



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة باجي مختار - عنابة-

Université Badji Mokhtar -Annaba-
Faculté des Sciences

Département de Biologie

Laboratoire de recherche en Biologie Végétale et Environnement



THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Végétale et Environnement

Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes

THÈME

Les Terfesses des dunes littorales du Nord-Est Algérien : Écologie, Symbioses et Biotechnologie

Présentée par

M^{lle} Ahlem DAFRI

Directrice de thèse : **Pr. Arifa BEDDIAR**

Membres du jury :

Pr. Ouahiba BORDJIBA

Dr. Lyès BRADAÏ

Pr. Rachid DJAMAÏ

Université d'Annaba -Algérie

Université d'Ouargla -Algérie

Université d'Annaba -Algérie

Présidente

Examinateur

Examinateur

Jedi 20 Juillet 2017

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents

À mes frères, ma sœur, mon beau-frère et mes adorables nièces

À mes proches tantes, oncles, cousines et amies

À toute personne ayant cru en moi et m'ayant sincèrement

encouragée



Remerciements

La gratitude est la mémoire du cœur ~ Adage Italien

Je tiens tout d'abord à exprimer ma vive gratitude à ma directrice de thèse, **Pr Arifa Beddiar**, enseignante à l'université d'Annaba (Algérie), d'avoir dirigé ce travail avec tant de souplesse et de délicatesse. Je la remercie pour tant de choses, surtout sa confiance, son temps, ses précieux conseils et sa promptitude. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie vivement **Pr Ouahiba Bordjiba**, enseignante à l'université d'Annaba, pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance, **Pr Rachid Djamaï**, enseignant à l'université d'Annaba et **Dr Lyès Bradai**, enseignant à l'université d'Ouargla (Algérie) d'avoir bien voulu examiner ce travail. J'exprime toute ma gratitude aux trois pour leur temps précieux accordé à cette thèse.

Ma vive gratitude se doit également à **Dr Asunción Morte** enseignante à l'université de Murcie (Espagne) et directrice du laboratoire « Mycologie, Mycorrhize, Biotechnologie végétale », pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Je la remercie pour son accueil si hospitalier, et d'avoir mis à ma disposition, non seulement matériel et consommable, mais aussi et surtout son temps et son savoir. Je lui dois toute la reconnaissance de m'avoir appris la culture *in vitro* sur les meilleures bases qui soient.

J'exprime aussi ma profonde gratitude à tous les chercheurs et staff de l'université de Murcie (Espagne) qui m'ont aidée pendant mes stages pratiques, notamment **Dr Alfonso Navarro-Ródenas** surtout d'avoir fourni de son temps pour m'initier à la culture *in vivo*, **Mr Juan Julian Bordallo** d'avoir consacré temps et effort pour me faire part de ses précieuses connaissances en biologie moléculaire et ses inédits dans ce domaine, et **Dr Almudena Gutiérrez** pour le suivi des plantes, son aide et ses conseils. Je ne voudrais pas oublier les doctorants de l'équipe, spécialement **Francisco Arenas** pour sa contribution dans la PCR. Le personnel du service d'appui à la recherche (SAI) de l'université de Murcie est aussi remercié, j'en spécifie **Mr Francisco Asensio Vidal** pour son aide avec les coupes semi-fines des racines.

J'adresse ma reconnaissance à **Dr Salem Shamekh**, enseignant à l'université d'Helsinki (Finlande) et directeur du « Juva Truffle Center » (Juva, Finlande) de m'avoir accueillie dans

le centre et procuré tous les moyens du confort pour mener à bien les expérimentations réalisées au niveau du centre et qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances et de mieux comprendre et discuter les résultats des autres expériences de la thèse.

Je dois des remerciements très vifs à **Dr Tarek Hamel**, enseignant à l'université d'Annaba, pour son aide précieuse dans l'identification de certaines espèces de plantes et son encouragement, ainsi qu'à **Dr Amel Hamza-Meddad**, enseignante à l'université d'Annaba, pour m'avoir intégrée dans le monde des mycorhizes, soutenue et encouragée.

Je remercie aussi vivement étudiantes-chercheuses, collègues et amies du laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, notamment **Driai Sihem** pour ses précieux conseils et surtout de m'avoir amplement encouragée au moment où j'en avais bien besoin pour aller de l'avant, **Imen Fetnaci** et **Chibi Asma** pour leur aide et leur appui, **Imen Boudiaf**, **Amina Hassaïne**, **Nora Aouissi** ainsi que toutes les autres pour toute aide et soutien quelque minimes qu'ils soient.

Mes remerciements vont également au **personnel des conservations des forêts de la wilaya d'El-Tarf** pour l'aide et les cartes géographiques de la région, ainsi qu'à **Mr Bilel Hanini**, **Mr Hassen Amouri** (Aéroport d'Annaba) et **Mr Réda Mokaddem** (Station météorologique du lac des oiseaux, El-Tarf) pour les relevés climatiques de la région. Je n'oublie pas dans ces remerciements toutes les personnes qui m'ont aidée à la cueillette du champignon.

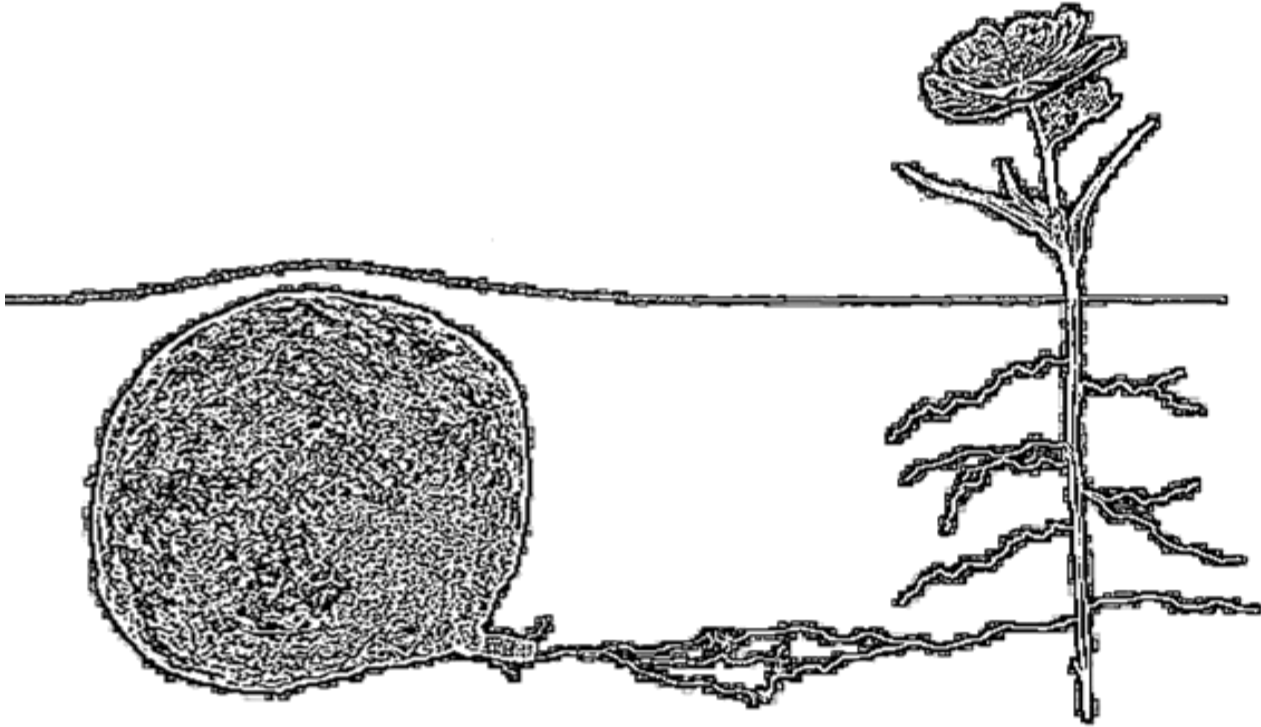
J'adresse un remerciement très spécial à ma **Tatie Arifa** pour m'avoir accueillie durant plusieurs mois de recherche, à **Tonton Rachid et toute sa famille** pour leurs inoubliables efforts, et à mon amie **Aïda** pour son inestimable soutien.

Ma plus grande et éternelle gratitude se doit à ma précieuse famille dont l'amour et l'appui étaient mon inépuisable source de courage. Je ne saurais leur exprimer (notamment mes parents) ma reconnaissance pour tous ce qu'ils m'ont fait pendant de très longues années, celles du doctorat entre autres. Je saisis ces lignes pour remercier mon cher **Papa** pour les innombrables journées entières passées avec moi sur le terrain et son accompagnement dans plusieurs destinations, ma chère **Maman** pour ses efforts inestimables et son aide infinie, ma chère **Sœur** et mon cher grand **Frère** d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir tant comblée de leur inégalable générosité, et mon cher petit **Frère** pour son accompagnement et son encouragement.

Merci à vous de m'avoir tant choyée.

Sans vous, après le tout puissant, cette thèse n'aurait pas eu lieu d'être.





ملخص

يعد هذا العمل أول بحث اهتم بدراسة إمكانية الإنتاج البيوتكنولوجي للترفاس أو ما يسمى "الكما" النامي في الكثبان الرملية الساحلية لشمال شرق الجزائر. لذا، ونظرا لعدم توفر دراسات سابقة ومرجعية عن وسط معيشة هذا الفطر في منطقة البحث، ولا عن الأنواع الموجودة بها، توجب تقسيم العمل إلى ثلاث محاور أساسية وهي: الدراسة الايكولوجية، دراسة العلاقات التعايشية والدراسة البيوتكنولوجية.

شمل محور الايكولوجيا دراسة المناخ، التربة والتنوع النباتي في الأراضي المنتجة للفطر. تمت دراسة المناخ من خلال جمع وتحليل معطيات الطقس، المتحصل عليها من محطات الأرصاد الجوية المتواجدة في منطقة البحث. أما التربة فقط حددت خصائصها من خلال التحليل المخبري لعينات مأخوذة من كل موقع. وأما فيما يخص التنوع النباتي، فقد تم التركيز على الأنواع الموجودة بكثرة في المواقع المعنية. أشارت محصلات هذه الدراسة إلى أن المنطقة موضوع البحث تلتقت ما يفوق ال 770 مم من الأمطار سنويا خلال الأعوام الأولى للبحث، وأقل من 600 مم عام 2016. كما أشارت المنحنيات البيانية للمناخ إلى امتداد الفترة الرطبة من شهر أكتوبر إلى شهر مارس والفترة الجافة من ماي إلى أوت. بينما أعربت نتائج تحليل التربة عن نمو الترفاس المدروس على تربة رملية غرينية، تميل إلى الحموضة وفقيرة من المواد العضوية. أما الغطاء النباتي فبدى مكونا أساسا من بعض النباتات العشبية التي تتقاسم جميع أماكن تواجد الفطر.

عني المحور الثاني (العلاقات التعايشية) بتحديد نوع النبات التكافلي وأنواع الفطر التي تنمو في المنطقة محور البحث. بحيث ارتكز تحديد نوع النبات على دراسة مورفولوجية بحتة، بينما تم تأكيد أنواع الفطر بواسطة البيولوجيا الجزيئية. هذا وقد تم بحث العلاقة التعايشية نفسها بتقدير نسبتها ودراسة نوعها. أظهرت هذه الدراسة أن النباتات العائلة للكما في المنطقة هي أنواع من أزهار الشمس المعروفة بالقصيص أو الرقوق خاصة *Tuberaria guttata* (L.) Fourr. كما سمحت بتحديد نوعين من الكما هما: *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe (1971) وهو نوع أحادي النمط في المنقطة وكثير الانتشار يتواجد في جميع المواقع المدروسة، و *Terfezia fanfani* (Mattirolo) 1900، وهو نوع نادر الوجود في مواقع البحث كما أنه ذكر هنا لأول مرة في الجزائر. أما عن العلاقة التعايشية فقد ثبت أن الفطر يشكل على جذور القصيص عددا من الأشكال الفطرية منها البسيطة ومنها المتشعبة وأن أنماط انشار الفطر على الجذور مختلفة، تتغير من داخلية إلى خارجية، وتحمل معطفا فطريا متطورا في بعض الأحيان.

أما الدراسة البيوتكنولوجية فقط استهلكت بإنتاج النباتات طبيعيا (*in vivo*) واستنباتها (*in vitro*) وتحضير اللقاح الفطري على شكل محلول بوغي (*in vivo*) ومستنبت خيوط فطرية (*in vitro*). من بين الامكانيات الأربع لإنتاج النباتات الملقحة بالترفاس، اثنتين تم تجربتهما (نباتات منتجة طبيعيا x محلول بوغي، ونباتات مستنبتة x محلول بوغي)، حيث حصلت نتائج إيجابية من التجربة الأولى التي أعطت بيانا للظروف الملائمة لإنتاج النباتات المدروسة وتلقيحها. أشارت نتائج هذه التجارب أيضا إلى أن العلاقة التكافلية الناتجة كانت خارجية، مشكلة حول بعض الجذور معطفا فطريا لم يسبق رصده على جذور نبات عشبي ملقح بالكما في ظروف طبيعية إذ ذكر هنا لأول مرة.

الكلمات المفتاحية: الكما، الترفاس، زهرة الشمس، القصيص، الرقوق، الكثبان الرملية، شمال شرق الجزائر.

Abstract

The present work was the first to study the biotechnological production of the northeastern Algerian desert truffles. For that purpose, it first investigated the ecology of truffle sites in the studied littoral dunes, and the symbiosis of the fungi before processing to their production.

The ecology was studied by collecting and analyzing climatic data from the meteorological stations of the region, analyzing soil physicochemical properties and studying the plant variability of each site. The results of this study showed up to 770 mm annual precipitations in the first years of the work, and less than 600 mm in 2016. Ombrothermic diagrams showed a wet period extending from October to March and a dry period from May to August. Soil analysis proved that the studied desert truffles grow in acidic sandy-loam soils poor in organic matter. The results of plant variability revealed some herbaceous plants in all desert truffle sites.

Symbiosis were processed by the morphological identification of the truffle host plant, morpho-anatomical and molecular identification of the harvested desert truffle species, and the study of the symbiotic relations (mycorrhizal morphotypes, mycorrhization percentages and mycorrhizal system) between the two antagonists. The herbaceous Cistaceae of the genus *Tuberaria*, especially *Tuberaria guttata* (L.) Fourr were the purchased desert truffle symbiotic partner. Two desert truffle species were identified: *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe (1971), a monophyletic species common in all sites, and *Terfezia fanfani* (Mattiolo) 1900, relatively rare and presently mentioned for the first time in Algeria. The natural symbiosis showed different mycorrhizal types namely: club-shaped mycorrhizae and branched mycorrhizae. The mycorrhizal level was considerable and the mycorrhizal system very variable (from endo- to ectomycorrhizae, with a developed mantle in some roots). Many remarkable and unexpected hyphal structures were observed.

The biotechnological production of desert truffle mycorrhizal plants required plant culture *in vivo* and *in vitro*, and inoculum production *in vivo* (sporal solution) and *in vitro* (mycelial culture) before inoculation. Four combinations were possible, two were realized (*in vivo* plants x *in vivo* fungi, *in vitro* micropropagated plants x *in vivo* fungi), while only one (*in vivo* x *in vivo*) succeeded. The appropriate *in vivo* and *in vitro* culture conditions of *T. guttata* were pointed out. The mycorrhizal level of the *in vivo* synthesized roots was hi, and the mycorrhizal system was mainly ecto with or without mantle. Sheathing ectomycorrhiza in herbaceous plant-desert truffle *in vivo* synthesis was described for the first time.

Keywords: Desert truffles, *Terfezia*, *Tuberaria guttata*, littoral dunes, northeastern Algeria.

Résumé

Étant le premier à s'intéresser à la biotechnologie des terfesses des dunes littorales du Nord-Est algérien, le présent travail n'a pu s'orienter directement à son but principal : « la production des terfesses de la région d'étude », avant d'entamer leur écologie et leurs symbioses.

La partie écologique a concerné le climat par la collecte et l'analyse des données climatiques des stations météorologiques, le sol par des analyses physicochimiques, et la diversité floristique par le recensement des espèces les plus répandues dans chaque site. L'étude climatique a montré des précipitations annuelles moyennes dépassant les 770 mm sur les premières années d'étude, et n'atteignant pas les 600 mm en 2016. Les diagrammes ombrothermiques ont marqué une période humide s'étendant d'octobre à mars et une période sèche de mai à août. Les analyses physicochimiques ont affirmé que le champignon pousse (dans la région d'étude) sur sols limono-sableux, de pH à tendance acide, et de faible teneur en matière organique. L'étude de la diversité floristique a listé des espèces végétales herbacées partageant les différents sites de prolifération des terfesses.

La recherche sur les symbioses a pris en charge l'identification morphologique de la plante hôte, l'identification morpho-anatomique et moléculaire des espèces de terfesses, et l'étude de la relation mycorhizienne par le recensement des morphotypes de mycorhizes, l'estimation du taux de mycorhization et l'analyse du système mycorhizien. Les Cistaceae du genre *Tuberaria*, notamment l'hélianthème à goutte (*Tuberaria guttata* (L.) Fourr) largement distribués dans la région, ont été identifiés comme « hôtes » des terfesses. Deux principales espèces de terfesse ont pu être identifiées. Il s'agit du *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe (1971), une espèce monophylétique trouvée en abondance sur tous les sites, et *Terfezia fanfani* (Mattiolo) 1900, beaucoup plus rare, venant d'être cité (ci-présent) pour la première fois en Algérie. Différents morphotypes de mycorhizes, notamment des mycorhizes simples et ramifiées ont été décrites, le taux de mycorhization était considérable et le système mycorhizien (naturel) s'est avéré très variable, des endomycorhizes et des éctomycorhizes avec ou sans manteau fongique ont pu être observées.

La production biotechnologique des plants mycorhizés par les terfesses a commencé par la culture *in vivo* et *in vitro* des plantules et la préparation de l'inoculum à base de solution sporale (*in vivo*) et de culture mycélienne (*in vitro*). Théoriquement, quatre modes d'inoculation sont possibles, dont deux ont été réalisés (plantes *in vivo* x champignon *in vivo*, plantes micropropagées *in vitro* x champignon *in vivo*). Parmi ces deux expérimentations, seulement la

première (*in vivo* x *in vivo*) a abouti. La culture *in vivo* de *T. guttata* aussi bien que sa culture *in vitro* et sa micropropagation ont abouti, et les conditions optimales de la production des plantes étudiées à partir des graines ont pu être mises en évidence. Les résultats de l'inoculation des plantes produites *in vivo* par la solution sporale du champignon ont montré des taux élevés de mycorhization. Le système mycorhizien était principalement ecto, laissant voir, pour la première fois dans de telles conditions, un manteau fongique bien développé sur certaines racines.

Mots clés : Terfesse, *Terfezia*, *Tuberaria guttata*, dunes littorales, Nord-Est algérien

Table des matières

ملخص.....	VII
Abstract.....	IX
Résumé.....	XI
Table des matières.....	XIII
Index des Figures.....	XVII
Index des tableaux.....	XIX
Liste des abréviations.....	XXI
Introduction générale.....	2
Chapitre 1 : Revue bibliographique	8
1. Les terfesses au fil des temps	8
2. Qu'est-ce que la terfesse ?	11
♦ Truffes ou terfesses ?	12
3. Propriétés morpho-anatomiques des terfesses	13
3.1 Le péridium	15
3.2 La glèbe.....	15
3.3 Les asques	15
3.4 Les ascospores.....	15
4. Taxonomie des terfesses	16
♦ Encadré : Présentation de quelques espèces de terfesse	17
♦ Outre les terfesses Ascomycètes.....	21
5. Les symbioses à terfesse	21
5.1 Les types de mycorhizes à terfesses	23
5.1.1 Les éctomycorhizes	23
5.1.2 Les endomycorhizes.....	25
5.1.3 Les éctendomycorhizes	25
5.2 Le partenaire vert des mycorhizes à terfesse	26
5.3 Facteurs influençant le type de mycorhizes.....	27
6. Cycle biologique.....	28
6.1 Germination.....	28
6.2 Fructification.....	30
6.3 Pérennité	31
7. Les terfesses dans le monde.....	32
8. Les terfesses en Algérie	34

8.1 Espèces identifiées.....	34
8.2 Aire de répartition.....	34
9. Terfesses toxiques ?.....	35
10. Vertus des terfesses.....	36
10.1 Vertus alimentaires.....	37
10.1.1 Valeur nutritionnelle.....	37
10.1.2 Aliment fonctionnel.....	38
10.2 Vertus médicinales : Activité antimicrobienne des terfesses.....	38
10.3 Vertus écologiques.....	40
Chapitre 2 : Présentation de la zone d'étude.....	44
1. Localisation et étendue.....	44
2. Géologie.....	45
3. Climat.....	45
4. Couvert végétal.....	48
Chapitre 3 : Étude expérimentale.....	52
I- Sites d'étude.....	52
II- Écologie.....	52
1. Le climat.....	52
2. Le sol.....	53
2.1 Échantillonnage du sol.....	53
2.2 Analyses physicochimiques du sol.....	53
2.2.1 pH eau.....	53
2.2.2 pH KCl.....	54
2.2.3 Conductivité électrique.....	54
2.2.4 Carbone et matière organique.....	54
2.2.5 Texture.....	55
2.2.6 Azote et phosphore total et assimilable.....	56
3. Diversité floristique.....	56
III- Symbioses.....	57
1. Le partenaire végétal de la symbiose.....	57
2. Le partenaire fongique de la symbiose.....	57
2.1 Échantillonnage des ascocarpes.....	57
2.2 Identification morpho-anatomique.....	59
2.3 Identification biomoléculaire.....	59
2.3.1 Extraction de l'ADN.....	60
2.3.2 Amplification de l'ADN.....	60
3. La relation symbiotique.....	66
3.1 Échantillonnage des racines.....	66

3.2 Étude de la mycorhization.....	67
3.2.1 Les morphotypes de mycorhizes	67
3.2.2 Le statut mycorhizien	68
3.2.3 Le système mycorhizien	69
IV- Biotechnologie.....	69
I. Production des plantes.....	70
I.1 Préparation des graines	70
I.2 Culture <i>in vivo</i>	70
I.2.1 Stérilisation des graines	70
I.2.2 Préparation du substrat.....	71
I.2.3 Ensemencement	71
I.3 Culture <i>in vitro</i>	71
I.3.1 Stérilisation des graines	71
I.3.2 Préparation du milieu	71
I.3.3 Ensemencement.....	71
I.3.4 Micropropagation.....	72
2. Production de l'inoculum	73
2.1 Solution sporale	73
2.2 Culture mycélienne	73
3. Inoculation	74
3.1 Inoculation plantes <i>in vivo</i> x champignon <i>in vivo</i>	74
3.2 Inoculation plantes <i>in vitro</i> x champignon <i>in vivo</i>	75
4. Analyse des résultats.....	76
4.1 Les morphotypes de mycorhizes	76
4.2 Le statut mycorhizien.....	76
4.3 Le système mycorhizien.....	76
4.3.1 Observation des racines	76
4.3.2 Coupes semi-fines	76
Chapitre 4 : Résultats et discussion	82
I- Sites à terfesse	82
II- Écologie	85
I. Le climat	85
2. Le sol	88
3. La diversité floristique	90
3.1 Les plantes herbacées	90
3.1.1 La famille Asteraceae	90
3.1.2 La famille Caryophyllaceae	90
3.1.3 La famille Fabaceae	92

3.1.4 La famille Poaceae	92
3.1.5 La famille Boraginaceae	92
3.2 Les plantes arbustives.....	94
III- Symbioses	96
1. Le partenaire végétal de la symbiose	96
2. Le partenaire fongique de la symbiose	107
2.1 <i>Terfezia arenaria</i>	107
2.2 <i>Terfezia fanfani</i>	109
3. La relation symbiotique	111
3.1 Les morphotypes de mycorhizes.....	112
3.1.1 Les mycorhizes simples.....	112
3.1.2 Les mycorhizes ramifiés	112
3.1.3 Autres mycorhizes.....	112
3.2 Le statut mycorhizien	113
3.3 Le système mycorhizien.....	114
3.3.1 Système éctomycorhizien.....	114
3.3.2 Système endomycorhizien	115
IV- Biotechnologie.....	117
1. Production des plantes.....	117
1.1 Culture <i>in vivo</i>	117
1.2 Culture <i>in vitro</i>	117
2. Production de l'inoculum	117
2.1 Solution sporale	117
2.2 Culture mycélienne	118
2.2.1 Isolement de <i>Terfezia arenaria</i>	118
2.2.2 Isolement de <i>Terfezia fanfani</i>	118
3. Inoculation	120
3.1 Inoculation plantes <i>in vivo</i> x champignon <i>in vivo</i>	120
3.1.1 Les morphotypes de mycorhizes	120
3.1.2 Le statut mycorhizien.....	121
3.1.3 Le système mycorhizien.....	122
3.2 Inoculation plantes <i>in vitro</i> x champignon <i>in vivo</i>	124
Discussion générale	126
Conclusion et perspectives.....	132
Travaux cités.....	136

Index des Figures

Fig. 1 Morpho-anatomie générale des terfesses.....	14
Fig. 2 Quelques espèces de terfesses.....	19
Fig. 3 Arbre généalogique des terfesses	20
Fig. 4 Terfesses non Ascomycètes	22
Fig. 5 Types de mycorhizes dans la nature.....	23
Fig. 6 Les mycorhizes à terfesses.....	24
Fig. 7 Cycle biologique des terfesses	29
Fig. 8 Terfesses toxiques ?	35
Fig. 9 Carte satellitaire du cordon dunaire de la wilaya d'El Tarf.....	44
Fig. 10 Altimétrie de la wilaya d'El Tarf.....	46
Fig. 11 Oueds et bassins versants de la wilaya d'El Tarf.....	46
Fig. 12 Étages bioclimatiques de la wilaya d'El Tarf.....	47
Fig. 13 Pluviométrie de la wilaya d'El Tarf.....	47
Fig. 14 Occupation des terrains de la wilaya d'El Tarf	48
Fig. 15 La récolte des terfesses	58
Fig. 16 Préparation de l'électrophorèse	63
Fig. 17 Lecture du résultat de l'électrophorèse.....	64
Fig. 18 Culture <i>in vitro</i> des plantes.....	72
Fig. 19 Les différentes modalités pour la production des plantes mycorhizées par les terfesses	75
Fig. 20 Quelques sites à terfesse.....	83
Fig. 21 Localisation des sites à terfesse dans les dunes littorales du Nord-Est algérien	84
Fig. 22 Diagrammes ombrothermiques de la wilaya d'El Tarf 2012–2016.....	86
Fig. 23 Histogrammes représentant les caractéristiques édaphiques des sols à terfesse	88
Fig. 24 La diversité floristique des sites à terfesse (A)	91
Fig. 25 La diversité floristique des sites à terfesse (B).....	93
Fig. 26 La diversité floristique des sites à terfesse (C) : Les arbustes.....	95
Fig. 27 Pièces florales, fruit et graines des différentes <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord- Est algérien.....	98
Fig. 28 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 1.....	102
Fig. 29 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 2	102

Fig. 30 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 3	103
Fig. 31 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 4.....	103
Fig. 32 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 5	104
Fig. 33 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 6	104
Fig. 34 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèces 7 et 8.....	105
Fig. 35 <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèces 9.....	105
Fig. 36 Quelques ascocarpes de terfesses récoltés au cours des années d'étude	108
Fig. 37 Pédicelle de <i>Terfezia arenaria</i>	109
Fig. 38 <i>Terfezia fanfani</i> (Mattiolo) 1900	110
Fig. 39 Phylogénie des espèces de terfesse identifiées inférée au maximum de vraisemblance	111
Fig. 40 Morphotypes de mycorhizes observés sur racines naturelles de <i>Tuberaria guttata</i>	113
Fig. 41 Statut mycorhizien des racines naturelles de <i>Tuberaria guttata</i>	114
Fig. 42 Système mycorhizien des racines naturelles de <i>Tuberaria guttata</i>	116
Fig. 43 Plantules de <i>Tuberaria guttata</i> produites <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	117
Fig. 44 Culture mycélienne de <i>Terfezia fanfani</i>	119
Fig. 45 Morphotypes de mycorhizes observés sur racines de <i>Tuberaria guttata</i> produites et inoculées <i>in vivo</i> par <i>Terfezia arenaria</i>	121
Fig. 46 Statut mycorhizien des racines de <i>Tuberaria guttata</i> produites et inoculées <i>in vivo</i> par <i>Terfezia arenaria</i>	122
Fig. 47 Système mycorhizien de <i>Tuberaria guttata</i> produite et inoculée <i>in vivo</i> par <i>Terfezia arenaria</i>	123
Fig. 48 Coupe semi-fines de racines de <i>Tuberaria guttata</i> micropropagées <i>in vitro</i> indemnes de mycorhization.....	125

Index des tableaux

Tableau 1 Échelle du pH.....	53
Tableau 2 Échelle de la conductivité.....	54
Tableau 3 Échelle de la matière organique.....	55
Tableau 4 Échelle de la texture	56
Tableau 5 Numéros d'accession des séquences de terfesses présentement étudiées	65
Tableau 6 Propriétés climatiques de la région d'étude	85
Tableau 7 Présentation de la variabilité morphologique des <i>Tuberaria</i> des dunes littorales du Nord-Est Algérien	99

Liste des abréviations

%	Pourcent
°C	Degré Celsius
µL	Micro litre
µm	Micro mètre
µmol	Micro mole
ADN	Acide désoxyribonucléique
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	<i>Bovin serum albumin</i> (Albumine de sérum bovin)
CaCo3	Carbonate de calcium
cm	Centimètre
cm ²	Centimètre carré
cm ³	Centimètre cube
CMA	Champignon mycorhizien à arbuscule
dATP	Désoxy-adénine triphosphate
dCTP	Désoxy-cytosine triphosphate
dGTP	Désoxy-guanine triphosphate
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
dTTP	Désoxy-thymine triphosphate
éctendo	Éctendomycorhize
écto	Éctomycorhize
endo	Endomycorhize
EDTA	<i>Ethylene-diamine-tetra-acetic acid</i> (Acide éthylène diamine tétra-acétique)
Erlen	Erlenmeyer
g	Gramme
GPS	<i>Global positioning system</i>
h	Heure
H ⁺	Ion hydrogène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaceur interne transcrit)

Liste des abréviations

J-C	Jésus-Christ
K ⁺	Ion potassium
KCl	Chlorure de potassium
KCr ₂ O ₇	Bichromate de potassium
kg	Kilogramme
km	Kilomètre
L	Litre
m	Mètre
m ²	Mètre carré
mg	Milligramme
Mg ⁺²	Ion magnésium
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Milli molaire
MO	Matière organique
mS	Millisiemens
N	Normal (Normalité en chimie)
NB	Nota bene
NH ⁴⁺	Ammonium
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Réaction de polymérisation en chaîne)
ppm	Partie par million
S	Siemens
s	Seconde
TAE	Tris acétate EDTA
UNESCO	<i>United nations educational, scientific and cultural organization</i> (Organisation des nations unies pour l'éducation, la science et la culture)
USA	<i>United states of America</i> (États unis d'Amérique)
V	Volt



Introduction générale



Introduction générale

Mystérieuses, ainsi sont décrites les terfesses qui poussent magiquement sous terre, sans la moindre intervention de l'homme. Connus depuis des temps immémoriaux, ces tubercules hypogés sont également appelés «truffes des sables» ou «truffes du désert» ; un nom qui évoque une partie de leur histoire et récapitule les connaissances ancestrales sur leur écologie. Lesquelles sans être fausses, ne peuvent être considérées comme exhaustives.

