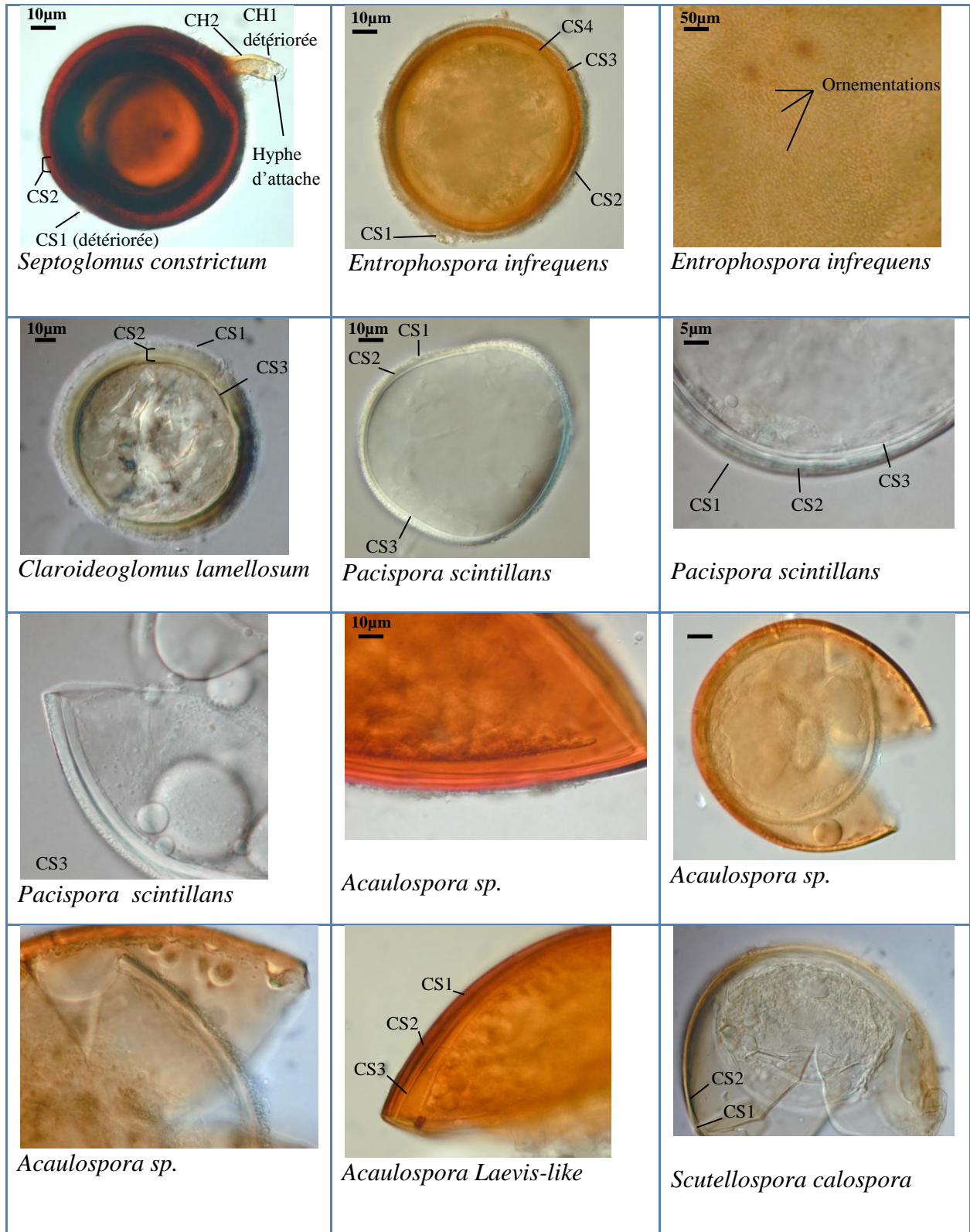
nd : Non déterminé

*F. mosseae* et *S. constrictum* sont les espèces de spores les plus abondantes puisqu'elles représentent plus de la moitié du nombre total des spores collectées dans les quatre parcelles. *S. Constrictum* a été détectée dans les quatre parcelles et *F. mosseae* dans les trois parcelles P1, P3 et P4. L'espèce *F. geosporum* n'a été détectée que dans les parcelles polluées P1, P2 et P3. L'espèce *S. calospora* qui représente 15% du nombre total des spores et l'espèce *R. clarus* ont été détectées dans les parcelles polluées P1 et P2. Les autres espèces de spores n'ont été identifiées que dans la parcelle P4 à l'exception de l'espèce *Acaulospora* sp qui a été détectée dans la parcelle P1.

**Tableau 11** Classification des espèces de CMA autochtones (www.mycobank.org)

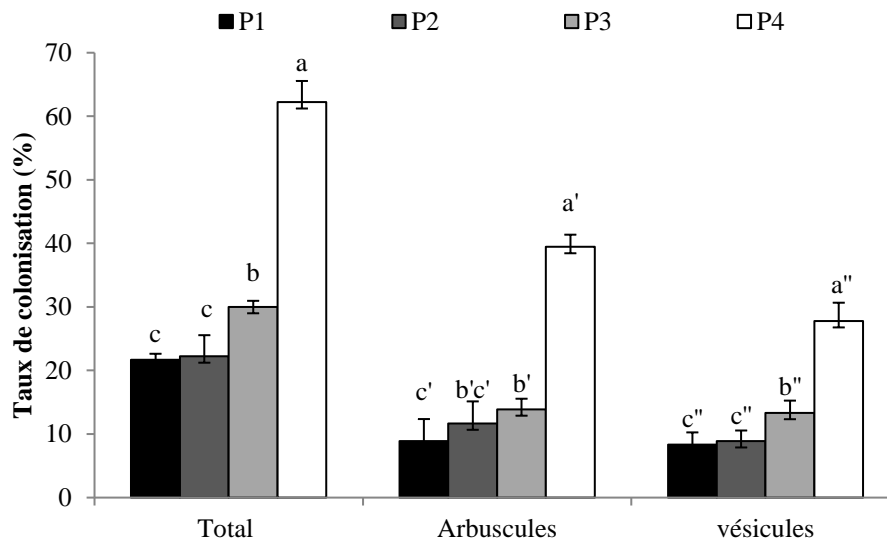
Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce		
<i>Glomeromycota</i>	<i>Glomeromycetes</i>	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>		
					<i>Funneliformis geosporum</i>		
				<i>Rhizophagus</i>	<i>Rhizophagus irregularis</i>		
					<i>Rhizophagus clarus</i>		
				<i>Septoglomus</i>	<i>Septoglomus constrictum</i>		
			<i>Septoglomus deserticola</i>				
				<i>Glomus</i>	<i>Glomus rubiforme</i>		
			<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i>	<i>Claroideoglomus lamellosum</i>		
		<i>Diversisporales</i>			<i>Gigasporaceae</i>	<i>Scutellospora</i>	<i>Scutellospora calospora</i>
					<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora laevis</i>
<i>Entrophospora</i>	<i>Entrophospora infrequens</i>						
<i>Pacisporaceae</i>	<i>Pacispora</i>				<i>Pacispora scintillans</i>		

**Planche 1** : Spores de champignons mycorhiziens à arbuscules isolées des quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. (CH : couche de la paroi hyphale, CS : couche de la paroi sporale)



## 2.6. Taux de mycorhization des racines des plants de tomate par les CMA autochtones

L'observation microscopique montre la présence de structures spécifiques de CMA (arbuscules, vésicules et hyphes intra-racinaires) dans les racines colorées au bleu de trypan des plants de tomate prélevés des quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. La colonisation racinaire totale a été approximativement 3 fois plus faible dans la parcelle P1 (21,66 %) et P2 (22,22 %) et 2 fois plus faible dans la parcelle P3 (30 %) par comparaison à la parcelle témoin P4 (62,22 %) (Fig. 18). De même, les pourcentages d'arbuscules et de vésicules dans les racines des plants de tomate collectées dans les parcelles P1, P2 et P3 (8,9, 11,7 et 13,9 % respectivement) étaient significativement faibles par comparaison à ceux des racines de tomate collectées dans la parcelle P4 (27,8 %) (Fig. 18).



**Figure 18** Taux de colonisation total, arbusculaire et vésiculaire des racines des plants de tomate dans les quatre parcelles P1, P2, P3 et P4. Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre P1, P2 et P3 par comparaison à P4 selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

## 3. Discussion

L'objectif de ce premier volet de la thèse est l'étude de l'impact des rejets industriels (dépôt des émissions atmosphériques et déversement) sur la biomasse microbienne. L'intérêt a porté notamment sur l'abondance et la biodiversité des CMA autochtones associés à la rhizosphère de plants de tomate cultivés sur des parcelles agricoles situées à proximité d'installations industrielles et donc potentiellement contaminées par divers types de polluants. Depuis plus de 30 ans, les trois parcelles P1, P2 et P3 sont exposées aux émissions polluantes

des usines installées avoisinantes, qui sont respectivement le Complexe Sidérurgique ArcelorMittal (AMA) d'El-Hadjar, la Société Algérienne des Fertilisants Fertial et la Société du Ciment de Hadjar Soud (SCHS). Les analyses physico-chimiques ont révélé une forte contamination des sols des trois parcelles P1, P2 et P3 par les ETM dont le Plomb, le Cuivre, le Zinc, le Manganèse, le Chrome et le Nickel. En revanche, la teneur du sol de la parcelle témoin P4 en ETM est en dessous des seuils fixés par la norme AFNOR NFU 44-041, excepté le Plomb qui dépasse légèrement le seuil. L'impact de la pollution sur le microbiote des sols des différentes parcelles étudiées a été évalué grâce à la quantification des marqueurs lipidiques spécifiques des bactéries (Les AGPL i15: 0, a15: 0, i16: 0, i17: 0, a17: 0, 18:1 $\omega$ 7, cy17: 0 et cy19:0) ainsi que des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens (l'ergostérol et l'AGPL C18: 2 $\omega$ 6,9) et mycorhiziens à arbuscules (l'AGPL et l'AGLN C16: 1 $\omega$ 5) (Frostegård et al., 1991). La quantité d'AGPL peut être affectée par plusieurs facteurs environnementaux, y compris la présence de polluants comme les ETM (Bååth et al., 1998). Nos résultats montrent une diminution significative des quantités des différents AGPL spécifiques des bactéries Gram-positive et Gram-négative dans les parcelles polluées par rapport à la parcelle témoin. L'effet négatif des ETM sur la biomasse bactérienne du sol a été rapporté par Shentu et al. (2014) qui ont trouvé une corrélation négative entre les quantités des AGPL bactériens et la teneur du sol en cadmium. Des teneurs très élevées du même ETM provenant de l'épandage des boues de stations d'épuration sur des sols agricoles ont provoqué une baisse des AGPL bactériens (Abaye et al., 2005). De même, notre étude montre que la quantité d'AGPL 18:2 $\omega$ 6,9 ainsi que celle de l'ergostérol, marqueurs des champignons ectomycorhiziens et saprotrophes (Frostegård & Bååth, 1996; Yuan et al., 2008), sont significativement plus faibles dans les trois parcelles polluées comparées à la parcelle témoin non pollué. Nos résultats sont en accord avec les résultats de Pennanen et al. (1996) qui ont constaté une diminution des AGPL 18:2 $\omega$ 6,9 dans le sol de deux forêts de conifères historiquement polluées par les ETM. Dans notre étude, la quantité de l'AGPL 16:1 $\omega$ 5, marqueur de la biomasse des CMA (Olsson et al., 1997), a été six fois plus faible dans les parcelles polluées que dans la parcelle témoin. Nos résultats sont en concordance avec ceux de Frostegård et al. (1993) qui ont démontré que l'ajout d'ETM (cadmium, Cuivre, Nickel, Plomb et Zinc) à différentes concentrations, provoque une baisse significative des teneurs des sols en AGPL 16:1 $\omega$ 5. Dans une étude sur l'effet des ETM Chrome, Zinc, Plomb, Molybdène, Nickel et Cadmium sur la structure des communautés microbiennes, Åkerblom et al. (2007) ont constaté que l'AGPL 16:1 $\omega$ 5 a été négativement affecté par la présence des ETM dans le sol. De plus, le rapport AGLN/AGPL 16:1 $\omega$ 5 est compris entre 2,05 et 2,27 dans les parcelles

polluées P1, P2 et P3 et dans la parcelle témoin P4, indiquant un impact négatif de la pollution métallique sur le développement des CMA. En effet, un rapport (AGLN/AGPL 16:105) supérieur à 1 indique une prédominance des CMA (Olsson, 1999; Bååth, 2003) puisque ces derniers stockent une grande proportion de leur carbone sous forme de lipides neutres (Olsson & Johansen, 2000)

L'estimation de la viabilité des propagules de CMA via l'évaluation du potentiel mycorhizogène infectieux du sol (Porter, 1979) fournit des estimations réelles de l'état général de la communauté des CMA (Cabello, 1997). Le potentiel mycorhizogène du sol est jugé acceptable au-delà de 1500 propagules/Kg de sol et trop faible en dessous de 500 propagules. Nos résultats montrent que le potentiel mycorhizogène des sols issus des parcelles P1, P2 et P3 est de 6 à 13 fois plus faible que celui du sol de la parcelle témoin P4. Des effets similaires ont été décrits sur des sols contaminés par divers polluants par (Cabello, 1997; Gattai et al., 2011). La diminution du potentiel mycorhizogène infectieux des sols serait probablement due à une diminution du pouvoir germinatif. En effet, Weissenhorn & Leyval (1996) ont démontré qu'en plus du pH du sol et sa concentration en phosphore disponible, la teneur en ETM influence la germination des spores de CMA. La variation significative du potentiel mycorhizogène infectieux et du rapport AGLN /AGPL 16:105 enregistrés pour les quatre sols est confirmée par une diminution du nombre des spores de CMA qui a été de 6 à 37 fois plus faible dans les parcelles polluées comparées à la parcelle témoin P4.

13 espèces de CMA appartenant à cinq familles (*Glomeraceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Pacisporaceae*) et neuf genres (*Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Septoglosum*, *Glomus*, *Claroideoglosum*, *Scutellospora*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Pacispora*) ont été isolées et identifiées à partir des quatre parcelles. La diversité spécifique la plus faible a été trouvée dans la parcelle P3 avec seulement trois espèces de CMA (*Funneliformis mosseae*, *Funneliformis geosporum* –like, *Septoglosum constrictum*) suivie par la parcelle P2 qui compte cinq espèces (*Funneliformis geosporum* –like, *Septoglosum constrictum*, *Rhizophagus clarus*, *Rhizophagus irregularis*–like, *Scutellospora calospora*). La famille *Glomeraceae* est la famille dominante dans les différents sites étudiés qu'ils soient pollués ou non. Elle constitue toute seule plus de 68 % du nombre total des spores collectées dans les trois parcelles polluées et 56 % des spores collectées dans la parcelle non polluée P4. La dominance de la famille *Glomeraceae* a été rapportée dans d'autres études réalisées sur différents habitats tels que les sites géothermiques (Appoloni et al., 2008), les forêts tropicales (Wubet et al., 2004), et les sols agricoles (Daniell et al., 2001)

mais aussi les sols contaminés par les ETM (Hassan et al., 2011, Schneider et al. (2013). Les CMA appartenant à la famille *Glomeraceae* ont été décrits pour leur grande adaptabilité aux conditions de stress (Jacobson, 1997; Lenoir et al., 2016b). Nos résultats ont montré aussi que le genre *Funneliformis* représente plus du tiers des spores isolées dans les trois parcelles polluées. Cette espèce a déjà été isolée par plusieurs auteurs à partir de sols pollués par les ETM tels que l'Arsenic, le Cadmium, le Cuivre, le Plomb, l'étain et le Zinc (Weissenhorn et al., 1993 ; Whitfield et al., 2003; Ortega-Larrocea et al., 2007; Hassan et al., 2011). Les espèces du genre *Funneliformis* ont également été trouvées dominantes dans des sols riches en phosphore (Renker et al., 2005), dans des sols calcaires (Labidi et al., 2011) et dans des sols à forte salinité (Bencherif et al., 2015).

Par ailleurs, nos résultats ont révélé que les taux de mycorhization des racines de tomate cultivée dans les parcelles P1, P2 et P3 avoisinant les sites industriels sont relativement plus faibles (21 - 30 %) par comparaison à ceux de la tomate cultivée dans la parcelle témoin non polluée (62,22 %). Ces résultats corroborent plusieurs études sur des sols pollués par les ETM (Del Val et al., 1999; Firmin et al., 2015 ; Kumar et al., 2015; Sun et al., 2015) et sur des sols fortement salins ( He et al., 2007; Abdel Latef & Chaoxing, 2011; Bencherif et al., 2015). La diminution des taux de mycorhization des plants de tomate dans les parcelles polluées pourrait s'expliquer par l'effet négatif des ETM sur la germination des spores de CMA (Del Val et al., 1999). Pawlowska & Charvat (2004) ont démontré que la présence des ETM diminue la sporulation présymbiotique des spores des CMA ainsi que le développement des hyphes extraracinaires ce qui se répercute par la suite sur la colonisation racinaire.

#### **4. Conclusion**

Les résultats de cette étude montrent l'impact négatif de la pollution industrielle sur les communautés microbiennes des sols des agro-écosystèmes. L'analyse des marqueurs lipidiques révèle une baisse de la biomasse fongique et bactérienne dans les sols pollués. L'effet de la contamination des sols par les ETM s'est traduit par une diminution de la biodiversité et l'abondance des spores de CMA dans la rhizosphère des plants de tomate dans les quatre parcelles étudiées ce qui a eu comme conséquence, la diminution du potentiel mycorhizogène des sols agricoles et du taux de mycorhization des plants de tomate. Cette étude met en évidence les conséquences de la pollution industrielle sur les microorganismes bénéfiques du sol et souligne l'importance de préserver les agro-écosystèmes de l'impact néfaste des activités industrielles.



## **Chapitre II. Impact de la pollution par le diesel sur la mycorhization chez la tomate et le blé cultivés en microcosmes**

### **1. Introduction**

Les produits pétroliers, tels que le diesel, sont des dérivés utilisables du pétrole brut issus de son raffinage. Ils contiennent un mélange mixte d'hydrocarbures. Leur présence dans l'environnement, soit de façon accidentelle, lors des fuites des réservoirs de stockage ou des déversements pendant le transport, ou suite aux activités humaines, peut provoquer une pollution locale ou diffuse de l'environnement (Yanxun et al., 2011). La contamination des sols par le diesel a montré une augmentation constante en parallèle avec l'augmentation de la demande mondiale en énergie et l'augmentation du volume transporté de diesel (Njoku et al., 2009).

Une fois dans l'environnement, en particulier dans le sol, les composés du diesel présentent des effets délétères sur le fonctionnement de l'ensemble des systèmes biologiques. Les hydrocarbures contenus dans le diesel constituent un risque potentiel pour la santé humaine (Sydbom et al., 2001) et environnementale (Macoustra et al., 2015; Kim, 2014). Ils induisent une importante détérioration des propriétés chimiques et physiques des sols. Plusieurs études ont montré que la contamination du sol par le diesel augmente sa teneur en éléments traces métalliques (ETM) tels que le cadmium, le fer et le plomb, et entraîne des modifications du pH, de la conductivité électrique et des indices de fertilité du sol (Ujowundu et al., 2011; Khan et al., 2013; Wang et al., 2013). De nombreuses études ont montré que le diesel affecte négativement les communautés microbiennes telluriques. En effet, la contamination du sol par le diesel entraîne un changement dans leur structure, biomasse et activités enzymatiques (Serrano et al., 2009; Sutton et al., 2013; Cheraghi et al., 2015).

Le diesel exerce également des effets toxiques sur les plantes. Il a été démontré qu'il réduit la teneur des plantes en éléments minéraux (Wyszkowski & Wyszkowska, 2005), le taux de chlorophylle (Sanchez et al., 2013) et le taux de germination des semences (Adam & Duncan, 1999). De plus, la contamination par le diesel conduit à des changements dans la morphologie racinaires et réduit leur conductivité hydraulique (Hernández-Ortega et al., 2012). Les effets toxiques du diesel se traduisent par une diminution de la croissance et du développement des plantes (Adam & Duncan, 2003; Bona et al., 2011).

Dans la plupart des cas, le stress biotique et abiotique tels que la sécheresse, les inondations, les températures extrêmes, la salinité, les polluants organiques et inorganiques ainsi que les agents phytopathogènes déclenchent chez les plantes une réaction appelée stress oxydant qui peut endommager les composants cellulaires et provoquer leur dysfonctionnement (Demidchik, 2015). Le stress oxydant est un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), tels que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical alkoxy ( $RO\cdot$ ) et la capacité de l'organisme à contrebalancer ou détoxifier leurs effets néfastes par les antioxydants. Les ERO sont des molécules contenant de l'oxygène ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend hautement réactives avec d'autres biomolécules. L'accumulation des ERO dans les cellules végétales peut causer des dommages réversibles ou irréversibles au niveau des différentes biomolécules telles que les lipides, les protéines et les acides polynucléiques (Farmer & Mueller, 2013; Møller et al., 2007). La peroxydation lipidique conduit à la production de substances nocives telles que les produits secondaires aldéhydiques (malondialdéhyde, 4-hydroxy-2-nonenal, 4-hydroxy-2-hexenal et acroléine), marqueurs de la peroxydation lipidiques (Del Rio et al., 2005; Farmer & Mueller, 2013). Parmi les produits secondaires de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA) a été largement utilisé comme un indicateur des dommages causés par les ERO au niveau des membranes cellulaires dans les conditions de stress. L'oxydation des acides aminés par les ERO peut se traduire par une modification de la structure et la fonction des protéines. L'oxydation de quelques acides aminés tels que la lysine et l'histidine peut également se produire suite à la production et l'accumulation des produits de peroxydation lipidique (Demidchik, 2015). L'accumulation des ERO peut causer des altérations au niveau des acides polynucléiques tels que l'ADN mitochondrial et chloroplastique qui peuvent conduire à un dysfonctionnement ou une inactivation des gènes codant pour certaines protéines (Sharma et al., 2012).