Importantes et remarquablement présentes dans des textes religieux et des contes fabuleux de civilisations distinctes en temps et en espace, les terfesses ont joui de plusieurs appellations, à savoir : mannes (المن), kamés (الكمأ), fagâa (الفقع), turmas et bien d'autres.

Ce sont des champignons Ascomycètes mycorhiziens qui présentent au cours de leur cycle biologique une phase symbiotique importante, avec des plantes de différentes familles végétales. Cette relation mycorhizienne mutuelle est indispensable à la fructification des terfesses et la formation des tubercules passionnément recherchés par les populations qui les connaissent et les savourent.

L'importance des terfesses ne repose pas simplement sur leur usage culinaire. En effet, l'intérêt médicinal prononcé de ces tubercules, leur importance économique et le rôle qu'ils jouent dans le maintien des écosystèmes et la réhabilitation des terres improductives, leur accordent une pesanteur non négligeable et en font un sujet de recherche appétissant pour plusieurs équipes dans le monde.

Les travaux réalisés sur ce champignon portent sur sa description, sa taxonomie, ses propriétés gastronomiques, médicinales et écologiques, ses symbioses, son cycle biologique et sa production biotechnologique. Outre cela, et vue son importance, l'histoire du champignon a également fait l'objet de nombreuses synthèses.

En Algérie, les travaux sur les terfesses n'ont concernés que le sud et le nord-ouest du pays. Aucune étude, avant l'an 2012, ne s'était intéressée aux terfesses des dunes littorales du Nord-Est algérien, dont l'existence ne fut, jusqu'à lors, connue, que par les habitants de la région.

Ce travail débuté en 2013 a pris en charge plusieurs points importants, visant à répondre à la problématique initialement posée : Comment peut-on produire les terfesses à partir des espèces végétales et/ou fongiques des dunes littorales du Nord-Est Algérien ?

Afin de répondre à cette problématique, la présente recherche, bien que appuyée sur les résultats obtenus dans une étude préliminaire réalisée en 2012 (Dafri, 2012), a dû passer par plusieurs points indispensables ciblant essentiellement les objectifs suivants :

- 1) La recherche de nouveaux sites à terfesse dans les dunes prospectées.
- 2) Une étude écologique visant la compréhension des conditions de prolifération de ces terfesses dans leur environnement naturel. Elle s'est articulée sur les points suivants :
 - Le climat.
 - Les propriétés physicochimiques des sols.
 - La diversité floristique des sites à terfesses.
- 3) Une étude approfondie des symbioses à terfesses ayant pour but une meilleure compréhension de leur relation mycorhizienne et leur cycle biologique, et portant sur ce qui suit :
 - Identifier le partenaire végétal de la symbiose et vérifier l'existence de sous espèces différentes (une observation de 2012 restée à vérifier).
 - Authentifier, via la biologie moléculaire, l'identification des espèces de terfesses récoltées et en rechercher de nouvelles espèces éventuelles.
 - Étudier la relation symbiotique en se basant, en plus des taux de mycorhization, sur la nature du système mycorhizien et les observations susceptibles de contribuer à l'élucidation du cycle biologique du champignon.
- 4) La recherche des conditions propices pour la production des terfesses étudiées par le biais des méthodes biotechnologiques, portant sur :
 - La culture *in vivo* et *in vitro* de la plante hôte à partir des graines récoltées sur les sites d'étude.
 - La culture mycélienne pure (*in vitro*) du champignon.
 - L'inoculation des plantules obtenues *in vivo* et/ou *in vitro* par le champignon dans le but de la production des plants mycorhizés recherchés.
 - L'étude de la symbiose et du système mycorhizien issus de la mycorhization induite et leur comparaison avec les racines naturelles.

Afin d'exposer sa démarche et ses aboutissements, la thèse s'est articulée en quatre chapitres : le premier à servi à un passage en revue la bibliographie récapitulant l'histoire, la définition, la description, la taxonomie, les symbioses, le cycle biologique, la répartition géographique,

l'écologie et enfin les vertus des terfesses. Le deuxième chapitre a été consacré à la présentation de la région d'étude, le troisième à l'étude expérimentale et le quatrième à l'interprétation et la discussion des résultats. Ces deux derniers chapitres ont été subdivisés en plusieurs sections concernant dans l'ordre les points suivants : sites d'étude, écologie, symbioses et biotechnologie.



Chapitre 1

Revue bibliographique



Chapitre 1 : Revue bibliographique

1. Les terfesses au fil des temps

قال رسول الله صلى الله عليه و سلم: "الكُمأة من المنّ و ماؤها شفاء للعين" (صحيح مسلم #2049 ؛ صحيح البخاري #5708(5381) ؛ الجامع الصحيح سنن الترمذي #2066-2069) .

Ce hadith du prophète (ﷺ) qui date de plusieurs siècles, révèle dans sa première partie, que les terfesses ou kamés, tel que connues en orient, sont les mannes par lesquelles le créateur a gratifié Moïses en réponse à la demande de son peuple. Cela est également évoqué dans plusieurs versets du coran, dont le verset ﴿57﴾ de « La vache » (من سورة البقرة) :

قال تعالى، باسم الله الرحمن الرحيم: "وظللنا عليكم الغمام وأنزلنا عليكم المن والسلوى..." ﴿57﴾

La description avancée pour cette nourriture providentielle et miraculeuse dont bénéficièrent les hébreux dans la traversée du désert de Sinaï après leur sortie d'Égypte, ne puisse désigner rien d'autre que les «truffes des sables ou truffes du désert» (Hall *et al.*, 2007 ; Loizides *et al.*, 2011). Ces champignons dont la présence sur terre remonte à plusieurs millénaires, font partie intégrante de l'histoire de l'humanité et ont été appréciés comme denrée précieuse bien longtemps avant que la truffe n'émerge (Loizides *et al.*, 2011).

Les plus anciens documents sur ces perles antiques reviennent au néo-sumérien, période allant de 1728 à 1531 avant J-C. En effet, plusieurs références ont été trouvées dans les anciens textes de nombreux philosophes, pharmaciens et médecins de l'époque, tels : le philosophe grec (de Lesbos) Théophraste, le philosophe de la Grèce antique Platon, le philosophe grec Aristote, le grammairien, poète et médecin grec Nicandre de Colophon, l'écrivain et naturaliste romain Pline l'ancien et le médecin, pharmacologue et botaniste grec Dioscoride (Chatin, 1892a ; Loizides *et al.*, 2011).

Théophraste, Pline et Dioscoride, les premiers à avoir parlé de truffes, ont d'abord parlé de terfesse d'Asie mineure, désignées sous les noms 'Mizy' ou 'Mison' (Mizy de Pline et Mison de Théophraste) décrites comme légumes sans racines, originaires des tonnerres (Chatin, 1892a ; Morte *et al.*, 2000).

Selon les documents anciens, les terfesses étaient étroitement liées aux cultures méditerranéennes depuis leurs origines (Morte *et al.*, 2009). Elles étaient, dès la préhistoire, connues et appréciées par les populations locales du moyen orient et d'Afrique du Nord, où

elles étaient servies dans les banquets royaux des pharaons de l'Égypte ancienne (Trappe *et al.*, 2008). Les grecs et les romains anciens qui les importaient de Lybie, Lesbos et Carthage, les vendaient dans leurs deux empires et en faisaient une importante source de commerce (Morte *et al.*, 2009). Chez les romains, ces champignons se vendaient chers, non seulement pour leur délicatesse mais également pour leurs diverses propriétés réputées à l'époque (Loizides *et al.*, 2011).

Le moyen âge qui a signé l'apogée de la prospérité des civilisations arabo-musulmanes nous raconte les légendes de la terfesse à travers l'héritage culturel qu'ont laissé les savants arabes et musulmans de l'époque.

En plus de l'usage culinaire connu pour la terfesse, Avicenne, l'écrivain, médecin et scientifique médiéval persan, lui mentionne un intérêt médicinal contre la paralysie, l'apoplexie et les maladies oculaires (Al-kazwini, 2000). Au septième siècle (600 après J-C), le savant arabe musulman Al-kazwini, décrit la terfesse comme une plante souterraine se produisant tels des bijoux dans les profondeurs du sol sans intervention de l'homme. Les arabes prétendaient que certaines espèces vénéneuses se voyaient pousser à l'ombre des oliviers. Loin de la logique, les légendes arabes racontaient également que les terfesses non cueillies se transformaient en serpents sous l'effet des pluies d'été (Al-kazwini, 2000).

À l'époque moderne (du 15^{ème} au 18^{ème} siècle), la terfesse s'est vu intéresser nombreux chercheurs dont le diplomate et explorateur Hassan Al-Wazzan dit Léon l'Africain. Celui-ci l'a décrite comme racine à écorce blanche de la grosseur d'une noix ou d'une orange, semblable à la truffe mais plus grosse encore, poussant aux arènes des lieux chauds (Léon, 1830). «Les déserts de la Numidie en produisent en grande abondance de quoi les arabes mangent autant volontiers comme si c'était du sucre...nettoyé et remis dans un bouillant gras, c'est une viande très singulière et délicate » Extrait de : De l'Afrique (Léon, 1830). Outre l'intérêt gastronomique, Léon rappelle qu'à cette époque, les terfesses étaient appelées « Camha » par les médecins qui leurs attribuaient des propriétés médicinales rafraichissantes (Léon, 1830).

Ces champignons vieux comme le temps, ont à l'égard de tous les champignons été, jusqu'à l'ère contemporaine, pris pour des végétaux, et ce n'est qu'après la découverte et le perfectionnement du microscope vers la fin du 18^{ème} siècle que la différence fût signalée. En effet, l'appellation 'champignon' vient du bas latin '*Campinoli*' qui désigne 'les petits produits des campagnes' (Trésor de la Langue Française Informatisé TLF ; In site web 1). Les chercheurs qui s'intéressaient aux terfesses leur attribuaient le nom 'champignon' tout en les classant parmi les végétaux, à cet égard, l'extrait suivant en sert de bonne preuve : «...qui a en

quelque sorte révélé aux botanistes l'existence des champignons hypogés, et auquel sont dues la plupart des connaissances exactes que nous possédons aujourd'hui sur ces végétaux » (Tulasne et Tulasne, 1851). Il a donc fallu attendre 1880 pour que Jacques De Velsers vienne nier l'appartenance des truffes au règne végétal (Chatin, 1892a).

Quelques années plus tôt, en 1823, l'illustre mycologue Fries dans son ouvrage '*Systema mycologicum*' a subdivisé la famille des Tubéracées en quatre genres : *Tuber*, *Rhizopogon*, *Endogone* et *Polygaster*. Cependant, ces trois derniers ont été rejetés en 1851 par Tulasne qui a décrit la famille comme étant un groupe de Gastéromycètes Angiogastres à fructification conceptaculaire. De ce fait, la liste des Tubéracées établie par Fries se bornait à 4 ou 5 espèces de véritables truffes toutes attribuées au genre *Tuber* (Tulasne et Tulasne, 1851).

Quelque temps après, Vittadini qui a entrepris d'écrire l'histoire des champignons hypogés, s'était promptement aperçu que les truffes récoltées si abondamment des compagnes ne pouvaient se rapporter toutes au petit nombre de *Tuber* décrit. Aidé par les chiens pour la cueillette, en plus des espèces facilement trouvées dans les marchés de Pavie et de Milan, Vittadini s'est consacré à l'étude de ces fameux tubercules lucifuges et a élaboré son '*Monographia Tuberacearum*' dans lequel il a décrit bon nombre d'espèces de terfesse, dont le *Picoa juniperi*. Cet ouvrage, que Tulasne traite de précieux, a porté profit à l'histoire des terfesses, et a ouvert l'appétit des mycologues de l'époque sur leur étude (Vittadini, 1831 ; Tulasne et Tulasne, 1851).

En 1844, Luis-René Tulasne en collaboration avec Charles Tulasne, ont décrit le genre *Choiromyces*, auquel ils ont attribué par la suite trois nouvelles espèces (Tulasne et Tulasne, 1845 ; 1851).

En 1847, après avoir établi une comparaison attentive entre les terfesses de Rome, d'Algérie et de Sardaigne, les frères Tulasne ont certifié leur identité spécifique, les ont toutes regroupées sous le vocable : *Terfezia Léonis* Tul et ont affirmé qu'il s'agissait bien du champignon que les Espagnols des royaumes de Castille, de Grenade et ceux du royaume de Léon, désignaient par le nom '*Turmas*' (Tulasne et Tulasne, 1851 ; Cordier, 1876 ; Chatin, 1869 ; 1892a).

Le genre *Terfezia* dont les espèces étaient attribuées au genre *Choiromyces* par les Tulasne a été, en 1851, décrit par les frères-mêmes comme genre à part entière (Tulasne et Tulasne, 1851). Vers la fin du 18ème siècle, le physicien, mycologiste et botaniste français Chatin a pris de l'intérêt pour ces champignons. En résultat, une bonne partie de la taxonomie des *Terfezia* est accréditée à lui. Avec la collaboration du botaniste grec Gennadios qui lui procurait des

échantillons de divers endroits (Thessaly, Peloponnesse, Crete et Cyprus), Chatin a décrit plusieurs nouvelles espèces et variétés de *Terfezia* et a également créé le genre *Tirmania* (Chatin, 1892a ; b ; c).

Après 1892, Chatin (1893, 1894a ; b ; 1895a ; b ; c ; 1896a ; b ; 1897) ainsi que plusieurs autres chercheurs (Patouillard, 1894a ; b ; 1899 ; Maire, 1906) ont décrits plusieurs nouvelles espèces, dont certains noms se sont avérés par la suite synonymes d'espèces d'ores-et-déjà décrites (Loizides *et al.*, 2011 ; Kovács et Trappe, 2014). Les recherches se sont poursuivies, les moyens ont évolués, et c'est ainsi que l'histoire des terfesses s'est orientée plus vers la taxonomie.

2. Qu'est-ce que la terfesse ?

Le mot terfesses désigne le corps fructifère potentiellement comestibles de certains champignons hypogés poussant à une profondeur de 5 à 10 cm. Cette fructification est caractérisée par une forme semblable à un tubercule de pomme-de-terre, de saveur plus ou moins intense, et de couleurs, textures et tailles différentes (Kagan-Zur, 2001 ; Morte *et al.*, 2009 ; Moreno *et al.*, 2012 ; El Enshasy *et al.*, 2013).

Ce sont des Ascomycètes des genres : *Terfezia*, *Tirmania*, *Picoa*, quelques espèces du genre *Tuber*, en plus des genres *Phaeangium*, *Delastria*, *Balsamia*, *Elderia*, *Kalaharituber*, *Mattiolomyces*, *Choiromyces*, *Reddelomyces*... (Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Gutiérrez *et al.*, 2003 ; Morte *et al.*, 2008 ; El Enshasy *et al.*, 2013).

Les terfesses se développent sur sols sablonneux, sous climats essentiellement arides ou semi-arides, d'où leurs appellations respectives : « Truffes des sables » ou « Truffes du désert » (Fortas et Chevalier, 1992a ; Díez *et al.*, 2002 ; Gutiérrez *et al.*, 2003 ; Morte *et al.*, 2008 ; Navarro-Ródenas *et al.*, 2011 ; Bradai *et al.*, 2014a, b ; Kovács et Trappe, 2014 ; Zitouni *et al.*, 2014). Cependant, elles ne sont pas exclusives de ces climats, elles prolifèrent également sous climats humides ou subhumides chauds comme sur les dunes littorales du Nord-Est algérien (Dafri et Beddiar, 2017).

Ce sont des champignons mycorhiziens et des symbiotes obligatoires de grand nombre de plantes, notamment des plantes herbacées de la famille Cistaceae et certains arbustes et arbres tels : l'armoise blanche, le pin maritime, le pin pignon, le pin d'Alep, le chêne vert, le chêne pubescent... (Duggar et Pinoy, 1907 ; Bokhary et Parvez, 1992 ; Turgeman *et al.*, 2011).

◆ **Truffes ou terfesses ?**

« Champignons Ascomycètes, mycorhiziens, hypogées et comestibles, de la forme d'un tubercule », cette description commune entre truffe et terfesse n'est pas suffisante pour deviner de laquelle des deux cousines s'agit-il.

L'appellation « Truffe » se doit uniquement aux 'vraies' truffes appartenant au genre *Tuber*, très parfumées et prestigieuses, caractérisées notamment par leur couleur noire et la texture écailleuse de leur péridium. Cependant, il en existe également des espèces blanches à péridium lisse et de qualité moindre comparativement aux premières (Callot, 1999 ; Læssøe et Hansen, 2007 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Kovács et Trappe, 2014).

Les espèces de truffe les plus connues sont : la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vitt.), les truffes grise et jaune de Bourgogne (*T. uncinatum* Chatin et *T. excavatum* Vitt.), la truffe blanche d'été (*T. aestivum* Vitt.), la truffe musquée (*T. brumale* Vitt.), la truffe blanche d'Italie (*T. borchii* Vitt.), la truffe mésentérique (*T. mesentericum* Vitt.), la truffe de Chine (*T. indicum* Cooke et Massée), la truffe de l'Himalaya (*T. himalayaense* BC Zhang et Minter) et la truffe du Texas (*T. texens*).

Les truffes sont principalement répandues en Europe de l'ouest (France, Italie et Espagne). Toutefois, il en existe également des espèces (notamment des truffes blanches) récoltées en Chine et en Amérique du Nord (Californie et Texas). Les zones de répartition des truffes sont caractérisées par des climats tempérés humides à été chaud ou des climats méditerranéens. D'après Callot (1999), ces exigences climatiques s'expliquent par une longue période de fructification sous terre, durant laquelle ces champignons ne supportent ni de longues périodes froides ni des sécheresses prolongées.

Les truffes noires d'Europe poussent sur sols calcaires, bien drainants et caillouteux, d'où le péridium à écailles pyramidales qui constitue une structure particulièrement adaptée pour progresser dans des milieux offrant une forte résistance mécanique à la pénétration. Cependant, les truffes blanches sont, à l'égard des terfesses, mieux adaptées à des textures sableuses ou limoneuses permettant la formation d'un péridium plutôt lisse (Callot, 1999).

Si les partenaires symbiotiques des terfesses sont principalement des plantes herbacées ou des arbrisseaux, les truffes établissent en revanche leur relation mycorhizienne avec des arbres tels : les chênes (*Quercus sp.*), le noisetier (*Corylus sp.*), les conifères notamment les pins (*Pinus sp.*) et les cèdres (*Cedrus sp.*), les tilleuls (*Tilius sp.*)... etc (Callot, 1999).

Contrairement aux terfesses principalement printanières, la période de récolte des truffes s'étend essentiellement de novembre à mars à l'exception de la truffe d'été (*T. aestivum*) récoltée de juin à septembre et la truffe jaune de Bourgogne (*T. uncinatum*) dont la récolte débute en mois de septembre (Callot, 1999).

Un autre point de divergence serait la profondeur du tubercule, relativement faible pour les terfesses et pouvant aller chez les truffes jusqu'à 30 voire 40 cm en dessous de la surface du sol. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de chien et autres animaux s'impose dans la cueillette des truffes inversement aux terfesses (Loizides *et al.*, 2011 ; El Enshasy *et al.*, 2013).

Cependant, et malgré la valeur gustative actuellement répandue des truffes d'Europe, dites nobles, les terfesses restent plus importantes encore des points de vue historique et ethnomycologique. Ce sont des champignons fabuleux qui ont accompagné l'homme dans différentes époques et ont fait l'objet de bon nombre de légendes et conquêtes contre plusieurs maladies ayant subsisté à une période ou une autre de la vie humaine.

3. Propriétés morpho-anatomiques des terfesses

L'identification morphologique des terfesses est facilitée par un certains nombres de caractères qui diffèrent d'une espèce à l'autre. Ainsi, une description morphologique détaillée peut servir à la reconnaissance du genre voir de l'espèce, même si de nos jours, les méthodes moléculaires sont les plus crédibles.

Les corps fructifères des terfesses nommés **Ascocarpes** ou **Ascomes**, ont une forme plus ou moins globulaire. Leur taille va de quelques millimètres à plusieurs centimètres. Leur poids frais varie de 1 g à quelques centaines de grammes. Bencivenga et Urbani (1996) ont mentionné un ascome de terfesse blanche mesurant 8 cm de diamètre pour un poids de 235 g (Hussain et Al-Ruqaie, 1999). Jamali et Banihashemi (2012) ont mentionné des ascocarpes de *Terfezia claveri* avec un poids qui varie entre 20 et 350 g en Iran. En Arabie Saoudite, des ascocarpes de 300, 700 et plus de 1000 g ont été récoltés, les deux premiers sont des terfesses brunes, le troisième une terfesse blanche qui a été identifiée par la suite comme *Tirmania nivea* (Sawaya *et al.*, 1985).

L'ascome est potentiellement doté d'un pédoncule constitué d'agrégats de mycélium lâches, racines et particules de terres (Awameh et Alsheikh, 1997 ; Kovács *et al.*, 2007). Ce pédicelle est présent à la base de l'ascocarpe chez les espèces du genre *Terfezia* et *Tirmania* (Awameh et Alsheikh, 1997 ; Hussain et Al-Ruqaie, 1999 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Kovács *et al.*, 2007 ; Trappe

et Castellano, 1991 ; Jamali et Banihashemi, 2012). Très facilement détachable, il reste bien souvent dans le sol et est de ce fait généralement absent à la récolte.

Les ascocarpes matures sont constitués de l'extérieur vers l'intérieur de plusieurs parties à savoir (Fig. 1) :

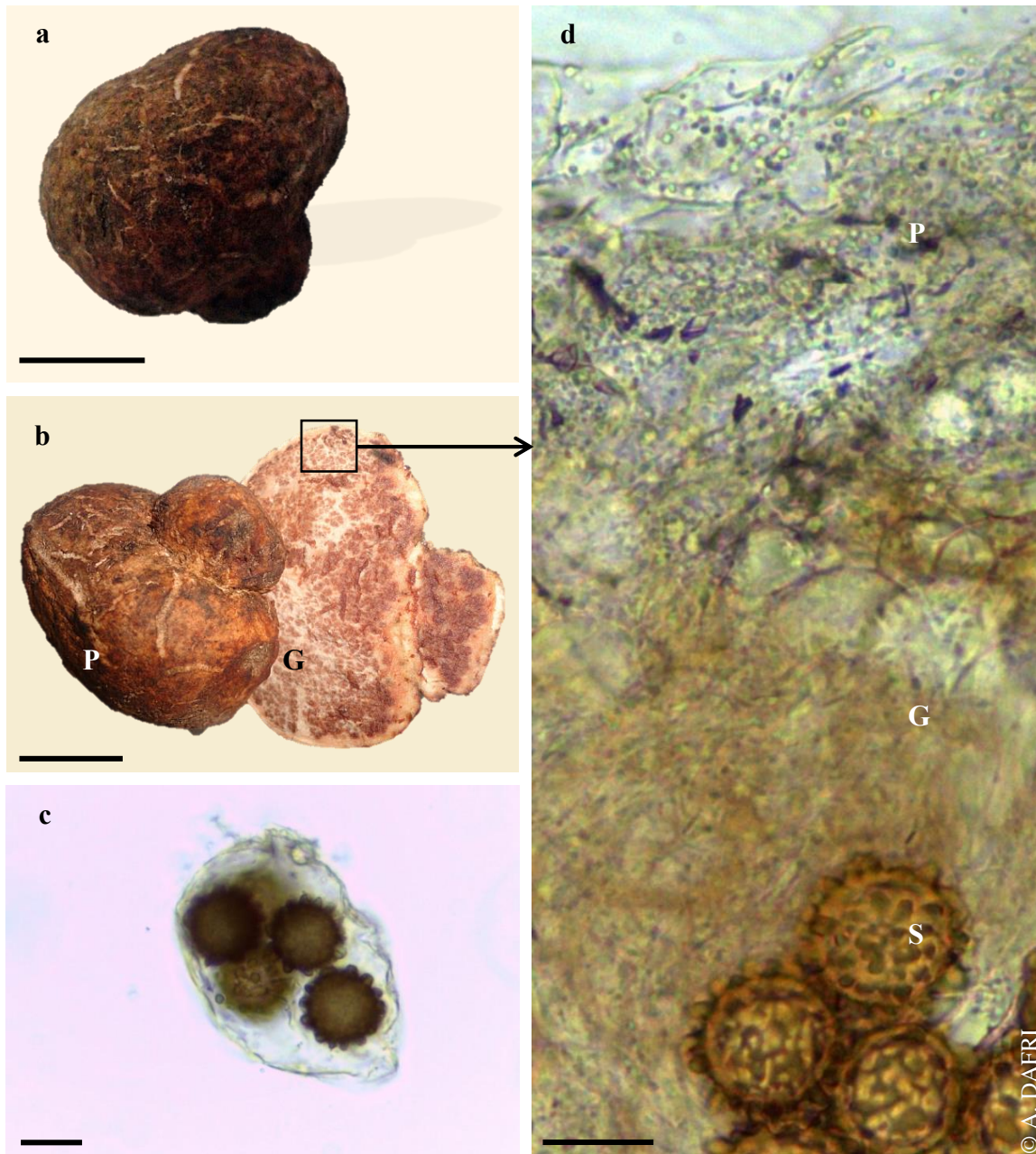


Fig. 1 Morpho-anatomie générale des terfesses

La figure décrit la morpho-anatomie générale de *Terfezia arenaria* récoltée au printemps 2012 des dunes littorales du Nord-Est algérien. **a** : ascocarpe, **b** : coupe transversale au niveau d'un ascocarpe montrant à l'extérieur le périidium (P) et à l'intérieur la glèbe (G), **c** : asque renfermant des ascospores, **d** : coupe fine de l'ascome observée en microscope photonique montrant de l'extérieur vers l'intérieur : le périidium, la glèbe et les ascospores. Échelle barre [a, b] = 1 cm, [c, d] = 20 μ m.

3.1 Le péridium

Également appelé **Pérignon** ou **Pirignon**, le péridium constitue l'enveloppe générale de l'ascocarpe et est constitué d'hyphes souvent à paroi épaisse. Sa surface peut être lisse ou hérissée selon la nature du sol, son épaisseur varie de quelques micromètres à quelques millimètres, et sa couleur est très variable selon les espèces et le stade de maturation. Elle va du blanc, au brun clair, allant au brun foncé, très foncé et jusqu'au brun noir. (Hussain et Al-Ruqaie, 1999 ; Alsheikh, 1994 ; Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Læssøe et Hansen, 2007).

3.2 La glèbe

La glèbe est la masse charnue entourée par le péridium, également appelée **Gleba** ou **Chair** (Chatin, 1896). Sa texture peut être solide ou spongieuse, et sa couleur blanchâtre, jaunâtre, rosâtre, marron clair ou foncé, selon les espèces et le stade de développement (Moreno *et al.*, 2000 ; Moreno-Arroyo *et al.*, 2001 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Læssøe et Hansen, 2007 ; Agnello et Kaounas, 2011). La glèbe comporte souvent des poches fertiles portant les asques, délimitées par des veines stériles de couleur généralement blanche formant un réseau plus ou moins perceptible selon l'épaisseur des veines variables d'après les espèces (Moreno *et al.*, 2000 ; Moreno-Arroyo *et al.*, 2001 ; Agnello et Kaounas, 2011).

3.3 Les asques

Les asques sont les structures caractéristiques des ascomycètes qui en tirent leur nom. Ce sont des sortes de sacs allongés à l'intérieur desquelles se forment les ascospores. Ils sont souvent hyalins, mesurant quelques dizaines de micromètres, d'une forme globuleuse, subglobuleuse ou ovoïde, avec ou sans pédicelle. Leur paroi est d'épaisseur variable, et le nombre d'ascospores y varie de 1 à 8 selon les genres (Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Moreno-Arroyo *et al.*, 2001 ; Læssøe et Hansen, 2007 ; Agnello et Kaounas, 2011).

3.4 Les ascospores

Les spores ou ascospores sont les cellules reproductrices permettant la multiplication et la dissémination du champignon. À l'égard des asques, les ascospores qui mesurent quelques micromètres ont différentes formes également : globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Leur couleur peut être hyaline, jaunâtre ou brune, et leur surface lisse ou ornée de verrues (tronquées ou arrondies) ou d'épines. Elles constituent une importante clé d'identification (Chatin, 1896a ; Læssøe et Hansen, 2007).

4. Taxonomie des terfesses

La description morphologique et morpho-anatomique a constitué la principale clé d'identification des terfesses et la première base de leur classification taxonomique pendant de très longues années, bien avant l'apparition des méthodes moléculaires et jusqu'à aujourd'hui d'ailleurs. De ce fait, et vu son importance, la morpho-anatomie des espèces les plus répandues et les plus connues est présentée dans l'[encadré](#) ci-après et illustrée sur la figure [2](#) du présent manuscrit.

Grace à la biologie moléculaire, la taxonomie des terfesses a été représentée par plusieurs arbres phylogénétiques dont celui publié en 2014 par Kovács et Trappe (Fig. [3](#)), considéré comme un des plus parcimonieux.

Les études taxonomiques des terfesses montrent que celles-ci sont des champignons vrais (Amastigomycota), Ascomycetes, Discomycetes, autrefois groupés dans la famille Terfeziaceae, élevée à ce rang par Fischer (1897) et classée dans l'ordre Tuberales. Trappe (1971) a approuvé la famille Terfeziaceae. Il a rejeté l'ordre phylogénétique des Tuberales et joint les familles : Tuberaceae et Terfeziaceae à l'ordre Pezizales avec les familles Pezizaceae, Pyronemataceae et plusieurs autres familles (Trappe, 1971 ; Læssøe et Hansen, 2007).

La première étude phylogénétique moléculaire mentionnant les terfesses était réalisée par O'Donnell *et al.* en 1997. Cette étude avait déplacé plusieurs taxons et attesté le classement des terfesses parmi les Pezizales (Kovács et Trappe, 2014).

En 1999 deux études sur la phylogénie des terfesses ont été entreprises par Percudani *et al.* et Norman et Egger. Les résultats de ces deux études affirment ceux d'O'Donnell *et al.* (1997) et classent les terfesses dans l'ordre Pezizales. Ces auteurs ont également mentionné la distance entre la position phylogénique de *Mattiolomyces terfezioides* (*Terfezia terfezioides*) et *Terfezia arenaria* que Norman et Egger ont considérés paraphylétiques et dont ils ont justifié les ressemblances morphologiques par la convergence (Norman et Egger, 1999 ; Percudani *et al.* 1999).

Les terfesses sont restées en perpétuel reclassement. La famille Terfeziaceae a été anéantie et les genres *Terfezia* et *Tirmania* ont été classés dans la famille Pezizaceae (Norman et Egger, 1999 ; Percudani *et al.* 1999 ; Roth-Bejerano *et al.*, 2004 ; Hansen *et al.*, 2005 ; Læssøe et Hansen, 2007).

ENCADRÉ

PRÉSENTATION DE QUELQUES ESPÈCES DE TERFESSE

***Terfezia arenaria* (Moris) Trappe.** Connue par «Et-terfess Lahmar» qui signifie «La terfesse rouge». Synonymes : *Tuber arenarium* Moris 1829 ; *Terfezia leonis* Tul. 1851. **Ascomes** hypogés, partiellement émergés à maturité, de forme globuleuse, subglobuleuse, cornée, napiforme ou piriforme, souvent lobés et pédonculés, de 3–10(–15) cm. **Péridium** lisse à légèrement ridé, plus ou moins fissuré ou cannelé, non brillant, d'abord blanc tacheté de spots roses et noires, sa couleur s'assombrit au fur et à mesure, devenant brun foncé à maturation, section de 1–4 mm, blanchâtre à rose saumon. **Gleba** solide et rosâtre au début, avec, à maturité, des poches fertiles brunes, séparées par un réseau de veines stériles concolore avec la section du péridium. **Asques** non amyloïdes, globuleux, subglobuleux, cornés, napiformes ou réniformes, non pédicellés (sessiles), aléatoirement placés dans les poches fertiles, subglobuleux, de 80–120 x 70–100 µm (site web 2), ou globuleux, de 40–85 µm, ou réniformes, de 60–110 x 55–75 µm (Alsheikh, 1994). **Ascospores** (8/asque) globuleuses, d'abord hyalines et lisses, puis jaune marron et ornementées de verrues tronquées à maturité, mesurant (21–) 24–31 µm (verrues incluses) (Chatin, 1896a ; Fortas et Chevalier, 1992b ; Alsheikh, 1994 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2002 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Bradai *et al.*, 2014a ; sites web 2 ; 3).

***Terfezia boudieri* Chat. 1891.** Synonymes : *Terfezia deflersii* Pat. 1894 ; *Terfezia aphroditis* Chat. 1897. **Ascome** hypogé, subglobuleux, napiforme à corné, souvent lobé et pédonculé. **Péridium** terne, brun pâle à brun foncé, brun noir avec l'âge, surface lisse à pubescente, ridée et plus ou moins crevassée, de 0.5 à 2 mm de diamètre, de section blanche. **Glebe** charnue, solide, d'abord blanche à rose pâle, puis rose saumon à maturité, poches fertiles de 0.1–0.3 mm d'épaisseur, séparées par des veines stériles d'une épaisseur de 0.1 à 0.4 mm, concolore avec la section du péridium. **Asques** non amyloïdes, hyalins, pédicellés, globuleux à subglobuleux, de 60–110 x 50–80 µm, aléatoirement distribués dans les poches fertiles, comportant 4–6(8) spores, séparées du cytoplasme de l'asque par une membrane. **Ascospores** globuleuses, de (18)20 à 26 µm, verrues arrondies incluse (Chatin, 1896a ; Alsheikh, 1994 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2002 ; Slama *et al.*, 2006 ; sites web 2 ; 4).

***Terfezia claveryi* Chat. 1891.** Connue sous le nom « Et'terfesse Lak'hel » qui se traduit par « Les terfesses noires » Synonyme : *Terfezia hafizi* Chat. 1892. **Ascome** hypogés, subglobuleux ou cornés (parfois napiformes ou gibbeux, lobé, de forme irrégulière), de 3 à 12 cm. **Péridium** lisse au début, puis +/- craquelé. de 1–1.5(–3) mm d'épaisseur, de couleur d'abord saumon ocre, puis rouge brun à quasi noire avec l'âge, de section blanc rosâtre. **Glebe** solide, charnue et moite, avec poches fertiles polygone, isodiamétrique ou allongée,

de couleur d'abord rose pâle puis rose saumon, séparées par des veines stériles blanc rosâtre imperceptibles à maturité. **Asques** hyalins, non amyloïdes, subglobuleux, ovoïdes ou piriformes, de 70–100 x 50–70 µm, aléatoirement disposés dans les poches fertiles. **Ascospores** (6–8 / asques) d'abord hyalines puis jaunâtres, globuleuses, avec verrues arrondies minces s'élargissant avec l'âge donnant à la spore un aspect réticulé, diamètre de (17–)18–21(–23) µm verrues incluses, (Alsheikh, 1994 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; Bradai *et al.*, 2014a ; sites web 2 ; 5).

***Terfezia leptoderma* Tul. 1851.** Elle était considérée synonyme de *Terfezia olbiensis* Tul. 1851, prise pour une forme immature de *Terfezia leptoderma*, jusqu'à ce que Bordallo *et al.* (2013) les prouvent distinctes. **Ascomes** similaire à *T. arenaria* mais plus petits (3.5 à 4 cm secs). **Péridium** lisse à pubescent, rosâtre puis rouge brun, brun foncé avec des tâches noires à maturité, de faible épaisseur, de section jaune pâle à brun clair. **Gleba** solide, charnue, avec poches fertiles blanchâtres au début, verdâtre à maturité, séparées par des veines stériles blanches nettement distinguable à maturité. **Asques** non amyloïdes, subglobuleux, de 60–90 x 50–60 µm, sessiles ou dotés d'un court pédicelle, avec 6-8 ascospores. **Ascospores** globuleuses, de 18–27 µm (verrues ou épines fines incluses), n'atteignant pas toutes simultanément la maturité (Alsheikh, 1994 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Moreno *et al.*, 2002 ; sites web 6 ; 7).

***Tirmania nivea* (Desf.) Trappe 1971.** Connue comme tous les *Tirmania* par « terfesses labyed » ou « terfesses blanches ». Synonymes : *Tuber niveum* Desf. 1823 ; *Terfezia africana* (Chatin) Maire 1916. **Ascomes** hypogés, subglobuleux à pyriformes, de 4–8(–10 ou plus) cm. **Péridium** lisse, blanc jaunâtre à jaune brun à maturité, de 1.5–2 mm d'épaisseur, de section blanc jaunâtre. **Gleba** charnue, solide, blanc jaunâtre, avec des veines d'un blanc cassé. **Asques** hyalins, amyloïdes, ellipsoïdes à ovoïdes, de 95–110 x 45–50 µm (Moreno *et al.*, 2000), ou 56–73 x 38–47 (Bradai *et al.*, 2014 a). **Ascospores** ((4)/8 / asque) de 16–18 x 12.5–14 µm, hyalines, lisses, ellipsoïdes, à paroi épaisses, avec de grosses goulettes lipidiques (Alsheikh et Trappe, 1983 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Moreno *et al.*, 2000 ; Díez *et al.*, 2002 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; Bradai *et al.*, 2014a ; sites web 2 ; 7 ; 8).

***Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon 1973.** Synonyme : *Terfezia pinoyi* Maire 1906. **Ascomes** hypogés, subglobuleux à cornés. **Péridium** d'abord jaune, puis brun ou rouge brun, à surface glabre, ridé ou craquelée. **Glebe** blanche à rose pâle.

Asques amyloïdes, obovoïdes à piriformes, de 51–110 x 38–63 µm, avec (4–)8 spores. **Ascospores** globuleuses, hyalines, entourées d'une double paroi. Mesurant 15–20 µm de diamètre, réticulées avec de minuscules verrues (Alsheikh et Trappe, 1983 ; Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; site web 9 ; 10).

Picoa carthusiana Tulasne 1851. Synonyme : *Leucangium ophthalmosporum* Quélet. **Ascomes** globuleux, irréguliers, tubériformes, légèrement et irrégulièrement lobés, bosselé, de 1.5–8 cm de diamètre. **Péridium** velouté à granuleux-feutré, pourpre-violet très foncé à presque noir, légèrement crevassé, de 1 mm d'épaisseur. **Gleba** finement granuleuse, charnue, assez ferme, plus molle à maturité et très aqueuse, blanc crème puis tachetée de noire et marbrée à maturité, d'une forte odeur très aromatique +/- désagréable et forte surtout à la dessiccation. **Asques** ellipsoïdes, irrégulièrement disposés dans la glèbe, de 80–110 x 65–85 µm, avec 6/8 spores. **Ascospores** lisses, citriformes à fusiformes, incolores puis brun jaune à maturité, de paroi épaisse (2–3 µm), de 60–80 x 20–35 µm de diamètres (Laurent, 1996 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; site web 11 ; 12).

Picoa juniperi Vittadini 1831. Synonyme : *Picoa juniperina* Tul. 1851. **Ascomes** subglobuleux, assez réguliers, de 0.5–7 cm. **Péridium** (rappelle la truffe d'été) couvert de verrues polygonales, aplaties, avec dépression au sommet, de 4 mm de large. **Gleba** blanche, avec veines blanches, d'odeur douce et gout plaisant rappelant la noix de coco. **Asques** subglobuleux, de 90–150 x 40–70 µm, renfermant 6–8 spores par asque. **Ascospores** hyalines, sphériques, parfois ellipsoïdes, d'abord lisses, puis pointillées, avec une large gouttelette, mesurent 22–28 (32) x 22–25 (28) µm (Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Sbissi *et al.*, 2010 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; site web 2).

Picoa lefebvrei (Pat.) Maire 1906. Synonymes : *Phaeangium lefebvrei* Pat. 1894. **Ascomes** subglobuleux, assez irréguliers surtout quand ils poussent ensemble (cas le plus fréquent), de 0.5–5 cm. **Péridium** de 180–300 µm d'épaisseur, brun à noir (nuance rougeâtre), avec verrues polygonales, aplaties dotées de dépression au sommet, régulièrement distribuées sur le péridium. **Gleba** solide, blanche avec des veines blanches, d'odeur douce, forte et plaisante, et un gout de noix de coco. **Asques** subglobuleux, de 90–140x40–62 µm, avec pédicelle de 50 x 8 µm, et (2–)4–8 spores (le plus souvent entre 7 et 8). **Ascospores** de 22–28x20–24 (/28–34 x 24–32) µm, globuleuses à ovales, hyalines avec grande gouttelette lipidique, dotées de grandes verrues éparses et de petites verrues denses (Moreno *et al.*, 2000 ; Sbissi *et al.*, 2010 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; Site web 2 ; 13 ; 14).

Tuber asa Tul. & C. Tul. 1851 : **Ascomes** sont irréguliers, globuleux, tubériformes, de 2–5(–7) cm de diamètre. **Péridium** quasi lisse, jaune ocre avec des spots brun rougeâtre. **Glebe** jaunâtre, grise à beige, avec des veines blanchâtre, d'odeur généralement non plaisante, semblable à celle du bois pourri, parfois plaisante. **Asques** hyalins, subglobuleux à ellipsoïdes, de 70–95 µm aléatoirement insérés dans les poches fertiles, sessiles ou munis d'un court pédicelle, enfermant 1–4(–5) spores. **Ascospores** globuleuses à ellipsoïdes, jaunes puis brunes à maturité, de 25–45 x 22–40 µm, avec réticulum alvéolé formant des mailles polygonales de 1–3(–5) µm (Agnello et Kaounas, 2011 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Alvarado *et al.*, 2012).

Tuber gennadii (Chatin) Pat. (1903). Synonymes : *Terfezia gennadii* Chatin 1886, *Loculobuter gennadii* (Chatin) Trappe (1992). **Ascomes** très petits de 1–4 cm, et de 8–15 g, irréguliers, globuleux et tubériformes. **Péridium** lisse ou pubescent, gris jaunâtre avec des spots brun ocre. **Gleba** d'abord grisâtre puis brun noir, avec de très petites loges de 0.2–1 mm de large, séparées avec de larges veines blanchâtres, à odeur et saveur peu sensibles, non plaisante (rappelle le fromage mûr). **Asques** de 100–150 x 50–90 µm, hyalins, claviformes à ellipsoïdes avec de longs pédoncules. **Ascospores** (1–3(–4)/ asque) jaunâtres à brunâtre, globuleuses, ellipsoïdes à cirtiformes, de 32–42(55) x 25–32(35) µm, avec réticulum hexagonal rigide de 3 à 5 ou 7 µm de large. Espèce caractérisée par les paraphyses (cellules filamenteuses stériles intercalées entre les sporocystes) fragmentées, plus longues ou plus courtes que les asques, avec un apex élargi de 3–6 (8) µm (Alsheikh, 1994 ; Agnello et Kaounas, 2011 ; Loizides *et al.*, 2011 ; Alvarado *et al.*, 2012 ; site web 2 ; 15).

Tuber oligospermum (Tul. et C. Tul.) Trappe 1979. Synonymes : *Terfezia oligosperma* Tul. et C. Tul 1851. **Ascomes** hypogés, subglobuleux, souvent gibbeux et lobés, de 3–6 cm de diamètre. **Péridium** blanc sale à brun, glabrescent (d'abord pubescent puis lisse à maturité), craquelé après dessiccation, de 150–200 µm d'épaisseur. **Glebe** ferme, solide, d'abord blanchâtre, puis brun claire, foncée à maturité, marbrée de veines stériles blanches et irrégulières, rayonnant à partir du centre, d'odeur d'abord plaisante puis non plaisante et acétylénique à maturité. **Asques** subglobuleux à ovoïdes, de 70–100 (130) x 60–80 (90) µm, de parois épaisses (1–2 µm), avec ou sans court pédicelle. **Ascospores** (1–4 / asque) globuleuses, de 29–52 µm (selon le nombre de spores par asque), jaunâtres, translucides, avec réticulum régulier à maillage polygonal (Moreno-Arroyo *et al.*, 2001 ; Agnello et Kaounas., 2011 ; Alvarado *et al.*, 2012 ; site web 16 ; 17 ; 18).



Fig. 2 Quelques espèces de terfesses

a, b : *Terfezia arenaria* (a : ascocarpe, b : ascospores ; site web 3), **c, d** : *T. boudieri* (site web 4), **e, f** : *T. claveryi* (site web 5), **g, h** : *T. leptoderma* (g : site web 6, h : site web 7), **i, j** : *Tirmania nivea* (site web 8), **k, l** : *T. pinoyi* (k : site web 9, l : site web 10), **m, n** : *Picoa carthusiana* (m : site web 11, n : site web 12), **o, p** : *P. juniperi* (site web 2), **q, r** : *P. lefebvrei* (q : site web 13, r : site web 14), **s, t** : *Tuber asa* (Agnello et Kaounas, 2011), **u, v** : *T. gennadii* (u : Loizides *et al.*, 2011, v : site web 15), **w, x** : *T. oligospermum* (w : site web 17, x : site web 18).

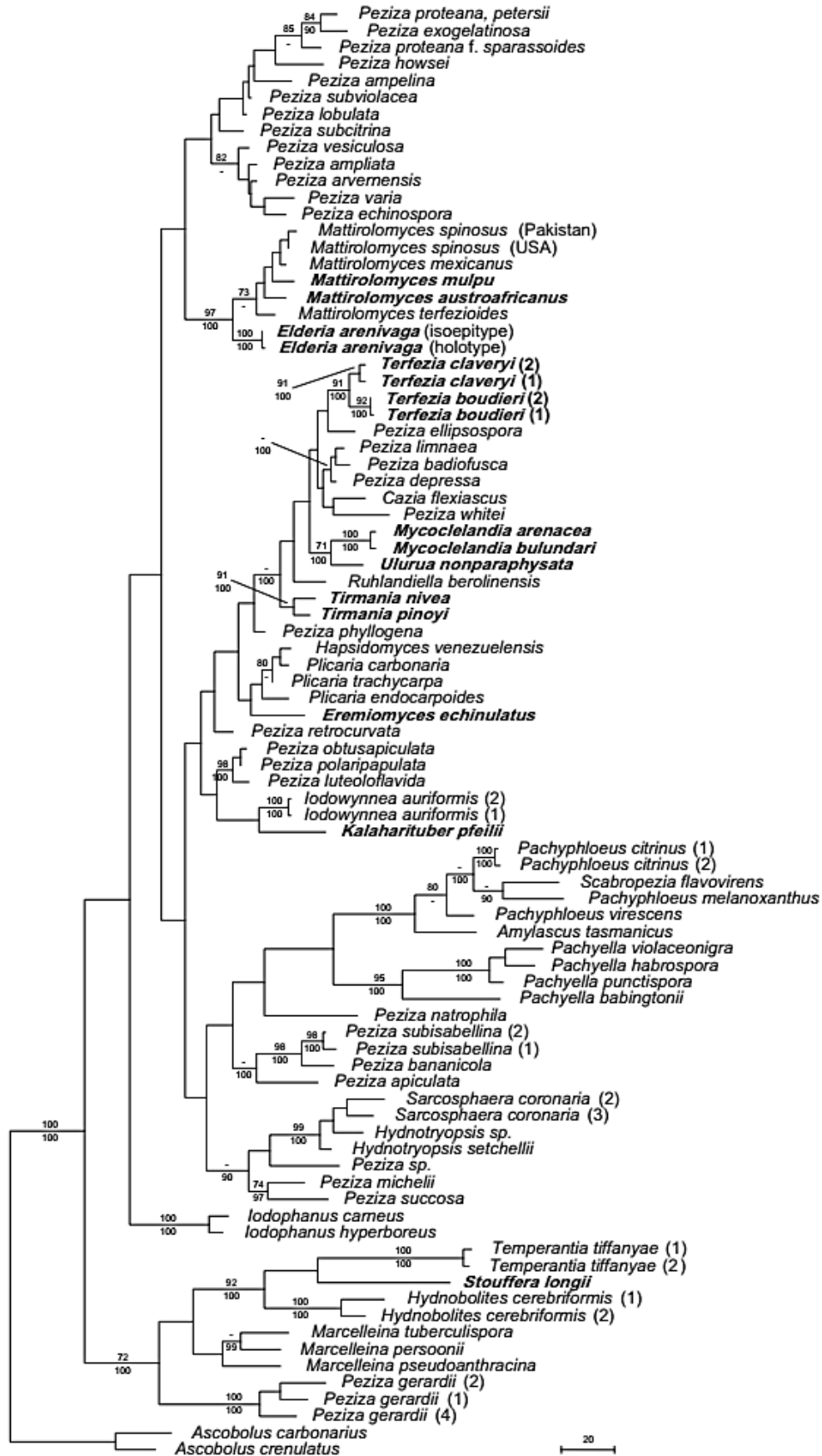


Fig. 3 Arbre généalogique des terfesses

(Kovács et Trappe, 2014)

Díez *et al.* (2002) ont authentifié la relation génétique étroite entre *Terfezia* et *Tirmania* et ont transféré le genre *Choiromyces* de la famille Pezizaceae à la famille Tuberaceae.

Læssøe et Hansen (2007) ont étudiés les genres : *Kalaharituber* et *Eremiomyces* nouvellement connus. Ils les ont déplacés de la famille Tuberaceae à la famille Pezizaceae avec *Terfezia*, *Tirmania* et *Mattiolomyces* (Percudani *et al.* 1999 ; Hansen *et al.* 2001 ; Díez *et al.* 2002 ; Læssøe et Hansen, 2007).

Le genre *Picoa* autrefois classé dans l'ancienne famille Balsamiaceae après avoir été attribué à la famille Terfeziaceae puis Eutuberaceae anciennement rangée dans l'ordre Tuberales (Muller, 1995), a été étudié par Sbissi *et al.* en 2010 et a été rangé dans la famille Pyronemataceae, conformément à ce qu'ont avancé Tedersoo *et al.* (2010) concernant la position taxonomique de ce genre. Dans la même famille, on trouve également le genre *Phaeangium* parfois considéré synonyme de *Picoa* (Maire, 1906 ; Moreno *et al.*, 2000).

Le genre *Balsamia* est classé dans la famille Helvellaceae et les genres *Reddelomyces* et *Choiromyces* avec *Tuber* dans la famille Tuberaceae (Alsheikh et Trappe, 1983 ; Kovács et Trappe, 2014).

◆ Outre les terfesses Ascomycètes

Selon Trappe *et al.* (2010), *Horakiella watarrkana* serait la seule terfesse Basidiomycètes, alors que Moreno *et al.* (2014) mentionnent plusieurs espèces à savoir : *Descomyces albus* (Brek.) Bougher et Castellano, *Hydnangium carneum*. Wallr., *Hymenogaster luteus* Vittad, *Hysterangium cistophilum* (Tul.) Zeller et C.W. Dodge... (Fig. 4).

D'après ces mêmes auteurs, les terfesses sont subdivisées en trois groupes : terfesses Ascomycètes (Les plus connues), terfesses Basidiomycètes (dont les espèces citées ci-haut) et quelques espèces de Zygomycètes considérées comme terfesses. Ces dernières sont principalement caractérisées par l'absence du corps fructifère, et ne présentent que des spores dispersées dans le sol. Il en existe néanmoins, certaines espèces chez qui on remarque la présence d'ascocarpe. Elles appartiennent aux genres : *Endogone*, *Sclerogone* et *Youngiomyces* (Endogonaceae), *Gigaspora* (Gigasporaceae) et *Glomus* (Glomeraceae).

5. Les symbioses à terfesse

Les symbioses sont des relations à bénéfice mutuel entre deux ou plusieurs organismes vivants, principalement des microorganismes et des plantes ou animaux. Parmi ces symbioses, celles



Fig. 4 Terfesses non Ascomycètes

a, b : *Descomyces albus* (site web 19), **c, d** : *Hydnangium carneum* (site web 20) , **e, f** : *Hymenogaster luteus* (site web 21), **g, h** : *Hysterangium cistophilum* (site web 22).

connues sous le nom de « Mycorhizes » sont établies entre certains champignons et les racines de plantes vertes dites « hôtes ». Dans la nature, la colonisation mycorhizienne peut être extra et/ou intracellulaire, ce qui donne naissance à trois différents types de mycorhizes : Les éctomycorhizes, les endomycorhizes et les éctendomycorhizes (Fig. 5). Ces relations symbiotiques sont établies avec différentes espèces de plantes, et le type de la relation est sujet à plusieurs facteurs.

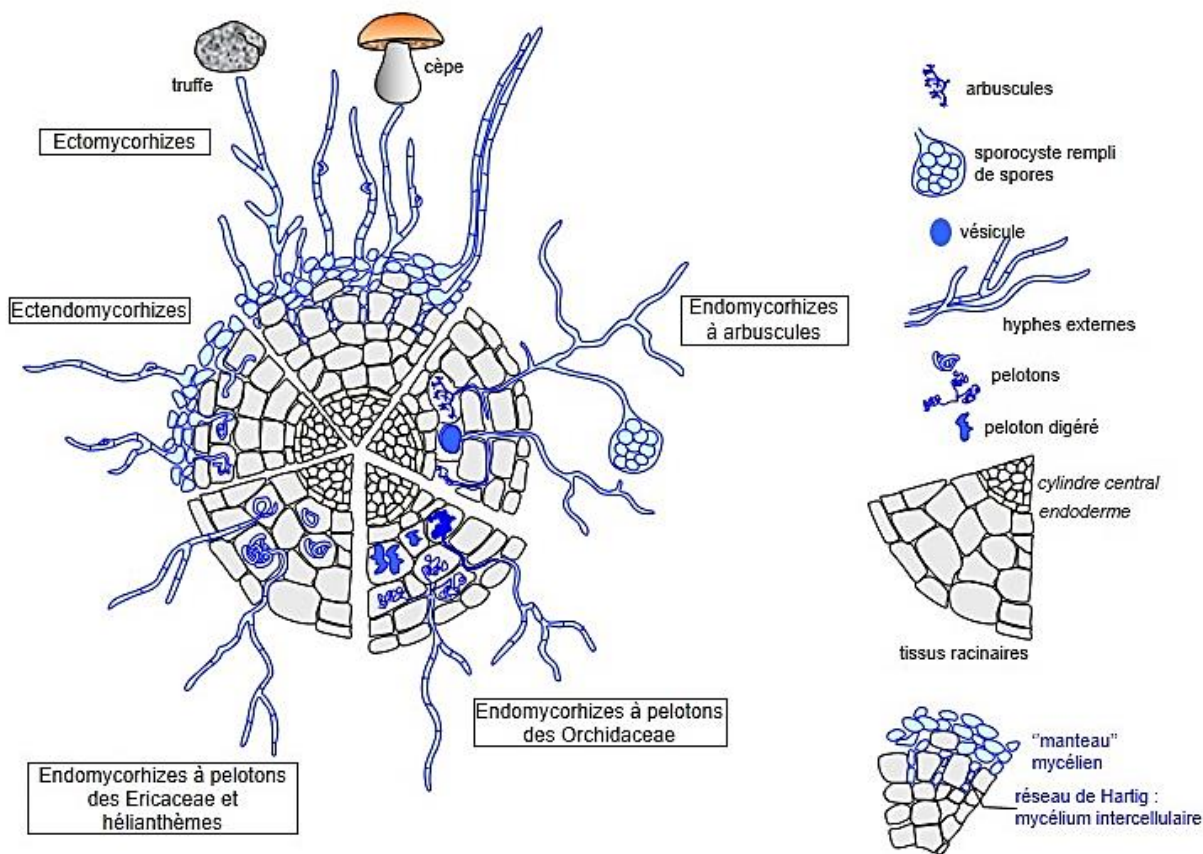


Fig. 5 Types de mycorhizes dans la nature

(Site web 23)

5.1 Les types de mycorhizes à terfesses

À l'égard de tous les champignons mycorhiziens, les terfesses peuvent former des ecto-, des endo-, ou des éctendomycorhizes (Fig. 6).

5.1.1 Les éctomycorhizes

Associations caractérisées par la présence d'hyphes intercellulaires formant ce qu'on appelle le réseau intercellulaire de Hartig, et des hyphes extra-racinaires qui entourent les cellules du cortex formant parfois un véritable manteau fongique.

Ce type de système mycorhizien a été observé sur substrat riche en phosphate, par Fortas et chevalier (1992a) qui ont étudié l'influence de la fertilité du substrat sur le système mycorhizien de l'hélianthème à goutte (*Helianthemum guttatum*) inoculé par *Terfezia arenaria* et *T. claveryi*. L'éctomycorhize ainsi formée montre le réseau de Hartig mais pas de manteau fongique.

Le même résultat a été observé en pots sous serre par Gutiérrez *et al.* (2003) sur les racines de *H. almeriense* mycorhizées par *T. claveryi* et *Picoa lefebvrei*. Au cours de la même expérience,

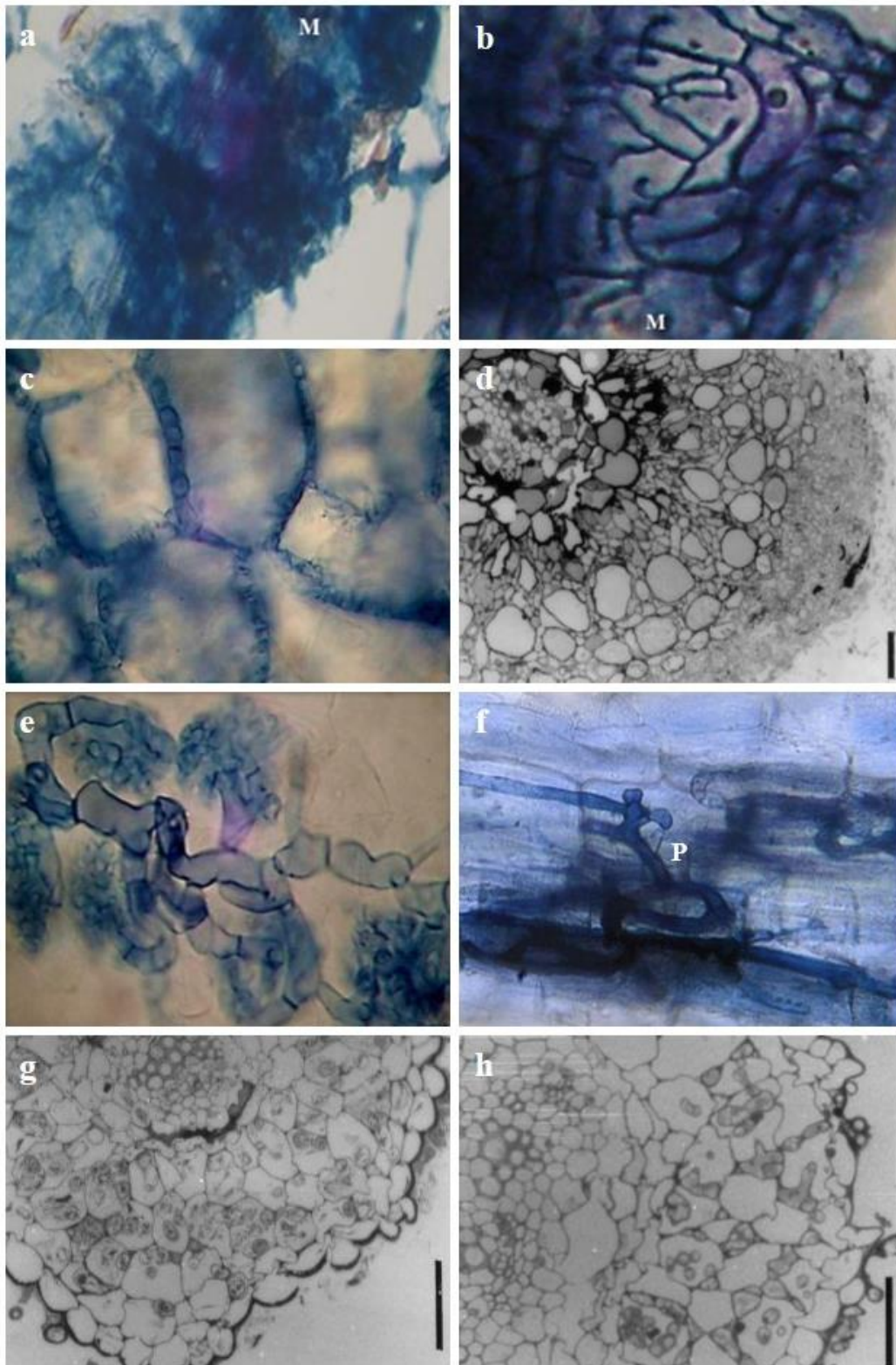


Fig. 6 Les mycorhizes à terfesses

a, b : éctomycorhizes montrant le manteau fongique (M), **c** : éctomycorhizes montrant le réseau de Hartig, **d** : coupe ultrafine au niveau d'une éctomycorhize, **e, f** : endomycorhizes montrant les hyphes intracellulaires (P : peloton), **g** : coupe ultrafine au niveau d'une endomycorhize, **h** : coupe ultrafine au niveau d'une ectendomycorhizes. (a, b, c, e : Zitouni *et al.*, 2014 ; d, g, h : Gutiérrez *et al.*, 2003 ; f : Dafri et Beddiar, 2017).

ces auteurs ont également décrit, pour la première fois, des éctomycorhizes avec manteau fongique sur ces mêmes associations mycorhiziennes sous conditions contrôlées (*in vitro*).