Pour se protéger contre les dommages causés par le stress oxydant, les plantes utilisent les ERO comme molécules de signal pour déclencher les mécanismes de défense. Le maintien d'un niveau homéostatique des ERO est assuré par l'implication des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Ahmad et al., 2008). Parmi les enzymes antioxydantes impliquées dans la protection des plantes contre les dommages dus au stress oxydant, la superoxyde dismutase (SOD) constitue la première ligne de défense dans la cellule. Sous des conditions de stress, la SOD catalyse la dismutation du  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$

(Demidchik, 2015), un produit relativement stable mais toxique. La peroxydase (POD) est une autre enzyme importante impliquée dans la neutralisation et la conversion du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en espèces moins réactives.

En plus de l'activation des systèmes anti-oxydants, la symbiose avec les champignons telluriques constitue un autre mécanisme de défense mis au point par les plantes pour se protéger contre les effets négatifs de la toxicité des polluants. La symbiose mycorhizienne à arbuscules constitue le type de symbiose entre les plantes et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) de loin le plus répandu et le plus ancien dans la nature (Smith & Read, 2008a). Les CMA ont la capacité de procurer de nombreux avantages à la plante hôte, dont une meilleure croissance due à une nutrition hydrique et minérale améliorée dans des conditions naturelles et extrêmes (Redon et al., 2008; Redondo-Gómez et al., 2014) et une meilleure tolérance aux stress ( Dalpé, 2005; Verdin et al., 2006; Chen et al., 2015; Firmin et al., 2015;Zhu et al., 2015). De plus, les CMA peuvent améliorer la qualité du sol (Jeffries et al., 2003; Medina & Azcón, 2010)

Le but de ce travail était, d'une part (i) d'étudier les effets de la pollution par le diesel sur deux plantes largement cultivées dans les agro-écosystèmes du Nord-est algérien, le blé dur (*Triticum turgidum* L.) et la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculés ou non par deux inoculum mycorhiziens commerciaux, Fm et SZE, composés respectivement du CMA *Funneliformis mosseae* et d'un mélange de *Glomus* sp. et d'autre part (ii), d'évaluer la contribution de la symbiose mycorhizienne dans la protection de ces deux plantes contre la pollution au diesel et ce, via la quantification de marqueurs du stress oxydant : le malondialdéhyde (MDA), marqueur de peroxydation lipidique, ainsi que les activités enzymatiques anti-oxydantes, superoxyde dismutase (SOD) et peroxydase (POD).

## **2. Expression des résultats**

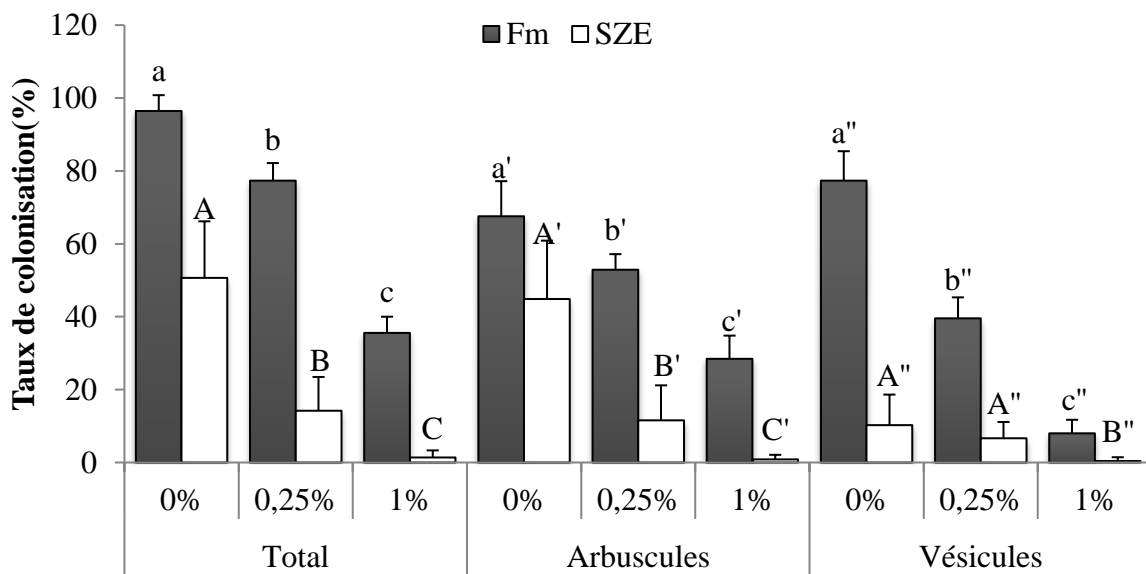
### **2.1. Taux de mycorhization racinaire**

L'observation des racines colorées des deux plantes, tomate et blé, non inoculées cultivées sur sol stérilisé a montré l'absence des structures fongiques spécifiques des CMA.

#### **2.1.1. Taux de mycorhization racinaire chez la tomate**

Les estimations de la colonisation mycorhizienne (Fig. 19) ont révélé, en moyenne, des taux nettement élevés en absence de diesel. La colonisation des racines de tomate par Fm a

atteint un taux de 96 % tandis que la colonisation par SZE était de 50 %. En présence des concentrations croissantes de diesel, le taux de mycorhization totale des racines de tomate par les deux inoculums a diminué de façon significative par rapport à celui calculé en absence de diesel. A 0,25 et 1 % de diesel, le taux de mycorhization par Fm a diminué de 20 et 55 % respectivement, tandis que le taux de mycorhization par SZE a diminué de 70 et 90 % respectivement. Les taux d'arbuscules et de vésicules ont connu la même baisse en présence du diesel à l'exception du taux de vésicules à 0,25 % de diesel où aucune différence significative n'a été observée par comparaison au témoin non pollué.



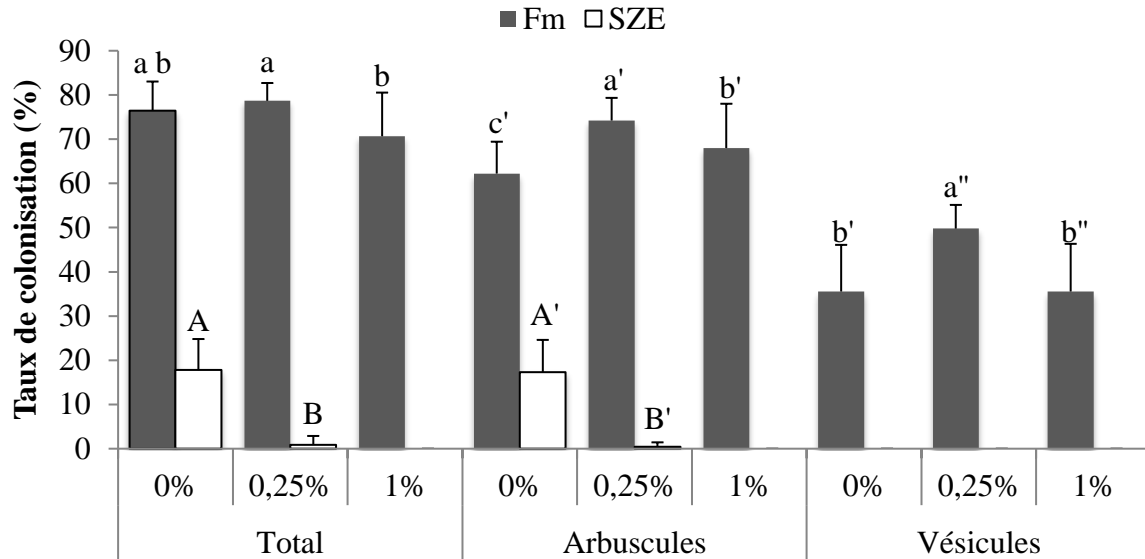
**Figure 19** Taux de colonisation mycorhizienne de la tomate inoculée par Fm et SZE et cultivée en absence (0 %) et en présence des concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %). Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

### 2.1.2. Taux de mycorhization racinaire chez le blé

Chez le blé inoculé par Fm (Fig. 20), les taux de mycorhization ont été de 76, 79 et 71 % en absence et en présence des deux concentrations de diesel 0,25 et 1 % respectivement. Le taux de mycorhization total par l'inoculum SZE a atteint 18 % en absence de diesel et a baissé de 95 et 100 % en présence des concentrations 0,25 et 1 % de diesel respectivement.

Le taux d'arbuscules dans les racines du blé cultivé en présence de 0,25 et 1 % de diesel a significativement augmenté de 20 et 10 % par comparaison au témoin non pollué. Concernant le taux de vésicules, une augmentation significative de 40 % a été enregistrée en présence de la concentration 0,25 % de diesel tandis qu'aucun changement par rapport au

témoin n'a été remarqué chez les plantes cultivées en présence de la concentration 1 %. Chez les plantes inoculées par SZE, le taux d'arbuscules a atteint 17 % en absence de diesel, il a diminué de façon significative de 97 et 100 % en présence des concentrations 0,25 et 1 %, respectivement. Quelle que soit la concentration testée, aucune vésicule n'a été observée dans les racines du blé inoculé par SZE.



**Figure 20** Taux de colonisation mycorhizienne du blé inoculé par Fm et SZE et cultivé en absence (0 %) et en présence des concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %). Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

## 2.2. Impact du diesel sur la croissance des plantes

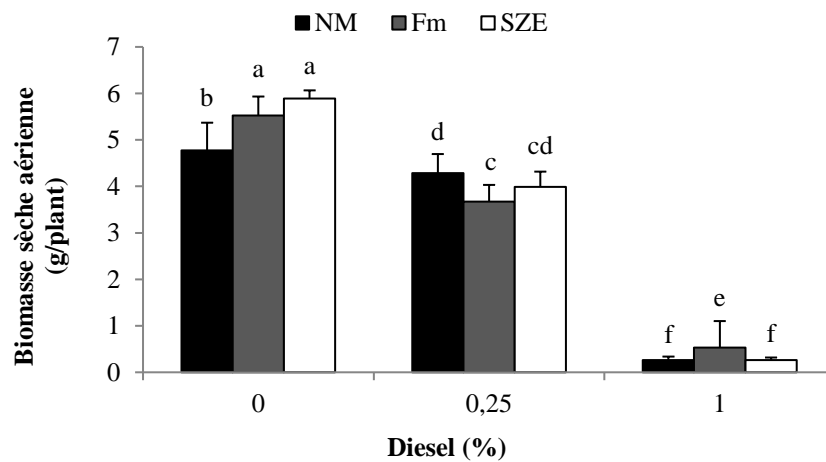
En absence de diesel, l'inoculation de la tomate par Fm et SZE a engendré une augmentation significative de 16 et 23 % de la biomasse sèche des parties aériennes et de 15 % des parties racinaires. En revanche, l'inoculation du blé a réduit significativement la biomasse sèche des parties aériennes et racinaires de 5-23 et 17 % respectivement (Fig. 21, 22).

La présence du diesel dans le sol a entraîné une baisse significative de la biomasse sèche des deux plantes par rapport aux témoins (0 %).

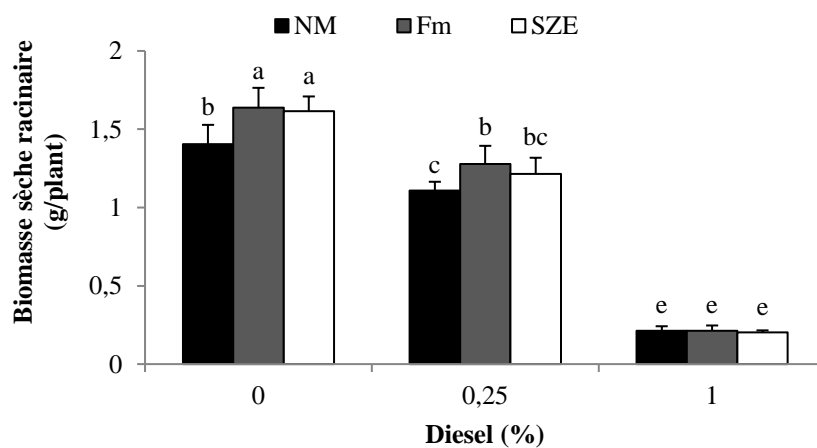
### 2.2.1. Impact du diesel sur la croissance de la tomate

Chez la tomate, des diminutions dans la biomasse sèche des parties aériennes et racinaires variant entre 10 à 95 % et 21 à 88 %, respectivement, ont été enregistrées. Les

parties aériennes et racinaires des plantes de tomate cultivées en présence de la concentration 0,25 % de diesel et inoculées par Fm ont connu un décroissement significatif de leur biomasse sèche tandis qu'en présence de la même concentration de diesel aucune différence significative n'a été observée chez la tomate inoculée par SZE. Excepté les parties aériennes de la tomate inoculée par Fm qui ont une biomasse sèche plus élevée que celle des plantes non inoculées, aucune différence significative n'a été observée entre les biomasses sèches des parties racinaires de la tomate inoculée et non inoculée et cultivée en présence de la concentration 1 %.



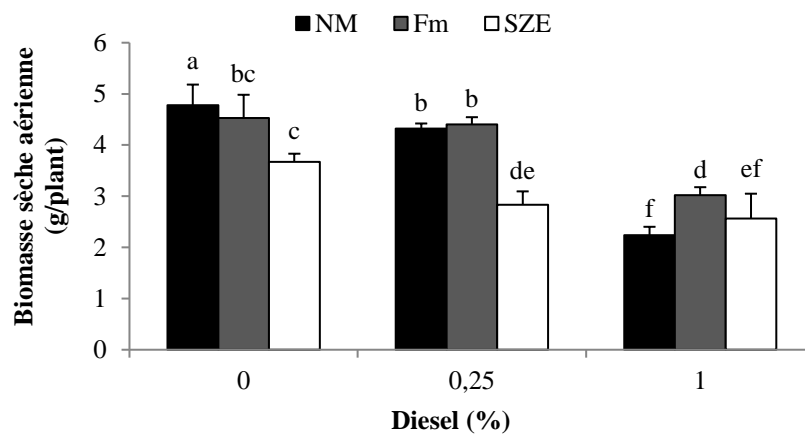
**Figure 21** Biomasses sèches des parties aériennes de la tomate mycorhizée et non-mycorhizée cultivée en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %). Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $P < 0,05$ )



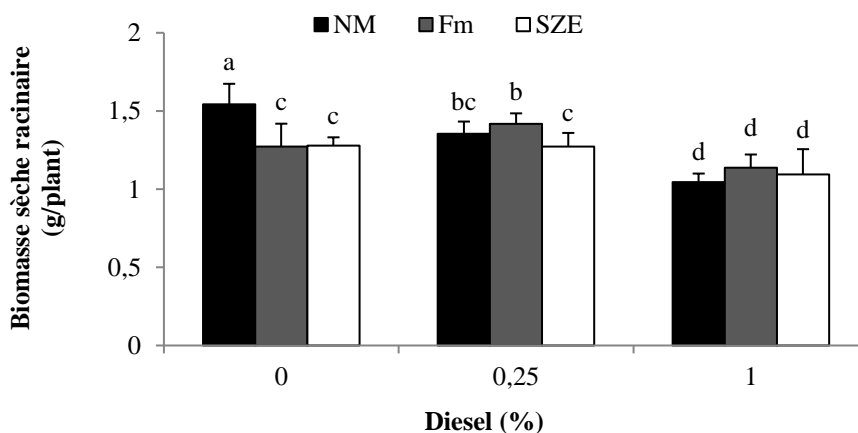
**Figure 22** Biomasses sèches des parties racinaires de la tomate mycorhizée et non-mycorhizée cultivée en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %). Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $P < 0,05$ )

### 2.2.2. Impact du diesel sur la croissance du blé

La biomasse sèche des parties aériennes et racinaires du blé cultivé en présence de diesel ont subi un décroissement de 3 à 53 % et de 10 à 32 % respectivement par comparaison aux plantes témoins (Fig. 23, 24). A 0,25 % de diesel, aucune différence significative n'a été enregistrée entre la biomasse sèche du blé inoculé par Fm par comparaison à celle du blé non-mycorhizé. Cependant, l'inoculation par SZE a diminué significativement la biomasse sèche des parties aériennes du blé. A 1 % de diesel, la biomasse sèche racinaire du blé inoculé par Fm et SZE a été constante comparée aux témoins non-mycorhizés.



**Figure 23** Biomasses sèches des parties aériennes du blé mycorhizé et non-mycorhizé cultivé en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %). Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $P < 0,05$ ).



**Figure 24** Biomasse sèches des parties racinaires du blé mycorhizé et non-mycorhizé cultivé en absence (0 %) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %). Les moyennes ont été obtenues à partir de 5 répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $P < 0,05$ ).

## 2.3. Impact du diesel sur les paramètres du stress oxydant

### 2.3.1. Impact du diesel sur les paramètres du stress oxydant chez la tomate

- **Impact du diesel sur la teneur en MDA**

L'incorporation du diesel aux deux concentrations a significativement augmenté le contenu en MDA dans les feuilles et les racines de la tomate mycorhizée et non mycorhizée.

En absence de diesel, la teneur en MDA chez la tomate inoculée par Fm a été constante dans les feuilles tandis qu'elle a augmenté de façon significative dans les racines par comparaison aux plantes non mycorhizées. La concentration 0,25 % de diesel a significativement baissé le contenu en MDA des feuilles et des racines de la tomate inoculée par Fm. De même, une augmentation significative du contenu en MDA a été observée dans les feuilles et les racines de la tomate inoculée par Fm et cultivée en présence de 1 % de diesel par comparaison à la tomate non mycorhizée (Tab. 12).

En absence de diesel, une augmentation significative du MDA produit dans les feuilles et les racines de tomate inoculée par SZE a été observée par comparaison au témoin non mycorhizé. Tandis que les plantes de tomate cultivées en présence de 0,25 % de diesel et inoculées par SZE ont connu une diminution significative dans leur contenu en MDA foliaire et racinaire par comparaison à celles non mycorhizées, aucun changement significatif dans le contenu en MDA n'a été observé dans les feuilles et les racines de tomate inoculée par SZE et cultivée en présence de 1 % de diesel par comparaison à celles non mycorhizées.

**Tableau 12** Concentration de MDA dans les feuilles et les racines de tomate mycorhizée (Fm, SZE) et non mycorhizée (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)

			MDA ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de protéines)		
			NM	Fm	SZE
Tomate	feuilles	0 %	4.76 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	4.98 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	5.96 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup> <sup>b</sup>
		0.25 %	8.09 $\pm$ 0.3b <sup>a</sup>	5.45 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup> <sup>b</sup>	5.44 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup> <sup>b</sup>
		1 %	9.68 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup> <sup>a</sup>	6.78 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup> <sup>b</sup>	9.26 $\pm$ 1.18 <sup>b</sup> <sup>a</sup>
	racines	0 %	0.96 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> <sup>a</sup>	1.94 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup> <sup>b</sup>	2.55 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup> <sup>c</sup>
		0.25 %	4.7 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup> <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup> <sup>b</sup>	3.06 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup> <sup>b</sup>
		1 %	7.62 $\pm$ 0.69 <sup>c</sup> <sup>a</sup>	5.46 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup> <sup>b</sup>	7.5 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup> <sup>a</sup>

N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les plantes mycorhizées et non mycorhizées selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

- **Impact du diesel sur l'activité SOD**

A l'exception des feuilles de la tomate non mycorhizée, l'augmentation de diesel a entraîné une augmentation significative de l'activité SOD dans les deux organes de la tomate mycorhizée et non mycorhizée (Tab. 13).

En absence de diesel, l'inoculation de la tomate par Fm n'a pas changé l'activité SOD dans les feuilles et les racines. Cependant, une augmentation significative de l'activité SOD dans les deux organes a été enregistrée en présence de 0,25 et 1 % de diesel par comparaison à celle enregistrée chez la tomate non mycorhizées cultivées en présence des mêmes concentrations de diesel.

Chez la tomate inoculée par SZE, une diminution significative de l'activité SOD a été observée dans les feuilles et les racines en absence de diesel. Une augmentation significative de l'activité SOD a été également enregistrée dans les feuilles de tomate cultivée à 0,25 % de diesel par comparaison au témoin non mycorhizé. Cependant, aucun changement n'a été observé dans les racines. En présence de la plus haute concentration de diesel, l'activité SOD chez la tomate inoculée par SZE n'a montré aucun changement significatif dans les feuilles. Cependant, une diminution significative de l'activité SOD a été enregistrée dans les racines par comparaison au témoin non mycorhizé.

**Tableau 13** Activité de la SOD dans les feuilles et les racines de tomate mycorhizée (Fm, SZE) et non mycorhizée (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)

			SOD (U.g <sup>-1</sup> de protéines)		
			NM	Fm	SZE
Tomate	feuilles	0 %	10.23±0.94a <sup>a</sup>	10.84±1.92a <sup>a</sup>	8.43±1.78a <sup>b</sup>
		0.25 %	11.23±1.41a <sup>a</sup>	13.57±1.37b <sup>b</sup>	12.27±1.71b <sup>b</sup>
		1 %	10.76±1.48a <sup>a</sup>	15.68±1.66b <sup>b</sup>	11.60±1.64b <sup>a</sup>
	racines	0 %	26.09±2.47a <sup>a</sup>	24.95±2.27a <sup>a</sup>	18.32±2.46a <sup>b</sup>
		0.25 %	27.57±2.6a <sup>a</sup>	37.62±2.2b <sup>b</sup>	24.67±2.08b <sup>a</sup>
		1 %	40.92±5.09b <sup>a</sup>	54.36±6.29c <sup>b</sup>	24.46±1.76b <sup>c</sup>

N= 5 (±SD). Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD (p<0,05).

Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les plantes mycorhizées et non mycorhizées selon le test LSD (p<0,05).

- **Impact du diesel sur l'activité POD**

L'augmentation de la concentration de diesel a entraîné une augmentation de l'activité POD dans les feuilles et les racines de la tomate mycorhizée et non mycorhizée (Tab. 14).

Par comparaison aux plantes non mycorhizée, une augmentation significative de l'activité POD a été enregistrée dans les feuilles et les racines de tomate inoculée par Fm quelque soit la concentration du diesel.

Chez la tomate inoculée par SZE, une augmentation similaire a été observée dans les feuilles et les racines en absence et en présence de la concentration 0,25 % de diesel. A 1 % de diesel, une diminution significative de l'activité SOD a été enregistrée dans les feuilles. Cependant, aucun changement n'a été observé dans les racines.