Par ailleurs, Zitouni *et al.* (2014) ont mentionné pour la première fois des éctomycorhizes avec manteau sur une inoculation *in vivo* de *Pinus halepensis* par *Terfezia leptoderma*.

5.1.2 Les endomycorhizes

Ce sont des relations mycorhiziennes caractérisées par des hyphes intracellulaires, formant des pelotons ou, rarement chez les terfesses, des arbuscules.

Les endomycorhizes à arbuscules ont été observées par Awameh *et al.* (1979) sur les racines de *H. ledifolium* et *H. salicifolium* inoculées *in vivo* par *Terfezia boudieri*, *T. claveryi* et deux autres espèces du genre *Tirmania*.

Le système endomycorhizien a également été décrit par Gutiérrez *et al.* (2003) sur les racines des mêmes plantes (*H. almeriense*) citées ci-avant (5.1.1) récoltées des truffières naturelles de Murcie, Espagne.

Des hyphes intracellulaires semblables aux arbuscules ont également été observés par Zitouni *et al.* (2014) sur les racines de *H. ledifolium*, *H. lippii* et *Fumana procumbens* inoculées par *T. leptoderma* et *T. claveryi*. Ces auteurs ont mentionné sur les mêmes racines des hyphes intracellulaires formant des pelotons. De telles structures ont été précédemment observées sur les racines de *Tuberaria guttata* naturellement mycorhizées par *Terfezia sp.* récoltées des dunes littorales du Nord-Est algérien (Dafri et Beddiar, 2017).

5.1.3 Les éctendomycorhizes

Ce sont, comme leur nom l'indique, des systèmes mycorhiziens intermédiaires entre les écto- et les endomycorhizes. Elles sont caractérisées par le réseau de Hartig et des hyphes intracellulaires.

Fortas et Chevalier (1992a) au cours de l'expérience précédemment citée (5.1.1), ont observés à faible pourcentage du phosphate, des ectendomycorhizes avec un réseau de Hartig et des hyphes intracellulaire formant des pelotons.

Ce type mycorhizien a également été observé par Gutiérrez *et al.* (2003), en plus des éctomycorhizes, sur les racines de *H. almeriense* produites en pots sous serre.

Il est à signaler que ces trois différents types de mycorhizes peuvent être présents sur la longueur de la même racine formant ce que Navarro-Ródenas *et al.* (2012) ont appelés « *continuum d'ectendomycorhizes* ».

5.2 Le partenaire vert des mycorhizes à terfesse

Dépourvues de chlorophylle et incapables de photosynthèse, les terfesses sont, tel que cité ci-avant, des symbiotes obligatoires de nombreuses plantes herbacées, arbustives ou plus rarement encore arborescentes appartenant à différentes familles végétales.

Parmi ces familles, la famille Cistaceae représente une des plus importantes par le genre *Helianthemum* dans lequel on dénombre : *H. aegyptiacum*, *H. almeriense*, *H. apenninum*, *H. eremophilum*, *H. ledifolium*, *H. lippii*, *H. salicifolium*, *H. sessiliflorum*, *H. violaceum*, le genre *Tuberaria*, représenté notamment par *Tuberaria guttata*, ainsi que certains arbustes du genre *Cistus* à savoir : *Cistus albidus*, *C. halimifolius*, *C. monspeliensis*, *C. salviaefolius* (Bokhary et Parvez, 1992 ; Fortas et Chevalier, 1992b ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Læssøe et Hansen, 2007 ; Morte *et al.*, 2008 ; Turgeman *et al.*, 2011 ; Bordallo *et al.*, 2013 ; Zitouni *et al.*, 2014).

Les terfesses forment des relations mycorhiziennes également avec des conifères comme le genévrier (arbuste du genre *Juniperus*, hôte des terfesses du genre *Picoa* (Muller, 1995)), et des arbres de la famille Pinaceae, tel que *Pinus halepensis*, *P. pinaster* var. *atlantica* (Plante hôte de *Tuber oligospermum* et des terfesses du genre *Delastria*), *P. radiata* et *P. canariensis*, ou certains arbres feuillus de la famille Fagaceae, notamment le chêne vert (*Quercus ilex*), le chêne kermès (*Quercus coccifera*) et le chêne pubescent (*Quercus pubescens*, plante hôte de *Terfezia leptoderma*) (Alsheikh, 1994 ; Díez et Manjón, 2001 ; Chevalier, 2014), ou des arbres du genre *Acacia*, symbiotes des terfesses du genre *Eremiomyces* (Riley, 1963 ; Ferdman *et al.*, 2005).

Elles peuvent également s'associer à des Astéracées telles : l'armoise blanche : *Artemisia herba-alba*, un arbuste steppique symbiotique des terfesses, potentiellement parasitée par *Terfezia claveryi* qui attaque la plante et la fait périr (Duggar et Pinoy, 1907).

Il est possible de citer également (sans exhaustivité), une autre astéracée : *Atractylis serratuloïdes* (chaméphyte), une papilionacée : *Robinia pseudoacacia* (Plante hôte de *Terfezia terfezioides*), des géraniacées du genre *Erodium*, des tamaris (*Tamarix sp.*), la passerine hérissée (*Thymelae hirsuta*), le plantain blanchissant (*Plantago albicans*)... (Maire, 1906 ; Chevalier, 2014).

5.3 Facteurs influençant le type de mycorhizes

L'élaboration d'un type de mycorhize ou d'un autre a été attribuée par les chercheurs à différents facteurs à savoir : les conditions de cultures, les ions, les hormones, et le microclimat.

L'effet des conditions de culture sur la mycorhization a été rapporté par Gutiérrez *et al.* (2003) qui ont observé sur les racines de *Helianthemum almeriense* en plein champs des endomycorhizes, sous serre des ectomycorhizes sans manteau et *in vitro* des ectomycorhizes avec manteau. Ces auteurs ont expliqué ces différences dans le type de par l'humidité du sol ou l'humidité relative dans le milieu. La formation du manteau *in vitro* a été attribuée au diamètre étroit des tubes à essai utilisés dans la culture ainsi qu'à la bonne croissance du mycélium sur le milieu Morte-Honrubia (MH) riche en saccharose.

Parmi les ions, celui dont l'influence sur le système mycorhizien a été le plus étudié est l'ion phosphate. Fortas et Chevalier (1992a) ont avancés que les faibles concentrations en phosphate donnent des endomycorhizes tandis qu'une bonne fertilité aboutit à des ectomycorhizes sans manteau. Cependant, Navarro-Ródenas *et al.* (2012) ont trouvé que le phosphate influence l'ampleur de la mycorhization mais pas son type. En 2008 Kagan-Zur *et al.* qui ont étudié l'influence de divers ions ont montré, qu'outre le phosphate, le fer et les nitrates sont également susceptibles d'avoir un effet sur le type de la mycorhization.

Les auxines sont les principales hormones excrétées par le champignon, dont l'effet sur le type de la relation symbiotique a été étudié. Dexheimer *et al.* (1985) et Gea *et al.* (1994) ont avancé que des valeurs élevées de ces phytohormones libèrent dans les parois cellulaires des protons qui diminuent le pH de ces dernières, ce qui augmente leur élasticité et facilite ainsi la pénétration du mycélium fongique à l'intérieur des cellules de la racine de la plante hôte, favorisant donc la formation d'endomycorhizes.

L'effet combiné Auxine-Phosphate a également été étudié par Wenkart *et al.* (2001) qui ont déduit ce qui suit :

- La combinaison de concentrations élevées en phosphate avec des concentrations élevées en auxine donne des endomycorhizes, tandis qu'avec des concentrations très faibles en auxines les mêmes concentrations en phosphate ne donnent aucune mycorhization.
- Les concentrations faibles en phosphate combinées à de fortes concentrations en auxines donnent des ectomycorhizes, alors que des concentrations faibles des deux éléments aboutissent à une endomycorhization.

Plusieurs études ont entrepris l'effet du microclimat sur le type de la mycorhization. Navarro-Ródenas *et al.* (2013) ont trouvé que le stress hydrique stimule et influence le type de la mycorhization : il se forme des éctomycorhizes et éctendomycorhizes en présence d'eau, et des endomycorhizes en déficit hydrique. D'après Itai (1999), le stress hydrique baisse les taux d'auxine et de cytokinine et augmente ceux de l'acide abscissique (ABA) et de l'éthylène. Ainsi, possible soit-il qu'en déficit hydrique l'ABA préserve l'extensibilité des cellules corticales permettant de ce fait la formation d'endomycorhizes (Roth-Bejerano *et al.*, 2014).

6. Cycle biologique

Le cycle biologique des terfesses ne semble pas s'être entièrement éclairci, beaucoup d'énigmes restent encore à élucider. Kagan-Zur *et al.* (2008) l'ont subdivisé en deux phases importantes (germination et fructification). Ces auteurs ont avancé qu'à l'égard de tous les ascomycètes, les terfesses ont des cellules mycéliennes multi-nucléées, ce qui rend problématique le nombre de ploïdie au cours des différents stades de développement. Si nous partons d'une spore, le cycle biologique pourrait se résumer comme suit (Roth-Berejano *et al.*, 2004 ; Kagan-Zur *et al.*, 2008) (Fig. 7).

6.1 Germination

En automne, et sous des conditions de pluie et de température adéquates, la spore mature germe et émet, par voie végétative, un mycélium primaire homocaryotique qui se développe dans le sol à proximité des racines des plantes hôtes.

À la rencontre de deux mycéliums homocaryotiques (de signes opposés + et -), les cytoplasmes de deux cellules s'unissent par plasmogamie et donne un mycélium hétérocaryotique ($n + n$).

La relation mycorhizienne du mycélium avec les racines de la plante-hôte, indispensable à la fructification, peut intervenir avant cette phase de plasmogamie (par le mycélium homocaryotique), aussi bien qu'après (par le mycélium hétérocaryotique) (Roth-Berejano *et al.*, 2004).

Les hyphes hétérocaryotiques ($n + n$) subissent une caryogamie ; les paires de noyaux s'unissent à l'intérieur des cellules, et aboutissent à des hyphes diploïdes ($2n$), dont l'agrégation donne potentiellement le primordium à l'origine de l'ascocarpe ou corps fructifère.

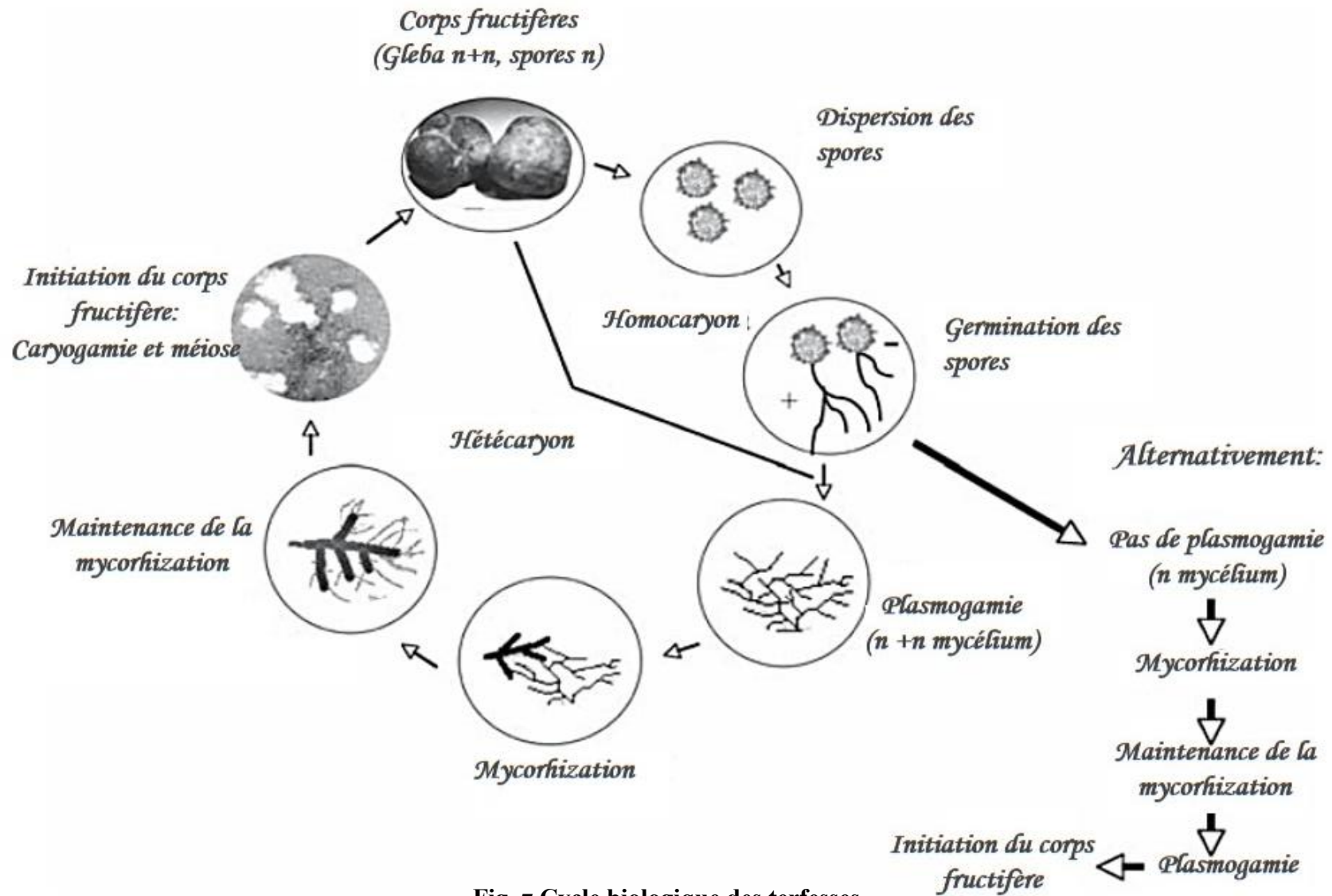


Fig. 7 Cycle biologique des terfesses

(Kagan-Zur *et al.*, 2008)

6.2 Fructification

Même si les phases du cycle biologique sont presque les mêmes avancées par différents chercheurs, les avis de ces derniers divergent quant à la mycorhization. Fortas et Chevalier (1992b) pensent que la mycorhization est possible tant pour le mycélium monosporique (issu de la germination d'une seule spore) que multisporique (issu de la germination de plusieurs spores). Roth-Bejerano *et al.* (2004) ont montré que chez *Kalaharituber pfeili* les hyphes stériles sont hétérocaryotiques issues de mycélium multisporique tandis que les hyphes homocaryotiques sont monosporiques. Ils ont également montré que les mycéliums primaire et secondaire sont tous deux capables d'établir avec les racines de la plante hôte une mycorhization. Toutefois, on ignore toujours à quel stade du cycle la plasmogamie aurait-elle lieu si la mycorhization s'effectue avant, par le mycélium primaire.

Ce qui semble bien évident serait le fait que le corps fructifère soit issu d'hyphes hétérocaryotiques binucléées en provenance des racines mycorhizées (Roth-Bejerano *et al.*, 2004 ; Fortas et Chevalier, 1992b ; Kües et Liu, 2000).

Ces hyphes s'enroulent en une masse sphérique de 1 à 2 mm donnant, après différenciation cellulaire, naissance au primordium comportant tous les tissus présents dans un corps fructifère mature dont il est l'ébauche (Kües et Liu, 2000). La méiose (éventuellement en relation avec la différenciation) aurait lieu pendant la formation du primordium, avant la création des ascospores (Roth-Bejerano *et al.*, 2004).

Plusieurs chercheurs pensent que la formation de ce primordium est favorisée par un pédoncule de taille allant de 2 à 15 cm, constitué d'agrégats de mycéliums lâches, de racines et de particules de terre (Kües et Liu, 2000 ; Awameh et Alsheikh, 1979). Ce pédoncule jouerait un rôle important dans la nutrition des tubercules au cours de leur développement (Chatin, 1892a). Awameh et Alsheikh (1979) ont référé à cet agrégat lié aux ascocarpes de *Terfezia* et *Tirmania*, par l'appellation « nombril-navel ». En outre, Kovács *et al.* (2007), qui ont remarqué la présence de ces agrégats liés aux racines des plantes hôtes de *Mattiolomyces terfezioides*, trouvent que ces structures rappelant celles formées par les morilles, pensent qu'elles pourraient ainsi être considérées comme des sclérotés et leur attribuent un rôle important dans la protection du tubercule pendant l'hiver.

Un caractère commun chez les terfesses, est l'abondance au niveau du peridium et de la glèbe, de cellules larges et gonflées à paroi mince. (Alsheikh et Trappe, 1983 ; Alsheikh, 1994 ; Trappe et Weber, 2001). Contrairement à ce que l'on pourrait croire, ces structures ne sont pas efficaces

dans la rétention d'eau, mais ont la capacité d'en capter de grandes quantités, assurant ainsi à l'intérieur du primordium l'humidité nécessaire à la sporogénèse (Trappe *et al.*, 2008). Au cours du processus de développement, l'ascocarpe tire l'énergie nécessaire de la dégradation des polysaccharides de stockage (Kües et Liu, 2000). Ce dernier, peut, à un certain stade de développement, devenir indépendant de la mycorhize élaborée avec la plante hôte (Navarro-Ródenas *et al.*, 2009).

Une fois les ascocarpes matures, le pédoncule, qui y est lié, devient de plus en plus délicat et finit bien souvent par s'en séparer. Ainsi, rares sont les tubercules pédicellés à la récolte, sinon celle-ci faite très soigneusement (Chatin, 1892a ; Kovács *et al.*, 2007 ; Kagan-Zur et Roth-Bejerano, 2008).

6.3 Pérennité

À la fin de la saison, les ascocarpes non récoltés, formés d'une multitude d'asques renfermant des ascospores, explosent sous l'effet de leur teneur en urée qui augmente leur pression osmotique. Les asques s'ouvrent et les spores se libèrent dans le sol et se disséminent.

D'après les chercheurs, la dissémination des spores serait assurée par plusieurs agents. Læssøe et Hansen (2007) invoquent le rôle de certains mammifères, notamment des rongeurs (marsupiaux, campagnols et tamias), des sangliers et des cerfs, dans la dissémination des ascospores de terfesses. D'après Claus *et al.* (1981) ces animaux seraient attirés par les composés volatiles semblables aux phéromones, libérés par les tubercules mûrs.

Læssøe et Hansen (2007) et Trappe *et al.* (2008) suggèrent respectivement des oiseaux (les alouettes et les huppés) et des insectes, comme vecteur de la dissémination des spores à terfesses. Outre les animaux, on attribue ce rôle de dispersion aux vents secs qui transportent les ascospores libérées des ascocarpes séchés (Díez *et al.*, 2002).

Kües et Liu (2000) pensent, qu'en plus de leur rôle dans la sporogénèse, les cellules gonflées à paroi mince qui se trouvent en abondance dans le périidium et la glèbe, ont également un rôle important dans la dispersion des ascospores.

La dissémination des spores ne permet pas uniquement la propagation de l'espèce, mais également sa pérennité. Grâce à l'occupation de nouveaux terrains favorables à la survie de l'espèce, les spores ont plus de chance à germer et à refaire le cycle en cas d'éventuelles dégradations des terrains autrefois propices au développement et à la fructification du champignon. La pérennité de l'espèce serait ainsi assurée.

7. Les terfesses dans le monde

Le nom « truffes du désert » est à la fois informatif et trompeur. Il est en relation étroite avec l'histoire du champignon et révèle une importante partie de sa distribution : le désert, climat aride ou semi-aride et sol sablonneux (Alsheikh, 1994 ; Trappe, 1990 ; Fortas et Chevalier, 1992a ; Morte *et al.*, 2000 ; Díez *et al.*, 2002 ; Morte *et al.*, 2009 ; Kovács et Trappe, 2014 ; Bradai *et al.*, 2014). Cependant, à cause de ce nom, on croirait que le champignon est exclusif des régions désertiques, alors que sa distribution est beaucoup plus vaste. Il pousse dans les cinq continents dans des régions pas toutes dominées par le même type de climat et de sol (Bonifacio et Morte, 2014).

Les sols sablonneux sur lesquels croient les terfesses sont en général, légèrement limoneux, profonds et drainants, à pH acide à neutre, mais surtout non perturbés.

Néanmoins, la texture sableuse n'est pas la seule à laisser pousser des terfesses, bien qu'elle en soit la plus appropriée. Des terrains limoneux et caillouteux le permettent aussi, mais en spécifiant un aspect différent du peridium. En effet, les textures sableuse et limoneuse donnent des truffes à peridium lisse tel que la quasi-totalité des terfesses. Tandis que, les truffes avec un peridium à écailles, semblent être adaptées aux sols caillouteux plus résistants à la pénétration.

La température du sol sur une bonne année à terfesse oscille entre plus de 15 °C vers la fin Avril et plus de 23 °C de juin à septembre. Une température du sol inférieure à 15 °C jusqu'à la mi-juin chute considérablement la production (Callot, 1999).

En termes de climat, les terfesses ne supportent donc, ni de longues périodes froides, ni des sécheresses prolongées. Cette sensibilité aux conditions climatiques s'explique par une longue période de fructification sous terre (Callot, 1999), durant laquelle, tout excès de température, d'humidité et/ou de déshydratation est funeste à leur développement.

Les relations entre la production de truffes et les facteurs climatiques sont toutefois difficiles à établir. Cependant, les études de l'influence des facteurs climatiques sur la production truffière confirment le bienfait des pluies du mois d'août et permettent de dégager les caractéristiques climatiques des bonnes et des mauvaises années de production.

Les années de fortes productions sont des années chaudes et humides, avec une alternance de fortes pluies et de périodes de sécheresse n'excédant pas une vingtaine de jours.

Les années de faibles productions sont des années avec des périodes de sécheresse prolongées au printemps et/ou en été.

Les caractéristiques moyennes des climats sous lesquels on récolte des terfesses en Afrique du Nord sont les suivantes :

- Une pluviométrie automnale variant entre 40 et 60 mm bien répartis d'octobre à mars, et une pluviométrie d'environ 15 mm au mois de mars.
- Une température moyenne se situant entre 14 et 18 °C de mars à mai (Khabar *et al.*, 2001).

Si les conditions générales de leur prolifération sont les mêmes, les régions productrices des terfesses dans le monde, ont tout de même quelques spécificités l'une par rapport à l'autre.

Les régions désertiques productrices des terfesses s'étendent sur le Sahara du grand Maghreb (désert d'Afrique du Nord), l'Afrique du Sud, le désert de la Namibie, le désert du Kalahari, le moyen orient, le Sud asiatique, une partie des USA et le Mexique. Les terfesses de ces régions prolifèrent sous climat désertique chaud (type BWh selon la classification de Koppen-Geiger (Kottek *et al.*, 2006)), caractérisé par une température annuelle excédant 18 °C, et sols acides ou basiques à faible teneur en matière organique et présentant, pour certains, une conductivité électrique relativement élevée (Mathieu et Lozet, 2011 ; Bonifacio et Morte, 2014).

Au moyen orient, bien que le climat soit du type BWh également, le sol est considéré comme intermédiaire entre celui des régions désertiques et celui des régions méditerranéennes. Il diffère de ce dernier par le pH, plutôt basique (aux alentours de 9) au moyen orient et variant de 5 à 8 dans les régions méditerranéennes (Bonifacio et Morte, 2014).

Les variations climatiques entre les régions désertiques et Méditerranéennes ont également un impact sur la saison de croissance végétale entre les deux régions. Cette saison dure entre 0-103 jours dans les régions désertiques, tandis qu'elle est de 67-250 jours dans les régions méditerranéennes (Watson, 1992). Ceci, peut donc influencer la période de récolte du champignon d'une zone à l'autre.

En Europe et Afrique du Nord, mais aussi en Amérique (Californie, Chili...), et au Sud australien, les terfesses prolifèrent sous climat méditerranéen à été chaud (de type Cs). D'après la classification de Koppen-Geiger, ce type de climat est caractérisé par une température variant entre -3 °C et 18 °C dans le mois le plus froid de l'année. Les précipitations estivales mensuelles sont inférieures à 40 mm, pendant que celles hivernales sont au moins trois fois plus abondantes (Kottek *et al.*, 2006). Dans ces régions, les terfesses poussent sur une large gamme de propriétés édaphiques. Díez *et al.* (2002) ont rapporté la présence de terfesses, sur sols sablonneux, acides et basiques et ils ont expliqué cette tolérance par la simple adaptation des plantes hôtes aux

différents pH. D'après Bonifacio et Morte (2014), les variations de conditions édaphiques dans ces régions ne se limitent pas au pH, elles concernent également les proportions en matière organique, argile, limon, sable et carbonate de calcium aussi bien que les nutriments.

8. Les terfesses en Algérie

Les terfesses en Algérie sont représentées par des espèces toutes printanières dont la période de récolte est l'une des plus longues. Elle débute à la fin de l'hiver et se prolonge jusqu'à la fin du printemps (Fortas, 1990 ; Bradai *et al.*, 2014b ; Dafri et Beddiar, 2017).

8.1 Espèces identifiées

Les recherches sur les terfesses en Algérie invoquent la présence d'une dizaine d'espèces de différents genres : le genre *Terfezia* représenté par plusieurs espèces (*T. arenaria*, *T. boudieri*, *T. clavery*, *T. leptoderma* et *T. schweinfurthii* (mentionnée par Zitouni *et al.*, 2015)), le genre *Tirmania* avec deux espèces (*Tirmania nivea* et *Tirmania pinoyi*) et le genre *Picoa* avec principalement trois espèces (*P. carthusiana*, *P. lefebvrei* et *P. juniperi* (Fortas, 1990 ; Fortas et Chevalier, 1992a, b ; Aïbeche, 2008 ; Zitouni, 2010 ; Bradai *et al.* 2014a ; Zitouni *et al.*, 2015 ; Dafri et Beddiar, 2017), et le genre *Tuber* avec comme unique représentant : *Tuber gennadii* découvert pour la première fois en Algérie en 2012 (Dafri et Beddiar, 2017).

Ces espèces établissent leurs relations mycorhiziennes principalement avec des *Cistaceae* du genre *Helianthemum*, notamment : *H. guttatum*, *H. salicifolium* et *H. lippii* (Fortas, 1990 ; Ozenda, 1991 ; Fortas et Chevalier, 1992a ; Díez *et al.*, 2002 ; Bradai *et al.*, 2014a ; Dafri et Beddiar, 2017). Outre les hélianthèmes, Chatin (1869) a mentionné la présence des terfesses également sous cèdre du Liban (*Cedrus libani*).

8.2 Aire de répartition

En Algérie deux principales aires de répartition des terfesses ont été étudiées : les dunes littorales du Nord-Est algérien (Chap. 2) et les régions arides et semi-arides.

Les zones à terfesse des régions arides et semi-arides ont été entretenues dans plusieurs études (Fortas, 1990 ; Aïbeche, 2008 ; Zitouni, 2010 ; Dib-Bellahouel, 2012 ; Bradai *et al.* 2014a, b ; Zitouni *et al.* 2014, 2015). Ces études ont montré que ces zones sont caractérisées par des sols sablonneux, non salins de conductivité électrique variable entre 0.65 et 0.79 S.m⁻¹, majoritairement alcalins (pH ≈ 7.60–8.05), modérément calcaires (CaCO₃ entre 9.09 et 12.01 %), pauvres en matière organique (0.78–0.98 %) et pauvres en phosphore (23.42–25.54 ppm) (Bradai *et al.* 2014a, b). Zitouni (2010) mentionne pour *Terfezia claveryi* et *Tirmania nivea* des

sols riches en magnésium et pourvus en potassium. Les zones arides concernent principalement les wilayas de : Bechar, Tindouf, Biskra, Ghardaïa, Laghouat, Timimoune, Ouargla, Touggourt et Tamanrasset, tandis que celles semi-arides s'étendent sur les wilayas de : Mostaganem, Tlemcen, Tiaret, Saïda, Djelfa, El-Bayad, Naama, M'sila, Batna, Sétif et la Kabylie.

9. Terfesses toxiques ?

Contrairement à la plupart des champignons dont la cueillette exige impérativement l'intervention de spécialistes afin d'éviter le risque des espèces toxiques voir même mortelles, les terfesses ne présentent nullement ce danger.

Les recherches sur la composition chimique des terfesses ne mentionnent aucune vénéosité. Aucun composé toxique n'y a été détecté, au contraire, plusieurs composés bénéfiques ont pu en être extraits (voir section [10](#) de ce chapitre) (Ahmed *et al.* 1981 ; Bokhary *et al.*, 1989 ; Slama *et al.*, 2010).

Toutefois, deux espèces de « fausses truffes » *Balsamia vulgaris* Vitt. et *Choiromyces meandriformis* Vitt. (Fig. 8) ont été décrites comme non comestibles par Hall *et al.* (2007).

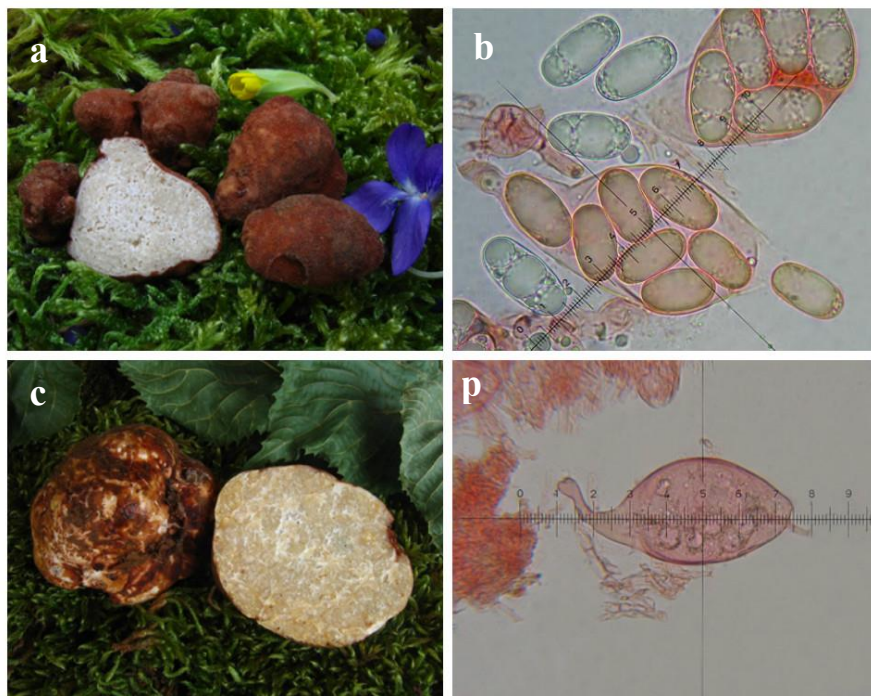


Fig. 8 Terfesses toxiques ?

a, b : *Balsamia vulgaris* (site web 24 ; **a** : ascocarpe , **b** : asque contenant des ascospores), **c, d** : *Choiromyces meandriformis* (site web 25 ; **c** : ascocarpe , **d** : asque contenant des ascospores).

Ces deux espèces ne sont pas des terfesses et n'appartiennent pas à la famille Terfeziaceae. Elles appartiennent respectivement aux familles Helvellaceae et Tuberaceae.

Aucun inventaire n'a enregistré la présence d'une de ces deux espèces en Algérie, ni dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique du Nord et du moyen orient.

C. meandriiformis est commune en Europe et aux états unis. N'étant pas clairement vénéneuse, cette espèce est différemment considérée en Europe. Elle est consommée comme une délicatesse gastronomique dans l'Europe du Nord, pendant qu'elle est, dans l'hémisphère sud du continent, regardée comme irritant gastro intestinal (Hall *et al.*, 2007).

En Espagne, elle est interdite à la vente. En outre, la morphologie de ses ascocarpes immatures ainsi que son odeur qui rappelle la truffe blanche d'Italie (*Tuber magnatum*) sont susceptibles de tromper ceux qui ne savent que très peu de ces champignons. De ce fait, l'espèce est parfois illégitimement vendue comme truffe blanche notamment en Italie.

B. vulgaris partage l'habitat naturel de la truffe blanche Italienne. Elle est souvent consommée par les chiens truffiers au cours de la cueillette du *T. magnatum*, sans aucune menace sanitaire enregistrée sur l'animal. Cependant, il n'est nullement possible de la consommer par l'homme vue son odeur de graisse rancie (Hall *et al.*, 2007).

10. Vertus des terfesses

Beaucoup de gens considèrent les terfesses comme rien de plus que des tubercules en forme de patate. Pourtant, la science proclame que ces joyaux des sables ne sont pas si modestes que cela. Elles sont très riches en protéines et vitamines et ont des propriétés médicinales et écologiques incontestables (Ackerman *et al.*, 1975 ; Al-Delaimy, 1977 ; Ahmed *et al.*, 1981 ; Al-Shabibi *et al.*, 1982 ; Sawaya *et al.*, 1985 ; Bokhary *et al.*, 1989 ; Bokhary et Parvez, 1993 ; Slama *et al.*, 2010 ; Shavit et Shavit, 2014).

Les populations du moyen orient, de l'Afrique du Nord et du bassin méditerranéen sont les plus anciennement et considérablement réputées pour être consommatrices de terfesses comme denrée alimentaire aussi bien qu'en médecine parallèle. Les Aborigènes de l'Australie centrale et les San (Bochimans) du désert africain du Kalahari ont également utilisés ces champignons dès longtemps (Shavit, 2008).

Les terfesses les plus amplement utilisées au long de l'histoire sont celles des genres *Terfezia* et *Tirmania* (Shavit, 2008).

10.1 Vertus alimentaires

10.1.1 Valeur nutritionnelle

Diverses études ont montré que la valeur nutritionnelle des terfesses varie d'une espèce à l'autre (Ahmed *et al.*, 1981 ; Sawaya *et al.*, 1985 ; Bokhary et Parvez, 1993).

Kagan-Zur *et al.* (2008) ont étudié la composition chimique des terfesses et ont trouvé que la matière sèche contient 20 à 27 % de protéines, 3 à 7.5 % de lipides (acides gras saturés et insaturés), environ 60 % de glucides et 7 à 13 % de fibres.

L'étude de la composition chimique de deux espèces de terfesses *Terfezia claveryi* et *Tirmania nivea* originaire d'Arabie saoudite a été entretenue par Sawaya *et al.* (1985). Les résultats de cette étude montrent que les deux espèces contiennent respectivement 19.6 et 27.2 % de protéines, 2.8 % et 7.4 % de lipides, 7 % et 13.2 % de fibres et 1.8 % et 5.1 % d'acide ascorbique. L'analyse de la composition minérale des deux espèces a montré des taux élevés en macroéléments : potassium (K) et phosphore (P), et des valeurs égales en oligoéléments : fer (Fe), cuivre (Cu), zinc (Zn) et manganèse (Mn). Cette étude a également montré que *T. claveryi* et *T. nivea* contiennent tous les acides aminés essentiels en quantités plus ou moins équilibrées, y compris des acides aminés limitant comme : la valine dans *T. nivea* et la leucine et la lysine dans *T. claveryi*.

Ahmed *et al.* (1981) ont étudié la valeur nutritionnelle de *Terfezia boudieri* de Lybie. Ils ont enregistré les composants suivants : protéines (17.19 %), lipides (6.4 %), glucides (59.63 %), fibres (3.80 %). La composition minérale de l'espèce montre dans un ordre décroissant de leur teneur, les macroéléments suivants : potassium (K), calcium (Ca) et sodium (Na), et les microéléments suivants : fer (Fe), zinc (Zn), cuivre (Cu) et manganèse (Mn). L'espèce contient également les neuf acides aminés essentiels, avec des taux plus élevés en thréonine, isoleucine et valine.

Murcia *et al.* (2003) ont rapporté 22.54 % de protéines, 19.94 % de lipides, 36.66 % de glucides et 13.04 % de fibres dans le genre *Picoa* qui montre une différence remarquable dans les valeurs des lipides et glucides par rapport aux genres *Terfezia* et *Tirmania*. Les espèces du genre *Picoa* semblent être relativement plus riches en lipides et moins riches en glucides que les espèces des deux autres genres.

Ces résultats et beaucoup d'autres, ont prouvé que les terfesses sont des aliments sains, de faibles teneurs en calories et graisses, et plus riches en protéines que tous les légumes. Les protéines des terfesses sont constituées d'acides aminés comparables à ceux des protéines

animales (Danell et Eaker, 1992 ; Murcia *et al.*, 2003). Outre cela, les terfesses sont une bonne source de vitamines A, B et C, de minéraux et de carotènes (antioxydants et provitamines A) (Ahmed, 1989 ; Mattila *et al.*, 2002).

10.1.2 Aliment fonctionnel

« Que ta nourriture soit ton médicament et que ton médicament soit dans ta nourriture », en d'autres termes « Que ta nourriture soit ta première (/seule) médecine ». Ces citations d'Hippocrate qui datent de la préhistoire sont de nos jours très populaires. Elles synthétisent le concept d'aliment fonctionnel. Lequel peut être défini comme une denrée dotée de propriétés bioactives, à l'exemple des antioxydants diététiques qui en plus de leurs valeurs nutritionnelles basiques, procurent des bénéfices physiologiques et améliorent la santé (Hasler, 1998).

Les cellules utilisent les antioxydants dans l'élimination ou l'inactivation des radicaux libres toxiques susceptibles de contribuer au développement de plusieurs maladies, à savoir : le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose et le processus dégénératif responsable du vieillissement (Al-Laith, 2010).

Les terfesses traditionnellement consommées en moyen orient et en Afrique du Nord comme aliments fonctionnels depuis plusieurs siècles, ont été prouvées riches en substances à pouvoir antioxydant, tel l'acide ascorbique, les anthocyanines, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les dérivés phénoliques libres et les phénols estérifiés (Murcia *et al.*, 2002 ; Al-Laith, 2010).

Plusieurs travaux de recherches ont entrepris l'étude de l'activité antioxydante des terfesses et l'ont comparée à celle d'autres aliments communs. Les résultats de ces essais montrent que les terfesses : *Terfezia claveryi*, *Picoa juniperi* (Murcia *et al.*, 2002), *Terfezia boudieri* (Dundar *et al.*, 2012 ; Dogan et Aydin, 2013) ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui des autres aliments.

L'activité antioxydante des extraits d'autres espèces (*Tirmania nivea* et *T. pinoyi*) a également été démontrée (Al-Laith, 2010).

Ces résultats consentent la consommation traditionnelle des terfesses comme aliment fonctionnel et les suggèrent comme un antioxydant diététique à prendre en considération.

10.2 Vertus médicinales : Activité antimicrobienne des terfesses

L'utilisation de l'eau extraite des terfesses dans le traitement des maladies oculaires et des lésions cutanées en moyen orient et en Afrique du Nord date de plusieurs siècles. Les espèces de terfesses concernées sont principalement : *Terfezia claveryi*, *Terfezia boudieri* et *Tirmania*

nivea (Hussain et Al-Ruqaie, 1999 ; Shavit, 2008). Cette utilisation est étroitement liée à la croyance religieuse des habitants de ces régions, tire son origine du hadith du prophète (ﷺ) qui explique que les terfesses font partie des mannes (que Dieu a offert aux Israélites) et que leur eau est un remède pour l'œil (صحیح البخاری #2049 ; Sahih Muslim #5084–5089 ; صحيح البخاري #5708(5381) ; Sahih Al Bukhari #5708 ; الجامع الصحيح سنن الترمذي #2066–2069 ; Jami' At-Tirmidhi #2066-2069).

At-Tirmidhi raconte au nom de Abu-Hurayra que celui-ci (après avoir entendu le hadith du prophète (ﷺ)), a pris trois, cinq ou sept terfesses, les a pressées, a mis le jus dans une bouteille et l'a appliqué sur les yeux d'une servante à lui et elle a guéri (الجامع الصحيح سنن الترمذي #2069 ; Jami' At-Tirmidhi, #2069).

Cette vertu médicinale recommandée par le prophète de l'islam Mohamad (ﷺ) au septième siècle a été évoquée au dixième siècle par le philosophe et physicien musulman persan Avicenne (Ibn Sina) qui a recommandé la terfesse comme remède pour la faiblesse, les vomissements et les plaies (Hall *et al.*, 2007 ; Shavit, 2008). Elle a également été scientifiquement prouvée en 1981 par l'ophtalmologiste égyptien Dr. Al-Marzouki (Al-Mazouki, 1981 ; Mandeel et Al-Laith, 2007).

L'activité antimicrobienne des terfesses concerne notamment le trachome. Une infection oculaire causée par les sérotypes A, B et C de la bactérie intracellulaire obligatoire *Chlamydia trachomatis*. Cette inflammation oculaire souvent printanière peut entraîner à la longue, de par les complications ou les réinfections répétées, une opacité cornéenne menant à une cécité irréversible (Al-Marzouki, 1981 ; Mandeel et Al-Laith, 2007 ; OMS ; In site web 26).

Dr. Al-Marzouki a étudié l'effet de l'extrait de *Terfeiza claveryi* sur le développement *in vitro* de différentes bactéries incluant l'agent pathogène responsable du trachome. Après avoir montré son efficacité sur une large gamme de microbes, l'ophtalmologue a entrepris une étude pilote sur des patients atteints du trachome. Il a trouvé que l'extrait aqueux stérilisé de *Terfezia claveryi* est efficace mais agit plus lentement que les antibiotiques standards vendus en pharmacie (Mandeel et Al-Laith, 2007).

D'un point de vue cyto-histologique, ce résultat est expliqué par la faculté de l'eau extraite des terfesses à stopper la formation des tissus fibreux dans la zone infectée et diminuer considérablement la formation des cellules lymphatiques. Lesquelles résultent de l'inflammation et sont susceptibles d'engendrer l'opacité de la cornée (Al-Marzouki, 1981).

Plus récemment encore, l'activité antimicrobienne des terfesses a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Différentes espèces de terfesse ont été testées contre plusieurs souches bactériennes, en utilisant divers solvants et méthodes d'extractions. Les résultats de ces expériences sont variables (Janakat *et al.*, 2004, 2005 ; Gouzi *et al.*, 2011 ; Dib-Bellahouel et Fortas, 2011 ; Aldebasi *et al.*, 2012).

10.3 Vertus écologiques

Outre sa valeur nutritionnelle, la composition chimique des terfesses, notamment leur richesse en produits phénoliques antioxydants, joue un rôle écologique important.

Ces composés produits par les végétaux au cours du métabolisme secondaire, assurent plusieurs fonctions, dont la défense contre les pathogènes (Clériveret *et al.*, 2013) et la protection contre les rayons UV (Macheix *et al.*, 2005) et les stressés abiotiques (Sairam *et al.*, 1998).

Vu la contenance des fructifications fongiques de quantités remarquables de ces métabolites secondaires, les racines des plantes mycorhizées en montrent des pourcentages plus élevés que celles non mycorhizées (Schützendübel et Polle, 2002).

Al-Laith (2014) qui a étudié les propriétés antioxydantes de *Tirmania nivea*, a précisé que le grand pourcentage de composés phénoliques contenu dans les ascocarpes de l'espèce n'est pas uniquement un mécanisme d'adaptation aux stress notamment abiotiques mais également une manifestation de l'association mycorhizienne au double profit du champignon et de la plante.

Quelques années avant, Moreno-Arroyo *et al.* (2001) avaient soulevé le rôle important des terfesses dans le maintien des écosystèmes terrestres, et encouragé leur utilisation comme partenaire mycorhizien, dans le but d'accélérer la croissance des plantes et diminuer leur taux de mortalité. Ils ont également soulevé leur importance économique provenant à la fois de leur valeur nutritionnelle, leurs vertus médicinales ainsi que leur rôle écologique majeur.



Chapitre 2

Présentation de la zone d'étude



Chapitre 2 : Présentation de la zone d'étude

1. Localisation et étendue

Les côtes sableuses algériennes s'étendent sur une superficie de 99.000 hectares, avec une longueur de 197 Kilomètres. La partie orientale de ces côtes dunaires comporte à elle seule 75 % des amas sableux de ce littoral (Boussouak, 1999).

La zone d'étude englobe le cordon dunaire confiné dans la wilaya d'El-Tarf située à l'extrême nord-est du pays. Ce cordon s'étend sur une longueur de 40 Km de l'Oued Mafrag à l'ouest au bassin du Tonga à l'est et se prolonge de la côte jusqu'au pied du Djebel Segleb avec une orientation ouest-sud-ouest-est-sud-est (Fig. 9).

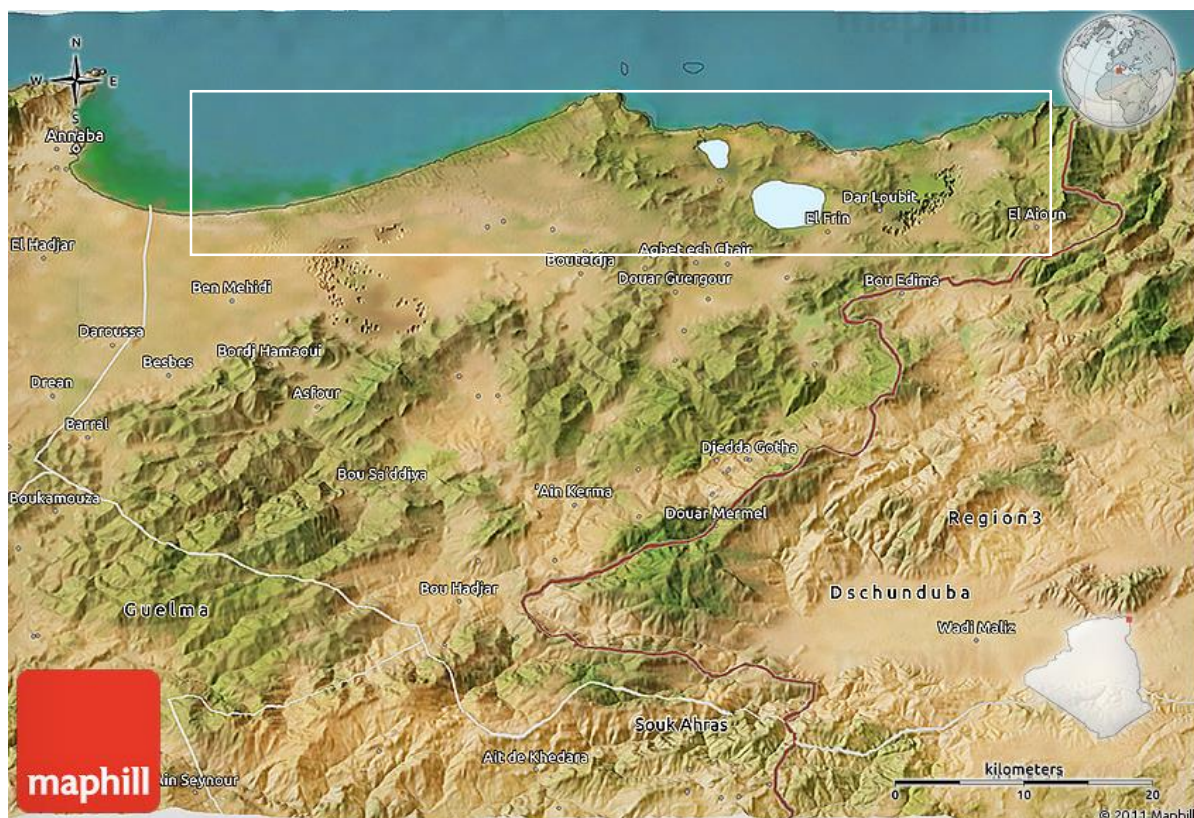


Fig. 9 Carte satellitaire du cordon dunaire de la wilaya d'El Tarf

(Site web 27)

Il prend origine avec une largeur n'excédant pas une dizaine de kilomètres et une hauteur d'une vingtaine de mètres. Il s'apparente à un véritable massif dunaire au fur et à mesure que l'on se dirige vers l'orient où il atteint une vingtaine de mètre de large et plus de 100 mètre de haut. Cependant, le massif s'interrompt une première fois au pied de djebel Koursi et de son

prolongement marin : le cap Rosa, réapparaît au niveau de la ville d'El-Kala et s'interrompt une seconde fois au niveau du cap Segleb (Benyacoub, 1993).

2. Géologie

D'après Joleaud (1936), cette région dunaire comporte une série de sédiments quaternaires marins qui couvrent des sables rouges anciens. Elle dessine une pente plus raide vers l'intérieur des terres et présente en s'y dirigeant, de la mer, quatre degrés de formations dunaires à savoir : Les plages à sable blanc, les dunes littorales dans la partie occidentale, les dunes sub-littorales à sable gris à l'est et enfin les dunes intérieures à sable rougi par les dépôts d'oxyde de fer plus à l'est. Elle se caractérise également par un gradient de degrés de fixation ou de fossilisation des dunes, qui deviennent d'autant plus stables que l'on se dirige vers l'intérieur où se trouvent les dunes les plus anciennes.

La région est caractérisée par une altitude allant de 0 à 1200 m et une altitude moyenne de 104 m (Fig. [10](#)).

Elle est dotée d'un réseau hydrographique riche en vallées temporaires et permanentes, et peut être subdivisée en trois domaines : la plaine de Ben M'hidi au nord, les montagnes au sud et les lacs humides à l'est. Elle comporte plusieurs bassins versants à savoir : Oued Mafragh, Oued Kebir-est et Côtiers-la-Calle (Fig. [11](#)).

3. Climat

La Région est soumise à un climat méditerranéen avec quatre variantes d'étages bioclimatiques dont deux caractérisent le cordon dunaire englobant les sites étudiés. Il s'agit des étages bioclimatiques : subhumide chaud et humide chaud (Fig. [12](#)).

Les précipitations moyennes sont de 500 à 1000 mm par an (Fig. [13](#)). Elles augmentent d'ouest en est et avec l'altitude (Benslama *et al.*, 2010) et sont concentrées en automne, hiver et printemps, janvier étant le mois le plus pluvieux de l'année. La saison sèche dure entre quatre et six mois, de la mi-mai à la mi-septembre. Les températures moyennes varient entre 8 °C et 29.7 °C, avec une moyenne annuelle de 17.9 °C et une amplitude de 6.75 °C.

L'humidité relative, élevée durant toute l'année, varie entre 72.1 et 76.2 % (Bentouili, 2007). La vitesse mensuelle moyenne des vents est d'environ 3.05 m/s. Ces vents sont de divers types :

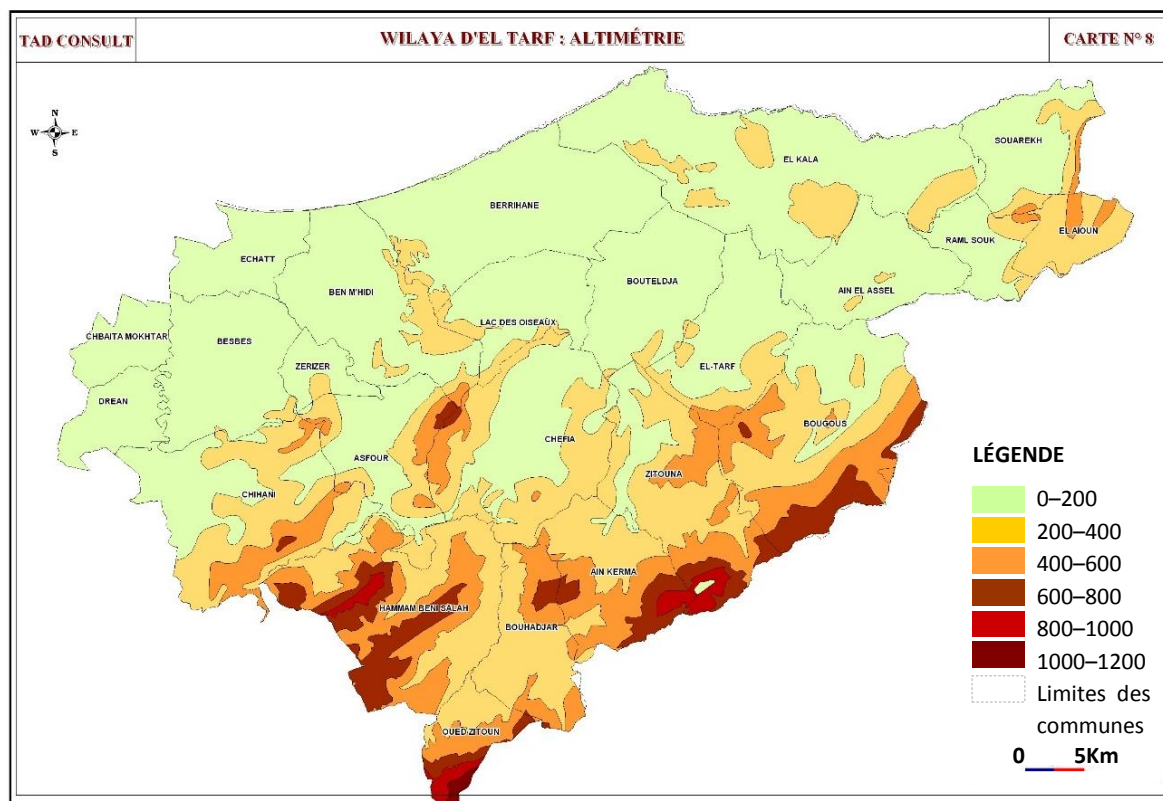


Fig. 10 Altimétrie de la wilaya d'El Tarf (Conservation des forêts, El-Tarf, 2012)

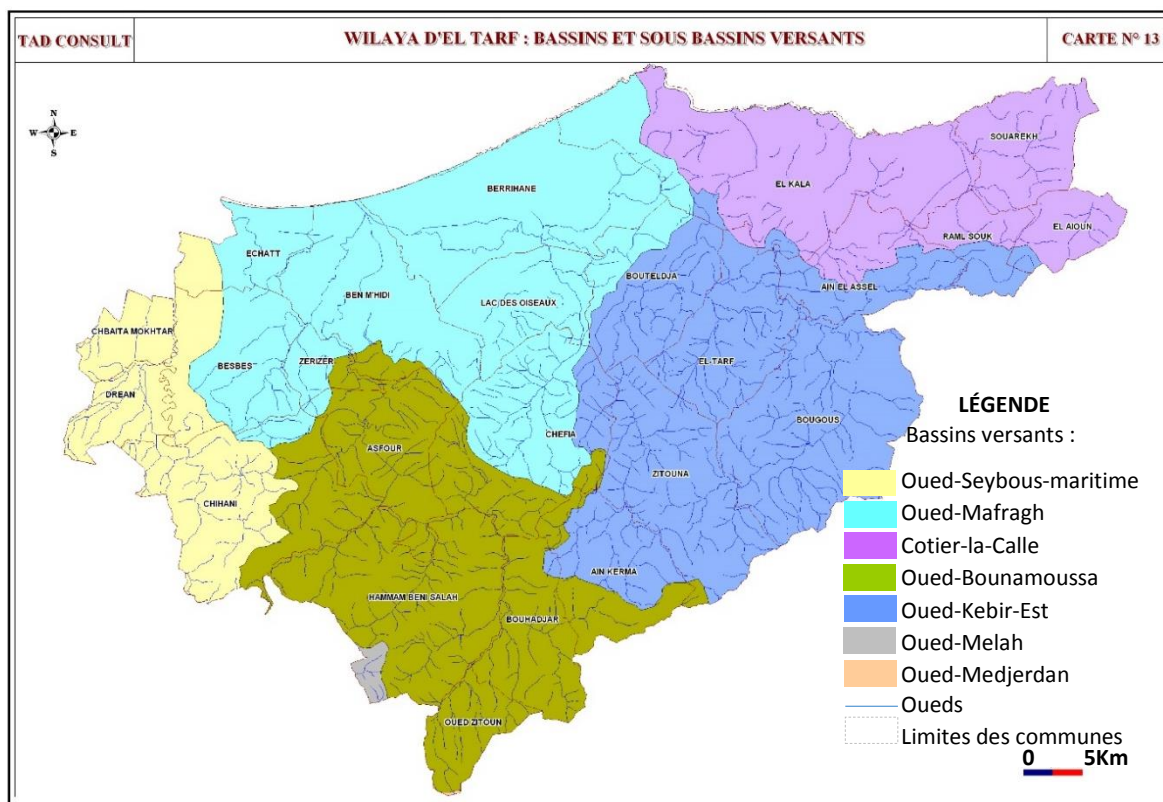


Fig. 11 Oueds et bassins versants de la wilaya d'El Tarf (Conservation des forêts, El-Tarf, 2012)

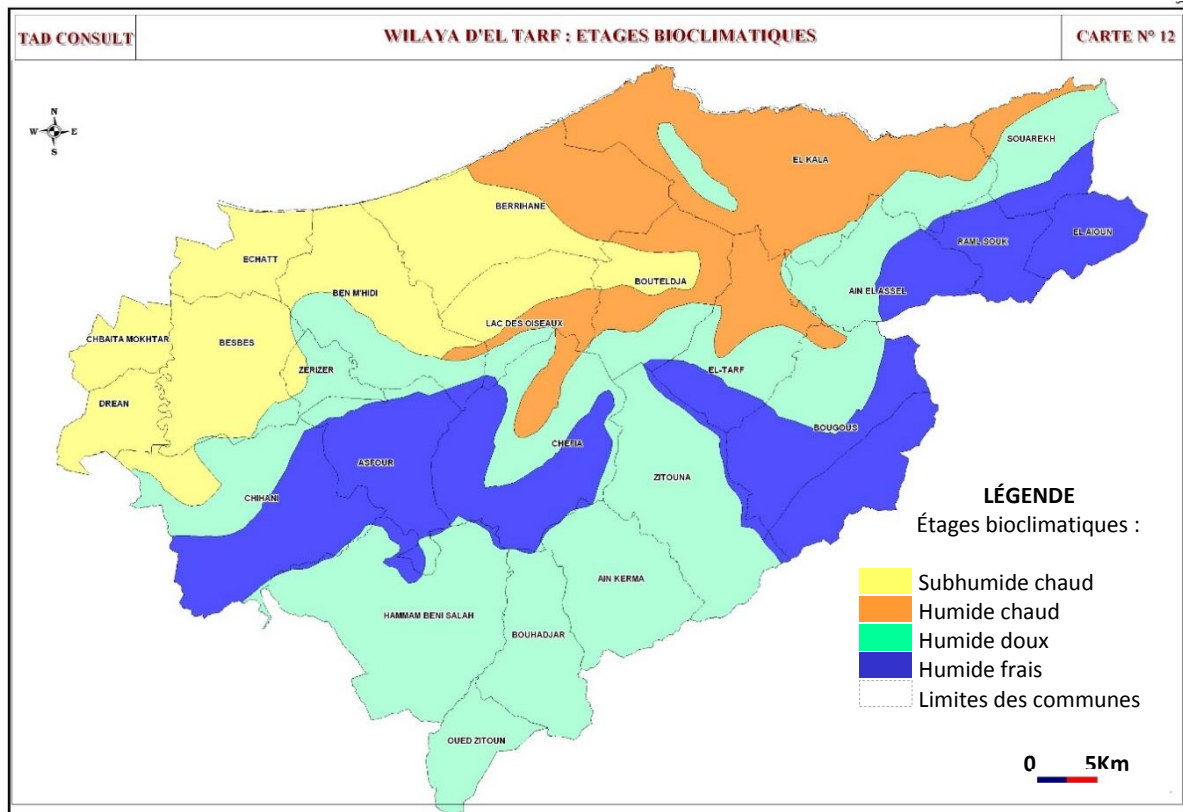


Fig. 12 Étages bioclimatiques de la wilaya d'El Tarf (Conservation des forêts, El-Tarf, 2012)

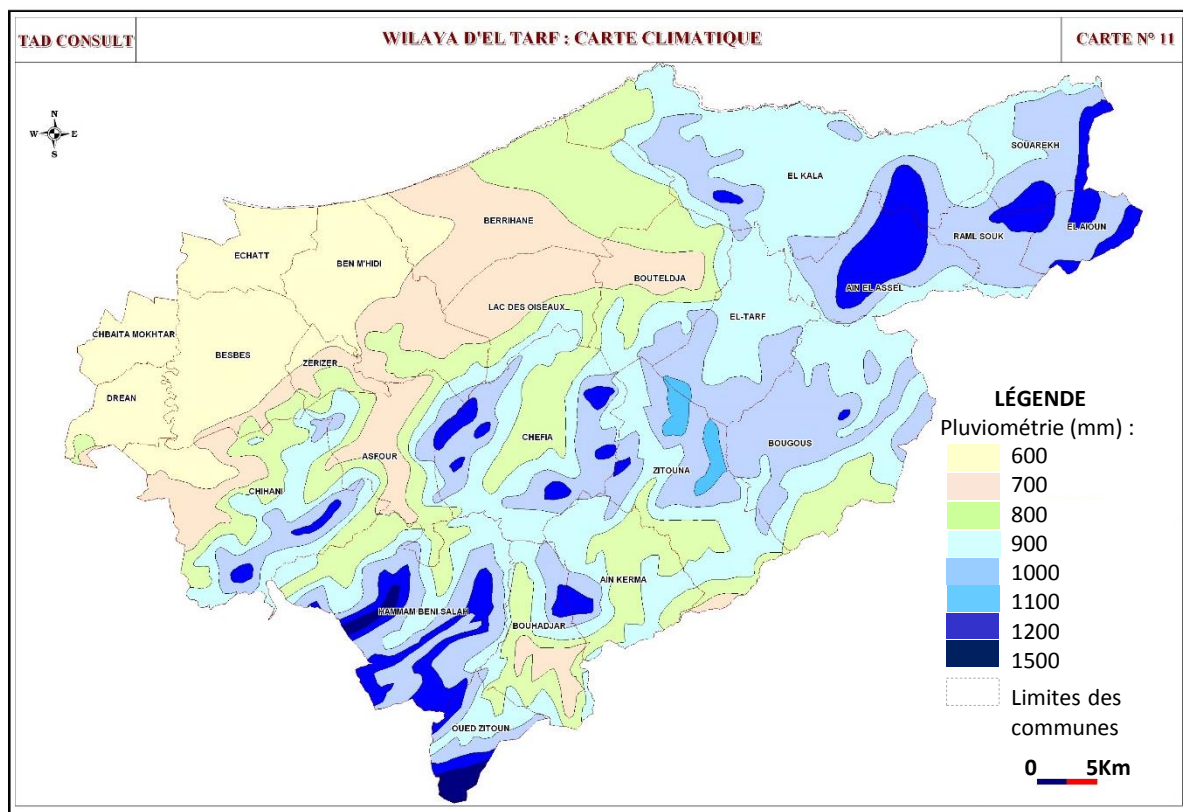


Fig. 13 Pluviométrie de la wilaya d'El Tarf (Conservation des forêts, El-Tarf, 2012)

des vents violents NW, des vents SE parfois SW dus au Sirocco provenant du Sahara (ce sont des vents chauds et plus fréquents en mois d'août), les vents du Nord-Est : assez fréquents mais faibles avec une influence peu importante sur le milieu, et les vents du Nord-Ouest qui soufflent avec une importante régularité en hiver et sont plus modérés en été (Bentouili, 2007).