**Tableau 14** Activité de la POD dans les feuilles et les racines de tomate mycorhizée (Fm, SZE) et non mycorhizée (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)

			POD (U.g <sup>-1</sup> de protéines)		
			NM	Fm	SZE
Tomate	feuilles	0 %	28.43±1.84a <sup>a</sup>	61.07±4.71a <sup>b</sup>	77.67±6.52a <sup>c</sup>
		0.25 %	53.52±2.24b <sup>a</sup>	79.42±6.91b <sup>b</sup>	91.5±6.04b <sup>c</sup>
		1 %	94.79±7.37c <sup>a</sup>	119.40±6.58c <sup>b</sup>	89.04±1.51b <sup>a</sup>
	racines	0 %	203.24±8.66a <sup>a</sup>	231.35±11.17a <sup>b</sup>	283.94±12.63a <sup>c</sup>
		0.25 %	247.46±7.69b <sup>a</sup>	296.75±19.13b <sup>b</sup>	345.07±12.66b <sup>c</sup>
		1 %	450.16±11.16c <sup>a</sup>	535.33±12.92c <sup>b</sup>	413.36±21.55c <sup>c</sup>

N= 5 (±SD). Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les plantes mycorhizées et non mycorhizées selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.2. Impact du diesel sur les paramètres du stress oxydant chez le blé

- **Impact du diesel sur la teneur en MDA**

L'incorporation du diesel aux deux concentrations a significativement augmenté le contenu en MDA dans les feuilles et les racines du blé mycorhizé et non mycorhizé (Tab. 15).

Tandis qu'une production constante de MDA a été observée dans les feuilles du blé inoculé par Fm et cultivé en absence de diesel, une augmentation significative a été observée dans les racines par comparaison au blé non mycorhizé. La teneur du MDA a été constante à 0,25 % de diesel dans les deux organes du blé inoculé par Fm par rapport au témoin non mycorhizé. Cependant, une diminution significative a été observée en présence de la concentration la plus élevée.

L'inoculation du blé par SZE n'a pas changé la quantité de MDA produite dans les feuilles mais elle l'a significativement augmentée dans les racines. A 0,25 % de diesel, une

production constante de MDA foliaire et racinaire a été enregistrée chez le blé inoculé par SZE par rapport au blé non mycorhizé. Le contenu en MDA a également été constant dans les feuilles du blé inoculé par SZE et cultivé à 1 % de diesel comparé à celui non mycorhizé. Cependant, une augmentation significative du contenu en MDA a été observée dans les racines.

**Tableau 15** Concentration de MDA dans les feuilles et les racines de blé mycorhizé (Fm, SZE) et non mycorhizé (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)

			MDA ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de protéines)		
			NM	Fm	SZE
Blé	feuilles	0 %	2.50±0.31 <sup>ab</sup>	2.74±0.47 <sup>a</sup>	2.17±0.15 <sup>ab</sup>
		0.25 %	3.08±0.32 <sup>ab</sup>	2.66±0.6 <sup>a</sup>	3.65±0.55 <sup>b</sup>
		1 %	4.95±0.43 <sup>c</sup>	2.32±0.27 <sup>ab</sup>	4.45±0.63 <sup>c</sup>
	racines	0 %	0.47±0.06 <sup>a</sup>	0.73±0.11 <sup>b</sup>	0.72±0.11 <sup>ab</sup>
		0.25 %	0.57±0.11 <sup>a</sup>	0.60±0.11 <sup>a</sup>	0.69±0.08 <sup>a</sup>
		1 %	0.84±0.07 <sup>b</sup>	0.58±0.12 <sup>ab</sup>	1.11±0.26 <sup>c</sup>

N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les plantes mycorhizées et non mycorhizées selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

#### • Impact du diesel sur l'activité SOD

L'augmentation de la concentration de diesel a entraîné une augmentation de l'activité SOD dans les feuilles et les racines du blé mycorhizé et non mycorhizé (Tab. 16).

**Tableau 16** Activité de la SOD dans les feuilles et les racines de blé mycorhizé (Fm, SZE) et non mycorhizé (NM), et cultivé en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)

			SOD ( $\text{U.g}^{-1}$ de protéines)		
			NM	Fm	SZE
Blé	feuilles	0 %	16.37±1.02 <sup>a</sup>	18.83±1.43 <sup>b</sup>	16.57±1.05 <sup>a</sup>
		0.25 %	19.12±1.5 <sup>b</sup>	22.61±1.76 <sup>b</sup>	14.31±1.47 <sup>b</sup>
		1 %	26.6±1.6 <sup>c</sup>	39.94±2.8 <sup>c</sup>	16.48±1.43 <sup>c</sup>
	racines	0 %	20.21±1.35 <sup>a</sup>	29.89±1.88 <sup>b</sup>	26.39±1.69 <sup>a</sup>
		0.25 %	29.15±2.29 <sup>b</sup>	32.88±2.18 <sup>b</sup>	26.66±1.29 <sup>a</sup>
		1 %	35.86±1.57 <sup>c</sup>	40.72±2.09 <sup>c</sup>	21.70±2.65 <sup>b</sup>

N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

Les différentes lettres entre les lignes indiquent des différences significatives entre les plantes mycorhizées et non mycorhizées selon le test LSD ( $p < 0,05$ ).

Quelle que soit la concentration de diesel, une augmentation significative de l'activité SOD a été observée dans les feuilles et les racines du blé inoculé par Fm par comparaison au blé non mycorhizé.

Chez le blé inoculé par SZE, l'activité SOD enregistrée dans les feuilles a été constante par comparaison à celle enregistrée dans les feuilles du blé non mycorhizé. Cependant, une augmentation significative a été enregistrée dans les racines. En présence des deux concentrations de diesel 0,25 et 1 %, l'activité SOD a significativement diminué dans les feuilles et les racines du blé inoculé par SZE par rapport au blé non mycorhizé.

#### • Impact du diesel sur l'activité POD

A l'exception des feuilles du blé inoculé par SZE, l'augmentation de la concentration de diesel a entraîné une augmentation de l'activité POD dans les feuilles et les racines du blé mycorhizé et non mycorhizé (Tab. 17).

Chez le blé inoculé par Fm, une augmentation significative de l'activité POD a été enregistrée dans les feuilles et les racines en présence et en absence des différentes concentrations de diesel par comparaison au blé non mycorhizé.

**Tableau 17** Activité de la POD dans les feuilles et les racines de blé mycorhizé (Fm, SZE) et non mycorhizé (NM), et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,25 et 1 %)

			POD (U.g <sup>-1</sup> de protéines)		
			NM	Fm	SZE
Blé	feuilles	0 %	15.09±2.15a <sup>a</sup>	82.14±6.04a <sup>b</sup>	78.23±5.19a <sup>b</sup>
		0.25 %	50.44±5.84b <sup>a</sup>	131.56±7.89b <sup>b</sup>	81.77±4.09a <sup>c</sup>
		1 %	94.74±3.67c <sup>a</sup>	144.86±6.6c <sup>b</sup>	85.34±6.04a <sup>c</sup>
	racines	0 %	211.50±10.63a <sup>a</sup>	271.59±18.41a <sup>b</sup>	194.56±9.27a <sup>a</sup>
		0.25 %	281.67±15.34b <sup>a</sup>	497.67±20.85b <sup>b</sup>	255.43±16.63b <sup>a</sup>
		1 %	430.65±9.11c <sup>a</sup>	553.99±28.61c <sup>b</sup>	272.25±14.33c <sup>c</sup>

N= 5 (±SD). Des lettres différentes entre les lignes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD (p<0,05).

Des lettres différentes entre les lignes indiquent des différences significatives entre les plantes mycorhizées et non mycorhizées selon le test LSD (p<0,05).

En absence et en présence de 0,25 % de diesel, l'activité POD a augmenté significativement dans les feuilles du blé inoculé par SZE par rapport au blé non mycorhizé. Par contre, aucun changement dans l'activité POD n'a été observé dans les racines en présence de la même concentration de diesel. A 1 % de diesel, l'activité POD a montré une

diminution significative dans les feuilles et les racines de blé inoculé par SZE par rapport au blé non mycorhizé.

### 3. Discussion

La contamination par le diesel a engendré une baisse significative des taux de mycorhization de la tomate inoculée par les deux inoculums et ceux du blé inoculé par SZE. L'effet négatif des polluants sur la colonisation MA a été rapporté pour plusieurs autres polluants tels que les produits pétroliers (Hernández-Ortega et al., 2012), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Verdin et al., 2006; Campagnac et al., 2010) et les métaux lourds (Zhong et al., 2012; Firmin et al., 2015). Dans un essai *in vitro*, Driai et al. (2015) ont trouvé que la pollution par le diesel entraînait une réduction de la production et la germination des spores du CMA *R. irregularis* ainsi que la croissance des hyphes extraracinaires. Cela laisse supposer que la diminution des taux de mycorhization des deux plantes peut être due à l'effet négatif du diesel sur le développement des CMA. Bien que la colonisation mycorhizienne par SZE ait été inhibée en présence de la plus forte concentration de diesel (1 %), la colonisation par Fm est restée possible. L'augmentation des taux de mycorhization chez la tomate et le blé inoculés par *F. mosseae* pourrait probablement être due à la grande tolérance du champignon aux contaminants. Dans un sol pollué par l'arsénique, Christophersen et al. (2012) rapportent une augmentation significative du taux de mycorhization de *Medicago truncatula* par *F. mosseae* que par *R. irregularis*. En plus, *F. mosseae* a été le seul CMA isolé dans un sol contaminé par le plomb, le cadmium et le zinc, près de l'usine Metaleurop à Evin-Malmaison (Nord de France) (Firmin et al., 2015). Il a également été suggéré que *F. mosseae* est l'espèce de CMA la plus dominante dans des sols contaminés par les métaux lourds (Weissenhorn et al., 1993; Whitfield et al., 2003; Ortega-Larrocea et al., 2007).

Le traitement du sol par le diesel a engendré une importante diminution de la biomasse sèche des deux plantes. La diminution de la biomasse des plantes a été plus marquée à 1 % de diesel chez la tomate mycorhizée et non mycorhizée que chez le blé. La tomate est une espèce sensible à la sécheresse (Ünyayar et al., 2006) à l'inverse du blé dur qui est une espèce résistante (Nezhadahmadi et al., 2013). La grande sensibilité de la tomate au diesel serait donc due à sa sensibilité au stress hydrique puisque le diesel exerce un effet similaire à celui exercé par la sécheresse en diminuant l'activité hydraulique dans les racines (Hernández-Ortega et al., 2014). Le même résultat a été trouvé par Redondo-Gómez et al. (2014) qui ont constaté que le traitement du sol par une concentration de 1 % de diesel réduisait la biomasse sèche de

*Spartina argentinensis* de 65 %. Les mêmes auteurs rapportent également une diminution du contenu chlorophyllien des plantes exposées au diesel. La diminution de la biomasse sèche des plantes pourrait aussi être due à la réduction du contenu des plantes en macroéléments. Des concentrations élevées de diesel ont eu un effet négatif marqué sur la teneur de tous les macroéléments chez l'avoine, à l'exception du phosphore (Wyszkowski & Wyszkowska, 2005). Les hydrocarbures du diesel peuvent avoir un effet indirect sur les plantes en modifiant les propriétés physico-chimiques du sol qui à leur tour modifient la fertilité du sol (Khan et al., 2013; Wang et al., 2013). Une telle modification peut limiter la croissance et le développement des plantes. En plus, la nature huileuse de certains composés du diesel peut également baisser le transfert d'oxygène dans le sol en bloquant les espaces d'air entre le sol et l'atmosphère (Uzoho et al., 2006).

L'inoculation par *F. mosseae* a significativement augmenté la biomasse sèche des feuilles des deux plantes cultivées à 1 % de diesel et les racines de tomate cultivée à 0,25 %. Ceci peut s'expliquer par l'intervention du réseau hyphale du champignon dans l'absorption de l'eau et des éléments minéraux par la plante (Smith & Read, 2008b). Dans une étude sur l'effet de la salinité sur la tomate inoculée par les CMA, Huang et al. (2013) ont constaté que l'amélioration de la croissance et de l'acquisition des éléments minéraux a été plus marquée quand les plantes étaient inoculées par *F. mosseae* que par *Claroideoglonus etunicatum*. Il a également été démontré que les CMA améliorent la croissance des plantes dans les sols pollués (Leyval & Binet, 1998; Joner & Leyval, 2003). L'effet de l'inoculation par *F. mosseae* sur la croissance de *Medicago sativa* cultivée dans un sol pollué par l'arsénique a été étudié par Chen et al. (2007). Les résultats de leur étude montrent que l'inoculation par *F. mosseae* augmente la biomasse sèche foliaire et racinaire de *Medicago sativa* par un facteur de six par rapport aux plantes non inoculées.

Il est connu que le fonctionnement des différentes combinaisons CMA-plante dépend de l'efficacité du champignon en tant que symbiote et de la réponse de la plante en terme de croissance par rapport aux témoins non mycorhizé (Smith et al., 2003). Burleigh et al. (2002) ont testé l'effet de l'inoculation par sept espèces de CMA sur la croissance de *Medicago sativa*, leurs résultats ont montré que la meilleure croissance a été enregistrée chez les plantes inoculées par *F. mosseae* par comparaison aux plantes inoculées par les six autres CMA. L'absorption du phosphore a été significativement plus élevée chez les plantes de *Medicago truncatula* inoculées par *F. mosseae* que celles inoculées par *R. irregularis* (Christophersen et al., 2012). L'amélioration de la croissance des plantes mycorhizées par *F. mosseae* peut se

produire même quand le taux de mycorhization des plantes est faible. Ceci a été constaté par Heijden (2001) qui rapporte qu'un taux de mycorhization de moins de 5% par *F. mosseae* entraîne une énorme augmentation de la croissance et l'absorption du phosphore chez *Salix repens*.

Sur le plan biochimique, le contenu en MDA a augmenté de façon significative chez les plantes cultivées sur le sol pollué par le diesel par rapport à celles cultivées sur le sol non pollué indiquant que les plantes cultivées en présence de diesel ont subi des dommages au niveau des membranes cellulaires résultant de la peroxydation lipidique. L'augmentation de la teneur en MDA a été observée chez la tomate et le blé exposés à d'autres types de stress abiotique tels que les métaux lourds (Panda et al., 2003; Nogueirol et al., 2015); les pesticides (Yildiztekin & Kaya, 2015); la sécheresse (Pei et al., 2009; Murshed et al., 2013) et la pluie acide (Dolatabadian et al., 2013). La mycorhization des plantes de tomate et du blé a provoqué des effets variables sur la production du MDA dans les deux organes feuilles et racines. Tandis que l'inoculation par les deux inoculum Fm et SZE a réduit la production du MDA chez la tomate cultivée à 1 % de diesel, elle n'a eu aucun effet sur le blé. De plus, le contenu en MDA a été deux fois plus élevé chez la tomate que chez le blé ce qui indique que la tomate est plus sensible au stress induit par le diesel que le blé. En fait, la réponse des plantes au stress abiotique dépend à la fois de l'espèce de plante et du type de stress (Roy & Basu, 2015). La variation dans l'expression de la tolérance au stress oxydant existe même au sein d'une même espèce comme le confirme Chakraborty & Pradhan (2012) qui rapportent que la quantité de MDA produite chez le blé exposé à un stress hydrique est trois fois plus élevée chez les variétés sensibles que chez les tolérantes. L'atténuation des dommages oxydatifs chez les plantes mycorhizées, évaluée par la mesure de la production du MDA, a été rapportée par Hashem et al. (2015) qui ont observé une diminution de la teneur en MDA chez la tomate mycorhizée cultivée dans un sol pollué par le cadmium. Tang et al. (2009) ont également rapporté que les plantes de *Zea mays* cultivées dans un sol pollué par le diesel produisent de faibles quantités de MDA quand elles sont mycorhizées par *F. constrictum*. L'effet positif de la mycorhization sur la production du MDA a été démontré chez les plantes exposées à d'autres types de stress induit par la sécheresse et les herbicides (Bressano et al., 2010; Fouad et al., 2014).

La diminution des quantités de MDA chez la tomate mycorhizée a été associée à une amélioration des activités SOD et POD, indiquant l'implication de ces deux enzymes dans l'atténuation de la peroxydation lipidique. A 1 % de diesel, une diminution significative du

contenu en MDA foliaire chez les deux plantes inoculées par Fm a été associée à une amélioration de la croissance. A ce niveau de pollution, l'inoculation par Fm a été capable de procurer aux plantes une protection contre les effets négatifs du stress par l'amélioration des activités antioxydantes. Abad & Khara (2007) ont rapporté que la peroxydation lipidique induite par le cadmium chez les plantes de blé dépend de l'espèce de CMA utilisé pour l'inoculation; ils ont démontré que *Diversispora versiformis* a diminué la production du MDA tandis que *Claroideoglossum etunicatum* l'a significativement augmentée. He et al. (2007) et García-Sánchez et al. (2014) ont rapporté que *F. mosseae* réduisait le contenu en MDA chez la tomate cultivée en conditions de stress causé par la salinité et l'ajout des grignons d'olive utilisés comme composte.

La SOD est une enzyme clé responsable de l'élimination du  $O_2^{\cdot-}$ , alors que la POD convertit les produits de la dismutation à des sous produits moins toxiques. L'augmentation des activités SOD et POD protège les cellules végétales contre les dommages associés au stress oxydant (Gill & Tuteja, 2010). Nos résultats montrent que les activités SOD et POD ont été significativement élevées chez la tomate et le blé inoculés par Fm que ceux non inoculés ou inoculés par SZE indiquant que ces deux enzymes ont été impliquées dans l'élimination des ERO chez les plantes mycorhizées par Fm. Cette augmentation s'est accompagnée d'une diminution de la production du MDA, cela laisse supposer que l'inoculation par Fm confère une meilleure protection aux deux plantes. Nos résultats concordent avec ceux de Tang et al. (2009) qui ont rapporté une diminution des activités SOD et POD chez *Zea mays* inoculé par *F. constrictum* et cultivé en présence du diesel. L'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes concordent aussi les résultats rapportés par He et al. (2007) qui ont démontré que l'inoculation de la tomate par *F. mosseae* augmentait significativement les activités SOD et SOD par comparaison à la tomate non inoculée. Plusieurs autres études ont démontré le même effet de l'inoculation par les CMA sur les activité SOD et POD chez les plantes exposées à d'autres stress abiotiques tels que les métaux lourds (Garg & Singla, 2012; Chen et al., 2015; Firmin et al., 2015 ) et la salinité (Ghorbanli et al., 2004).

#### 4. Conclusion

Les résultats de l'expérience en microcosmes montrent que la pollution par le diesel réduit significativement le taux de mycorhization des deux plantes et inhibe complètement la mycorhization du blé par SZE à 1% de diesel. Le diesel a également baissé la croissance des deux plantes non inoculées et inoculées par les deux inoculum. Son effet a été plus marqué

chez la tomate cultivée à 1 % de diesel. Les concentrations croissantes de diesel ont entraîné une augmentation significative des quantités de MDA et des activités SOD et POD chez les deux plantes mycorhizées ou non. Nos résultats montrent une diminution significative de la production du MDA accompagnée d'une augmentation des activités SOD et POD chez la tomate et le blé inoculés par Fm que ceux non inoculés ou inoculés par SZE. L'inoculation par Fm confère une meilleure protection aux plantes contre la phytotoxicité du diesel. Cette protection est due à une induction plus efficace des enzymes antioxydantes chez les plantes mycorhizées par Fm.

## Chapitre III. Impact de la pollution par le diesel sur le développement *in vitro* du CMA *Rhizophagus irregularis*

### 1. Introduction

Produit du raffinage du pétrole, le diesel est un fioul léger utilisé comme carburant pour les moteurs diesel. Sa composition est très variée et dépend de son origine et de la législation en cours. Il est en grande partie composé d'hydrocarbures saturés (n-alkanes C12-C26 et naphènes) (Khalladi et al., 2009). L'utilisation accrue du diesel est susceptible de provoquer un risque pérenne pour l'environnement et pour l'homme. Ses déversements continus dans la nature provoquent la contamination des sols. La toxicité du diesel est due au faible poids moléculaire de ses composants saturés, plus solubles et plus biodisponibles que les composés à poids moléculaire élevé (Kauppi, 2011), et à sa nature hydrophobe qui augmente sa récalcitrance à la biodégradation et sa persistance dans l'environnement (Abed et al., 2002).

L'effet toxique des polluants organiques sur les plantes et les microorganismes du sol a été démontré par plusieurs auteurs (Leyval & Binet, 1998 ; Verdin et al., 2006 ; Debiane et al., 2008 ; Debiane et al., 2009 ; Campagnac et al., 2010). Les polluants organiques limitent la croissance et l'absorption des éléments nutritifs chez les plantes (Merkl et al., 2005; Hernández-Ortega et al., 2012;) et induisent la formation des espèces réactives oxygénées (ERO) comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les hydroxyles ( $\cdot OH$ ) (Parida et al., 2004). Parmi les dommages oxydatifs causés par les ERO, figure la peroxydation des lipides membranaires pouvant générer du malondialdéhyde (MDA) utilisé comme biomarqueur d'altérations membranaires (Bailly et al., 1996; Arora et al., 2002; Goel & Sheoran, 2003). Les plantes ont la capacité de maintenir un niveau non toxique des ERO en utilisant des systèmes antioxydants non enzymatiques (Dat et al., 2000) et enzymatiques tels la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation du  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , et la peroxydase (POD) qui décompose le  $H_2O_2$  (Arora et al., 2002).

Par ailleurs, présents dans les sols de la plupart des écosystèmes, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) forment des associations symbiotiques avec les racines de plus de 80% des espèces végétales terrestres (Smith & Read, 2008a). Grâce à son réseau mycélien, la symbiose mycorhizienne améliore l'absorption de l'eau et des éléments minéraux

chez la plante en particulier le phosphore (Debiane et al., 2009; Aroca et al., 2007; Paul Schreiner, 2007; Mardukhi et al., 2011; Labidi et al., 2012). Les CMA jouent également un rôle dans l'augmentation de la tolérance des plantes vis-à-vis des stress abiotiques tels que les polluants (Debiane et al., 2008, 2009; Leyval & Binet, 1998; Verdin et al., 2006), et biotiques tels que les agents phytopathogènes (Akhtar & Siddiqui, 2008; Dalpé, 2005). Il a été également démontré que les CMA améliorent la croissance des plantes dans les sols pollués et participent à l'élimination des polluants (Joner & Leyval, 2003; Leyval & Binet, 1998; Verdin et al., 2006).

L'objectif du présent travail est d'étudier dans des conditions monoxéniques, l'impact de concentrations croissantes de diesel sur les principaux stades du cycle de développement du champignon mycorhizien *R. irregularis* (germination des spores, élongation des hyphes germinatives, taux de mycorhization, développement des hyphes extraracinaires et sporulation) et sur la croissance des racines de chicorée (élongation racinaire et biomasse sèche). Au niveau biochimique, la mesure de marqueurs du stress oxydant tels que la production du MDA et les activités SOD et POD est également envisagée.

## **2. Expression des résultats**

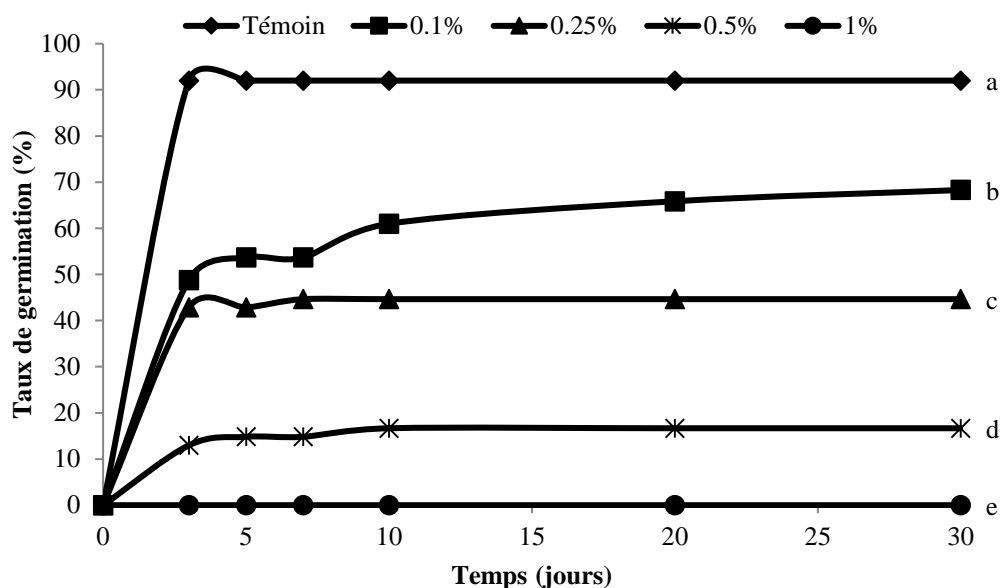
### **2.1. Test de germination des spores de *R. irregularis* en absence et en présence de diesel**

#### **2.1.1. Cinétique de germination**

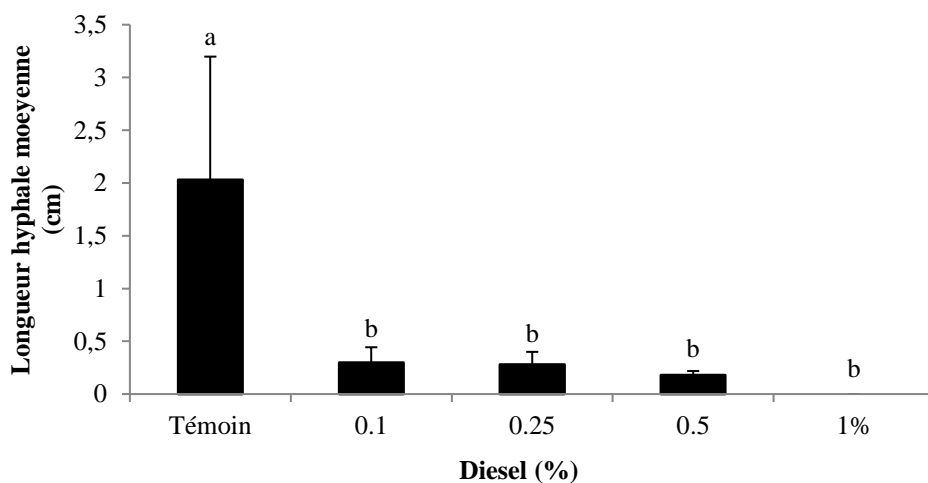
La figure 25 montre les cinétiques de germination des spores de *R. irregularis* cultivées *in vitro* pendant 3, 5, 7, 10, 20 et 30 jours en absence (témoin) et en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %). Alors que sur milieu non pollué, le taux de germination atteint 92% après 3 jours d'incubation, celui-ci montre des réductions significatives de 47, 53, 86 et 100 % respectivement sur les milieux contenant 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 % de diesel.

#### **2.1.2. Elongation des hyphes germinatives de *R. irregularis* en absence et en présence de diesel**

La longueur moyenne des hyphes germinatives des spores de *R. irregularis* cultivées en absence de diesel a atteint 2,5 cm après 30 jours d'incubation. Elle a été réduite de façon significative de 87, 88, 92 et 100 % dans les milieux pollués par 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 % de diesel respectivement (Fig. 26).



**Figure 25** Cinétique de germination des spores de *R. irregularis* cultivées pendant 30 jours en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %). N=50. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les cinétiques de germination pour les différentes concentrations de diesel selon le test LD ( $p < 0.05$ ).

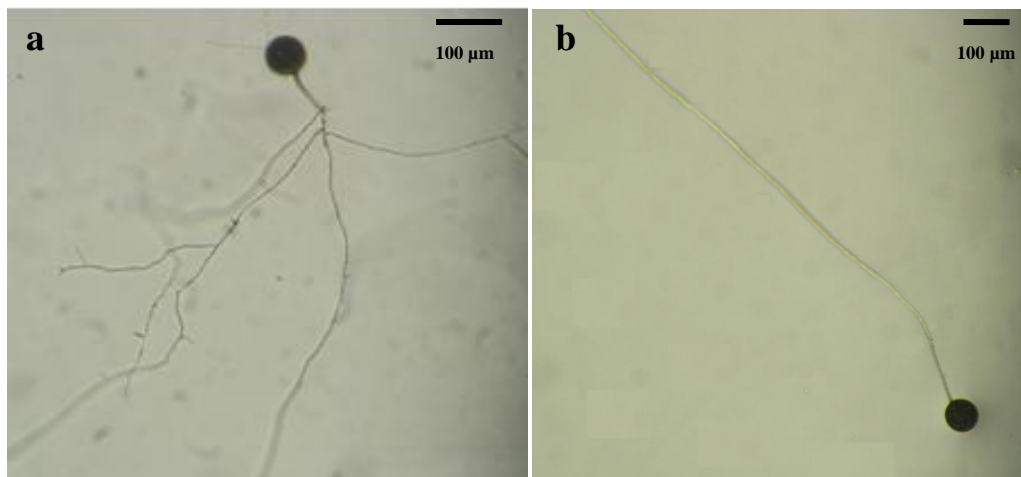


**Figure 26** Longueurs hyphales moyennes des spores de *R. irregularis*, après 30 jours d'incubation en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %). N=50 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives entre les longueurs hyphales aux différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

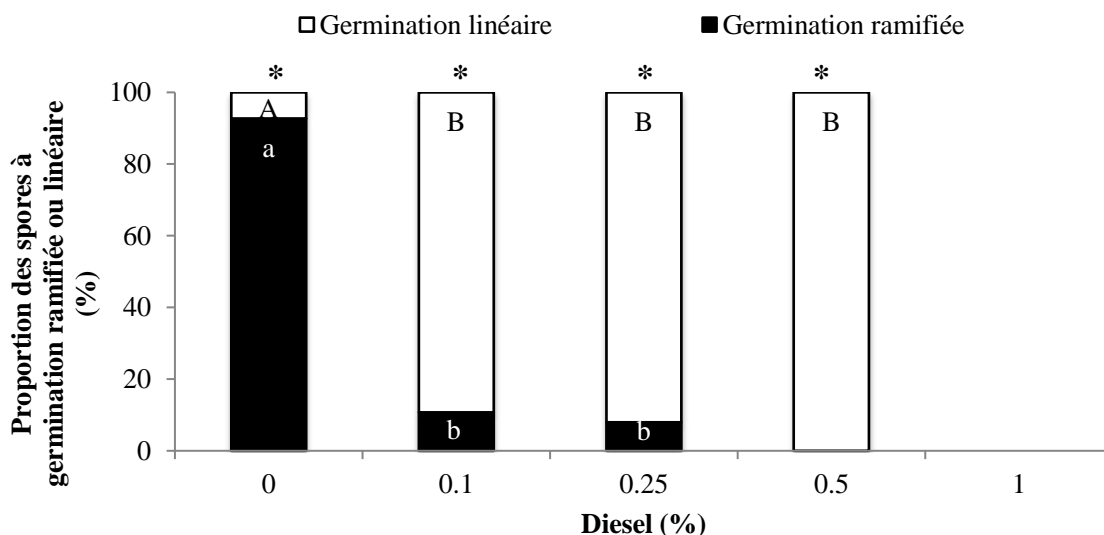
### 2.1.3. Mode de germination des spores de *R. irregularis* en absence et en présence de diesel

En absence de diesel (témoin), la majorité des spores de *R. irregularis* (92 %) ont germé de façon ramifiée (Photo 4.a). Seules 8 % des spores ont germé de façon linéaire (Photo 4.b)

(Fig. 27). En présence de diesel, la germination des spores selon un mode linéaire a augmenté de façon significative au détriment de la germination ramifiée. A 0,1 et 0,25 % de diesel, le taux de spores à germination ramifiée a été réduit significativement à 10 et 8 % et les taux de spores à germination linéaire ont atteint respectivement 90, 92 et 100 % dans les milieux pollués par 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 % de diesel (Fig. 21).



**Photo 4.** Modes de germination des spores de *R. irregularis* observés au microscope optique (G 100x). a : mode ramifié, b : mode linéaire.



**Figure 27** Mode de germination des spores de *R. irregularis*, observées après 30 jours d'incubation en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives dans le mode de germination des spores cultivées à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

\*Indique une différence significative entre les spores à germination ramifiée ou linéaire pour chaque concentration de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

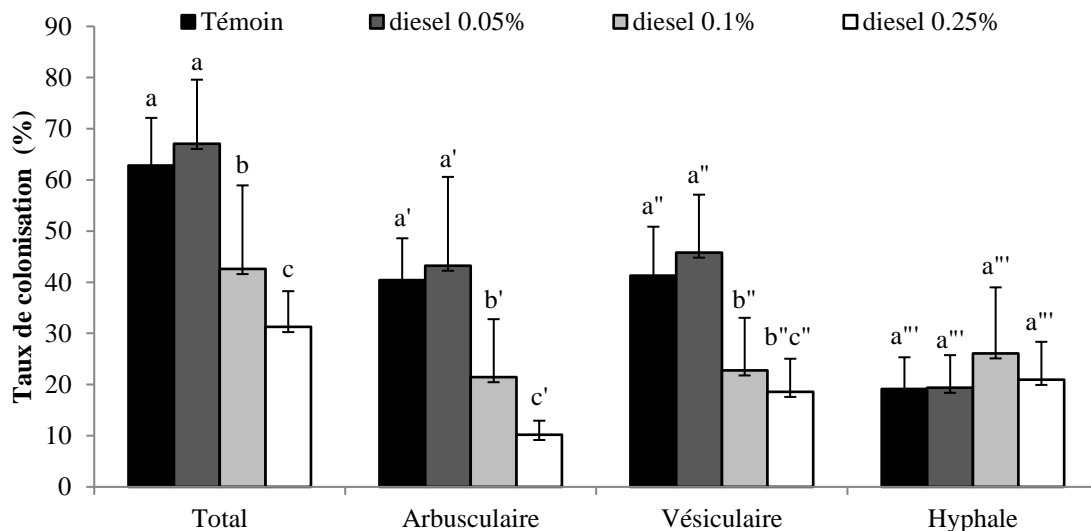
### 2.1.4. Test de viabilité de spores

La totalité des spores qui n'avaient pas germé en présence des différentes concentrations de diesel, n'a pas regermé après repiquage sur milieu M témoin (sain sans polluant).

## 2.2. Culture *in vitro* des racines de chicorée mycorhizées ou non mycorhizées par le champignon *Rhizophagus irregularis* en absence et en présence de diesel

### 2.2.1. Taux de colonisation racinaire

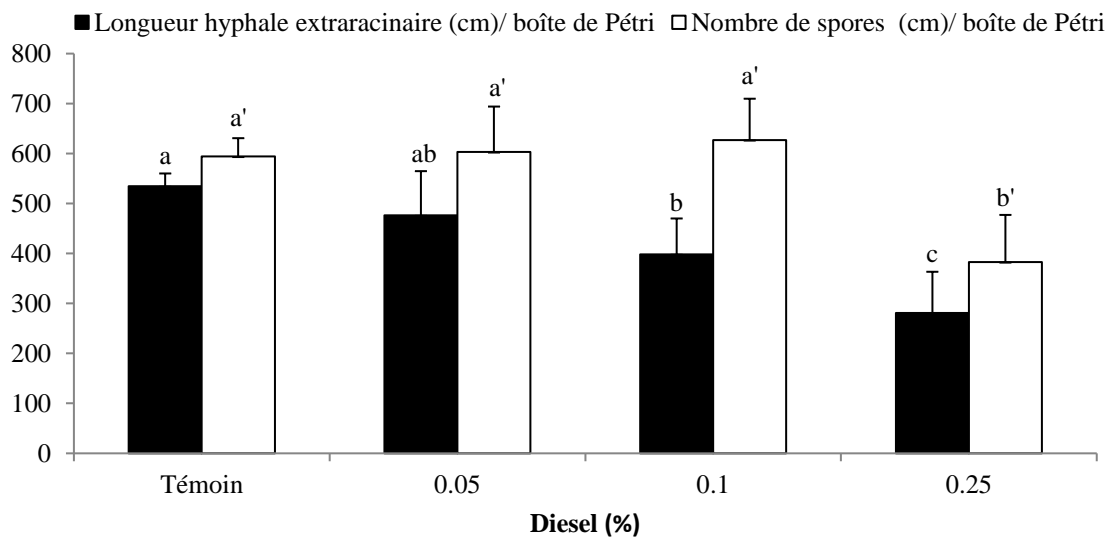
La colonisation des racines de chicorée par le champignon *R. irregularis* après 9 semaines d'incubation en présence et en absence des différentes concentrations de diesel est représentée dans la figure 28. Le taux de mycorhization totale a été réduit significativement ( $p < 0.05$ ) de 32 et 50 % à 0,1 et 0,25 % de diesel. En présence des mêmes concentrations de diesel, les taux d'arbuscules et de vésicules ont connu le même déclin avec une diminution significative de 47 et 75 % pour la colonisation arbusculaire, et de 45 et 55 % pour la colonisation vésiculaire. Concernant les taux de mycorhization hyphale, aucune différence significative au seuil 5 % n'a été observée entre le témoin et en présence des différentes concentrations de diesel.



**Figure 28** Taux de colonisation totale, arbusculaire, vésiculaire et hyphale des racines de chicorée mycorhizées par *R. irregularis*, cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25). N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives entre les taux de colonisation à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

### 2.2.2. Développement extraracinaire du CMA *R. irregularis* en absence et en présence de diesel

La longueur hyphale extraracinaire moyenne du CMA *R. irregularis* cultivé en absence de diesel atteint plus de 5,3 m. Alors que la concentration de 0,05 % de diesel n'affecte pas le développement hyphal extraracinaire, les concentrations de 0,1 et 0,25 % de diesel font chuter les longueurs hyphales moyennes de 25 et 47 % par comparaison au témoin (Fig. 29).



**Figure 29** Longueurs hyphales extraracinaires et nombre moyen de spores de *R. irregularis*, cultivé en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25). N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

Le nombre de spores produites par le champignon reste constant en absence et en présence des concentrations 0,05 et 0,1 % de diesel. En revanche, une diminution significative de 35 % a été observée à la concentration de diesel de 0,25 % (Fig. 29).

### 2.2.3. Impact du diesel sur la croissance des racines de chicorée

L'effet du diesel sur la croissance des racines de chicorée colonisées ou non par le CMA *R. irregularis*, cultivées en absence (0 %) ou en présence de diesel (0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %) a été mesuré après 9 semaines d'incubation. La longueur moyenne des racines non mycorhizées cultivées en absence de diesel a atteint 8m. En présence des concentrations 0,25 et 0,5 % de diesel, une diminution de 27 et 85 % a été observée. La longueur moyenne des racines mycorhizées a atteint 8.46m en absence de diesel. Elle diminue de 88 % en présence de la concentration 0,5 % de diesel. (Tab. 18).

En absence de diesel, les biomasses sèches des racines mycorhizées et non mycorhizées sont respectivement de 88,4 et 81,1 mg et ne montrent aucune différence significative (Tab. 18). Alors qu'aucune différence dans les biomasses produites par les racines mycorhizées et non n'est observée en présence de 0,05 et 0,1 % de diesel, celles-ci diminuent significativement de 75 et 78 % en présence de la concentration 0,5 % de diesel par comparaison au témoin. La concentration 1 % a complètement inhibé la croissance racinaire.

**Tableau 18** Longueurs racinaires et biomasses sèches des racines de chicorée mycorhizées (M) ou non (NM), après 9 semaines de culture en absence ou en présence de différentes concentrations de diesel (0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 %).

Diesel (%)	Longueur racinaire (m/boîte)		Biomasse sèche (mg/boîte)	
	NM	M	NM	M
Témoin	8.1±0.99 <sup>a</sup>	8.5±0.94 <sup>ab</sup>	81.1±4.69 <sup>a</sup>	88.4±7.30 <sup>a</sup>
0.05	7.6±0.62 <sup>a*</sup>	8.9±0.71 <sup>a</sup>	75.9±3.61 <sup>ab</sup>	78.4±5.51 <sup>a</sup>
0.1	6.8±1.22 <sup>b*</sup>	8.1±0.55 <sup>ab</sup>	74.1±12.58 <sup>ab</sup>	75.4±6.55 <sup>ab</sup>
0.25	5.9±1.85 <sup>b*</sup>	7.7±0.82 <sup>b</sup>	38.5±10.09 <sup>c*</sup>	62.4±6.10 <sup>bc</sup>
0.5	1.1±0.1 <sup>d</sup>	0.9±0.1 <sup>d</sup>	20.4±2.6 <sup>d</sup>	19±3.2 <sup>d</sup>
1	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>

Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

\*Indique une différence significative entre les racines mycorhizées et non mycorhizées pour chaque concentration de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Impact du diesel sur les paramètres du stress oxydant

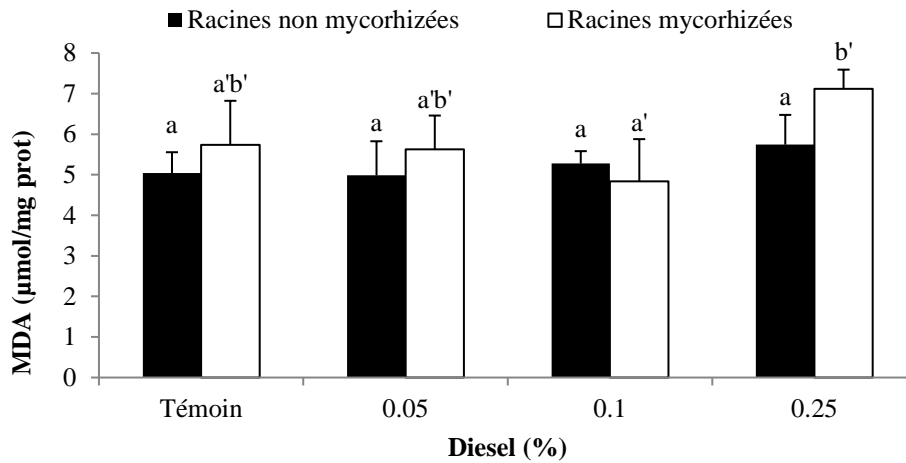
#### 2.3.1. Impact du diesel sur la teneur en MDA

La quantité de MDA formé par les racines mycorhizées et non mycorhizées en présence de diesel reste constante par comparaison au témoin non pollué. Aucune différence significative n'a été observée entre les quantités de MDA produites dans les racines mycorhizées par rapport aux racines non mycorhizées (Fig. 24).

#### 2.3.2. Impact du diesel sur l'activité SOD

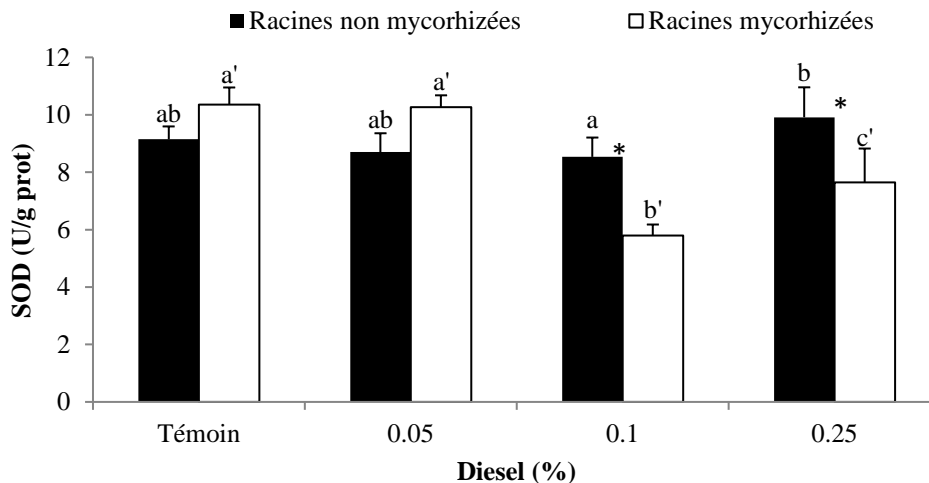
Aucun changement significatif dans l'activité de la SOD n'a été observé dans les racines non mycorhizées en absence et en présence de diesel. Cependant, une diminution significative dans l'activité SOD a été enregistrée chez les racines mycorhizées aux concentrations 0,1 et 0,25 % de diesel par comparaison au témoin mycorhizé (Fig. 30). A 0,1

et 0,25 % de diesel, l'activité SOD a été significativement plus faible dans les racines mycorhizées par comparaison aux non mycorhizées.