4. Couvert végétal

Une partie importante de ces dunes est incluse dans le parc national d'El-Kala (PNEK), créé en 1983 et reconnu comme une réserve de biosphère par l'UNESCO en 1990.

Le couvert végétal est de plus en plus dense que nous nous dirigeons vers les dunes les plus anciennes se trouvant à l'intérieur (voir la carte d'occupation de la wilaya d'El Tarf : Fig. 14).

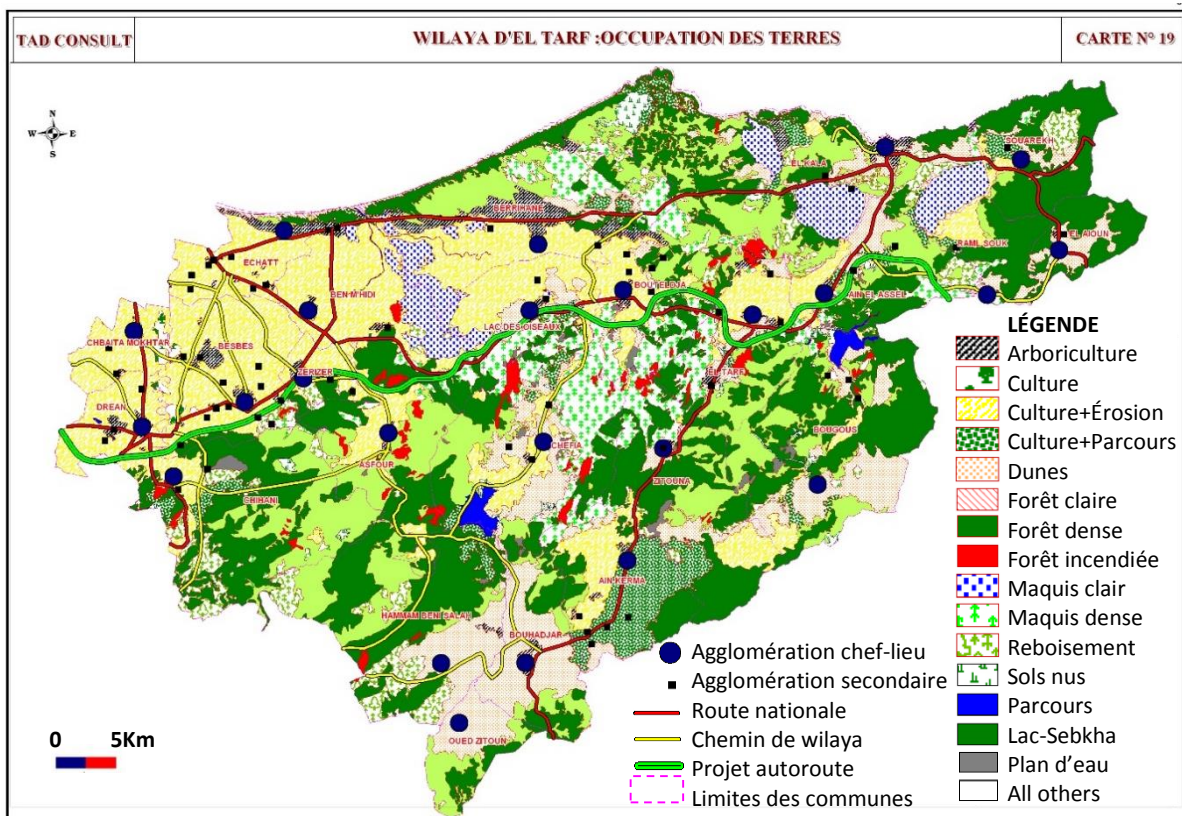


Fig. 14 Occupation des terrains de la wilaya d'El Tarf (Conservation des forêts, El-Tarf, 2012)

Celles-ci sont caractérisées par la présence de chêne-Kermès (*Quercus coccifera*) et de genévrier (*Juniperus oxycedrus*) qui témoignent de leur stabilité et de leur rémanence face aux incendies. Au contraire les dunes les plus proches de la mer, moins stables, sont caractérisées par une végétation moins dense comportant principalement des espèces pionnières, telles que *Amophila arenaria*, *Agropyrum junceum*, *Anthemis maritima*, *Medicago marina*, *Helichrysum maritimum* (Boussouak, 1999).



Chapitre 3

Étude expérimentale



Chapitre 3 : Étude expérimentale

I- Sites d'étude

La détermination des sites d'études dans la région s'est basée sur les orientations des récolteurs de terfesses et la présence de la plante hôte. Les données géographiques des sites repérés sont prises grâce à un GPS (Global Positioning System) Garmin 60. La distribution des terfesses dans la région a été représentée sur la carte du contexte topographique de la wilaya d'El-Tarf (fournie par la direction générale des forêts de la wilaya).

II- Écologie

L'étude écologique s'est basée principalement sur l'étude des caractéristiques climatologiques et édaphiques et du cortège floristique des sites terfesses.

1. Le climat

En plus des données bibliographiques sur les caractéristiques climatiques de la région, une étude simple des températures et précipitations mensuelles et annuelles (moyennes, minimas et maximas) a été réalisée en se basant sur les données météorologiques fournies par la station du lac des oiseaux. Une station érigée dans un endroit stratégique permettant de fournir, selon des normes internationales, des données moyennes de la wilaya.

Les diagrammes ombrothermiques des cinq dernières années (2012–2016) ont été établis afin de discerner les saisons sèches et humides de la région. L'an 2012 étant inclus en raison de l'importance de ses pluies automnales (d'après la bibliographie, notamment les résultats de Bradai *et al.* (2014b)) dans la discussion de la production des terfesses du printemps 2013. Ces diagrammes ont été construits avec deux axes : l'axe des coordonnées portant les températures et l'axe secondaire des coordonnées portant les précipitations, en prenant garde de définir les données maximales de l'axe des températures à une valeur deux fois plus petite que celle de l'axe des précipitations.

Les saisons sèches et humides de chaque année ont été déduites par l'interprétation du diagramme correspondant.

2. Le sol

L'étude édaphique a concerné principalement les propriétés physicochimiques des sols des différents sites à terfesse. Des échantillons de sol ont été prélevés et analysés au laboratoire selon la méthodologie décrite ci-dessous.

2.1 Échantillonnage du sol

Afin de déterminer les caractéristiques édaphiques propices à la poussée des terfesses, des échantillons de sols ont été prélevés à une profondeur allant de 0 à 20 cm, préférablement dans les points de récolte des ascocarpes. Parmi ces points, au moins trois sont choisis par hasard et le sol de l'ensemble est mélangé pour l'obtention d'un échantillon représentatif.

2.2 Analyses physicochimiques du sol

Plusieurs paramètres physico-chimiques ont été analysés. À l'exception des derniers paramètres (Azote et phosphore), toutes les analyses ont été réalisées au niveau du laboratoire de biologie végétale et environnement (BVE) et se sont basées sur les méthodes de Baize (2000). Les résultats ont été comparés aux données du même auteur. Les sols ont été classés en différentes catégories, selon chacun des paramètres listés ci-dessous :

2.2.1 pH eau

Le pH eau exprime l'acidité du sol liée à la présence des protons (H^+). Elle n'a pas d'unité et est mesurée comme suit :

- Mettre 5 g de sol dans un flacon.
- Ajouter 25 ml d'eau distillée.
- Agiter pendant 2 h à température ambiante.
- Mesurer le pH à l'aide d'un pH mètre.

Le statut du sol est déterminé selon les données représentées sur le tableau 1 ci-après (Baize, 2000).

Tableau 1 Échelle du pH

pH	Acidité du sol	pH	Acidité du sol
3–4.5	Extrêmement acide	6–6.75	Faiblement acide
4.5–5	Très fortement acide	6.75–7.25	Neutre
5–5.5	Très acide	7.25–8.5	alcalin
5.5–6	Acide	> 8.5	Extrêmement alcalin

2.2.2 pH KCl

Le pH KCl reflète l'acidité minimale que le sol peut atteindre. Il est mesuré de la même façon que le pH eau, en remplaçant l'eau distillée par le chlorure de potassium (KCl 1N).

2.2.3 Conductivité électrique

La conductivité électrique d'un sol représente sa concentration en sels solubles. Elle est exprimée en millisiemens par centimètre (mS/cm). Elle est mesurée suivant les mêmes étapes du pH eau (la même préparation peut servir aux deux mesures) en utilisant un conductimètre au lieu du pH mètre.

L'état salin du sol est précisé selon l'échelle de la conductivité (Tableau 2) ci-dessous (Baize, 2000).

Tableau 2 Échelle de la conductivité

Conductivité (mS/cm)	Salinité du sol
0–0.6	Non salé
0.6–1.4	Peu salé
1.4–2.4	Salé
2.4–6	Très salé

2.2.4 Carbone et matière organique

La matière organique comprise dans un sol peut être estimée via la teneur en carbone du sol en question. Celle-ci peut être mesurée selon les étapes suivantes :

- Placer dans un Erlenmeyer 0.5 ou 1 g de sol et y ajouter (sous la hotte) 10 ml de bichromate de potassium (KCr_2O_7 8 %) et 15 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4).
- Chauffer sur une plaque chauffante (sous hotte toujours) jusqu'à 5 mn après la première goutte condensée puis laisser refroidir.
- Transvaser 20 ml de la solution dans une fiole de 100 ml puis compléter jusqu'au trait de Jauge avec les eaux de lavage de l'Erlen.
- Verser dans un Becher 20 ml de la solution contenue dans la fiole.
- Ajouter 80 ml d'eau distillée, 2 à 3 gouttes de Diphénylamine et 1 g de sel de FNa (On obtient une solution de couleur sombre).
- Titrer avec du sel de Mohr (0.2N) jusqu'à l'obtention d'une couleur verte. Noter le volume (X) de sel Mohr nécessaire à l'obtention de la couleur désirée.

- Refaire les mêmes étapes sans sol (Témoin) et mesurer le volume (Y) de sel de Mohr nécessaire au virement de la couleur sombre (étape 6) vers le vert (étape 7).

Le pourcentage de carbone est calculé par l'équation suivante :

$$C \% = (Y-X) \times 0.615 \times (100/20) \times (100/P) \times (1/1000)$$

Avec :

- 0.615 = Facteur d'équivalence entre le sel de Mohr et le Carbone
- 100/20 réfère à l'utilisation de 20 ml à partir de 100 ml.
- P = Poids du sol.
- 1/1000 = Facteur de conversion.
- Le pourcentage de la matière organique (MO) égal 1,72 fois celui du carbone.
- $MO \% = C \% \times 1.72$

Les résultats sont comparés aux données du tableau (3) suivant (Baize, 2000) :

Tableau 3 Échelle de la matière organique

Matière organique (%)	Statut du sol
1 <	Extrêmement faible
1–1.5	Très faible
1.5–2.5	Faible
2.5–3.5	Moyen
3.5–4.5	Moyennement élevé
4.5–5	Élevé
> 5	Très élevé

2.2.5 Texture

La texture d'un sol correspond à la répartition, dans ce sol, des minéraux par catégorie de grosseur. Pour déterminer la texture nous avons utilisé la méthode par saturation décrite ci-dessous :

- Prendre 50 à 100 g de sol et les imbiber d'eau au goutte à goutte, jusqu'à l'obtention d'une pâte luisante qui glisse doucement à l'inclinaison du récipient.
- Peser une capsule vide (P1).
- Mettre dans cette même capsule une petite quantité de la pâte préalablement préparée, et repeser (P2).

- Placer la capsule contenant le sol dans l'étuve à 105 °C pendant 24 h. Peser encore pour obtenir le poids de la capsule vide et du sol sec (P3).
- Calculer le poids de l'humidité (X₁) et celui du sol sec (X₂), avec : **X₁ = P₂ - P₃** et **X₂ = P₃ - P₁**
- Mesurer la valeur (Y) donnée par la règle de trois suivantes :

$$\mathbf{X_1 \rightarrow X_2 \text{ g de sol sec}}$$

$$\mathbf{Y \rightarrow 100 \text{ g de sol sec}}$$

La texture est déterminée par comparaison du résultat (Y) trouvé avec les valeurs représentées dans le tableau 4 (Baize, 2000).

Tableau 4 Échelle de la texture

Pourcentage d'humidité (Y %)	Texture
< 12	Sableuse
12–24	Sablo-limoneuse
24–37.5	Limono-sableuse
37.5–45	Limono-argileuse
45–75	Argilo-limoneuse
> 75	Argileuse

2.2.6 Azote et phosphore total et assimilable

L'analyse de l'azote et du phosphore (total et assimilable) a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse des sols et des eaux « Horizon » (Annaba). L'azote a été dosé selon la méthode de Kjeldhal et le phosphore selon la méthode de la spectrophotométrie.

3. Diversité floristique

L'étude de la diversité floristique a porté sur l'identification des principales espèces de plantes présentes dans chaque site en plus du partenaire végétal de la symbiose à terfesses. Cette identification est strictement morphologique. Elle est basée sur les différentes flores qui ont pris en charge la description des plantes d'Algérie (De Maisonneuve, 1846–1849 ; Quezel et Santa, 1962, 1963), d'Afrique du Nord (Maire, 1952–1987 ; Le Floc'H *et al.*, 2010) ou d'autres régions de la méditerranée (Gillet et Magne, 1873).

III- Symbioses

L'étude des symbioses mycorhiziennes à terfesse s'articule sur trois points importants à savoir : l'identification des partenaires végétal et fongique de la symbiose et l'étude du statut et du système mycorhizien entre les deux partenaires.

1. Le partenaire végétal de la symbiose

Le partenaire végétal de la symbiose reconnu grâce aux connaissances bibliographiques d'autres régions (Fortas, 1990) et aux récolteurs des terfesses dans la région, n'a été identifié que morphologiquement. Cette identification s'est basée sur les flores de Maire (1953 [1952–1987]), Quezel et Santa (1963), Pottier-Alapetite (1979). Elle a été effectuée en prenant en considération la description botanique détaillée des plantes, avec les caractères communs qui permettent de reconnaître le genre. La variabilité morphologique constatée au niveau des tiges, feuilles, et fleurs a permis de distinguer différentes espèces et sous-espèces.

2. Le partenaire fongique de la symbiose

Le partenaire fongique de la symbiose est la terfesse autour de laquelle s'articule le présent travail.

Les méthodes d'échantillonnage et d'identification des espèces récoltées au cours de la présente thèse, sont décrites ci-après.

2.1 Échantillonnage des ascocarpes

Le repérage des terfesses dans la région d'étude n'utilise ni animaux comme en Europe (Loizides *et al.*, 2011), ni bâton comme au Maroc (Khabar *et al.*, 2001). Il est simplement basé sur un œil observateur pour détecter le renflement du sol et l'index et le majeur de la même main pour confirmer la présence des tubercules à l'endroit discerné. En général, la récolte s'effectue sur de petites parcelles de sol assez meubles pour laisser facilement enfoncer les doigts. Ces parcelles d'un mètre carré en moyenne, sont caractérisées, en plus du sol meuble, par l'abondance du partenaire végétal de la symbiose à terfesse (Fig. 15). Elles sont appelées par certains récolteurs « El masyda » (المصيدة) qui signifie « piège » ou « lieu de chasse ».

Les récolteurs nous ont également parlé de la méthode dite à la marque, dans laquelle des craquelures dans l'endroit gonflé par la présence de l'ascocarpe sont facilement détectables. Cependant, cette méthode n'est pas aussi pratique que facile, du fait qu'elle soit conditionnée



Fig. 15 La récolte des terfesses

a : Lieu de récolte des ascocarpe de terfesse « masyda » caractérisé par un sol très meuble et l'abondance du partenaire vert de la symbiose (quelques plantes sont indiquées par les flèches rouges). La flèche blanche indique le lieu de présence de l'ascocarpe ultérieurement récolté, **b** : ascocarpe semi-épigé, **c** : ascocarpe (b) récolté rattaché à son pied, **d** : pied récolté entier, **e** : pied resté enfoui dans le sol après récolte de l'ascocarpe (cas le plus général).

par le changement climatique brusque (Les fendillements sont causés par le soleil qui brille fort sur un sol auparavant mouillé par les eaux de pluie).

Parfois, l'ascocarpe (notamment dans le cas de *Terfezia arenaria*) effleure la surface du sol, un œil attentif serait donc la seule chose requise pour le capter.

Une fois repéré, l'ascocarpe est récolté après un dégagement soigneux du sol autour. Le pied, facilement détachable, n'est récupéré entier ou lié à son ascocarpe que très rarement. Dans la plus part des cas, il est soit laissé dans le sol, soit récupéré émietté à cause de sa texture cassable.

En raison de sa profondeur, il n'est presque jamais intégralement récolté, une partie de longueur indéterminée reste dans le sol enfoncée à des profondeurs méconnues jusqu'à ce jour.

2.2 Identification morpho-anatomique

L'identification morpho-anatomique des terfesses s'est basée sur plusieurs critères :

- Couleur et forme du périidium.
- Couleur et morphologie de la glèbe.
- Couleur et forme des spores et asques.
- Taille des spores et asques estimée par calcul de la taille moyenne de cent spores/asques.
- Nombre de spores à l'intérieur des asques.

L'ensemble de ces données notées pour chaque spécimen, ont été comparées avec les clés de déterminations des terfesses élaborées par plusieurs chercheurs (Khabar *et al.*, 2001 ; Slama *et al.*, 2010). L'espèce et ou le genre sont ainsi identifiés. Cependant, la confirmation de l'identification a requiert des analyses biomoléculaires des spécimens récoltés.

2.3 Identification biomoléculaire

L'identification biomoléculaire des espèces de terfesses récoltées s'est basée sur une amplification de l'ADN de ces dernières par la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique consiste en l'extension de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions Mg^{2+} . Après amplification d'ADN, on procède au séquençage de l'information génétique suivie d'une analyse des résultats par comparaison avec les séquences présentes dans les banques de gène afin d'identifier les espèces et établir l'arbre généalogique correspondant.

2.3.1 Extraction de l'ADN

Les méthodes d'analyses biomoléculaires courantes sont basées sur l'extraction de l'ADN de l'échantillon suivant généralement les instructions fournies par le kit commercial utilisé. Dans notre cas, une nouvelle méthode a été utilisée. Cependant, à l'heure actuelle, les détails ne peuvent être fournis pour respect des droits d'auteur.

2.3.2 Amplification de l'ADN

La méthode d'amplification à laquelle nous avons opté est la même utilisée après une extraction ordinaire de l'ADN, à une simple différence dans la composition du mix de PCR. Cette méthode s'articule en plusieurs étapes :

2.3.2.1 Préparation du mélange d'amplification

Le mélange d'amplification ou mix de PCR est constitué des composés listés ci-après (certaines traductions en anglais sont fournies vue leur praticité au laboratoire) :

A. Les amorces (Primers)

Ce sont de courtes séquences d'ADN (ou ARN) complémentaire d'une partie de la matrice (ADN étudiée). Elles jouent un rôle double : en s'hybridant à l'ADN matrice elles délimitent la région à amplifier, et grâce à leur extrémité 3' OH elles servent d'amorce à l'ADN polymérase (site web 29). Les amorces sont au nombre de deux, une amorce sens (Forward) et une amorce anti-sens (Reverse). Dans notre cas, la région ITS (Internal transcribed spacer) a été amplifiée. Les amorces utilisées sont respectivement ITS1F (Gardes and Bruns, 1993) et ITS4 (White *et al.*, 1990). Ces deux amorces semblent avoir une spécificité pour les champignons Ascomycètes, Basidiomycètes et Zygomycètes (Gardes and Bruns, 1993 ; Dickie *et al.*, 2002 ; Klamer *et al.*, 2002 ; Anderson *et al.*, 2003a, b ; Izzo *et al.*, 2005 ; In Manter et Vivanco, 2007).

B. L'ADN Polymérase

C'est une ADN thermorésistante servant de catalyseur à la PCR. De nos jours, des enzymes dites recombinantes peuvent être utilisées. Elles ont l'avantage d'être simple à obtenir et largement modifiées pour être plus efficaces. Cependant, l'ADN polymérase utilisée dans le présent travail est classique. Elle provient d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*), d'où le nom Taq polymérase. Celle-ci peut également intervenir comme enzyme de restriction servant à couper les brins d'ADN dans deux endroits bien déterminés afin d'obtenir isolément les fragments désirés (site web 28 ; 29).

C. Le tampon (Buffer)

Son rôle est de maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour l'enzyme d'amplification. Sa composition dépend du type et des caractéristiques de l'enzyme. En général le tampon (10 x) utilisé avec la Taq polymérase est, constitué de 10 mM de Tris à pH 8.3, 50 mM de KCl et 1.5 à 2.5 mM de MgCl₂. Il contient des cations bivalents (Mg⁺²) cofacteurs de l'enzyme, car leur présence dans le milieu réactionnel avec les cations monovalents (K⁺ ou NH₄⁺) est nécessaire pour neutraliser les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN afin de stabiliser les hybrides ADN/ADN formés par la réaction (site web 28 ; Innis et Gelfand, 1990).

D. Le chlorure de magnésium

En plus de la quantité de magnésium contenue dans le tampon, une addition de MgCl₂ est nécessaire pour la réaction.

E. Le désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP)

Constitué des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) impliqués dans la formation de la molécule d'ADN. Le dNTP doit contenir des concentrations équivalentes de chacun des quatre nucléosides afin de minimaliser les erreurs de mésincorporation (Innis *et al.*, 1988).

F. L'albumine de sérum bovin (BSA)

Comme son nom l'indique, c'est une protéine extraite du sérum de bovin. Elle est largement utilisée dans les travaux de recherche, car impliquée dans plusieurs analyses et réactions entre autres la PCR. Cette protéine occupe plusieurs fonctions dont l'augmentation de la stabilisation thermique du milieu réactionnel ainsi que de la demi-vie des enzymes de restriction utilisées. Grace à sa capacité à se combiner aux inhibiteurs de la PCR, l'albumine empêche ou diminue au maximum la combinaison de ces inhibiteurs à la Taq polymérase. Elle empêche également l'adhésion des enzymes aux parois des tubes utilisés dans la PCR (Farell et Alexandre, 2012).

En plus des réactifs cités ci-avant, le mix de PCR utilisé contient un autre composé ne pouvant être cité dans le courant manuscrit pour respect des droits d'auteur.

Le mélange préparé est agité à la main puis passé au vortex pendant quelques secondes avant utilisation.

Les proportions utilisées dans le mix de PCR sont également soumises aux droits d'auteur. Cependant, les kits commerciaux proposent différentes méthodes praticables.

Remarque :

- L'eau utilisée dans le mix de PCR doit être extrêmement pure (Milli Q).
- Les réactifs doivent être conservés à -20 °C. Pendant la préparation du mix ces réactifs doivent être impérativement placés dans de la glace. La Taq polymérase est préférablement récupérée du congélateur au dernier moment.

2.3.2.2 Amplification

Après préparation des échantillons d'ADN à amplifier et préparation du mix de PCR, la prochaine étape consiste en ce qui suit :

- Mettre les échantillons à analyser dans des tubes à amplification (tubes Eppendorf de 0.2 ml) annotés. Pour le contrôle positif mettre un échantillon déjà testé avec les amorces en question et prouvé positif, et pour le contrôle négatif ne pas mettre d'échantillon ou le remplacer par du Milli Q.
- À l'aide d'une micropipette, répartir équitablement le mix de PCR entre les tubes ($\approx 23,8 \mu\text{L}$ dans chaque tube, le volume final avec l'échantillon sera d'à peu près $25 \mu\text{L}$). Il est impératif de changer le cône pour chaque échantillon pour éviter tout risque de transfert d'ADN d'un tube à l'autre.
- Placer les tubes (contenant le mix de PCR et l'échantillon) dans le thermocycleur et le régler au programme désiré. Dans le présent travail le thermocycleur utilisé est un «Mastercycleur Gradient Eppendorf, Analytik Jena AG version 2007-1.3». Les paramètres choisis consistent en une phase de dénaturation de 3 min à 94 °C et de 45 cycles de trois étapes : une première étape de 30 secondes à 94 °C, une deuxième étape de 30 s à 60 °C et une troisième d'une minute à 72 °C. Enfin une phase d'extension à 72 °C pendant 4 min.

Après réglage des paramètres, mettre en marche le thermocycleur soigneusement fermé. L'opération dure environ une heure et demi.

2.3.2.3 Vérification de l'amplification (électrophorèse)

L'amplification est vérifiée grâce à une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1 % passant par plusieurs étapes :

A. Préparation du gel d'agarose

- Dans un Erlen ajouter 0.3 g d'agarose à 30 ml de tris acétate EDTA (TAE) à 30 %.
- Chauffer au microonde, d'abord pendant pas plus de 30 s, faire sortir, remettre au microonde pendant 15 s, faire sortir, agiter puis remettre encore au microonde pendant

5 s. Cette entrée-sortie du microonde est nécessaire, car elle permet de dissoudre l'agarose dans le TAE sans provoquer son ébullition.

- Laisser le gel refroidir un peu, avant d'y ajouter 1 μL de fluorophore (Bromure d'éthidium ou SYBR Safe).
- Agiter quelques secondes puis couler dans le moule à électrophorèse maintenu bien droit et muni d'un peigne inséré perpendiculairement à sa base permettant la création de puits sur la ligne de dépôt des échantillons.
- Déposer le moule dans la cuve d'électrophorèse. Les puits vers la cathode et couvrir de TAE.
- Laisser pendant 30 minutes à l'abri de la lumière avant d'enlever soigneusement le peigne.

B. Chargement des échantillons

- Sur un morceau de parafilm (face stérile), déposer des gouttes de 1 μL de tampon de chargement (bleu de bromophénol, ou vert de bromocrésol).
- Prendre 5 μL du premier échantillon, le mixer à une goutte du tampon de chargement puis déposer le mélange dans un puits du gel préparé (Fig. 16).

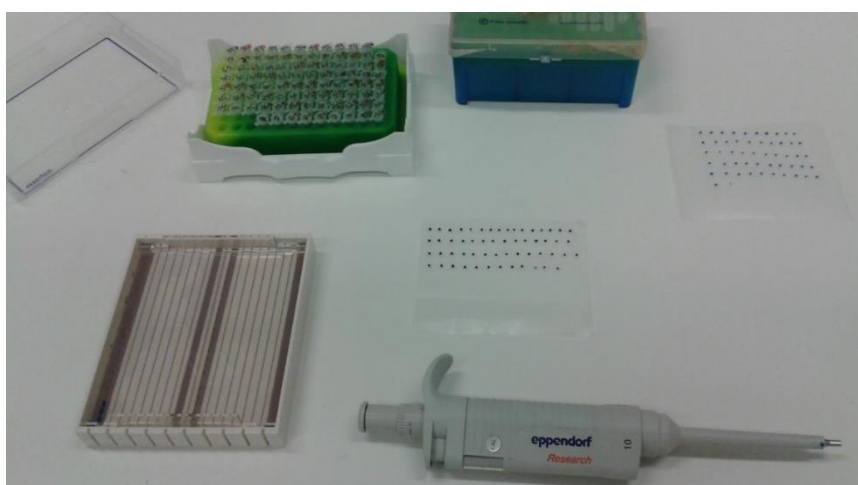


Fig. 16 Préparation de l'électrophorèse

- Procéder de la même manière avec tous les échantillons. Ceux-ci doivent être déposés dans les puits du gel d'agarose dans un ordre logique afin de permettre leur repérage sur le gel après migration.
- À la fin du dépôt des échantillons et des contrôles (+ et -), déposer sur un ou deux puits (de part et d'autre du gel) un marqueur d'ADN permettant de comparer la migration des échantillons à celle du marqueur.

C. Migration et visualisation

- Fermer la cuve, régler le voltage à 100 V et le temps à 30 min. Couvrir de papier Aluminium pour maintenir à l'abri de la lumière et démarrer le générateur.
- Une fois la migration terminée, placer le gel d'agarose dans une chambre de filtration de la fluorescence et observer le résultat sur l'écran de l'ordinateur lié à la chambre en question. L'ADN apparaît donc sous forme de bandes blanches fluorescentes sur le fond noir de la surface sur laquelle est déposé le gel (Fig. 17).

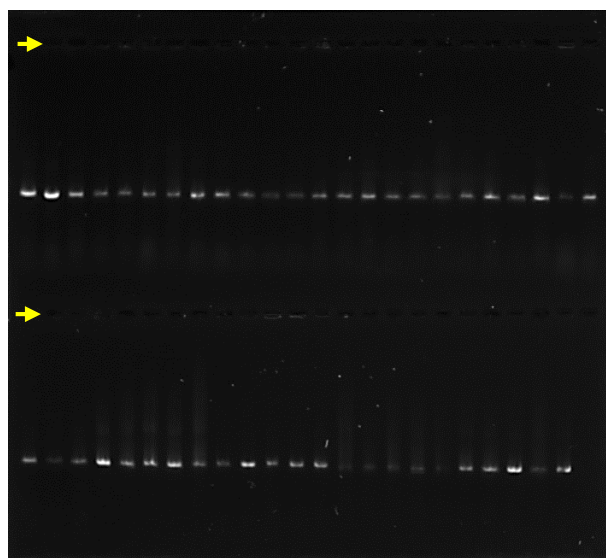


Fig. 17 Lecture du résultat de l'électrophorèse

Les flèches indiquent les lignes de dépôt (départ) des échantillons et les bandes blanches représentent les lignes d'arrivée. L'intensité de la couleur est corrélée positivement avec l'ampleur de l'amplification.

- Noter les échantillons montrant une bonne amplification afin de les préparer pour le séquençage.

2.3.2.4 Séquençage

Le séquençage consiste en la détermination de la succession linéaire des différentes bases dans le gène étudié afin d'identifier l'espèce par comparaison avec les séquences déposées dans les banques de gènes. À l'université de Murcia où le travail a été mené, le séquençage est assuré par un service spécialisé. 10 µL de chaque échantillon sont fournis au service, avec les amorces utilisées et une fiche de séquençage minutieusement remplie.

Pour chaque échantillon, deux séquences (sens et anti-sens) sont fournies. Un consensus des deux séquences (sens et anti-sens) a été créé en utilisant le programme BioEdit (Hall, 1999).

Les séquences (sens) ont été déposées dans la banque de gène (Genbank NCBI) qui leur a attribuées les numéros d'accès récapitulés dans le tableau (5) ci-après.

Tableau 5 Numéros d'accès des séquences de terfesses présentement étudiées

Échantillon	Numéro d'accès
<i>T. arenaria</i> 01	MF153921
<i>T. arenaria</i> 03	MF153922
<i>T. arenaria</i> 05	MF153923
<i>T. arenaria</i> 06	MF153924
<i>T. arenaria</i> 08	MF153925
<i>T. arenaria</i> 09	MF153926
<i>T. arenaria</i> 11	MF153927
<i>T. arenaria</i> 13	MF153928
<i>T. arenaria</i> 14	MF153929
<i>T. arenaria</i> 15	MF153930
<i>T. arenaria</i> 16	MF153931
<i>T. arenaria</i> 21	MF153917
<i>T. arenaria</i> 26	MF153918
<i>T. arenaria</i> 28	MF153919
<i>T. arenaria</i> 29	MF153920
<i>T. arenaria</i> 31	MF153932
<i>T. arenaria</i> 32	MF153933
<i>T. arenaria</i> 33	MF153934
<i>T. arenaria</i> 34	MF153935
<i>T. arenaria</i> 35	MF153936
<i>T. arenaria</i> 36	MF153937
<i>T. arenaria</i> 38	MF153938
<i>T. fanfani</i> -A 1	MF153939
<i>T. fanfani</i> -A 2	MF153940

Il est à noter que le nombre total des ascocarpes de terfesses dont l'ADN a été amplifié dépasse les 100. Cependant, seulement la vingtaine listée ci-dessus est entreprise dans le présent travail, pour plusieurs raisons, principalement la qualité des séquences qui n'ont pas toutes été déposées dans la banque de gène.

2.3.2.5 Identification et arbre généalogique

Afin d'identifier l'espèce, son consensus est analysé par l'outil de recherche d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, In site web 30) sur la banque de gène NCBI (Altschul *et al.*, 1997).

Les séquences ont été alignées en utilisant le ClustalW suivant les instructions par défaut du programme Méga version 6 (Tamura *et al.*, 2013) utilisé également dans l'élaboration de l'arbre généalogique. Ce dernier (l'arbre généalogique) fut inféré au maximum de vraisemblance (Maximum likelihood), suivant le modèle de Tamura et Nei (1993). L'algorithme SPR (Subtree-Pruning-Regrafting-Extensive) (niveau 5) a été utilisé pour tester 1000 répliques d'autoamorçage (bootstrap). Le pourcentage d'arbres dans lesquels les taxons associés sont regroupés ensemble se trouve à côté des branches. Les arbres initiaux de la recherche heuristique ont été obtenus automatiquement en appliquant les algorithmes Neighbor-Join et BioNJ.

Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées.

Picoa juniperi et *Phaeangium lefebvrei* ont été choisis comme extra-groupe (outgroup).

3. La relation symbiotique

L'étude de la mycorhization a porté sur le morphotypage, l'estimation du statut mycorhizien et l'étude du système mycorhizien sur les racines de la plante hôte des terfesses échantillonnées dans les différents sites étudiés.

3.1 Échantillonnage des racines

Les racines ont été récoltées de deux façons : directement du sol ou en association avec les ascocarpes de terfesses.

Sur le terrain, nous avons procédé à un échantillonnage aléatoire basé sur le prélèvement des plantes de trois points différents pour chaque site. Les plantes trouvées dans le périmètre des points de récolte des ascocarpes ont été favorisées. Ces échantillons sont utilisés principalement dans l'évaluation du taux mycorhizien de l'hélianthème à goutte dans chaque site.

Au laboratoire, avant le nettoyage des ascocarpes, les racines d'hélianthème qui y sont rattachées, sont soigneusement récupérées dans des tubes annotés avec le même code utilisé pour l'ascocarpe en question. Ces échantillons sont considérés plus fiables dans l'étude du statut mycorhizien du duo « plante hôte x terfesse ».

3.2 Étude de la mycorhization

L'étude de la mycorhization s'effectue avant et après coloration des racines. Celle-ci sont délicatement nettoyées afin d'éliminer tous les débris et les particules de sol sans abimer les mycorhizes notamment écto. Elles sont d'abord observées sous stéréomicroscope pour le recensement des morphotypes et l'estimation de l'ectomycorhization et sont ensuite colorées et observées sous microscope optique pour l'estimation de l'endomycorhization et l'étude du système mycorhizien.

3.2.1 Les morphotypes de mycorhizes

Les morphotypes de mycorhizes, universellement connus sous le nom de morphotypes d'ectomycorhizes, sont des formes adoptées par les petites racines des plantes mycorhizées ou données à celles-ci par le champignon mycorhizien qui entoure ces structures par son mycélium.

Le recensement des morphotypes est basé sur plusieurs critères dont les suivants :

3.2.1.1 La forme

Deux principales variantes peuvent être observées :

A. Des mycorhizes ramifiées

Selon le nombre de branches dans la ramification et leur forme on distingue différents morphotypes, dont principalement : Les mycorhizes bifurquées (à deux branches), les mycorhizes ramifiées avec plus de deux branches, les mycorhizes arborescentes (très ramifiées en forme de branche d'arbre).

B. Des mycorhizes non ramifiées ou simples

On en distingue plusieurs formes, à savoir : le morphotype long et simple parfois courbé, les mycorhizes moniliformes (présentant régulièrement des étranglements), les mycorhizes capitulées (la mycorhize se situe au sommet d'un pédicelle plus ou moins long)... etc.

3.2.1.2 La couleur

La couleur des mycorhizes peut aussi être un critère pour les différencier. Cependant, vu son assombrissement avec l'âge, elle ne peut être vraiment informative que sur des mycorhizes bien développées, ni très jeunes (de couleur généralement beige très clair) ni très vieilles (de couleur bien sombre).

Les mycorhizes sont observées à l'aide du stéréomicroscope Leica EM UC6. Les photos sont prises à l'aide d'une caméra Leica ICC50 HD intégrée à ce même stéréomicroscope, lié à un ordinateur pour une meilleure visualisation, description et photographie de l'échantillon.

3.2.2 Le statut mycorhizien

L'estimation du taux de mycorhization des racines a été réalisée avant coloration pour une évaluation du pourcentage de petites racines mycorhizées par rapport à leur nombre total dans un échantillon racinaire, et après coloration pour l'évaluation de la surface mycorhizées dans l'intégralité du système racinaire.

3.2.2.1 Estimation avant coloration

L'estimation avant coloration est également dite estimation des ectomycorhizes. La méthode d'évaluation utilisée est celle décrite par Brundrett *et al.* (1996). Elle consiste à placer l'échantillon racinaire dans une boîte de Pétri quadrillée à raison de 1 cm², et compter le pourcentage de fragments mycorhizés par rapport à ceux non mycorhizés dans un total d'à peu près 100 fragments en intersection avec les lignes du quadrillage.

3.2.2.2 Coloration des racines

L'étude de l'éctoendo- et de l'endomycorhization requiert une coloration des racines. Contrairement à la méthode précédemment décrite, celle-ci permet d'observer l'intégralité du mycélium porté par la racine, qu'il soit extra- ou intra-radulaire (intra ou intercellulaire).

La coloration des racines a été effectuée suivant la méthode de Philips et Hayman (1970) portant sur les quatre traitements suivants :

- Traitement des racines à la potasse (KOH à 10 %) pendant 20 à 60 min au bain marie (90 °C) avec éventuellement un renouvellement de la potasse toutes les 20 ou 30 minutes (la durée augmente avec la lignification des racines). Cette étape a pour but de vider le contenu cellulaire.
- Passage consécutif dans le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 10 % ou 30 Volumes) et dans le chlorure d'hydrogène (HCl 1N) pendant 5–10 min chacun dans le but de blanchir les racines.
- Colorer les racines au bleu Trypan (0.03 %) au bain marie à 90 °C, pendant 10–20 min (parfois plus, selon la nécessité). Cette étape a pour but de colorer le mycélium fongique pour pouvoir le visualiser et ainsi étudier le statut et le système mycorhizien.

NB : Il est important de savoir que le bleu Trypan (très dangereux et potentiellement cancérigène même par simple inhalation) est préférablement remplacé avec de l'encre bleue préalablement diluée dans du vinaigre potager (Acide acétique à 5 %). Pour préparer la dilution verser le contenu du flacon d'encre (≈57 ml) dans une fiole de 1 L puis compléter avec le vinaigre jusqu'au trait de jauge. Bien agiter à la main avant utilisation.

3.2.2.3 Estimation après coloration

La colonisation mycorhizienne des racines peut être estimée suivant plusieurs méthodes dont celle décrite par Giovanetti et Mosse (1980) utilisée dans le présent travail. Elle consiste à balayer la lame portant les racines colorées et compter le nombre de fragments racinaires mycorhizés dans un total de 100 fragments.

Contrairement à l'évaluation avant coloration qui ne concerne que les éctomycorhizes observées sur les petites racines, ce recensement permet d'évaluer le pourcentage de la surface racinaire mycorhizées par rapport à la surface racinaire totale de l'échantillon étudié. Elle inclut toutes les formes de colonisations : endo-, éctendo- et même éctomycorhizienne.

3.2.3 Le système mycorhizien

Contrairement aux mycorhizes à arbuscules où l'endomycorhization est évidente, les mycorhizes à terfesse peuvent former différents types d'associations symbiotiques. L'étude du système mycorhizien consiste donc à l'observation du type de colonisation mycélienne des racines. En d'autres termes étudier l'emplacement des hyphes fongiques dans la racine. Celles-ci peuvent être :

- Extra radiculaires : préciser s'il s'agit d'un véritable manteau fongique ou non.
- Intra radiculaires : préciser si la colonisation est intercellulaire (observer la présence ou non du réseau de Hartig), ou intracellulaire (présence potentielle des pelotons caractéristiques des terfesses).

L'étude du système mycorhizien intéresse de nos jours plusieurs chercheurs. Le but est de mieux connaître les types de mycorhizes et les facteurs qui régissent leur formation. Ceci est d'utilité dans la compréhension du cycle biologique du champignon et par conséquent dans sa production.

IV- Biotechnologie

Les méthodes biotechnologiques poursuivies sont basées sur les techniques décrites par Morte *et al.* (2008, 2009). Les cultures ont eu lieu au niveau du laboratoire « Mycologie-Mycorhizes-Biotechnologie végétale », de l'université de Murcia (Murcie, Espagne).

1. Production des plantes

Les plantes peuvent être produites sur un substrat, dans des pots, sous serre (*in vivo*), ou sur milieu de culture, dans des jarres spécifiques, dans une chambre de culture sous conditions contrôlés (*in vitro*). Les deux méthodes bien que différentes, partagent les premières étapes de récolte et de préparation des graines.

1.1 Préparation des graines

La récolte des graines de *Tuberaria guttata* a eu lieu vers la fin mai 2014 dans le site 9. Les graines sont récoltées dans leurs capsules. Elles sont conservées dans des sacs en papier ou à l'air libre pendant plusieurs heures voir quelques jours afin de favoriser le séchage des capsules. Les graines sont ensuite récupérées de leurs capsules par passage consécutif dans différent tamis (ouvertures de maille entre 400 et 50 μm) en écrasant légèrement.

Avant toute culture les graines doivent être scarifiées afin d'éliminer les téguments durs et accélérer le processus de germination. La méthode de scarification utilisée dans ce travail est une méthode mécanique qui consiste en ce qui suit :

- Placer les graines sur une feuille blanche et frotter soigneusement dessus avec du papier verre pendant plusieurs secondes (ne pas appuyer fort afin de ne pas écraser les graines).
- Faire glisser les graines sur une autre feuille blanche en inclinant la première doucement : les graines « sphériques » ont une vitesse de gravité supérieure à celle des débris des téguments. Ainsi, elles peuvent être récupérées seules sur la nouvelle feuille.

Refaire les mêmes manips jusqu'à élimination des téguments durs.

1.2 Culture *in vivo*

C'est une simple culture des graines dans des plaques alvéolées. Elle s'articule en plusieurs étapes :

1.2.1 Stérilisation des graines

Les graines scarifiées sont placées dans de la gaze (de préférence stérile) façonnée en sac fermé avec un élastique et plongée dans un flacon contenant de l' H_2O_2 à 10 % (33 volumes) pendant 15 minutes. En suite elles sont rincées au moins 3 fois dans de l'eau distillée stérile.

1.2.2 Préparation du substrat

Préparer un mélange de tourbe, perlite, et gravier à raison de 60 %, 20 %, 20 % respectivement et le distribuer sur les alvéoles de la ou les plaque(s) à utiliser. Le substrat n'est pas nécessairement stérilisé car tous les composants (industriels) sont d'ores-et-déjà stériles.

1.2.3 Ensemencement

Les graines préparées et stérilisées sont ensemencées dans les plaques préparées en plaçant 3 à 4 graines à la surface du sol dans chaque alvéole. Une fois l'ensemencement terminé la plaque est arrosée à l'eau du robinet et mise dans une boîte transparente avec une sorte de bouche d'aération au sommet. Elle est ensuite placée en serre dans des conditions de température et de pression plus ou moins contrôlées.

1.3 Culture *in vitro*

1.3.1 Stérilisation des graines

Les graines sont placées dans de la gaze et stérilisées dans de l'eau de Javel à 10 % et une goutte de détergent commercial pendant 15 à 25 min en agitant toutes les 5 min. Elles sont ensuite rincées au moins 3 fois sous hotte dans de l'eau distillée stérile.

1.3.2 Préparation du milieu

La culture *in vitro* des plantes est réalisée sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) à pH = 5.8, préparé dans des jarres destinées à la culture tissulaire *in vitro*, dotées de couvercles transparents à système de fermeture non hermétique, permettant les échanges gazeux uniquement. Le milieu est stérilisé à 180 °C pendant 20 min.

1.3.3 Ensemencement

L'ensemencement est théoriquement simple. Cependant, il requiert un matériel bien stérilisé et une vigilance extrême (Fig. 18). Il s'effectue comme suit :

- Prendre les graines une à une (dans la mesure du possible) et les déposer à la surface du milieu gélosé (sans les enfoncer) à ordre de 10 à 15 graines par jarre.
- Annoter les jarres en prenant garde de ne rien écrire sur le couvercle afin de ne pas diminuer le passage de la lumière.

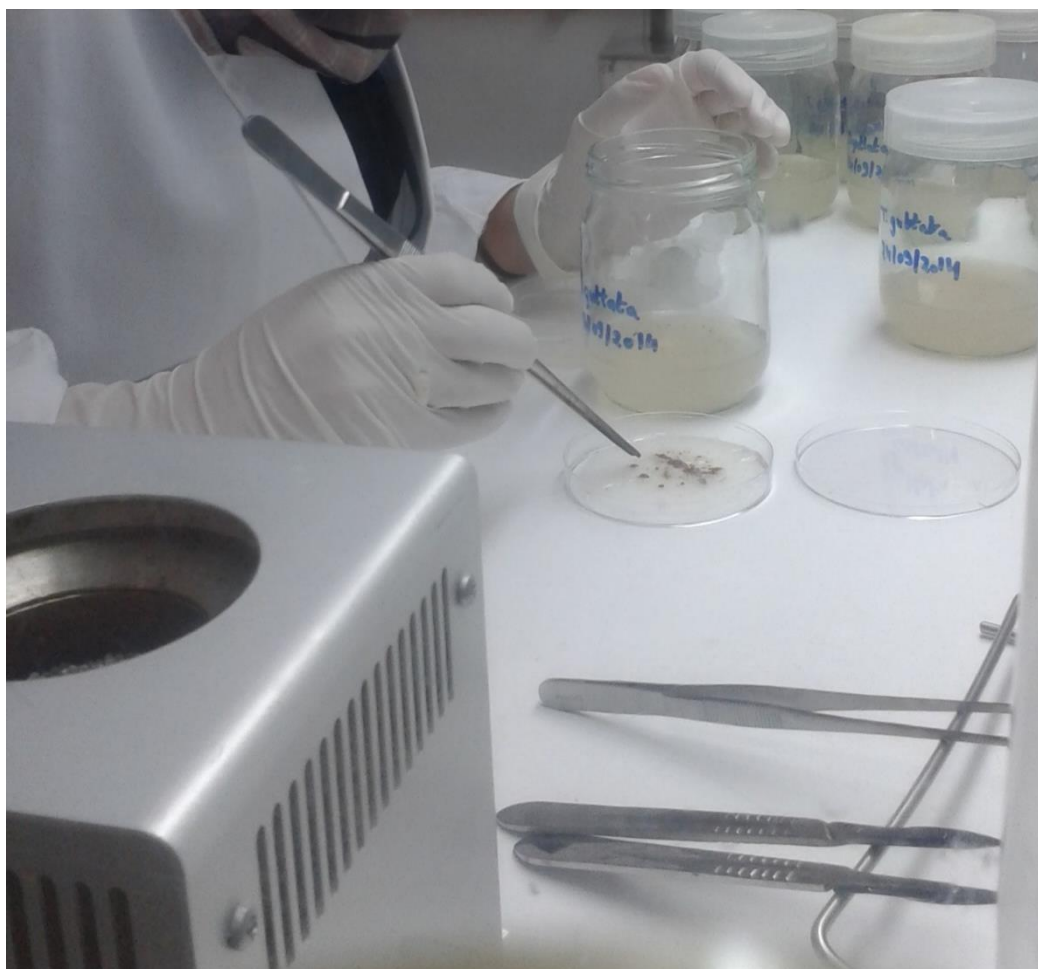


Fig. 18 Culture *in vitro* des plantes

La photo montre l'ensemencement des graines (dans la boîte de pétrie) sous hotte dans des conditions stériles.

Les jarres ainsi ensemencées sont placées dans une chambre de culture sous les conditions contrôlées suivantes :

- Température : 22 ± 2 °C.
- Pression à l'intérieur des jarres : entre 50 et 80 %.
- Intensité lumineuse : $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Elle est assurée par des néons blancs spéciaux pour la culture *in vitro* des plantes ne dégageant pas de chaleur. Ces néons sont placés à environ 30–35 cm des sommets des jarres.

1.3.4 Micropropagation

La micropropagation n'est pas indispensable, cependant elle permet l'obtention d'un grand nombre de plantes à partir d'un petit nombre. Elle est basée sur la propriété de totipotence des cellules végétales, capables de régénérer une plante entière à partir d'un seul tissu (ou cellule) vivant(e). Elle doit se dérouler dans des conditions extrêmement stériles lorsque les plantes cultivées *in vitro* atteignent une longueur d'environ 5–7 cm. Elle passe par les étapes suivantes :

- Sous la hotte, ouvrir la jarre contenant les plantules à propager, prendre une à l'aide d'une pince stérile, la déposer sur du papier stérile et fermer rapidement la jarre.
- Découper la plantule en micro plantules de quelques centimètres après en avoir éliminé la racine (elle n'est nécessaire qu'au dernier stade avant l'inoculation).
- Placer les petites plantules une à une dans une nouvelle jarre.
- Refaire la même chose pour toutes les plantules à propager en changeant le papier stérile à chaque fois. Des plantules issues de différentes jarres peuvent être réunies ensemble à ordre de 5 à 8 plantules dans chaque nouvelle jarre.
- Les jarres contenant les nouvelles plantules sont placés dans la même chambre de culture (mêmes conditions), et le processus peut se refaire tant que nécessaire.

2. Production de l'inoculum

L'inoculum des terfesses est produit à partir des ascocarpes récoltés, *in vivo* sous forme de solution sporale ou *in vitro* sous forme de culture mycélienne.

2.1 Solution sporale

La production *in vivo* de l'inoculum à base de spores passe par les étapes suivantes :

- Stériliser la surface des ascocarpes de terfesse à l'alcool (Éthanol à 75 %).
- Couper les ascocarpes en petits morceaux et les mettre dans un récipient ouvert.
- Sécher à l'étuve à 60 °C pendant au moins 24 h.
- Broyer puis stocker à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.
- Au moment de l'utilisation, le broyat doit être mélangé à de l'eau distillée stérile à raison de 6 g de poids sec dans 1 L d'eau. La suspension sporale est ensuite mélangée à de la perlite avec une concentration de 150 ml de suspension par litre de perlite.

NB : Le séchage n'est pas indispensable à la production de l'inoculum, c'est une forme de conservation si celui-ci est destiné au stockage. Ainsi, la production d'inoculum à partir d'ascocarpes frais est aussi possible. Dans ce cas, remplacer les 6g de poids sec par 20 g de poids frais (puisque l'eau constitue 70 % du poids frais de l'ascocarpe) et procéder de la même manière pour les autres étapes.

2.2 Culture mycélienne

L'inoculum mycélien des terfesses est une culture sur milieu MMN (Modified Melin-Norkrans ; Marx 1969) d'un fragment de la glèbe dans des conditions extrêmement stériles.

Cette culture passe par les étapes suivantes :

- Bien laver les ascocarpes et stériliser leurs surfaces à l'alcool.
- Sous la hotte, provoquer une légère lésion à la surface de l'ascocarpe. Suivre préférentiellement la fente naturelle s'il en existe. Éviter d'enfoncer la lame dans la profondeur de la glèbe afin ne peut pas porter les contaminants de la surface à l'intérieur de l'ascocarpe. Ouvrir l'ascocarpe avec les mains suivant la fente provoquée. Faire attention à ne pas toucher la glèbe pour ne pas la contaminer avec les doigts.
- Prendre un fragment de 4 à 5 mm² et le placer au milieu d'une boîte de Pétri contenant du milieu MMN gélosé en l'enfonçant légèrement (éventuellement créer une lésion au niveau du milieu gélosé pour y placer le fragment puisque il s'agit d'un champignon hypogé).
- Fermer hermétiquement la boîte de Pétri au parafilm, l'annoter et la placer dans une étuve réglée à 25 °C. Un suivi régulier est requis afin de pouvoir purifier les cultures en cas de contamination du milieu (loin du fragment de l'ascocarpe).

3. Inoculation

Il y a plusieurs modalités de production de plants mycorhizés (Fig. 19).

Seulement deux ont été entreprises dans le présent travail dont une seule a abouti à la mycorhization.

Les deux expériences réalisées ont portées sur l'utilisation de la solution sporale pour l'inoculation de plantes produites *in vivo* et *in vitro*. Pour les deux, un transfert des plants produits dans un nouveau substrat a été nécessaire.

3.1 Inoculation plantes *in vivo* x champignon *in vivo*

Pour s'apprêter à recevoir l'inoculum, les plantes produites *in vivo* doivent être transmises dans un nouveau substrat conforme au premier, mais en remplaçant le gravier par le sol originaire des sites à terfesses (Soit donc un mélange de 60 % tourbe, 20 % perlite et 20 % sol). Le substrat préparé est stérilisé à 108 °C trois fois pendant 1 h à intervalle de 48 h.

Une fois le substrat et l'inoculum préparés, l'inoculation est réalisée dans des pots d'à peu près 500 cm³, comme suit :

- Remplir un peu plus de la moitié des pots par le substrat préparé et compléter jusqu'aux $\frac{3}{4}$ du volume par l'inoculum sporale.
- Transférer les plantules âgées d'au moins 45 jours dans les pots en mettant bien en contact les racines des plantes avec l'inoculum, puis recouvrir du substrat et arroser.

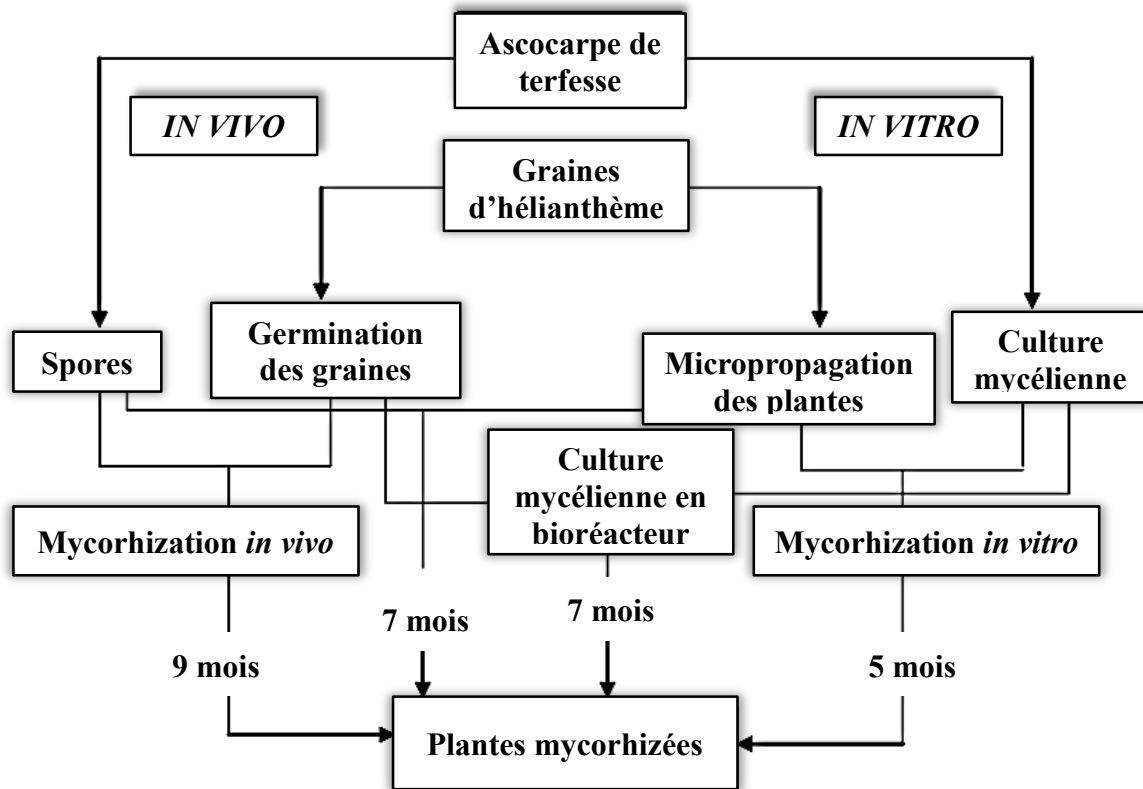


Fig. 19 Les différentes modalités pour la production des plantes mycorhizées par les terfesses

(Morte *et al.*, 2008)

- Placer les plantes en serre et faire un suivi continu. Ne pas les arroser abondamment car un petit déficit hydrique pourrait être bénéfique pour la mycorhization.

3.2 Inoculation plantes *in vitro* x champignon *in vivo*

Les plantes produites *in vitro* passent préférablement par une étape d'acclimatation avant inoculation. Cependant, faute de temps, nous avons effectuée simultanément les deux étapes. De ce fait, l'inoculation des plantes produites *in vitro* a été réalisée suivant le même protocole décrit pour les plantes produites *in vivo*, à la seule différence de la composition du substrat.

Celui-ci est constitué de $\frac{1}{3}$ tourbe, $\frac{1}{3}$ perlite, $\frac{1}{6}$ sable et $\frac{1}{6}$ sol. La tourbe utilisée est une tourbe baltique noire caractérisée par son acidité. Ainsi, afin d'équilibrer le pH du mélange, nous avons utilisé un sol humifère plutôt alcalin. À partir de la stérilisation du substrat, les étapes sont les mêmes que celles précédemment décrites précédemment dans la culture et inoculation *in vivo* des plantes.

4. Analyse des résultats

Les racines issues de l'inoculation contrôlée sont à la fin de l'expérience récupérées et observées afin d'en déduire l'aboutissement ou non par l'étude du statut et du système mycorhiziens. L'analyse de ces plantes porte sur les mêmes paramètres que pour les racines récoltées dans la nature et suivant les mêmes protocoles.

4.1 Les morphotypes de mycorhizes

Voir section [II 3.2.1](#) de ce chapitre.

4.2 Le statut mycorhizien

Voir section [II 3.2.2](#) de ce chapitre.

4.3 Le système mycorhizien

Le système mycorhizien des racines issues de la mycorhization contrôlées a été étudié par l'observation des racines suivant le même protocole ultérieurement décrit ainsi que par des coupes semi-fines des mycorhizes obtenues.

4.3.1 Observation des racines

Voir section [II 3.2.3](#) de ce chapitre.