**Figure 30** Concentration de MDA dans les racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées par le CMA *R. irregularis*, et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25 %). N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

\*Indique une différence significative entre les racines mycorhizées et non mycorhizées pour chaque concentration de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

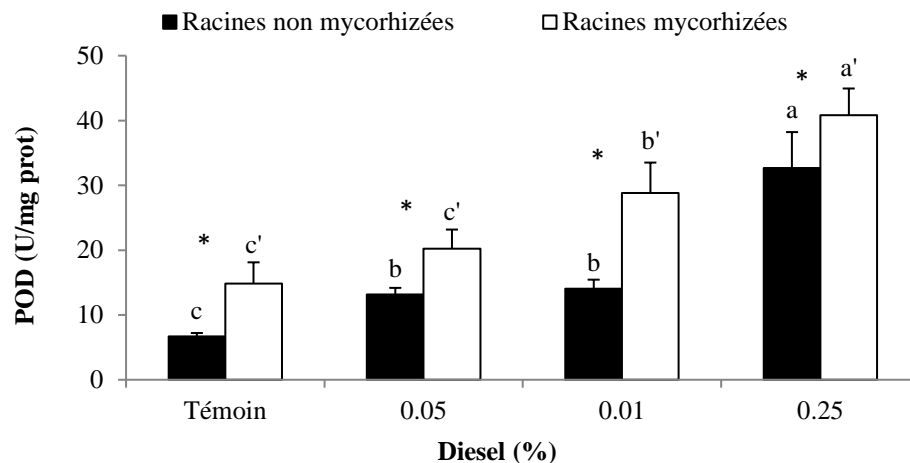


**Figure 31** Activité de la SOD dans les racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées par le CMA *R. irregularis*, et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25 %). N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

\*Indique une différence significative entre les racines mycorhizées et non mycorhizées pour chaque concentration de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.3. Impact du diesel sur l'activité de la POD

L'augmentation de la concentration de diesel a entraîné une augmentation de l'activité POD dans les racines mycorhizées et non mycorhizées. En présence et en absence de diesel, l'activité POD montre une augmentation significative dans les racines mycorhizées par comparaison aux racines non mycorhizées (Fig. 32).



**Figure 32** Activité de la POD dans les racines de chicorée mycorhizées et non mycorhizées par le CMA *R. irregularis*, et cultivées en absence (0 %) ou en présence de concentrations croissantes de diesel (0,05 ; 0,1 et 0,25 %). N= 5 ( $\pm$ SD). Les différentes lettres entre les colonnes indiquent des différences significatives entre les cultures à différentes concentrations de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

\*Indique une différence significative entre les racines mycorhizées et non mycorhizées pour chaque concentration de diesel selon le test LSD ( $p < 0.05$ ).

## 3. Discussion

Le second volet du présent travail a consisté à étudier l'impact du diesel sur les principaux stades de développement du CMA *R. irregularis* et la croissance des racines de la plante hôte, la chicorée (*Cichorium intibus* L.). Nos résultats ont montré que la présence du diesel aux concentrations 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 % provoque non seulement une baisse significative du pourcentage des spores germées avec une inhibition totale à la plus forte concentration (1 %), mais également une chute dans l'élongation hyphale ainsi qu'une modification dans le mode de germination des spores. En effet, en présence du polluant, la germination des spores selon un mode linéaire se produit au détriment de la germination ramifiée. La germination de façon linéaire observée en présence de diesel, peut être une forme

d'adaptation du champignon au milieu pollué afin de minimiser la surface de contact avec le polluant. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Kirk et al., (2005) qui ont observé qu'une concentration de 0,5 % de diesel ralentissait la croissance des hyphes germinatives mais n'affectait pas la germination des spores de *R. irregularis in vitro* et dans le sol. Des effets similaires ont déjà été décrits avec d'autres types de polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques, fongicides) sur les spores de *R. irregularis* (Alarcón et al., 2006; Zocco et al., 2008; Debiane et al., 2008, 2009; Calonne et al., 2010). Les spores qui n'ont pas germé en présence de diesel ont perdu leur pouvoir germinatif dénotant leur mortalité. Ces résultats suggèrent un effet fongicide du diesel.

L'incorporation du diesel dans le milieu de culture a fait baisser significativement les taux de mycorhization arbusculaires et vésiculaires. Nos résultats sont en accord avec ceux de Tang et al. (2009) et Trejo et al. (2013) qui ont constaté une baisse du taux de mycorhization des plantes de *Zea mays* et *Brachiaria decumbens* cultivées en présence de diesel. La diminution du taux de mycorhization pourrait être due à la réduction du taux de germination des spores (Hirrel, 1981), et/ou à la modification de l'architecture hyphale. Le diesel à 0,25 % a également affecté négativement le développement extraracinaire de *R. irregularis* aussi bien en termes d'élongation des hyphes que de formation de spores. Le même effet négatif a été observé en présence de fongicides par Campagnac et al. (2009).

La présence du diesel a également eu un effet négatif sur la croissance de la racine hôte, aussi bien au niveau de l'élongation que de la biomasse des racines de chicorée mycorhizées et non. Cette baisse a été plus marquée chez les racines non mycorhizées par comparaison aux racines mycorhizées. Ces résultats corroborent les travaux de Hernández-Ortega et al. (2012) qui ont observé une diminution de la croissance des plants de *Melilotus alba* cultivés en présence de diesel ainsi que ceux de Barrutia et al. (2011) sur *Trifolium repens* et *Lolium perenne*, de Muratova et al. (2012) sur les plants de *Secale cereale*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Lolium perenne* et *Onobrychis antasiacia* et les travaux de Jagtap et al. (2014) sur *Pinus densiflora*, *Populus tomentiglandulosa* et *Thuya orientalis*, cultivés dans un sol contaminé par le diesel.

Nos résultats ne montrent aucune augmentation du MDA, marqueur de peroxydation lipidique, chez les racines de chicorée en présence de diesel. Ceci indique que l'écotoxicité du diesel ne peut s'expliquer par une altération membranaire. Cette chute dans la biomasse

pourrait être le résultat d'une déficience dans l'absorption hydrique et minérale (Quiñones-Aguilar, 2003; Sangabriel et al., 2006).

À 0,25 % de diesel, les racines mycorhizées avaient une biomasse sèche plus importante que celle des racines non mycorhizées montrant ainsi une meilleure croissance lorsque le champignon est présent. Ces données suggèrent un effet protecteur de la mycorhization contre la toxicité du diesel. Le même effet positif de la mycorhization sur la biomasse de *Brachiaria decumbens* et *Lolium multiflorum* a été observé avec le diesel (Alarcón et al., 2006; Trejo et al., 2013) et d'autres polluants (hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux lourds) (Joner & Leyval, 2003; Debiane et al., 2009; Redon et al., 2009).

D'après les résultats obtenus, l'effet protecteur de la mycorhization observé chez la chicorée serait dû à une induction de l'activité anti-oxydante POD. En effet l'accroissement des concentrations de diesel a conduit à une augmentation plus accrue de l'activité POD chez les racines mycorhizées, permettant d'éliminer plus efficacement les ERO qui seraient induites par la présence du diesel. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Campagnac et al. (2010) qui ont constaté une augmentation de la POD dans les racines mycorhizées en présence d'un fongicide inhibiteur de la biosynthèse des stéroïdes le fenpropimorphe (0,02 mg/l). Le même effet a été observé par Tang et al. (2009) sur les plants de *Zea mays* cultivés en présence de diesel.

En revanche, l'activité SOD reste constante chez les racines non mycorhizées et diminue chez les racines mycorhizées en présence des concentrations 0,1 et 0,25% de diesel. Ces résultats ne sont pas en accord avec d'autres études qui rapportent une augmentation de l'activité SOD chez les racines mycorhizées (Debiane et al., 2009; Tang et al., 2009). La diminution de l'activité SOD pourrait être due (i) à une faible génération d' $O_2^{\cdot-}$  chez les racines mycorhizées, (ii) à l'implication d'autres systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques tels que la vitamine C (ascorbate) molécule intervenant dans le piégeage du  $O_2^{\cdot-}$ , (iii) à l'inactivation de l'enzyme SOD par les ERO. À la concentration 0,25 % de diesel, une amélioration de la croissance des racines mycorhizées concomitant avec une baisse de l'activité SOD a été observée. Ceci pourrait être une conséquence de l'atténuation du stress oxydant liée à la présence du CMA. Il serait intéressant d'étudier, dans le futur, les mécanismes moléculaires mis en œuvre par le CMA pour protéger les plantes contre la phytotoxicité du diesel.

#### 4. Conclusion

Les résultats du présent travail montrent bien que le diesel affecte négativement les différents stades de développement du CMA *R. irregularis* et la croissance des racines de chicorée. Il ne les inhibe pas complètement, excepté à la concentration testée (1 %). Le champignon mycorhizien arrive, non seulement, à accomplir un cycle de développement complet en présence du diesel mais il confère également une protection à la racine contre la toxicité du polluant. L'effet protecteur serait dû à une induction de l'enzyme POD mais pas à la SOD. De plus, l'altération des lipides membranaires ne semble pas être à l'origine de la phytotoxicité observée.

D'une façon générale, ce travail contribue non seulement à l'évaluation de la toxicité des polluants d'origine industrielle sur la symbiose mycorhizienne arbusculaire mais aussi permet de fournir un outil dans les études d'écotoxicologie des sols et de l'évaluation des risques. En outre, il souligne l'intérêt des cultures *in vitro* pour étudier les mécanismes de toxicité des polluants sur la flore bénéfique du sol comme les CMA.

**Synthèse, conclusion générale  
et perspectives**

## SYNTHESE, CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La région Nord-est de l'Algérie connue par ses sols agricoles fertiles abrite depuis plus de 30 ans de grands complexes industriels. Les rejets de ces complexes constituent une vraie menace aussi bien pour la santé de l'Homme que pour la santé des sols agricoles et leur qualité agronomique. L'impact des rejets industriels sur les agro-écosystèmes dans cette région est peu étudié. C'est pourquoi, les travaux menés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif principal l'étude de l'impact des rejets industriels issus de diverses activités anthropiques sur la biomasse microbienne des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la diversité et à l'abondance des CMA, leur développement ainsi qu'à l'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire sur des sols potentiellement pollués ou dopés (c'est-à-dire artificiellement contaminés). Ainsi, nos investigations ont été menées à la fois *in situ*, en microsomes et *in vitro*.

Tout d'abord, les analyses physico-chimiques effectuées ont montré que les sols des parcelles agricoles P1, P2 et P3 situées à proximité de trois installations industrielles (complexe Sidérurgique d'El-Hajdar, Société Algérienne des Fertilisants Fertial, Société des Ciments de Hdjar Soud respectivement) et de la parcelle témoin P4 située à Séraïdi se caractérisent par un pH alcalin à faiblement alcalin, par un taux relativement faible de matière organique et par des teneurs faibles à élevées en éléments minéraux (azote, phosphore et potassium). Les sols des parcelles P1, P2 et P3 contiennent des teneurs totales en éléments traces métalliques (plomb, cuivre, zinc, manganèse, chrome et nickel) allant de 121 à 1154 mg.Kg<sup>-1</sup> de sol. Ces concentrations sont élevées par comparaison à celles fixées par la norme AFNOR NFU 44-041, indiquant une forte contamination métallique de ces parcelles.

Nos résultats ont également démontré que cette pollution d'origine industrielle exerçait un effet négatif sur la viabilité microbienne des sols des agro-écosystèmes. En effet, la quantification de la biomasse microbienne tellurique des sols de ces différentes parcelles grâce à des marqueurs lipidiques spécifiques des bactéries (AGPL i15 :0, a15 :0, i16 :0, i17 :0, a17 :0, cy17 :0, C18 :1 ω 7 et cy19 :0), des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens (ergostérol et AGPL C18: 2ω6,9) et des CMA (AGPL C16 :1 ω5) a montré

que la biomasse des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens est de 7 à 13 fois plus faible dans les parcelles polluées P1, P2 et P3 par comparaison à la parcelle témoin P4. De même, les biomasses des bactéries et des CMA sont, en moyenne, 5 fois inférieures dans les parcelles polluées par rapport à la parcelle témoin P4. Les données des analyses lipidiques révèlent également une prédominance des communautés bactériennes par rapport aux CMA dans les parcelles polluées. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux qui ont montré que les rejets industriels génèrent une contamination des sols environnants par divers types de polluants (Al-Khashman and Shawabkeh, 2009; Shukurov et al., 2014; Salmanighabeshi et al., 2015) et que cette contamination impactait négativement la diversité et la biomasse des communautés microbiennes telluriques (Deni and Penninckx, 2004; Hu et al., 2007; Krishnamoorthy et al., 2015; Yang et al., 2015; Sun et al., 2016).

L'isolement des spores de CMA associées à la rhizosphère de plants de tomate dans les trois parcelles agricoles polluées par les ETM (P1, P2 et P3) et dans la parcelle témoin non polluée P4, et suivie de leur identification basée sur des critères morphologiques (en collaboration avec Y. Dalpé, CRECO, Ottawa) nous ont permis de mettre en évidence 13 espèces (*Funneliformis mosseae*, *Funneliformis geosporum* –like, *Septoglosum constrictum*, *Septoglosum deserticola*, *Rhizophagus clarus*, *Rhizophagus irregularis*–like, *Scutellospora calospora*, *Acaulospora laevis*-like, *Acaulospora* sp, *Entrophospora infrequens*, *Pacispora scintillans*-like, *Glomus rubiforme*, *Claroideoglosum lamellosum*) appartenant à cinq familles (*Glomeraceae*, *Claroideoglomeraceae*, *Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*, *Pacisporaceae*). Cependant, il apparaît clairement d'après nos résultats que la diversité des CMA est moins importante dans les parcelles polluées P1, P2 et P3 comparativement à la parcelle témoin P4. De même, d'un point de vue quantitatif, le nombre de spores de CMA isolées à partir des sols des parcelles polluées P1, P2 et P3 était plus faible que celui de la parcelle témoin P4. Ceci a été d'ailleurs confirmé par le faible potentiel mycorhizogène des sols et le faible taux de mycorhization des plants de tomate dans les parcelles polluées. En effet, le taux de mycorhization des plants de tomate cultivés dans les quatre parcelles est de 2 à 3 fois plus faible dans les parcelles polluées que dans la parcelle témoin P4.

Dans la deuxième partie de cette thèse, afin d'étudier les conséquences de la pollution du sol et de ses effets délétères sur les populations microbiennes telluriques (mis en évidence dans la première partie) sur la croissance des plantes, le développement des CMA et l'établissement de la symbiose mycorhizienne arbusculaire, deux expérimentations, l'une *in*

*in vitro* et l'autre en microcosmes sur du sol dopé au diesel et cultivé avec de la tomate et du blé (plantes largement cultivées dans les agro-écosystèmes Annabis), ont été conduites.

Quel que soit le mode de culture, nos résultats ont montré que le diesel réduisait significativement les taux de mycorhization des plantes testées et pouvait dans certains cas inhiber complètement la mycorhization à la concentration de 1 % de diesel. En outre, l'essai *in vitro* nous a permis de démontrer que le diesel affectait négativement les principaux stades du cycle de développement du CMA (germination, colonisation, développement des hyphes extraracinaires, sporulation) et les inhibait complètement à la concentration de 1 % de diesel. Il a été montré que non seulement le diesel diminuait le taux de germination des spores de *R. irregularis* mais ce polluant agissait sur l'architecture des hyphes. Une augmentation de spores qui germent selon un mode linéaire au détriment de la germination ramifiée a été observée en présence de diesel. Ceci serait probablement à l'origine de la réduction des stades de développement qui suivent.

En plus de l'effet délétère du diesel vis-à-vis du développement des CMA, nos travaux ont montré que celui-ci avait un impact négatif sur la croissance des plantes testées, qu'elles soient mycorhizées ou non. En présence de 1 % de diesel, l'effet est plus marqué chez la tomate que chez le blé. Nos résultats corroborent les travaux de Barrutia et al. (2011), Hernández-Ortega et al. (2012) et Muratova et al. (2012) qui ont observé une diminution de la croissance des plantes cultivés sur des sols contaminés par le diesel.

Cependant, nos résultats ont montré que cet impact négatif du diesel sur la croissance était moins prononcé chez les plantes mycorhizées par comparaison aux plantes non mycorhizées suggérant une protection des plantes par la mycorhization contre la toxicité du diesel.

Enfin, afin d'essayer de comprendre l'origine de la phytotoxicité du diesel ainsi que les mécanismes biochimiques impliqués dans l'effet protecteur de la mycorhization observé précédemment, différents marqueurs du stress oxydant ont été mesurés.

Des concentrations croissantes de diesel ont entraîné une augmentation significative des quantités de MDA suggérant que les plantes cultivées en présence de diesel ont subi des dommages au niveau des membranes cellulaires résultant de la peroxydation lipidique due probablement à un stress oxydant. La teneur en MDA des cellules était deux fois plus élevée

chez la tomate que chez le blé ce qui explique la faible croissance des plants de tomate. Cependant, aucune augmentation de la production du MDA n'a été détectée chez les racines de chicorée mycorhizées ou non cultivées en présence de diesel. L'augmentation de la teneur en MDA a été déjà décrite chez la tomate et le blé exposés à d'autres types de polluants tels que les ETM et les pesticides (Panda et al., 2003; Nogueirol et al., 2015; Yildiztekin et Kaya, 2015).

Par ailleurs, il est important de souligner que nos données de l'essai en microcosmes montrent une production du MDA moins importante chez la tomate et le blé inoculés par Fm par comparaison aux plantes non inoculées ou inoculées par SZE. Cette diminution s'est accompagnée d'une augmentation des activités SOD et POD. Ces résultats sont en faveur d'une induction des systèmes enzymatiques anti-oxydants par la mycorhization (Fm) afin d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène générées par la pollution et qui seraient à l'origine d'une altération des membranes cellulaires. Cette protection s'est traduite par une amélioration de la croissance des plants de tomate et du blé inoculés par Fm à la concentration 1 % de diesel. A ce niveau de pollution, l'inoculation par Fm a été plus efficace dans la protection contre les effets négatifs du diesel par l'atténuation du stress oxydant. L'augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes corroborent les résultats rapportés par He et al. (2007) et Tang et al. (2009) qui ont démontré que l'inoculation de la tomate et du maïs augmente significativement les activités SOD et POD par comparaison aux plantes non inoculées. Chez les racines de chicorée, l'effet positif de la mycorhization observé sur leur croissance serait dû à une induction de l'enzyme POD mais pas à la SOD.

En conclusion, l'impact de la pollution anthropique sur la santé des sols est indéniable avec notamment comme conséquence des changements drastiques au niveau de la diversité, de l'abondance et de l'activité des microorganismes telluriques, notamment les CMA qui jouent un rôle essentiel dans la fertilité du sol et par conséquent dans la nutrition des plantes et la productivité agricole. Ainsi, la menace de la pollution industrielle sur la santé et le bon fonctionnement des agro-écosystèmes est bien réelle. Nos résultats mettent en évidence les conséquences des pollutions industrielles générées par les complexes ArcelorMittal Algérie (AMA) d'El-Hadjjar, Fertial et la Société des Ciments de Hadjar Soud (SCHS) sur les microorganismes bénéfiques du sol et souligne l'importance de préserver les agro-écosystèmes de l'impact néfaste des activités industrielles. Les résultats de l'essai en microcosmes montrent l'intérêt de l'ajout d'un amendement biologique à base de CMA dans

les sols anthropisés ainsi que l'importance du choix du type d'inoculum dans son efficacité sur la croissance des plantes et leur protection contre la phytotoxicité induite par les polluants. Bien que certains polluants tel que le diesel réduisent les principaux stades de développement des CMA, ils ne les inhibent pas complètement. En présence de certaines concentrations de polluants, les CMA arrivent non seulement à accomplir un cycle de développement complet mais ils sont également capables de protéger les plantes contre la phytotoxicité des polluants en atténuant le stress oxydant grâce à une moindre production de malondialdéhyde (biomarqueur de peroxydation lipidique) et à une induction des activités enzymatiques anti-oxydantes telles que la SOD et la POD. Cependant, au-delà d'une certaine concentration de polluant, la pérennité de ces champignons et par conséquent de la symbiose mycorhizienne bénéfique ainsi que de ses fonctions écologiques seront menacées.

Afin de compléter et de poursuivre ce travail, des perspectives à la fois fondamentales et appliquées peuvent être envisagées:

1. Approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la tolérance des plantes mycorhizées à la pollution en étudiant l'expression de certains gènes comme par exemple des gènes de résistance contre le stress oxydant codant pour la superoxyde dismutase (*MtSOD*), la glutarédoxine (*MtGRX*), la peroxydase (*MtPOX*) et l'ascorbate peroxydase (*MtAPX*); des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN : le facteur d'élongation de la transcription TFIIIS (*MtTFIIS*), les Tyrosyl-ADN phosphodiesterase  $\alpha$  et  $\beta$  (*MtTdp1\alpha* et *MtTdp1\beta*) et des gènes de métabolisation des polluants organiques codant pour la glutathion-S-transférase (*MtGST*). Plusieurs études ont révélé une induction de ces gènes en présence de divers stress (métaux, ozone, osmotique) (Puckette et al., 2008; Chandran et al., 2008; Aloui et al., 2009; Balestrazzi et al., 2011)
2. Caractériser les populations microbiennes des sols pollués grâce à des outils de biologie moléculaire. Cette étude sera basée sur le décryptage du génome du microbiote du sol (métagénomique) pour isoler des souches indigènes tolérantes et efficaces dans la dégradation de polluants organiques (comme le diesel) et la séquestration des polluants inorganiques (comme les ETM). L'analyse des profils taxonomiques pourra se faire principalement par l'utilisation du séquençage à haut débit de marqueurs génétiques sélectionnés pour leur résolution phylogénétique (analyse des séquences ITS et 16S d'ADN ribosomique pour les champignons et

bactéries respectivement). La finalité d'une telle étude serait la sélection d'espèces et/ou souches microbiennes spécifiques ayant un potentiel élevé dans la dégradation ou la séquestration des polluants organiques et inorganiques respectivement et la formulation d'inoculum à base de consortia microbiens combinant plusieurs souches de bactéries et de champignons indigènes des sols pollués et efficaces dans la dépollution *in situ* en association avec des plantes phytoremédiatrices.

3. Produire des inoculums autochtones à partir des souches microbiennes indigènes isolées des sols pollués et conduire d'essais de phytoremédiation assistée par les CMA *in situ* sur les sites pollués. Il s'agit de la phytostabilisation pour les ETM et de la phytorhizodégradation pour les polluants organiques comme le diesel par exemple. Il est important également de suivre le devenir des polluants dans les plantes (bioaccumulation, transferts dans les parties aériennes,...).
4. Evaluer le risque que présentent ses sols pollués vis-à-vis de l'Homme en effectuant des tests de cytotoxicité comme par exemple la mesure de l'intégrité/la perméabilité membranaire via le test de la LDH (Lactate DésHydrogénase) et la viabilité cellulaire à l'aide du test de la DHm (DésHydrogénase mitochondriale).

## **Références bibliographiques**

---

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES****A.**

Abad, A.K.J., & Khara, J. (2007). Effect of cadmium toxicity on the level of lipid peroxidation and antioxidative enzymes activity in wheat plants colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. *10*, 2413–2417.

Abaye, D.A., Lawlor, K., Hirsch, P.R., & Brookes, P.C. (2005). Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. *European Journal of Soil Science*. *56*, 93–102.

Abdel Latef, A.A.H., & Chaoping, H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*. *127*, 228–233.

Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inès, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*. *31*, 427–436.

Abed, R.M.M., Safi, N.M.D., Köster, J., Beer, D. de, El-Nahhal, Y., Rullkötter, J., & Garcia-Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. *68*, 1674–1683.

Adam, G., & Duncan, H. (2003). The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants. *Environmental Geochemistry and Health*. *25*, 123–130.

Adam, G., & Duncan, H.J. (1999). Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*. *21*, 353–357.

Ahmad, P., Sarwat, M., & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*. *51*, 167–173.

Åkerblom, S., Bååth, E., Bringmark, L., & Bringmark, E. (2007). Experimentally induced effects of heavy metal on microbial activity and community structure of forest mor layers. *Biology and Fertility of Soils*. *44*, 79–91.

Akhtar, M.S., & Siddiqui, Z.A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. In: *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*, Z.A. Siddiqui, M.S. Akhtar, & K. Futai, eds. (Springer Netherlands), pp. 61–97.

Akiyama, K. (2007). Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. *71*, 1405–1414.

Akiyama, K., & Hayashi, H. (2006). Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany*. *97*, 925.

- Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. *435*, 824–827.
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*. *184*, 529–544.
- Alarcón, A., Delgadillo, J., Franco, A., Davies, F.T., & Ferrera, R. (2006). Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita*-*Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. *22*, 39-47.
- Alexander, M. (1965). Most probable number for microbial populations. In: *Methodes of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.*, (Midson: American Society of Agronomy), pp. 1467–1472.
- Al-Khashman, O.A., & Shawabkeh, R.A. (2009). Metal distribution in urban soil around steel industry beside Queen Alia Airport, Jordan. *Environmental Geochemistry and Health*. *31*, 717–726.
- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., Aschi-Smiti, S., & Dumas-Gaudot, E. (2009). On the mechanisms of cadmium stress alleviation in: *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics*. *9*, 420–433.
- Alrumman, S.A., Standing, D.B., & Paton, G.I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*. *27*, 31–41.
- Alscher, R.G., Erturk, N., & Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. *53*, 1331–1341.
- Andrade, S.A.L. de, Jorge, R.A., & Silveira, A.P.D. da (2005). Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Agricola*. *62*, 389–394.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. *55*, 373–399.
- Appoloni, S., Lekberg, Y., Tercek, M.T., Zabinski, C.A., & Redecker, D. (2008). Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbial Ecology*. *56*, 649–659.
- Aranda, E., Scervino, J.M., Godoy, P., Reina, R., Ocampo, J.A., Wittich, R.-M., & García-Romera, I. (2013). Role of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus custos* in the dissipation of PAHs under root-organ culture conditions. *Environmental Pollution*. *181*, 182–189.
- Aroca, R., Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J.M. (2007). How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*. *173*, 808–816.

Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M., Zamarreño, A.M., Paz, J.A., García-Mina, J.M., Pozo, M.J., & López-Ráez, J.A. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *Journal of Plant Physiology*. *170*, 47–55.

Arora, N., McKiernan, P.J., Beath, S.V., deVilleville de Goyet, J., & Kelly, D.A. (2002). Concomitant basiliximab with low-dose calcineurin inhibitors in children post-liver transplantation. *Pediatric Transplantation*. *6*, 214–218.

Aruoma, D.O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. *75*, 199–212.

Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*. *141*, 391–396.

Asubiojo, O.I., Aina, P.O., Oluwole, A.F., Arshed, W., Akanle, O.A., & Spyrou, N.M. (1991). Effects of cement production on the elemental composition of soils in the neighborhood of two cement factories. *Water, Air and Soil Pollution*. *57–58*, 819–828.

Atafar, Z., Mesdaghinia, A., Nouri, J., Homaei, M., Yunesian, M., Ahmadimoghaddam, M., & Mahvi, A.H. (2010). Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environmental Monitoring and Assessment*. *160*, 83–89.

## B.

Bååth, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution*. *47*, 335–379.

Bååth, E. (2003). The use of neutral lipid fatty acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. *Microbial Ecology*. *45*, 373–383.

Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å., & Campbell, C.D. (1998). Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied Environmental Microbiology*. *64*, 238–245.

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., & Come, D. (1996). Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*. *97*, 104–110.

Baize D., (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA Éditions, Paris, 410 p.

Baize D., Roddiers., (2002). Cartographie au 1/50 000<sup>e</sup>. Approche typologique d'une cartographie pédogéochimique. Exemple de l'avallonnais, p. 123-134. In : D. Baize, M. Tercé (coord.), Les Éléments traces métalliques dans les sols – Approches fonctionnelles et spatiales. INRA Éditions, Paris. 570 p.

Balestrazzi, A., Confalonieri, M., Macovei, A., & Carbonera, D. (2011). Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: Expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. *Journal of Plant Physiology*. *168*, 706–713.

- Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Bécard, G., & Rochange, S.F. (2011). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany*. *62*, 1049–1060.
- Barber S.A., Walker J.M., & Vasey E.H. (1962). Principles of ion movement through the soil to the plant root. Transaction Joint Meeting Commission IV and V International Soil Science, New Zealand. 121-124 pp.
- Barrutia, O., Garbisu, C., Epelde, L., Sampedro, M.C., Goicolea, M.A., & Becerril, J.M. (2011). Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. *Science of The Total Environment*. *409*, 4087–4093.
- Bartolome-Esteban, H., & Schenck, N.C. (1994). Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil aluminum saturation. *Mycologia*. *86*, 217–226.
- Basta, N.T., Ryan, J.A., & Chaney, R.L. (2005). Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *Journal of Environmental Quality*. *34*, 49–63.
- Bécard, G., & Fortin, J.A. (1988). Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*. *108*, 211–218.
- Bécard, G., Kosuta, S., Tamasloukht, M., Séjalon-Delmas, N., & Roux, C. (2004). Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*. *82*, 1186–1197.
- Beckman, K.B., & Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*. *78*, 547–581.
- Bencherif, K., Boutekrabt, A., Fontaine, J., Laruelle, F., Dalpè, Y., & Lounès-Hadj Saharaoui, A. (2015). Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas. *Science of The Total Environment*. *533*, 488–494.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.-C., Roux, C., Bécard, G., & Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*. *4*.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C., & Séjalon-Delmas, N. (2008). GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology*. *148*, 402–413.
- Bevege, D.I. & Bowen, G.D. (1975). Endogone strain and host plant difference in development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: *Endomycorrhizas* (Ed. by F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker), Academic Press, New York and London. 149-174 pp.
- Bligh EG, & Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. *37*, 911–917.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*. *91*, 179–194.

- Bobin, J.-L., Nifenecker, H., and Stéphan, C. (2012). *L'Énergie dans le monde (Nelle Ed.) - Bilan et perspectives* (EDP Sciences). Edition. EDP Sciences - Paris. 123 p.
- Bolignano, N.C., Safir, G.R., & Warncke, D.D. (1983). Mycorrhizal infection and growth of onion in the field in relation to phosphorus and water availability. *Journal of the American Society Horticultural Science*. *108*, 819–825.
- Bona, C., de Rezende, I.M., Santos, G. de O., & de Souza, L.A. (2011). Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Seedlings. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. *54*, 1379–1387.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science*. *13*, 492–498.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*. *1*, 48.
- Bonfante, P., & Requena, N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. *14*, 451–457.
- Bong, C.W., Malfatti, F., Azam, F., Obayashi, Y., & Suzuki, S., (2010). The effect of Zinc exposure on the bacteria abundance and proteolytic activity in seawater, in: Hamamura, N., Suzuki, S., Mendo, S., Barroso, C.M., Iwata, H., & Tanabe, S. (Eds.), *Interdisciplinary studies on Environmental Chemistry - Biological responses to contaminants*. Terrapub, pp. 57 - 63.
- Bressano, M., Curetti, M., Giachero, L., Gil, S.V., Cabello, M., March, G., Ducasse, D.A., & Luna, C.M. (2010). Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*. *167*, 1622–1626.
- Breton, J.-M., Portécop, J., Ribot, C., & Miossec, A. (2008). *Gestion des ressources en eau et développement local durable* : (Paris : Pointe-à-Pitre: Karthala).
- Brookes, P.C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*. *19*, 269–279.
- Bruins, M.R., Kapil, S., & Oehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *45*, 198–207.
- Brundrett, M.C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. *154*, 275–304.
- Brundrett, M.C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*. *320*, 37–77.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. *33*, 95–130.

Bünemann, E.K., Schwenke, G.D., & Van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Australian Journal of Soil Research*. *44*, 379.

Burgess, T., Dell, B., & Malajczuk, N. (1994). Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist*. *127*, 731–739.

Burleigh, S.H., Cavagnaro, T., & Jakobsen, I. (2002). Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *Journal of Experimental Botany*. *53*, 1593–1601.

Buttery B. R., Park S. J., Findlay W. I. & Dhanvantar B. N. (1988). Effects of fumigation and fertilizer on growth, yield, chemical composition, and mycorrhizae in white bean and soybean. *Canadian Journal of Plant Science*. *68*, 677–686.

## C.

Cabello, M.N. (1997). Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*. *22*, 233–236.

Calonne, M., Fontaine, J., Debiante, D., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Louns-Hadj, A. (2010). Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*. In: Carisse O (ed) *Fungicides*, Chapter 16, 326–346.

Calonne, M., Sahraoui, A.L.-H., Campagnac, E., Debiante, D., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Fontaine, J. (2012). Propiconazole inhibits the sterol 14 $\alpha$ -demethylase in *Glomus irregulare* like in phytopathogenic fungi. *Chemosphere*. *87*, 376–383.

Calvet, R. (2003). *Le sol: propriétés et fonctions*. France Agricole Editions. 511 p.

Campagnac, E., Fontaine, J., Sahraoui, A.L.-H., Laruelle, F., Durand, R., & Grandmougin-Ferjani, A. (2008). Differential effects of fenpropimorph and fenhexamid, two sterol biosynthesis inhibitor fungicides, on arbuscular mycorrhizal development and sterol metabolism in carrot roots. *Phytochemistry*. *69*, 2912–2919.

Campagnac, E., Fontaine, J., Sahraoui, A.L.-H., Laruelle, F., Durand, R., & Grandmougin-Ferjani, A. (2009). Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza*. *19*, 365–374.

Campagnac, E., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Debiante, D., Fontaine, J., Laruelle, F., Garçon, G., Verdin, A., Durand, R., Shirali, P., & Grandmougin-Ferjani, A. (2010). Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza*. *20*, 167–178.

Cappellazzo, G., Lanfranco, L., Fitz, M., Wipf, D., & Bonfante, P. (2008). Characterization of an amino acid permease from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*. *147*, 429–437.

Cardenas-Flores, A., Cranenbrouck, S., Draye, X., Guillet, A., Govaerts, B., & Declerck, S. (2011). The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza*. *21*, 443–449.

- Chakraborty, U., and Pradhan, B. (2012). Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 24, 117–130.
- Chandran, D., Sharopova, N., VandenBosch, K.A., Garvin, D.F., & Samac, D.A. (2008). Physiological and molecular characterization of aluminum resistance in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*. 8, 89.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., & El Ferjani, E. (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*. 127, 139–147.
- Chaoui, W., Bousnoubra, H., Benhamza, M., & Bouchami, T. (2013). Etude de la pollution des eaux des oueds Seybouse et Mellah (Région de l'Est Algérien). Synthèse: *Revue Des Sciences et de La Technologie*. 26, 50–56.
- Chen, B., Xiao, X., Zhu, Y.-G., Smith, F.A., Miao Xie, Z., & Smith, S.E. (2007). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. *Science of The Total Environment*. 379, 226–234.
- Chen, L., Hu, X., Yang, W., Xu, Z., Zhang, D., & Gao, S. (2015). The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on sex-specific responses to Pb pollution in *Populus cathayana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 113, 460–468.
- Chen, Y.P., Liu, Q., Liu, Y.J., Jia, F.A., & He, X.H. (2014). Responses of soil microbial activity to cadmium pollution and elevated CO<sub>2</sub>. *Scientific Reports*. 4. e4287.
- Christophersen, H.M., Smith, F.A., and Smith, S.E. (2012). Unraveling the influence of arbuscular mycorrhizal colonization on arsenic tolerance in *Medicago*: *Glomus mosseae* is more effective than *G. intraradices*, Associated with lower expression of root epidermal Pi transporter genes. *Frontiers Physiology*. 3, 1–13.
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S., & Berta, G. (2005). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere*. 59, 21–29.
- Clark, R.B., & Zeto, S.K. (2000). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*. 23, 867–902.

## D.

- Dalpé, Y. (2005). Les mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. *Phytoprotection*. 86, 53–59.
- Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H., & Young, J.P.W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology*. 36, 203–209.

- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Montagu, M.V., Inzé\*, D., & Breusegem, F.V. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*. *57*, 779–795.
- De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M.C., Motto, M., & Arrigoni, O. (2000). Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*. *109*, 7–13.
- Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Grandmougin-Ferjani, A., Shirali, P., & Sahraoui, A.L.-H. (2008). *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany*. *64*, 120–127.
- Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Shirali, P., Grandmougin-Ferjani, A., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2009). Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry*. *70*, 1421–1427.
- Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2011). Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fungal Biology*. *115*, 782–792.
- Declerck, S., Dupré de Boulois, H., Bivort, C., & Delvaux, B. (2003). Extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus lamellosum* can take up, accumulate and translocate radiocaesium under root-organ culture conditions. *Environmental Microbiology*. *5*, 510–516.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. *15*, 316–328.
- Del Val, C., Barea, J.M., & Azcón-Aguilar, C. (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied Environmental Microbiology*. *65*, 718–723.
- Dell, B., Malajczuk, N., Bougher, N.L., & Thomson, G. (1994). Development and function of Pisolithus and Scleroderma ectomycorrhizas formed *in vivo* with Allocasuarina, Casuarina and Eucalyptus. *Mycorrhiza*. *5*, 129–138.
- DeLorenzo, M.E., Lewitus, A.J., Scott, G.I., & Ross, P.E. (2001). Use of metabolic inhibitors to characterize ecological interactions in an estuarine microbial food web. *Microbial Ecology*. *42*, 317–327.
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*. *109*, 212–228.
- Deni, J., & Penninckx, M.J. (2004). Influence of long-term diesel fuel pollution on nitrite-oxidising activity and population size of nitrobacter spp. in soil. *Microbiological Research*. *159*, 323–329.

Derradji, F., Bousnoubra, H., Kherici, N., Romeo, M., & Caruba, R. (2007). Impact de la pollution organique sur la qualité des eaux superficielles dans le Nord-Est algérien. *Science et Changements Planétaires / Sécheresse*. *18*, 23–27.

Dickson, S. (2004). The Arum–Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*. *163*, 187–200.

Dodd, J.C., & Jeffries, P. (1989). Effect of fungicides on three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biology and Fertility of Soils*. *7*, 120–128.

Doidy, J., van Tuinen, D., Lamotte, O., Corneillat, M., Alcaraz, G., & Wipf, D. (2012). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: Characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant*. *5*, 1346–1358.

Dolatabadian, A., Sanavy, S.A.M.M., Gholamhoseini, M., Joghian, A.K., Majdi, M., & Kashkooli, A.B. (2013). The role of calcium in improving photosynthesis and related physiological and biochemical attributes of spring wheat subjected to simulated acid rain. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. *19*, 189–198.

Driai, S., Verdin, A., Laruelle, F., Beddiar, A., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2015). Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution? *International Biodeterioration & Biodegradation*. *105*, 58–65.

## E.

Estaun, M.V. (1990). Effect of sodium chloride and mannitol on germination and hyphal growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. *29*, 123–129.

## F.

Farmer, E.E., & Mueller, M.J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology*. *64*, 429–450.

Fazeli, F., Ghorbanli, M., & Niknam, V. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*. *51*, 98–103.

Feidt, C. (2012). Contamination des sols - Transferts des sols vers les animaux: Transferts des sols vers les animaux (EDP Sciences).

Firmin, S., Labidi, S., Fontaine, J., Laruelle, F., Tisserant, B., Nsanganwimana, F., Pourrut, B., Dalpé, Y., Grandmougin, A., Douay, F., Shirali, P., Verdin, A., & Lounès-Hadj Sahraoui A. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation protects *Miscanthus* × *giganteus* against trace element toxicity in a highly metal-contaminated site. *Science of The Total Environment*. *527–528*, 91–99.

Fomina, M., Ritz, K., & Gadd, G.M. (2003). Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycological Research*. *107*, 861–871.

- Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., Glorian, V., & Durand, R. (2004). 24-Methyl/methylene sterols increase in monoxenic roots after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. *163*, 159–167.
- Fortin, J.A., Plenchette, C., & Piché, Y. (2008). *Les Mycorhizes. La nouvelle révolution verte* (Québec; Versailles, France: Multimondes). 132 pp.
- Fouad, M.O., Essahibi, A., Benhiba, L., & Qaddoury, A. (2014). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of olive plants against oxidative stress induced by drought. *Spanish Journal of Agricultural Research*. *12*, 763–771.
- Fraga-Beddiar, A., & Le Tacon, F. (1990). Interactions between a VA mycorrhizal fungus and *Frankia* associated with alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaetn.). *Symbiosis*. *9*, 247-258.
- Franco-Ramírez, A., Ferrera-Cerrato, R., Varela-Fregoso, L., Pérez-Moreno, J., & Alarcón, A. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic Microbiology*. *47*, 378–383.
- Frank, A.B. (1877). Ueber die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten: Vorläufige Mittheilung (Königl. Botanische Gesellschaft in Regensburg).
- Frostegård, A., & Bååth, E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*. *22*, 59–65.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (1991). Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*. *14*, 151–163.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied Environmental Microbiology*. *59*, 3605–3617.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (2011). Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. *43*, 1621–1625.
- Fu, J., & Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. *45*, 105–114.
- García-Sánchez, M., Palma, J.M., Ocampo, J.A., García-Romera, I., & Aranda, E. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate oxidative stress induced by ADOR and enhance antioxidant responses of tomato plants. *Journal of Plant Physiology*. *171*, 421–428.

## G.

- Gardel, A. (2013). *Energie: Economie et prospective* (Elsevier). eBook.
- Garg, N., & Singla, P. (2012). The role of *Glomus mosseae* on key physiological and biochemical parameters of pea plants grown in arsenic contaminated soil. *Scientia Horticulturae*. *143*, 92–101.

- Gaspar, M., Cabello, M., Cazau, M., & Pollero, R. (2002). Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza*. *12*, 55–59.
- Gattai, G.S., Pereira, S.V., Costa, C.M.C., Lima, C.E.P., & Maia, L.C. (2011). Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of woody plants in lead contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*. *42*, 859–867.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., & Barker, D.G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*. *17*, 3489–3499.
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., & Bonfante, P. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist*. *198*, 190–202.
- Gerdemann, J.W., & Nicolson, T.H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. *46*, 235–244.
- Ghorbanli, M., Ebrahimzadeh, H., & Sharifi, M. (2004). Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. *Biologia Plantarum*. *48*, 575–581.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., & Trouvelot, A. (1985). Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular–arbuscular fungal populations in some agricultural soils in Burgundy. *Canadian Journal of Botany*. *63*, 1521–1524.
- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. *48*, 909–930.
- Gilroy, S., & Jones, D.L. (2000). Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in Plant Science*. *5*, 56–60.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S., & Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*. *125*, 587–593.
- Giri, C., Zhu, Z., Tieszen, L.L., Singh, A., Gillette, S., & Kelmelis, J.A. (2008). Mangrove forest distributions and dynamics (1975–2005) of the tsunami-affected region of Asia. *Journal of Biogeography*. *35*, 519–528.
- Girotti, A.W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*. *39*, 1529–1542.
- Goel, A., & Sheoran, I.S. (2003). Lipid Peroxidation and Peroxide-Scavenging Enzymes in Cotton Seeds Under Natural Ageing. *Biologia Plantarum*. *46*, 429–434.
- González-Guerrero, M., Azcón-Aguilar, C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, C.W., Eide, D.J., & Ferrol, N. (2005). Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology*. *42*, 130–140.

Gough, C., & Cullimore, J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. *24*, 867–878.

Greene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arabidopsis Book 1*. e0036.

## H.

Hall, I.R., & Fish, B.J. (1979). A key to the Endogonaceae. *Transactions of the British Mycological Society*. *73*, 261–270.

Hallé, F. (2008). *Aux origines des plantes*, tome 1, Francis Hallé | Fayard (Paris).

Harrison, M.J. (2012). Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. *15*, 691–698.

Hart, M.M., & Reader, R.J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. *153*, 335–344.

Hashem, A., Abd\_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Aldubise, A., & Egamberdieva, D. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi enhances salinity tolerance of *Panicum turgidum* Forssk by altering photosynthetic and antioxidant pathways. *Journal of Plant Interactions*. *10*, 230–242.

Hassan, S.E.D., Boon, E., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular Ecology*. *20*, 3469–3483.

He, Z., He, C., Zhang, Z., Zou, Z., & Wang, H. (2007). Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. *59*, 128–133.

Heijden, E.W. van der (2001). Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza*. *10*, 185–193.

van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. *396*, 69–72.

Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., & Requena, N. (2011). A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *The Plant Cell*. *23*, 3812–3823.

Hernández-Ortega, H.A., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Zavaleta-Mancera, H.A., López-Delgado, H.A., & Mendoza-López, M.R. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management*. *95*, Supplement, S319–S324.

Hernández-Ortega, H.A., Quintanar-Isaías, P.A., Jaramillo-Pérez, A.T., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Lazzarini-Lechuga, R. (2014). Diesel effects on root hydraulic conductivity

and morphological changes of the vascular cylinder in *Medicago sativa*. *Environmental and Experimental Botany*/ 105, 1–9.

Hirrel, M.C. (1981). The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia*. 73, 610–617.

Hirrel, M.C., & Gerdemann, J.W. (1979). Enhanced carbon transfer between onions infected with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*. 83, 731–738.

Ho, I., and Trappe, J.M. (1973). Translocation of <sup>14</sup>C from Festuca Plants to their Endomycorrhizal Fungi. *Nature*. 244, 30–31.

Hodge, A., Campbell, C.D., & Fitter, A.H. (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413, 297–299.

Holford, I.C.R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research*.. 35, 227–240.

Hu, Q., Qi, H., Zeng, J., & Zhang, H. (2007). Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine. *Journal of Environmental Sciences*. 19, 74–79.

Huang, H., Zhang, S., Shan, X., Chen, B.-D., Zhu, Y.-G., & Bell, J.N.B. (2007). Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on the accumulation and metabolism of atrazine in maize (*Zea mays* L.) and atrazine dissipation in soil. *Environmental Pollution*. 146, 452–457.

Huang, H., Zhang, S., Wu, N., Luo, L., & Christie, P. (2009). Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 726–734.

Huang, J.-C., Lai, W.-A., Singh, S., Hameed, A., & Young, C.-C. (2013). Response of mycorrhizal hybrid tomato cultivars under saline stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13, 469–484.

## J.

Jacobson, K.M. (1997). Moisture and substrate stability determine VA-mycorrhizal fungal community distribution and structure in an arid grassland. *Journal of Arid Environments*. 35, 59–75.

Jagtap, S.S., Woo, S.M., Kim, T.-S., Dhiman, S.S., Kim, D., & Lee, J.-K. (2014). Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. *Fuel*. 116, 292–298.

Jakobsen, I., & Rosendahl, L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist*. 115, 77–83.

Jayakumar, K., Vijayarengan, P., Changxing, Z., Gomathinayagam, M., & Jaleel, C.A. (2008). Soil applied cobalt alters the nodulation, leg-haemoglobin content and antioxidant status of *Glycine max* (L.) Merr. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 67, 272–275.

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., & Barea, J.-M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37, 1–16.

Jiménez, G., Paroush, Z., & Ish-Horowicz, D. (1997). Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed. *Genes and Development*. 11, 3072–3082.

Jiménez, B. & Wang, L. (2006). Sludge treatment and management. In: Municipal wastewater management in developing countries, Ujang, Z. & Henze, M. (eds). IWAP, London

Jin, H., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Piotrowski, E., Lammers, P.J., & Shachar-Hill, Y. (2005). The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 168, 687–696.

Joner, E.J., & Leyval, C. (2003). Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomy for Sustainable Development*. 23, 495 - 502.

## K.

Kabata-Pendias, A. (2000). Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition (CRC Press).

Kauppi, S., Sinkkonen, A., & Romantschuk, M. (2011). Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65, 359–368.

Khalladi, R., Benhabiles, O., Bentahar, F., & Moulai-Mostefa, N. (2009). Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*. 164, 1179–1184.

Khan, S.R., Kumar, J.I.N., Kumar, R.N., & Patel, J.G. (2013). Physicochemical properties, heavy metal content and fungal characterization of an old gasoline-contaminated soil site in Anand, Gujarat, India. *Environmental and Experimental Biology*. 11, 137–143.

Kiers, E.T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J.A., Franken, O., Verbruggen, E., Fellbaum, C.R., Kowalchuk, G.A., Hart, M.M., & Bago, A. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*. 333, 880–882.

Kim, K.D. (2014). Effects of diesel and kerosene on germination and growth of coastal wetland plant species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 93, 596–602.

Kirk, J.L., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., & Trevors, J.T. (2005). Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. *Plant and Soil*. 270, 23–30.

Koomen, I., McGram, S.P., & Giller, K.E. (1990). Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil Biology and Biochemistry*. 22, 871–873.

Koske, R.E. (1981). Labyrinthula inside the spores of a vesicular: arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia*. 73, 1175–1180.

Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D.G., & Bécard, G. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*. *131*, 952.

Krishnamoorthy, R., Kim, C.-G., Subramanian, P., Kim, K.-Y., Selvakumar, G., & Sa, T.-M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. *PLoS One* *10*. e0128784.

Kuhn, H., Küster, H., & Requena, N. (2010). Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*. *185*, 716–733.

Kumar, P., Lucini, L., Roupael, Y., Cardarelli, M., Kalunke, R.M., & Colla, G. (2015). Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. *Frontiers in Plant Science*. *6*, 477.

## L.

Labidi, S., Calonne, M., Ben Jeddi, F., Debiane, D., Rezgui, S., Laruelle, F., Tisserant, B., Grandmougin-Ferjani, A., & Sahraoui, A.L.-H. (2011). Calcareous impact on arbuscular mycorrhizal fungus development and on lipid peroxidation in monoxenic roots. *Phytochemistry*. *72*, 2335–2341.

Labidi, S., Ben Jeddi, F., Tisserant, B., Debiane, D., Rezgui, S., Grandmougin-Ferjani, A., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2012). Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza*. *22*, 337–345.

Lacroix, A. (1995). Des solutions agronomiques à la pollution azotée. *Cahiers Agricultures*. *4*, 333–342.

Laiho, O. (1965). Further studies on the ectendotrophic mycorrhiza. *Acta forestalia fennica*. *79*, 1-34.

Lambert, D.H., Baker, D.E., & Cole, H. (1979). The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements. *Soil Science Society of America Journal*. *43*, 976–980.

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grün, S., & Sandermann, H. (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. *40*, 567–575.

Le Tacon, F. (1985). Les mycorhizes : une coopération entre plantes et champignons. *La Recherche*. *16*, 624–632.

Lenoir, I., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Frédéric, L., Yolande, D., & Joël, F. (2016a). Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environmental Pollution*. *213*, 549–560.

Lenoir, I., Fontaine, J., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2016b). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*. *123*, 4–15.

Leyval, C., & Binet, P. (1998). Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Environment Quality*. 27, 402.

Liu, S.L., Luo, Y.M., Cao, Z.H., Wu, L.H., Ding, K.Q., & Christie, P. (2004). Degradation of Benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*. 26, 285–293.

Logi, C., Sbrana, C., & Giovannetti, M. (1998). Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied Environmental Microbiology*. 64, 3473–3479.

López-Pedrosa, A., González-Guerrero, M., Valderas, A., Azcón-Aguilar, C., & Ferrol, N. (2006). GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology*. 43, 102–110.

López-Ráez, J.A., Charnikhova, T., Gómez-Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., Verstappen, F., Puech-Pages, V., Bécard, G., & Mulder, P. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*. 178, 863–874.

Loranchet, Y. (1992). Mise en oeuvre des turbines a gaz dans l'industrie (Ed. Techniques Ingénieur). Saint-Denis, France, 16 pp.

## M.

Macoustra, G.K., King, C.K., Wasley, J., Robinson, S.A., & Jolley, D.F. (2015). Impact of hydrocarbons from a diesel fuel on the germination and early growth of subantarctic plants. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 17, 1238–1248.

Mahouachi, J., Socorro, A.R., & Talon, M. (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: growth, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil*. 281, 137–146.

Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., & Niebel, A. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. 469, 58–63.

Mardukhi, B., Rejali, F., Daei, G., Ardakani, M.R., Malakouti, M.J., & Miransari, M. (2011). Arbuscular mycorrhizas enhance nutrient uptake in different wheat genotypes at high salinity levels under field and greenhouse conditions. *Comptes Rendus Biologies*. 334, 564–571.

Marschner, H., & Dell, B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159, 89–102.

Massard-Guilbaud, G. (2010). Histoire de la pollution industrielle. France, 1789-1914, Paris, Éditions de l'EHESS, 404 p.

- Masto, R.E., Chhonkar, P.K., Singh, D., & Patra, A.K. (2009). Changes in soil quality indicators under long-term sewage irrigation in a sub-tropical environment. *Environmental Geology*. *56*, 1237–1243.
- Mates JM, Perez-Gomez C, & De Castro N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. *32*, 595–603.
- McAinsh, M.R., & Pittman, J.K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytologist*. *181*, 275–294.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., & Swan, J.A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. *115*, 495–501.
- Medina, A., & Azcón, R. (2010). Effectiveness of the application of arbuscular mycorrhiza fungi and organic amendments to improve soil quality and plant performance under stress conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. *10*, 354–372.
- Meharg, A.A. (1993). The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum*. *88*, 191–198.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., & Infante, C. (2005). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution*. *165*, 195–209.
- Metting, F.B. (1992). *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker, New York. 646 pp.
- Mikola, P. (1965). Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of pine. *Acta forestalia fennica*. *79*, 1–56.
- Miller, R.M., Jastrow, J.D., & Reinhardt, D.R. (1995). External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia*. *103*, 17–23.
- Miransari, M., Bahrami, H.A., Rejali, F., & Malakouti, M.J. (2008). Using arbuscular mycorrhiza to alleviate the stress of soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth. *Soil Biology and Biochemistry*. *40*, 1197–1206.
- Mitchell, H.J., Hall, J.L., & Barber, M.S. (1994). Elicitor-Induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. *Plant Physiology*. *104*, 551–556.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sciences*. *7*, 405–410.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. *58*, 459–481.
- Morton, J.B., & Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae,

and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*. 37, 471–491.

Munkvold, L., Kjølner, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., & Jakobsen, I. (2004). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 164, 357–364.

Munné-Bosch, S. (2005). The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 162, 743–748.

Muratova, A.Y., Golubev, S.N., Dubrovskaya, E.V., Pozdnyakova, N.N., Panchenko, L.V., Pleshakova, E.V., Chernyshova, M.P., & Turkovskaya, O.V. (2012). Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. *Applied Soil Ecology*. 56, 51–57.

Murshed, R., Lopez-Lauri, F., & Sallanon, H. (2013). Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L, cv. Microtom). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 19, 363–378.

## N.

Newman, E.I. (1966). A Method of Estimating the Total Length of Root in a Sample. *Journal of Applied Ecology*. 3, 139–145.

Nezhadahmadi, A., Prodhani, Z.H., & Faruq, G. (2013). Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*. 2013, e610721.

Nishimura, S. (2006). 8-Hydroxyguanine: From its discovery in 1983 to the present status. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*. 82, 127–141.

Njoku, K.L., Akinola, M.O., & Taiwo, B.G. (2009). Effect of gasoline diesel fuel mixture on the germination and the growth of *Vigna unguiculata* (Cowpea). *African Journal of Environmental Science and Technology*. 3, 466–471.

Nogueira, M.A., Cardoso, E.J.B.N., & Hampp, R. (2002). Manganese toxicity and callose deposition in leaves are attenuated in mycorrhizal soybean. *Plant and Soil* 246, 1–10.

Nogueirol, R.C., Monteiro, F.A., Gratão, P.L., Borgo, L., & Azevedo, R.A. (2015). Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187, 73.

## O.

Olsson, P.A. (1999). Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 29, 303–310.

Olsson, P.A., & Johansen, A. (2000). Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research*. 104, 429–434.

Olsson, P.A., Baath, E., & Jakobsen, I. (1997). Phosphorus effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus as studied in the soil and roots by analysis of fatty acid signatures. *Applied and Environmental Microbiology*. *63*, 3531–3538.

Ortega-Larrocea, M.P., Siebe, C., Estrada, A., & Webster, R. (2007). Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P. *Applied and Environmental Microbiology*. *37*, 129–138.

## P.

Panda, S.K., Chaudhury, I., & Khan, M.H. (2003). Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*. *46*, 289–294.

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. *6*, 763–775.

Parida, A.K., Das, A.B., & Mohanty, P. (2004). Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *Journal of Plant Physiology*. *161*, 531–542.

Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., & Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. *52*, 199–223.

Paul Schreiner, R. (2007). Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of “Pinot noir” (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. *Applied Soil Ecology*. *36*, 205–215.

Pauwels, J.M. (1992). Manuel de laboratoire de pédologie : méthodes d’analyse de sols et de plantes, équipement, gestion de stocks de verrerie et de produits chimiques.

Pawlowska, T.E., & Charvat, I. (2004). Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. *70*, 6643–6649.

Pei, Z.F., Ming, D.F., Liu, D., Wan, G.L., Geng, X.X., Gong, H.J., & Zhou, W.J. (2009). Silicon improves the tolerance to water-deficit stress induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*. *29*, 106–115.

Pennanen, T., Frostegard, A., Fritze, H., & Baath, E. (1996). Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology*. *62*, 420–428.

Phillips, J.M., & Hayman, D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. *55*, 158–161.

Porter, W. (1979). The “most probable number” method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Soil Research*. *17*, 515–519.

Puckette, M.C., Tang, Y., & Mahalingam, R. (2008). Transcriptomic changes induced by acute ozone in resistant and sensitive *Medicago truncatula* accessions. *BMC Plant Biology*. 8, 46.

## Q.

Quiñones-Aguilar, E.E. (2003). Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrocencia*. 37, 585–594.

## R.

Rabie, G.H., 2004. Using wheat-mungbean plant system and arbuscular mycorrhiza to enhance in-situ bioremediation. *International journal of food, agriculture and environment*. 2, 381–390.

Rabie, G.H. (2005). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Mycobiology*. 33, 41.

Redecker, D., & Schüßler, A. (2014). 9 Glomeromycota. In *Systematics and Evolution*, D.J. McLaughlin, & J.W. Spatafora, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 251–269.

Redon, P.-O., Béguiristain, T., & Leyval, C. (2008). Influence of *Glomus intraradices* on Cd partitioning in a pot experiment with *Medicago truncatula* in four contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 40, 2710–2712.

Redon, P.-O., Béguiristain, T., & Leyval, C. (2009). Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza*. 19, 187–195.

Redondo-Gómez, S., Petenello, M.C., & Feldman, S.R. (2014). Growth, nutrient status, and photosynthetic response to diesel-contaminated soil of a cordgrass, *Spartina argentinensis*. *Marine Pollution Bulletin*. 79, 34–38.

Reggam, A., Bouchelaghem, H., & Houhamdi, M. (2015). Qualité physico-chimique des eaux de l'oued seybouse (nord-est de l'algérie): Caractérisation et analyse en composantes principales (Physico-chemical quality of the waters of the Oued Seybouse (North-eastern Algeria): Characterization and principal component analysis). *Journal of Materials and Environmental Science*. 6, 1417–1425.

Renker, C., Blanke, V., & Buscot, F. (2005). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution*. 135, 255–266.

Retsky, K.L., Chen, K., Zeind, J., & Frei, B. (1999). Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 90–98.

Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., & Siedow, J.N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology*. 141, 357–366.

Riedacker, A. (1993). *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides: séminaire*, Paris-Nancy, 20 mars-6 avril 1990 (John Libbey Eurotext).

Rilling, J.K., Gutman, D.A., Zeh, T.R., Pagnoni, G., Berns, G.S., & Kilts, C.D. (2002). A neural basis for social cooperation. *Neuron*. 35, 395–405.

Rosa, D. de la, & Sobral, R. (2008). Soil quality and methods for its assessment. In *Land Use and soil resources*, A.P.A.K. Braimoh, & P.P.L.G. Vlek, eds. (Springer Netherlands), pp. 167–200.

Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 25, 39–67.

Roy, B., & Basu, A.K. (2015). *Abiotic stress tolerance in crop plants: Breeding and Biotechnology* (New India Publishing Agency Exclusively Distributed by Astral International Pvt. Ltd.).

Ruiz-Sánchez, M., Aroca, R., Muñoz, Y., Polón, R., & Ruiz-Lozano, J.M. (2010). The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*. 167, 862–869.

Ruscitti, M., Arango, M., Ronco, M., & Beltrano, J. (2011). Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 23, 15–25.

## S.

Sainz, M.J., González-Penalta, B., & Vilariño, A. (2006). Effects of hexachlorocyclohexane on rhizosphere fungal propagules and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Plantago lanceolata*. *European Journal of Soil Science*. 57, 83–90.

Salmanighabeshi, S., Palomo-Marín, M.R., Bernalte, E., Rueda-Holgado, F., Miró-Rodríguez, C., Fadic-Ruiz, X., Vidal-Cortez, V., Cereceda-Balic, F., & Pinilla-Gil, E. (2015). Long-term assessment of ecological risk from deposition of elemental pollutants in the vicinity of the industrial area of Puchuncaví-Ventanas, central Chile. *Science of The Total Environment*. 527–528, 335–343.

Sanches, I.D., Souza Filho, C.R., Magalhães, L.A., Quitério, G.C.M., Alves, M.N., & Oliveira, W.J. (2013). Unravelling remote sensing signatures of plants contaminated with gasoline and diesel: An approach using the red edge spectral feature. *Environmental Pollution*. 174, 16–27.

Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-López, M.R., Cruz-Sánchez, J.S., López-Ortiz, C., Delgadillo-Martínez, J., & Alarcón, A. (2006). Tolerance and phytoremediation of fuel oil-contaminated soil by six plant species. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 22, 63–73.

Sawulski, P., Clipson, N., & Doyle, E. (2014). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation*. 25, 835–847.

- Scandalios, J.G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*. *101*, 7–12.
- Schenck, N.C., & Perez, Y. (1989). *Manual for the Identification of Va Mycorrhizal Fungi* Gainesville, USA, Synergistic Publications.
- Schneider, J., Stürmer, S.L., Guilherme, L.R.G., de Souza Moreira, F.M., & Soares, C.R.F. de S. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. *Journal of Hazardous Materials*. *262*, 1105–1115.
- Schreiner, R.P., & G.J. Bethlenfalvay. 1995. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*. *15*, 271–285.
- Schüßler, A., & Walker, C. (2010). The Glomeromycota: A species list with new families and new genera. Libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University.
- Schüßler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M., & Wipf, D. (2006). Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature*. *444*, 933–936.
- Schüßler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M., & Wipf, D. (2007). Arbuscular mycorrhiza: studies on the geosiphon symbiosis lead to the characterization of the first glomeromycotan sugar transporter. *Plant Signaling and Behavior*. *2*, 431–434.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. *105*, 1413–1421.
- Serrano, A., Tejada, M., Gallego, M., & Gonzalez, J.L. (2009). Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. *Science of The Total Environment*. *407*, 4056–4061.
- Sgherri, C., Cosi, E., & Navari-Izzo, F. (2003). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum*. *118*, 21–28.
- Shao, H.-B., Guo, Q.-J., Chu, L.-Y., Zhao, X.-N., Su, Z.-L., Hu, Y.-C., & Cheng, J.-F. (2007). Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surf B Biointerfaces*. *54*, 37–45.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. e217037.
- Shentu, J.-L., He, Z.-L., Zeng, Y.-Y., He, S.-Y., Du, S.-T., & Shen, D.-S. (2014). Microbial biomass and plfa profile changes in rhizosphere of pakchoi (*Brassica chinensis* L.) as affected by external cadmium loading. *Pedosphere*. *24*, 553–562.
- Shetty, K.G., Banks, M.K., Hetrick, B.A., & Schwab, A.P. (1994). Biological characterization of a southeast Kansas mining site. *Water, Air & Soil Pollution*. *78*, 169–177.
- Shukurov, N., Kodirov, O., Peitzsch, M., Kersten, M., Pen-Mouratov, S., & Steinberger, Y. (2014). Coupling geochemical, mineralogical and microbiological approaches to assess the health of contaminated soil around the Almalyk mining and smelter complex, Uzbekistan. *Science of The Total Environment*. *476–477*, 447–459.

- Smith, S.E., & Read, D. (2008a). 1 - The symbionts forming arbuscular mycorrhizas. In *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*, S.E.S. Read, ed. (London: Academic Press), p. 13–II.
- Smith, S.E., & Read, D. (2008b). 5 - Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants. In *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*, S.E.S. Read, ed. (London: Academic Press), p. 145–VI.
- Smith, S.E., & Read, D.J. (1997a). 10 - Ectendomycorrhizas. In *Mycorrhizal Symbiosis (Second Edition)*, S.E.S.J. Read, ed. (London: Academic Press), pp. 290–298.
- Smith, S.E., & Read, D.J. (1997b). Introduction. In: *Mycorrhizal symbiosis (Second Edition)*, S.E.S.J. Read, ed. (London: Academic Press), pp. 1–8.
- Smith, S.E., & Smith, F.A. (1990). Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist*. *114*, 1–38.
- Smith, F.A., Jakobsen, I., & Smith, S.E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist*. *147*, 357–366.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., & Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. *150*, 76–85.
- Smith, S.E., Smith, F.A., & Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology*. *133*, 16–20.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M., & Smith, F.A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology*. *156*, 1050–1057.
- Sobolev, D., & Begonia, M.F.T. (2008). Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. *5*, 450–456.
- Souza, T. (2015). Spores: A special tool to survive. In: *Handbook of arbuscular mycorrhizal fungi*, (Springer International Publishing), pp. 65–86.
- Stadtman, E.R., & Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. *899*, 191–208.
- Stellman, J.M. (2000). *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail (International Labour Organization)*.
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, Z., Hu, Y., Wu, S., & Chen, B. (2016). The molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the arsenic mining impacted sites in Hunan province of China. *Journal of Environmental Sciences*. *39*, 110–118.

Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J.A., Al-Soud, W.A., Langenhoff, A.A.M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H.M., & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 619–630.

Sydbom, A., Blomberg, A., Parnia, S., Stenfors, N., Sandström, T., & Dahlén, S.E. (2001). Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur. Respiratory J.* 17, 733–746.

## T.

Tang, M., Chen, H., Huang, J.C., & Tian, Z.Q. (2009). AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology and Biochemistry*. 41, 936–940.

Tisdall, J.M. (1991). Fungal hyphae and structural stability of soil. *Soil Research*. 29, 729–743.

Tisdall, J.M. (1994). Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*. 159, 115–121.

Todeschini, V., Franchin, C., Biondi, S., Torrigiani, P., Berta, G., Burlando, B., & Lingua, G. (2007). Responses to copper of two registered poplar clones inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi. *Caryologia*. 60, 146–155.

Trappe JM (1982) Synoptic key to the genera and species of zygomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopathology*. 72,1102–1108.

Trejo, D., Moreira, C., Bañuelos, I., Lara, L., Alafita, G., & Reyes, A. (2013). Effect of diesel and biodiesel on the growth of *brachiaria decumbens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 16, 391–398.

Twanabasu, B.R., Stevens, K.J., & Venables, B.J. (2013). The effects of triclosan on spore germination and hyphal growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Science of The Total Environment*. 454–455, 51–60.

## U.

Ujowundu, C.O., Kalu, F.N., Nwaoguikpe, R.N., Kalu, O.I., Ihejirika, C.E., Nwosunjoku, E.C., & Okechukwu, R.I. (2011). Biochemical and physical characterization of diesel petroleum contaminated soil in Southeastern Nigeria. *Research Journal of Chemical Sciences*. 1, 57–62.

Ünyayar, S., Keleş, Y., & Çekiç, F.O. (2006). Analysis of potentially toxic metals in airborne cement dust around sagamu, Southwestern Nigeria. *Journal of Applied Sciences*. 7, 35–40.

Uzoho, B.U., Oti, N.N., & Onweremadu, E.U. (2006). Effect of crude oil pollution on maize growth and soil properties in Ihiagwa, Imo State, Nigeria. *International Journal of Agriculture and Rural Development*. 5, 91–100.

## V.

Venedikian, N., Chiocchio, V., Martinez, A., Menendez, A., Godeas, A. D. de C.B., & Ocampo, J.A. (1999). Influence of the fungicides carbendazim and chlorothalonil on spore germination - arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean plants [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Agrochimica*. *43*, 105–109.

Verdin, A., Sahraoui, A.L.-H., Fontaine, J., Grandmougin-Ferjani, A., & Durand, R. (2006). Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*. *16*, 397–405.

## W.

Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., & Heijden, M.G.A. van der (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *111*, 5266–5270.

Walder, F., Niemann, H., Natarajan, M., Lehmann, M.F., Boller, T., & Wiemken, A. (2012). Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiology*. *159*, 789–797.

Walker, C. (1983). Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon*. *18*, 443–455.

Wang, S., Feng, Z., & Wang, X. (2006). Effects of environmental pollutants on arbuscular mycorrhiza formation and function. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. *17*, 1321–1325.

Wang, Y., Feng, J., Lin, Q., Lyu, X., Wang, X., & Wang, G. (2013). Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China. *Chinese Geographical Science*. *23*, 708–715.

Weissenhorn, I., & Leyval, C. (1996). Spore germination of arbuscular mycorrhizal fungi in soils differing in heavy metal content and other parameters. *European Journal of Soil Biology* *32*, 165–172.

Weissenhorn, I., Leyval, C., & Berthelin, J. (1993). Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil*. *157*, 247–256.

Whitfield, L., Richards, A.J., & Rimmer, D.L. (2003). Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonisation in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza*. *14*, 55–62.

Wilson, S.C., & Jones, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*. *81*, 229–249.

Wise, R.R., & Naylor, A.W. (1987). Chilling-enhanced photooxidation : evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology*. *83*, 278–282.

Wright, S.F., & Upadhyaya, A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. *198*, 97–107.

Wu, N., Huang, H., Zhang, S., Zhu, Y.-G., Christie, P., & Zhang, Y. (2009). Phenanthrene uptake by *Medicago sativa* L. under the influence of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Environmental Pollution*. *157*, 1613–1618.

Wubet, T., Weiß, M., Kottke, I., Teketay, D., & Oberwinkler, F. (2004). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Prunus africana*, an endangered medicinal tree species in dry Afromontane forests of Ethiopia. *New Phytologist*. *161*, 517–528.

Wyszowski, M., & Wyszowska, L. (2005). Effect of enzymatic activity of diesel oil contaminated soil on the chemical composition of oat (*Avena sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.). *Plant, Soil and Environment*. *51*, 360–367.

## Y.

Yang, Y., Song, Y., Scheller, H.V., Ghosh, A., Ban, Y., Chen, H., & Tang, M. (2015). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. *86*, 146–158.

Yang, Y.-G., Jin, Z.-S., Bi, X.-Y., Li, F.-L., Sun, L., Liu, J., & Fu, Z.-Y. (2009). Atmospheric Deposition-Carried Pb, Zn, and Cd from a Zinc Smelter and Their Effect on Soil Microorganisms. *Pedosphere*. *19*, 422–433.

Yanxun, S., Yani, W., Hui, Q., & Yuan, F. (2011). Analysis of the Groundwater and Soil Pollution by Oil Leakage. *Procedia Environmental Sciences*. *11, Part B*, 939–944.

Yildiztekin, M., & Kaya, C. (2015). Oxidative stress and antioxidative mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants sprayed with different pesticides. *Pakistan Journal of Botany*. *47*, 717–721.

Yoneyama, K., Xie, X., Kusumoto, D., Sekimoto, H., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., and Yoneyama, K. (2007). Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta*. *227*, 125–132.

Yu, T.E., Egger, K.N., & Peterson, L.R. (2001). Ectendomycorrhizal associations – characteristics and functions. *Mycorrhiza*. *11*, 167–177.

Yuan, J.-P., Kuang, H.-C., Wang, J.-H., & Liu, X. (2008). Evaluation of ergosterol and its esters in the pileus, gill, and stipe tissues of agaric fungi and their relative changes in the comminuted fungal tissues. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *80*, 459–465.

## Z.

Zarei, M., Saleh-Rastin, N., Jouzani, G.S., Savaghebi, G., & Buscot, F. (2008). Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. *European Journal of Soil Biology*. *44*, 381–391.

Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schäfer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G.S., Nekouei, M.K., & Buscot, F. (2010). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil

chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*. 158, 2757–2765.

Zenati, N., Messadi, D., & Belahcene, N. (2013). Effet du rejet de l'usine sidérurgique d'Annaba sur les objectifs environnementaux de l'Oued Meboudja. Algérie. *Cahiers de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé*. 18, 1–7.

Zhang, Q., Zhou, Q., Ren, L., Zhu, Y., & Sun, S. (2006). Ecological effects of crude oil residues on the functional diversity of soil microorganisms in three weed rhizospheres. *Journal of Environmental Sciences*. 18, 1101–1106.

Zhang, X., Li, F., Liu, T., Xu, C., Duan, D., Peng, C., Zhu, S., & Shi, J. (2013). The Variations in the Soil Enzyme Activity, Protein Expression, Microbial Biomass, and Community Structure of Soil Contaminated by Heavy Metals *International Scholarly Research Notices, International Scholarly Research Notices*. e803150.

Zhong, W., Li, J., Chen, Y., Shu, W., & Liao, B. (2012). A study on the effects of lead, cadmium and phosphorus on the lead and cadmium uptake efficacy of *Viola baoshanensis* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Environmental Monitoring*. 14, 2497–2504.

Zhu, X., Song, F., Liu, S., & Liu, F. (2015). Arbuscular mycorrhiza improve growth, nitrogen uptake, and nitrogen use efficiency in wheat grown under elevated CO<sub>2</sub>. *Mycorrhiza*. 26, 133–140.

Zocco, D., Fontaine, J., Lozanova, E., Renard, L., Bivort, C., Durand, R., Grandmougin-Ferjani, A., & Declerck, S. (2008). Effects of two sterol biosynthesis inhibitor fungicides (fenpropimorph and fenhexamid) on the development of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research*. 112, 592–601.

Zocco, D., Aarle, I.M.V., Oger, E., Lanfranco, L., & Declerck, S. (2011). Fenpropimorph and fenhexamid impact phosphorus translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 21, 363–374.

**Annexes**

**Valorisation**

## **Publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture**

DRIAI Sihem, VERDIN Anthony, LARUELLE Frédéric, BEDDIAR Arifa, LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa, 2015. Is the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* able to fulfil its life cycle in the presence of diesel pollution? *International Biodeterioration and Biodegradation* 105, 58-65. DOI : 10.1016/j.ibiod.2015.08.012.

## **Communications Scientifiques**

### **Communications par affiche**

- DRIAI Sihem, LABIDI Sonia, MEGLOULI Hacène, LARUELLE Frédérique, MEDDAD-HAMZA Amel, DALPE Yolande, BEDDIAR Arifa, LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa (15-17 octobre 2014) Impact de la pollution industrielle sur la viabilité microbienne et la biodiversité, des CMA des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien. *International Congress on Mycorrhizae*, Marrakech, Maroc.

## **Impact de la pollution industrielle sur la viabilité microbienne et la biodiversité des CMA des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien.**

DRIAI Sihem<sup>1, 2</sup>, LABIDI Sonia<sup>1</sup>, MEGLOULI Hacène<sup>1</sup>, LARUELLE Frédérique<sup>1</sup>, MEDDAD-HAMZA Amel<sup>2</sup>, DALPE Yolande<sup>3</sup>, BEDDIAR Arifa<sup>2</sup>, LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa<sup>1</sup>.

1. Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO). Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV). 50, rue Ferdinand Buisson. F-62228 Calais, France.
2. Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, BP 12, 23000 Annaba, Algérie.
3. Agriculture and Agri-Food Canada, 960 Carling Ave., Ottawa, ON K1A 0C6, Canada.

Les sols agricoles du Nord-est algérien sont des sols fertiles exploités principalement pour la production des céréales et des plantes maraîchères. Cependant, depuis plus de 45 ans, plusieurs usines ont été implantées dans le voisinage de ces terres, engendrant via leurs rejets, une forte contamination qui pourrait présenter un risque pour la viabilité microbienne du sol et par conséquent pour le bon fonctionnement de ces agro-écosystèmes. C'est pourquoi, l'objectif du présent travail vise à étudier l'impact de la pollution industrielle sur la microflore bénéfique du sol en évaluant la biomasse microbienne tellurique à la fois fongique (champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), ectomycorhiziens et champignons saprotrophes) et bactérienne, dans des parcelles agricoles P1, P2 et P3 du Nord-est algérien. P1 est située à proximité du complexe sidérurgique d'El-Hadjar (ArcelorMittal Algérie), P2 de la Société des Fertilisants d'Algérie (Fertial), et P3 de la Société des Ciments de Hadjar Soud (SCHS). La parcelle témoin P4 est localisée dans une zone non industrialisée à Séraïdi. Des marqueurs lipidiques ont été utilisés pour la détection et la quantification de la microflore tellurique parmi lesquels, le C16: 1ω5 associé aux phospholipides (PL) a été

adopté comme marqueur des CMA, l'ergostérol et le C18: 2 $\omega$ 6,9 associé aux PL comme marqueurs des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens, et les acides gras associés aux PL: i15 :0, a15 :0, i16 :0, i17 :0, a17 :0, cy17 :0, C18 :1  $\omega$  7 et cy19 :0 pour mesurer la biomasse bactérienne . Parallèlement à cela, des isolements de spores de CMA et leur identification morpho anatomique ainsi que la détermination de la capacité mycorhizogène des différents sols d'étude via la mesure des taux de mycorhization ont été effectués. Les résultats du dosage des marqueurs lipidiques montrent que la biomasse des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens est de 7 à 13 fois plus élevée dans la parcelle témoin P4 par comparaison aux parcelles polluées P1, P2 et P3. De même, les biomasses des bactéries et des CMA sont, en moyenne, 5 fois supérieures dans la parcelle témoin P4 par rapport aux autres parcelles. Concernant la biodiversité des spores de CMA isolées de ces différents sols, 14 espèces appartenant à 7 genres différents ont été identifiées : *Glomus*, *Pacispora*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Paraglomus*, *Funneliformis* et *Scutellospora*. Les résultats montrent également que la capacité mycorhizogène de ces sols est moins importante dans les parcelles polluées par comparaison à la parcelle témoin et varie de 14 à 70%. Cette étude met en évidence les conséquences des pollutions industrielles sur les microorganismes bénéfiques du sol et souligne l'importance de préserver les agro-écosystèmes de l'impact néfaste des activités industrielles.

**Mots-clés :** viabilité microbienne tellurique, pollution, biodiversité des champignons mycorhiziens à arbuscules, mycorhization, marqueurs lipidiques, agro-écosystèmes.

- DRIAI Sihem, BEDDIAR Arifa, LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa, (23-25 mars 2015) Impact de la pollution par le diesel sur le cycle de développement des acteurs clés des services écosystémiques : les champignons mycorhiziens. 11ème Colloque Francophone d'Ecologie des Communautés Végétales (Ecoveg 11), Grenoble, France.

## **Impact de la pollution par le diesel sur le cycle de développement des acteurs clés des services écosystémiques : les champignons mycorhiziens**

**DRIAI Sihem**<sup>a, b</sup>, BEDDIAR Arifa<sup>b</sup>, LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa<sup>a</sup>

a- Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV), Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), 50 Rue Ferdinand Buisson. BP 699. 62228 CALAIS Cedex France.

b- Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Université Badji Mokhtar, B.P. 12, 23000 Annaba, Algérie.

En raison des activités économiques humaines, le nombre de sites pollués par le diesel ne cesse d'augmenter. Cette pollution est en grande partie causée par des fuites dans les

réservoirs de stockage souterrains et des déversements accidentels pendant le transport. Le diesel est principalement composé d'un mélange complexe de n-alcanes (C-8-C26) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Certains de ses composés présentent une toxicité avérée non seulement vis-à-vis de l'homme (cancérogène et/ou mutagène) mais aussi vis-à-vis des microorganismes du sol. Sa nature hydrophobe et sa persistance dans l'environnement font augmenter les risques qu'il présente pour l'homme et son environnement. Parmi les microorganismes bénéfiques du sol, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont considérés comme des acteurs clés des services écosystémiques en raison des fonctions écologiques essentielles qu'ils remplissent dans les écosystèmes. Ils interviennent notamment dans l'amélioration de l'absorption hydrique et minérale des plantes ainsi que dans leur tolérance contre divers stress environnementaux. Cependant, leur capacité de développement dans les milieux pollués est peu connue. C'est pourquoi l'objectif du présent travail a consisté à étudier l'impact de concentrations croissantes de diesel (0.05, 0.1, 0.25, 0,5 et 1%) sur les principaux stades de développement (germination de spores, élongation des hyphes germinatives, colonisation racinaires, croissances des hyphes extraracinaires, sporulation) d'un CMA, *Rhizophagus irregularis*, cultivé *in vitro*. Nos résultats ont montré que bien que les différentes concentrations de diesel testées affectent négativement les principaux stades du cycle de développement de *R. irregularis*, ceux-ci ne sont pas complètement inhibés, sauf à 1%. Le champignon mycorhizien arrive à accomplir un cycle de développement complet en présence du polluant. Il est à signaler que, la présence du diesel a entraîné une augmentation du pourcentage des spores qui germent selon une architecture hyphale linéaire au détriment d'une architecture ramifiée. Cette étude met en évidence l'impact négatif de la pollution des sols sur le développement du CMA *R. irregularis* et sur l'établissement de la symbiose mycorhizienne avec les racines des plantes et montre qu'au-delà d'une certaine concentration de polluant, la pérennité de ces champignons et par conséquent de la symbiose mycorhizienne bénéfique ainsi que de ses fonctions écologiques seront menacées.

- DRIAI Sihem, VERDIN Anthony, LARUELLE Frédéric, BEDDIAR Arifa, LOUNES-HADJ SAHRAOUI Anissa (03-07 mai 2015) Diesel pollution impact on the arbuscular mycorrhizal symbiosis *Rhizophagus irregularis*/Chicory roots cultivated *in vitro*. *International Symposium on Green Chemistry*, LaRochelle, France.

**Diesel pollution impact on the arbuscular mycorrhizal symbiosis *Rhizophagus irregularis*/Chicory roots cultivated *in vitro***

**DRIAI Sihem**<sup>1, 2</sup>, VERDIN Anthony<sup>1</sup>, LARUELLE Frédéric<sup>1</sup>, BEDDIAR Arifa<sup>2</sup>, LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI Anissa<sup>1</sup>

1. Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO). Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV). 50, rue Ferdinand Buisson. F-62228 Calais, France.
2. Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, BP 12, 23000 Annaba, Algérie.

The diesel is a type of hazardous fuel commonly used for vehicles and machinery. The majority of its components consist of alkanes, both straight and branched chains as well as aromatic compounds including mono-, di- and polyaromatic hydrocarbons. These compounds are relatively persistent in the soil. Their presence in the environment not only adversely affects human health but also hinder the growth of plants and the multiplication of many other beneficial telluric microorganisms. Plants exposed to such pollutants show various physiological and biochemical disorders resulting in a growth delay and severe loss of performance. It is now accepted that the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) provides plant protection against toxicity induced by organic and inorganic pollutants. Thus the introduction of AMF would be a good solution to avoid or reduce the toxicity induced by pollutants. In this context, the current study aims to investigate, in the first time, the impact of increasing diesel concentrations (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1%) on the *Rhizophagus irregularis* mycorrhizal and non mycorrhizal chicory (*Cichorium intybus* L.) roots grown *in vitro*, by measuring: root colonization rate, radical elongation and dry weight. In the second time, the assessment of the AMF role in the protection of chicory roots against oxidative stress induced by diesel by assessing malondialdehyde (MDA, a lipid peroxidation biomarker) production as well as superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activities, two antioxidant enzyme. Our results showed that the different diesel concentrations affect negatively the chicory root growth as well as the mycorrhizal symbiosis by decreasing the mycorrhizal rate. Furthermore, the fungus was able to provide protection to chicory root against the diesel toxicity. In fact, the decrease in the chicory root growth in the presence of diesel was less important when they were mycorrhized. This protection could be due to an induction of the anti-oxidative enzyme POD but neither to the anti-oxidative enzyme SOD nor to the production of MDA. Taken together, our findings demonstrated the toxic effect of diesel on mycorrhizal symbiosis and suggest a probable involvement of mycorrhizal fungus in the protection of chicory roots against oxidative stress induced by this pollutant.

**Keywords:** Mycorrhiza, *Rhizophagus irregularis*, *Cichorium intybus* L, Diesel, oxydative stress.

## Résumé

Les émissions de polluants toxiques d'origine industrielle dans l'environnement peuvent avoir un impact négatif à la fois sur la santé de l'homme mais aussi sur son environnement, en particulier, sur le microbiote du sol aussi bien en termes d'abondance, de richesse, que de biodiversité. Ce qui pourrait conduire à la dégradation des écosystèmes agricoles. Parmi les microorganismes bénéfiques du sol, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) jouent un rôle majeur dans la nutrition minérale et hydrique ainsi que dans la protection des plantes contre divers stress environnementaux dont la pollution.

Ainsi, ce travail de thèse avait pour objectif principal d'étudier l'impact des rejets industriels sur le développement et la diversité des CMA, sur l'établissement de la mycorhization arbusculaire et sur la viabilité microbienne des sols des agro-écosystèmes du Nord-est algérien. Pour cela, différentes expérimentations ont été menées avec divers modes de cultures : *in situ*, en microsomes et *in vitro*.

La première partie de cette thèse a consisté à mesurer, *in situ*, l'impact de la pollution industrielle générée par le complexe ArcelorMittal Algérie (AMA) d'El-Hadjar, Fertial (Annaba) et la Société des Ciments Hadjar-Soud SCHS (Skikda) sur la microflore bénéfique des sols agricoles (cultivés par des tomates) situés à proximité. Les biomasses microbiennes telluriques bactérienne et fongique (champignons mycorhiziens à arbuscules, ectomycorhiziens et saprotrophes) ont été évaluées en utilisant des marqueurs lipidiques spécifiques parmi lesquels, les acides gras associés aux phospholipides (PL) : i15 :0, a15 :0, i16 :0, i17 :0, a17 :0, cy17 :0, C18 :1  $\omega$  7 et cy19 :0 ont été adoptés pour mesurer la biomasse bactérienne, l'ergostérol et le C18: 2 $\omega$ 6,9 associé aux PL comme marqueurs des champignons saprotrophes et ectomycorhiziens, et le C16: 1 $\omega$ 5 associé aux PL comme marqueur des CMA. Parallèlement à cela, des isolements de spores de CMA et leur identification morpho-anatomique ainsi que la détermination de la capacité mycorhizogène des différents sols d'étude via la mesure des taux de mycorhization et du potentiel mycorhizogène infectieux du sol, ont été effectués.

Dans un deuxième temps, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet négatif des polluants sur le développement des plantes et les CMA, l'étude de l'impact d'un mélange de polluants organiques et inorganiques (le diesel), sur l'établissement d'une mycorhization arbusculaire fonctionnelle et sur la croissance des plantes a été conduite sur deux essais, l'un en microcosmes et l'autre *in vitro*.

Les principaux résultats obtenus à partir de l'ensemble de ces expérimentations ont montré que l'abondance microbienne (biomasses des CMA, des champignons ectomycorhiziens et saprotrophes ainsi que la biomasse bactérienne) est significativement plus faible dans les sols pollués par comparaison à un sol témoin non pollué prélevé d'un site non exposé aux émissions industrielles situé à Séraïdi. De plus, la biodiversité des CMA isolés et identifiés à partir des sites pollués est moins importante comparée au site témoin. En effet, trois et cinq espèces de CMA ont été isolées des sols pollués à proximité du complexe.

Nos résultats ont également montré des diminutions drastiques du taux de mycorhization des plants de tomate cultivés à proximité de ces sites industriels et du potentiel mycorhizogène infectieux dans les sols pollués par comparaison au sol non pollué.

Par ailleurs, les résultats des essais en microsomes et *in vitro* ont démontré que bien que le diesel affecte négativement les principaux stades de développement du CMA *R. irregularis* ainsi que la croissance de différentes plantes cultivées (tomate, blé chicorée), les CMA sont, non seulement capables d'accomplir un cycle de développement complet en présence de certaines concentrations de diesel, mais ils parviennent à protéger les plantes contre la toxicité des polluants. En effet, l'inoculation mycorhizienne de plants de tomate et de blé grâce à l'ajout d'inoculum mycorhizien permet d'améliorer la croissance de ces plantes malgré la présence de polluants. Nous avons montré que les CMA confèrent une protection aux plantes en atténuant le stress oxydant induit par la phytotoxicité du diesel. Ceci a été mis en évidence grâce au dosage de biomarqueurs biochimiques du stress oxydant : le malondialdéhyde (marqueur de peroxydation lipidique), la peroxydase et la superoxyde dismutase (deux enzymes à activités antioxydantes).