4.3.2 Coupes semi-fines

Les coupes semi-fines des mycorhizes permettent une meilleure analyse du système mycorhizien. Elles ont été réalisées à l'université de Murcia (Murcie, Espagne) sur trois différents morphotypes, selon le protocole décrit ci-après :

4.3.2.1 Préparation de l'échantillon

La préparation des échantillons s'effectue après une visualisation des racines mycorhizées sous loupe binoculaire et la sélection des fragments racinaires ou des mycorhizes à sectionner. Elle passe par les étapes suivantes :

- Fixer les mycorhizes (ou racines mycorhizées) sélectionnées en les plaçant dans des tubes en verre hermétiquement clos contenant du Glutaraldéhyde à 3 % pendant 8 à 24 h à 4 °C.
- Laver les racines dans un tampon Cacodilate 0.1 M une fois pendant 24 h à 4 °C ou en répétant l'opération 3 fois de suite afin de raccourcir le temps et passer directement à l'étape suivante.

- Mettre les racines pendant 2 h à 4 °C dans du tétraoxyde d'osmium dont le rôle est la fixation des lipides racinaires.
- Laver les racines une fois encore dans le tampon, cette fois-ci pendant 2 jours à 4 °C.
- Faire un passage dans de l'acétate d'uranyle additionné de 2 % véronal sodique, et ce pour une durée de 90 min à 4 °C également, c'est la post coloration.
- Laver à l'aide de l'eau bidistillée ou du Milli Q, pendant 2 min.

NB : Contrairement aux premières étapes faites à 4 °C, les prochaines étapes jusqu'à la formation des blocs sont réalisées à température ambiante.

- Réaliser une déshydratation par des passages consécutifs dans de l'éthanol à 30 % pendant 20 min, 50 % pendant 50 min, 70 % pendant 50 min, 90 % pendant 40 min, 100 % deux fois 40 min.
- Mettre les mycorhizes dans de l'oxyde de propylène à 99.5 %, deux fois pendant 15 min.
- Passer les racines dans un mélange 1/1 d'oxyde de propylène et de résine (Spurr) durant 2 h.

Refaire la même étape précédente dans un mélange 1/2 d'oxyde de propylène et de résine (Spurr).

- Placer les racines dans de la résine pure pendant une nuit complète à l'abri de toute source de chaleur.

4.3.2.2 Formation des blocs

Les blocs sont préparés dans des moules spéciaux, passant par les étapes suivantes :

- Verser de la résine Spurr pure dans les moules à bloc.
- À l'aide d'une aiguille, prendre les échantillons traités et les mettre un par bloc dans le moule contenant la résine. Faire attention à bien placer l'échantillon selon l'orientation de la coupe désirée (longitudinale ou transversale).
- Garder les moules à 60–62 °C pendant 48–72 h.

Les blocs ainsi formés, peuvent être conservés pendant de très longues années.

4.3.2.3 Réalisation des coupes

Les coupes semi-fines sont réalisées grâce à un ultramicrotome Leica EM UC6 en utilisant un couteau en diamant (taille 4, type histo, vitesse 1 mm/s) muni d'une cuve. Les étapes peuvent être résumées comme suit :

- Mettre le bloc dans le porte-échantillon et éliminer, à l'aide d'une lame, l'excès de résine en épaisseur. Ceci doit être fait en diagonal car l'inclinaison permet d'absorber les vibrations. Faire attention à ne toucher ni l'échantillon ni la longueur du bloc.
- Placer le porte-échantillon dans l'ultramicrotome, le fixer et placer le couteau en diamant muni d'une cuve remplie d'eau et servant à la récupération des coupes désirées.

Si la partie voulue se trouve en profondeur de l'échantillon en question, il faut d'abord faire des coupes non récupérables à l'aide de lame en verre sans cuve, jusqu'à parvenir à la partie recherchée (à couper par la suite à l'aide du couteau en diamant).



Chapitre 4

Résultats et discussion



Chapitre 4 : Résultats et discussion

I- Sites à terfesse

Dans la région d'étude, la terfesse se développe sur la quasi-totalité des dunes non anthropisées et caractérisées par la présence du partenaire végétal de la symbiose. Ces dunes au long du cordon sont assez nombreuses, cependant, une dizaine seulement a pu être prospectée.

L'analyse de la diversité floristique des sites et de la répartition des espèces de plantes montre pour la quasi-totalité une physionomie semblable : des prairies de grande étendue laissant voir pour la plupart une ligne d'arbre ou une forêt à l'horizon. Le site 2 qui se trouve à côté d'une forêt de pin maritime, est la seule buissonnaie qui soit parmi ces sites à terfesses (Fig. 20). Les détails de leurs caractéristiques climatiques et édaphiques sont présentés dans les prochaines sections (II 1, II 2) de ce chapitre. Leur répartition géographique est représentée sur le plan topologique (Fig. 21) ci-après. Certains sites très récemment découverts, n'ont pas été indiqués sur la carte. Leur étude est reportée à un temps ultérieur.

Il est important de signaler que l'exploitation des terres dans la région, a provoqué la perte d'un nombre non négligeable de terres productrices des terfesses, dont le site 1 dirigé vers l'exploitation agricole, le site 4 confiné dans une pépinière autrefois non fonctionnelle, et qui perd sa surface petit à petit avec la reprise de la fonctionnalité de la pépinière, le site 5 qui a été dégradé par l'immobilier, le site 7 très tabassé par piétons et tracteurs ne cesse de prendre du recul du point de vue production des terfesses.

Ces terres, notamment celles labourées, ne pourront reproduire des terfesses que dans quelques années (une dizaine d'années en moyenne). Les conséquences de cette exploitation des terres, bien que encouragée car bénéfique pour l'agriculture en particulier et l'économie en générale, sont facilement perceptibles : les terfesses vendues au bord de la route avec les autres légumes et fruits de la saison n'y sont plus, les gens en cueillent de plus en plus pour leur propre consommation que pour la vente, surtout que même les conditions environnementales encouragent relativement moins la production des terfesses dans ces dunes. Seules les familles les plus fans de ce champignon, qui fait partie intégrante de leurs habitudes culinaires, veillent à laisser une petite parcelle de terre non labourée spécialement pour la cueillette des terfesses.

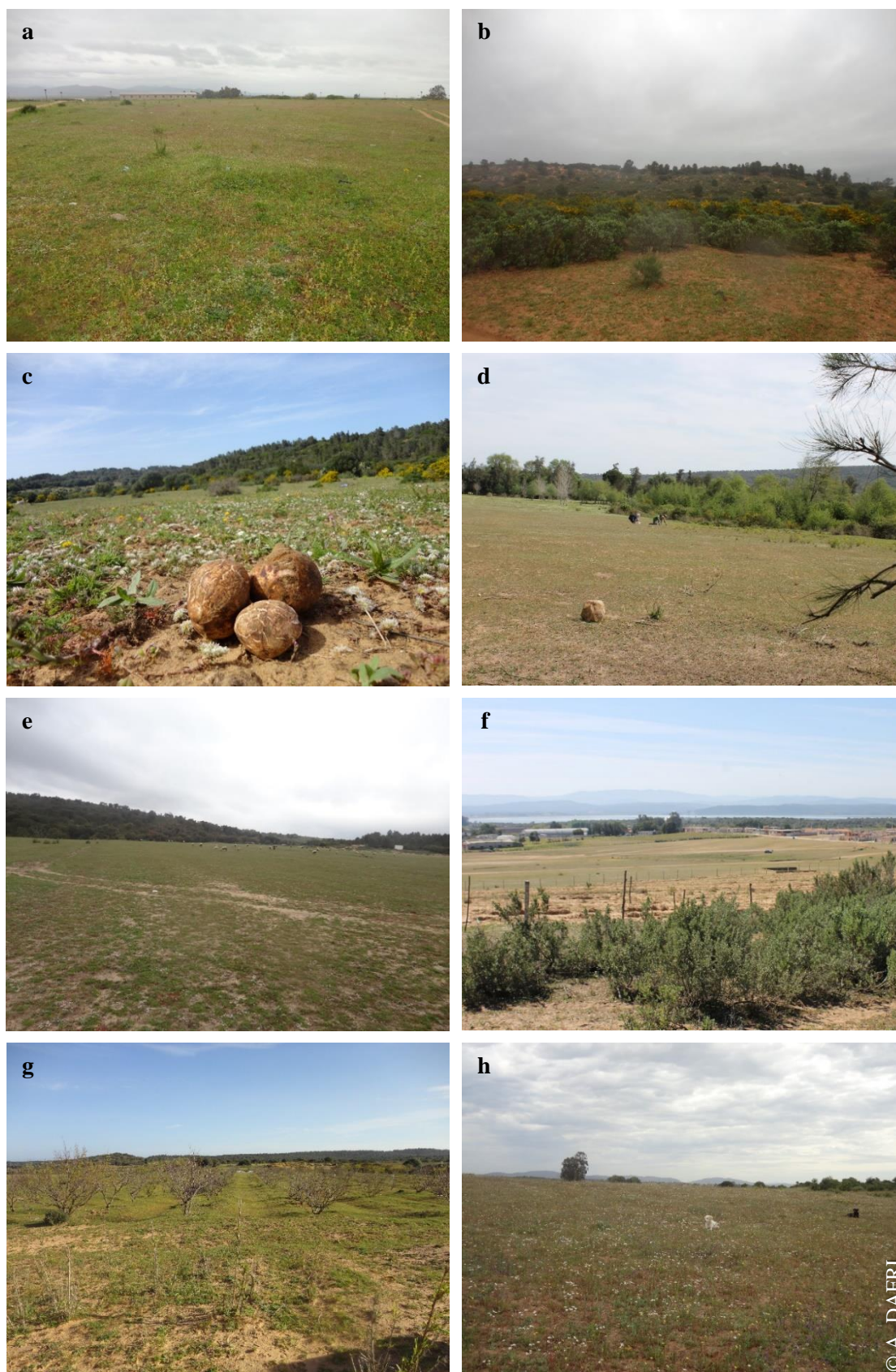


Fig. 20 Quelques sites à terfesse

a : site 1, **b** : site 2, **c** : site 3, **d** : site 4, **e** : site 6, **f** : site 7, **g** : site 8, **h** : site 9

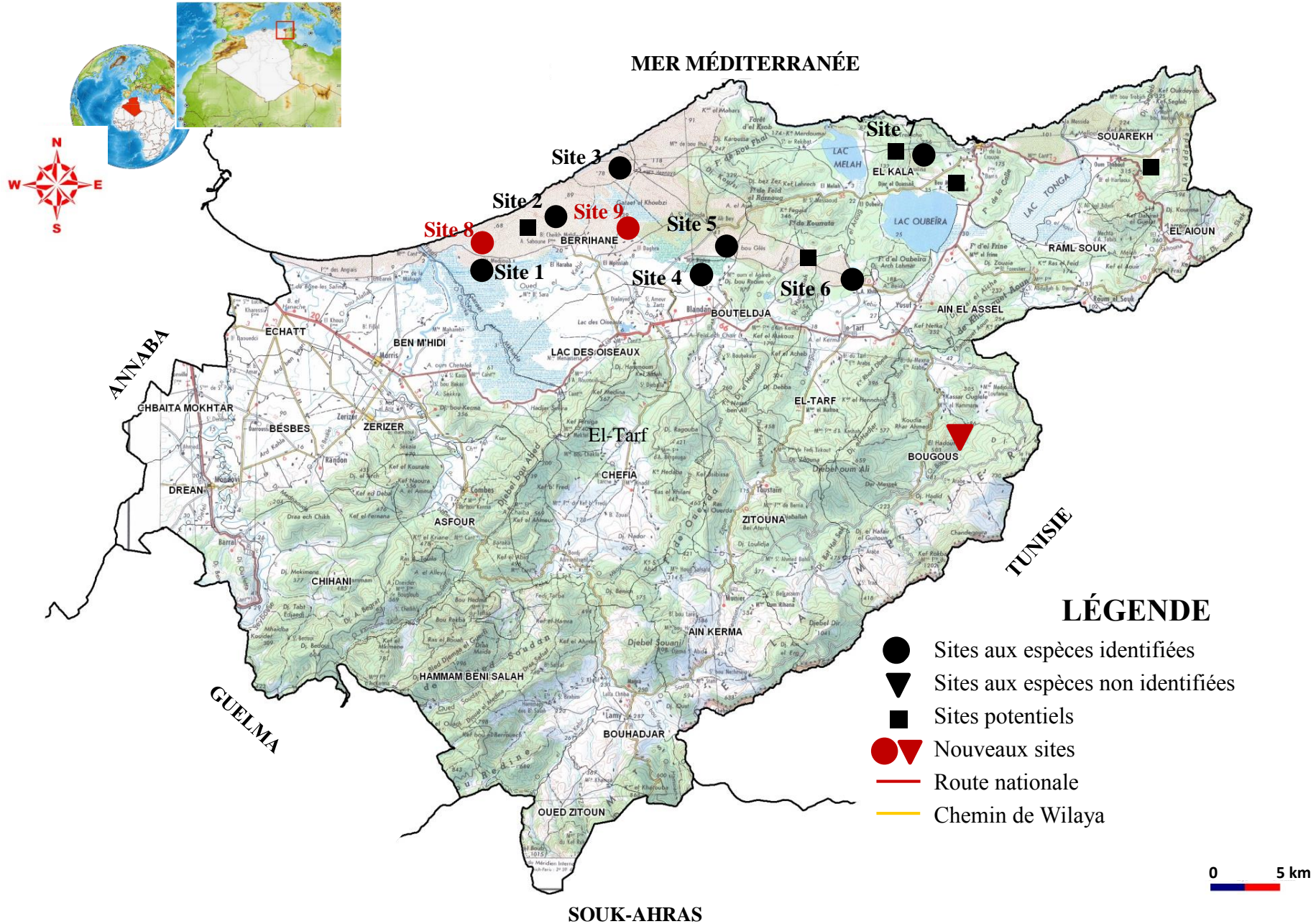


Fig. 21 Localisation des sites à terfesse dans les dunes littorales du Nord-Est algérien

II- Écologie

1. Le climat

L'analyse des données climatiques de la région des années 2012–2016 a permis d'en déduire les précipitations annuelles, le mois le plus sec et le plus humide, ainsi que le mois le plus froid et le plus chaud de l'année, en précisant les valeurs mensuelles moyennes correspondantes. Ces résultats sont représentés dans le tableau 6 ci-après.

Tableau 6 Propriétés climatiques de la région d'étude

	2012	2013	2014	2015	2016
Précipitations annuelles (mm)	772.1	776.6	803.7	880.6	585.7
Mois le plus humide	Février	Janvier	Décembre	Février	Mars
Précipitations (mm)	238	133	293	269	124,5
Mois le plus sec	Juillet	Juin	Août	Juillet	Août
Précipitations (mm)	0	0.4	1.7	0	0.6
Mois le plus frais	Février	Février	Déc. + Jan	Février	Janvier
Température (°C)	9.3	10	13	11	13
Mois le plus chaud	Août	Juil. + Août	Août	Juillet	Juil. + Août
Température (°C)	29.7	27.5	28	29	27

Les diagrammes ombrothermiques des cinq années sont représentés par les courbes de Gauss ci-après (Fig. 22).

Le diagramme de l'an 2012 montre deux périodes humides, l'une de janvier à la fin avril et l'autre de novembre à décembre et une longue période sèche qui se prolonge de la fin avril jusqu'au début septembre. Une brève période sèche a également été notée entre la fin octobre et le début novembre.

La courbe gaussienne de l'an 2013 montre cinq périodes distinctes. Trois humides et deux sèches. Les périodes humides se prolongent respectivement de janvier à mai, d'août à septembre et d'octobre à décembre. La longue période sèche a débuté en mai et s'est achevée en août. La courte période sèche est observée entre la deuxième semaine de septembre et le début octobre.



Fig. 22 Diagrammes ombrothermiques de la wilaya d’El Tarf 2012–2016

En 2014 une seule longue période sèche a été marquée. Elle a commencé en début avril et s'est achevée à la mi-septembre. Deux périodes humides sont observées, la première va du mois de janvier jusqu'au mois d'avril avec une rupture en mois de février, et la seconde débute faible à la deuxième quinzaine du mois de septembre et prend la hausse à partir du mois de novembre pour atteindre son apogée en décembre (le mois le plus pluvieux de l'année).

L'an 2015 a aussi enregistré deux périodes humides et une sèche. Les périodes humides se prolongent respectivement de janvier à la fin mars et de septembre à la fin décembre. La période sèche commence avant le début avril jusqu'au mois de septembre avec une nette rupture en début mai.

L'an 2016 a dessiné une courbe gaussienne marquée par une seule période sèche de quatre mois, débutant en mai et se terminant en septembre et deux périodes humides, l'une de janvier à mai et l'autre de septembre à décembre.

À première vue des courbes gaussiennes ci-dessus, l'instabilité du climat au cours des années d'étude se fait tout de suite remarquée. Ceci témoigne, à petite échelle, du changement climatique que subit la planète. Un réchauffement net se laisse voir dans les années 2012, 2013 par les périodes sèches enregistrées en automne (respectivement en octobre et novembre), ainsi que par les longues périodes sèches de 2014 et 2015, qui se sont prolongées sur cinq mois voire plus, d'avril jusqu'au début ou la mi-septembre. Malgré les périodes sèches longues ou inhabituellement automnales, les années 2012, 13, 14 et 15 ont joui d'une meilleure pluviométrie [772–881 mm] que l'an 2016 où les précipitations annuelles étaient inférieures à 590 mm.

En terme de pluies automnales précédant la période de récolte des terfesses, les années 2012 à 2016 ont bénéficié respectivement de : 326.7 mm, 192.2 mm, 275.3 mm, 418.9 mm et 221.2 mm. Aucune donnée chiffrée sur la production des terfesses dans la région n'est disponible, la récolte est faite anarchiquement par les habitants, chacun dans les sites qui l'entourent. Ainsi, l'étude sérieuse de la relation entre le climat et la production des terfesses n'a pu être menée. Cependant, ce qui semble bien évident c'est le fait que l'année 2015 soit la plus productive, probablement suivie de l'année 2012. Ce classement est basé sur l'évaluation des récolteurs, notre propre perception sur le terrain, les quantités de terfesses que nous avons pu cueillir ainsi que la taille moyenne des ascocarpes récoltés (celles-ci dépassent les 4 cm de diamètre pour les années 2012 et 2015). Cette observation, peut être appuyée par le résultat de Bradai *et al.* (2014) qui ont mené une étude sur les terfesses du sud du pays et ont démontré que la production du champignon est significativement influencée par les pluies automnales. Selon ces mêmes auteurs, les autres facteurs climatiques tels que les précipitations annuelles, les précipitations hivernales et les températures minimales entre juin et mars ne montrent aucune forte corrélation positive avec la production du champignon.

Si on se base sur les précipitations automnales, le classement de la production des terfesses durant les cinq dernières années serait comme suit : 2015, 2012, 2014, 2016 et 2013.

2. Le sol

L'étude des caractéristiques édaphiques des sites à terfesse montre que tous les sites partagent une texture limono-sableuse, un sol faiblement acide et généralement peu salé avec différentes teneurs en matière organique, azote et phosphore total et assimilable (Fig. 23).



Fig. 23 Histogrammes représentant les caractéristiques édaphiques des sols à terfesse

Les valeurs du pH montrent qu'à l'exception du site 1 à pH neutre (6.78), les sites d'étude sont tous dotés de sols faiblement acides dont la plus faible valeur (6.13) est enregistrée au niveau du site 3. Le pH KCl témoigne de la tendance acide des sept sites avec un potentiel minimum de 5.63, pouvant être éventuellement enregistré au niveau du site 3 toujours. La comparaison de ces valeurs avec celles reportées dans d'autres régions productrices des terfesses en Algérie montre une différence très significative entre les sols à tendance acide de la présente région d'étude, et les sols alcalins des autres régions du pays, comme le littoral ouest (Wilaya de

Mostaganem ; Aïbeche, 2008), les régions steppiques de la wilaya de Tiaret (Zitouni, 2010) et les régions désertiques de la wilaya de Ghardaïa (Bradai *et al.*, 2014b). Ces sols sont cependant similaires aux sols acides reportés pour d'autres sites à terfesses d'Algérie, du Maroc (Díez *et al.*, 2002) et d'Espagne (Bordallo *et al.*, 2013).

La conductivité électrique inférieure à 0.6 mS/cm partout signifie que les sols des sept sites sont non salés. Ce résultat rappelle ceux obtenus pour les régions steppiques par Zitouni (2010). Ils se montrent, en revanche, un peu inférieure à ceux obtenus par Aïbeche (2008) et Bradai *et al.* (2014b) pour le littoral ouest et les régions désertiques respectivement, où les valeurs de la conductivité supérieures à 0.6 mS/cm se réfèrent à des sols peu salés.

La matière organique mesurée à partir du carbone total est très variable. D'après les tableaux de Baize (2000), elle est extrêmement faible dans le site 2, très faible dans le site 6, faible dans les sites 1, 3, 4 et 5, et moyenne dans le site 7. La valeur du site 2 est conforme aux teneurs des régions steppiques et désertiques reportées par Zitouni (2010) et Bradai *et al.* (2014b) respectivement, pendant que la valeur moyenne du site 7 est analogue au résultat obtenu par Aïbeche (2008) pour le littoral ouest. Ces teneurs rentrent toutes dans l'intervalle délimité par Bonifacio et Morte (2014) pour les sols à terfesse de la méditerranée.

La teneur en Azote dans tous les sols n'excède pas les 4.5 mg/kg, à l'exception du sol 2 où elle est de 14.8 mg/kg. Ces teneurs, comprises entre 1.8 et 14.8 mg/kg, sont très faibles comparées aux valeurs avancées par Bonifacio et Morte (2014) pour les sols méditerranéens, dont, d'après ces auteurs, les valeurs varient entre 0.7 et 2.2 g/kg soit 700 et 2200 mg/kg.

Le phosphore assimilable est faible dans les sept sites. Il est inférieur à 4 mg/kg dans le site 6, et varie entre 16 et 64 mg/kg dans tous les autres sites. Ses teneurs sont conformes aux résultats des autres régions du pays (Aïbeche, 2008 ; Zitouni, 2010 ; Bradai *et al.*, 2014b) ainsi que des sols à terfesse des autres régions méditerranéennes (Bonifacio et Morte, 2014).

La texture limono-sableuse des sols à terfesse présentement analysées est plus ou moins différente des textures observées dans les autres régions du pays. Elle est un peu proche des sables-limoneux observés dans le littoral ouest du pays (Aïbeche, 2008), et moins proches des limons-argiles-sables des régions steppiques (Zitouni, 2010) et des terres sableuses du désert (Bradai *et al.*, 2014b).

3. La diversité floristique

L'étude de la diversité floristique des sites à terfesse montre que les sites prospectés partagent un certain nombre de plantes herbacées de différentes familles végétales, et diffèrent par la présence ou absence de quelques arbrisseaux ou arbustes.

Ces arbrisseaux sont présents sur les frontières des sites 1 et 5. Ils forment un petit buisson à côté du site 3 et sont parsemés sur tout le site 2 où les terfesses sont récoltées sur de petites parcelles de 1 à 5 m² séparées par les petits arbrisseaux et arbustes qui les intercalent. Les sites 6 et 7 quant à eux, ne laissent observer que des plantes herbacées tapissant le sol.

3.1 Les plantes herbacées

Les espèces de plantes herbacées communes dans la quasi-totalité des sites appartiennent à différentes familles végétales à savoir :

3.1.1 La famille Asteraceae

Cette famille est représentée dans les sites à terfesses étudiés par plusieurs genres (Fig. 24a-e) :

- Le genre *Leucanthemum* : Ce sont les marguerites rencontrées dans presque tous les sites. Souvent de petites tailles, abondantes et fréquemment trouvées proche des points de récolte des tubercules.
- Le genre *Chrysanthemum* : Communément appelées pâquerettes, ses plantes aux fleurs jaunes et blanches (bicolor) forment un joli ornement sur les terrains à terfesse où elles poussent.
- Les genres : *Centaurea* (les centaurées), *Echinops* (les chardons), *Tanacetum* (la tanaïs) et *Taraxacum* (les pissenlits), beaucoup moins fréquents, généralement représentés par quelques plantes parsemées dans les sites ou sur leurs bords.

3.1.2 La famille Caryophyllaceae

Deux principales espèces de cette famille partagent les sites à terfesse avec la plante hôte du champignon. Ces deux espèces appartiennent à deux genres différents (Fig. 24f-g) :

- Le genre *Paronychia* : Il est représenté par *Paronychia argentea* (la paronyque). Cette plante aux tiges couchées et aux fleurs argentées tapisse très joliment les sols de tous les sites à terfesse.

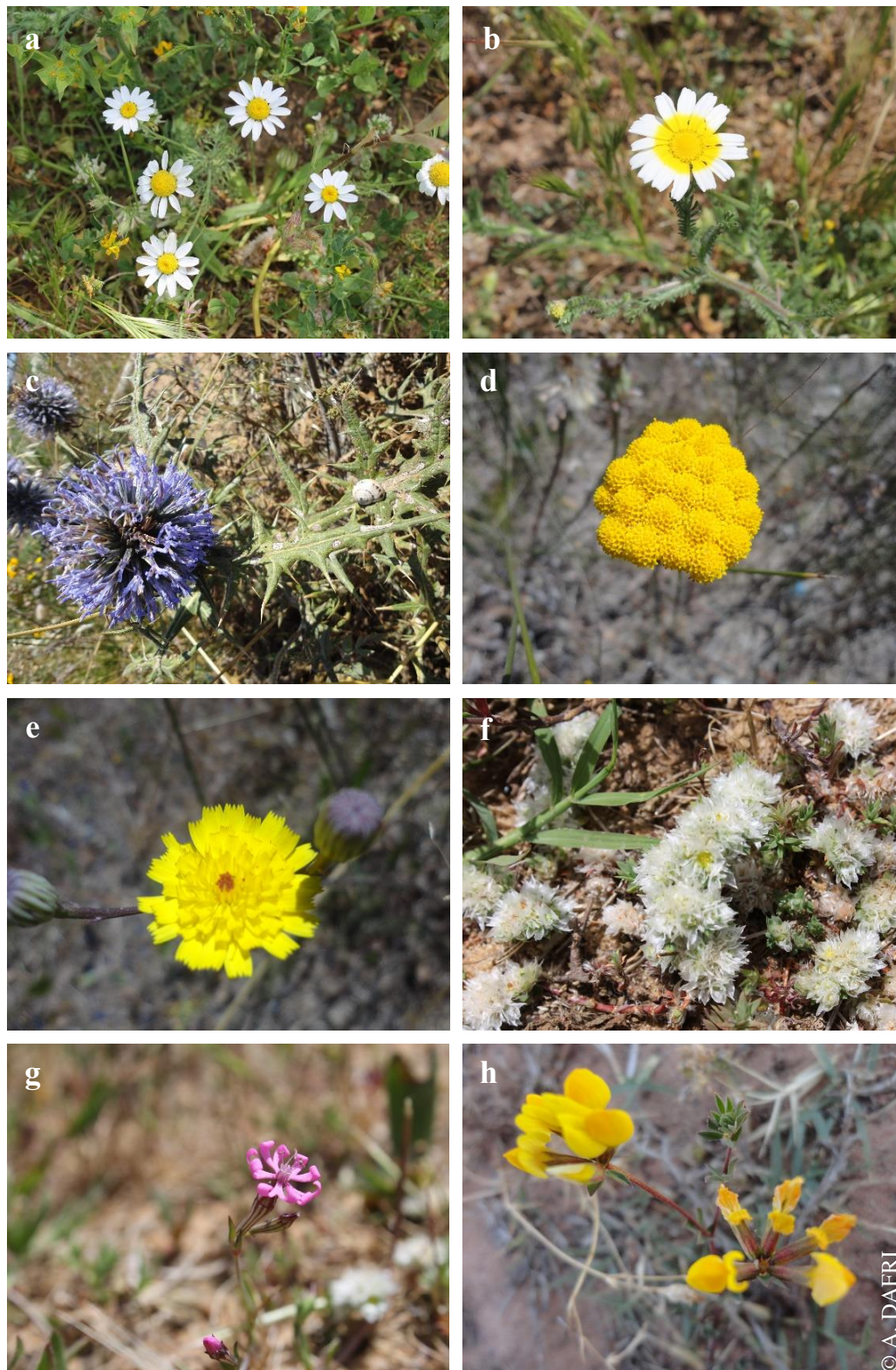


Fig. 24 La diversité floristique des sites à terfesse (A)

a-e : Asteraceae (**a** : *Leucanthemum* sp., **b** : *Chrysanthemum bicolor*, **c** : *Echinops* sp., **d** : *Tanacetum* sp., **e** : *Taraxacum* sp.), **f-g** : Caryophyllaceae (**f** : *Paronychia argentea*, **g** : *Silene colorata*), **h** : Fabaceae (*Medicago marina*).

- Le genre *Silene* : Il est représenté par *Silene colorata* (le silène), largement distribué et très remarquable de par ses tiges longues (15 à 60 cm) et sa longue période de floraison (de janvier à juin).

3.1.3 La famille Fabaceae

Cette famille est aussi représentée par deux genres largement distribués dans les sites à terfesse :

- Le genre *Trifolium* (les trèfles).
- Le genre *Medicago* (les luzernes) (Fig. [24h](#)).

3.1.4 La famille Poaceae

Cette famille végétale est l'une des plus fréquentes dans les sites à terfesse. Elle est représentée par différentes espèces communes des régions méditerranéennes ou de l'Afrique du Nord, formant généralement les gazons ou pelouses, considérées comme mauvaises herbes dans les terrains cultivés et représentant un bon fourrage dans les terrains de pâture. Ces espèces appartiennent à plusieurs genres dont les suivants (Fig. [25a](#)) :

- Le genre *Poa* : Il regroupe des plantes annuelles et d'autres vivaces, communément appelées pâturins.
- Le genre *Festuca* : Les plantes de ce genre portent le nom commun «fétuques».
- Le genre *Lolium* : Ces plantes très proches entre elles sont communément appelées ivraies.

3.1.5 La famille Boraginaceae

Cette famille est représentée par une principale espèce du genre *Echium*. C'est la vipérine à feuilles de plantain (*Echium plantagineum*). Cette plante aux fleurs parfois bleues, souvent mauves (Fig. [25b](#)) est notamment remarquable dans le site 4 où elle partage le paysage avec les autres plantes venant d'être citées.

Les plantes herbacées listées ci-avant, n'ont pas toutes la même abondance dans les sites à terfesse. De manière générale, celles fréquentes dans tous les sites sont : les marguerites, la paronyque, les graminées, les trèfles et/ou la luzerne et enfin le silène.

En plus de ces plantes, d'autres espèces ont également été identifiées, citons non exhaustivement les suivantes (Fig. [25c](#), d, e, f) :

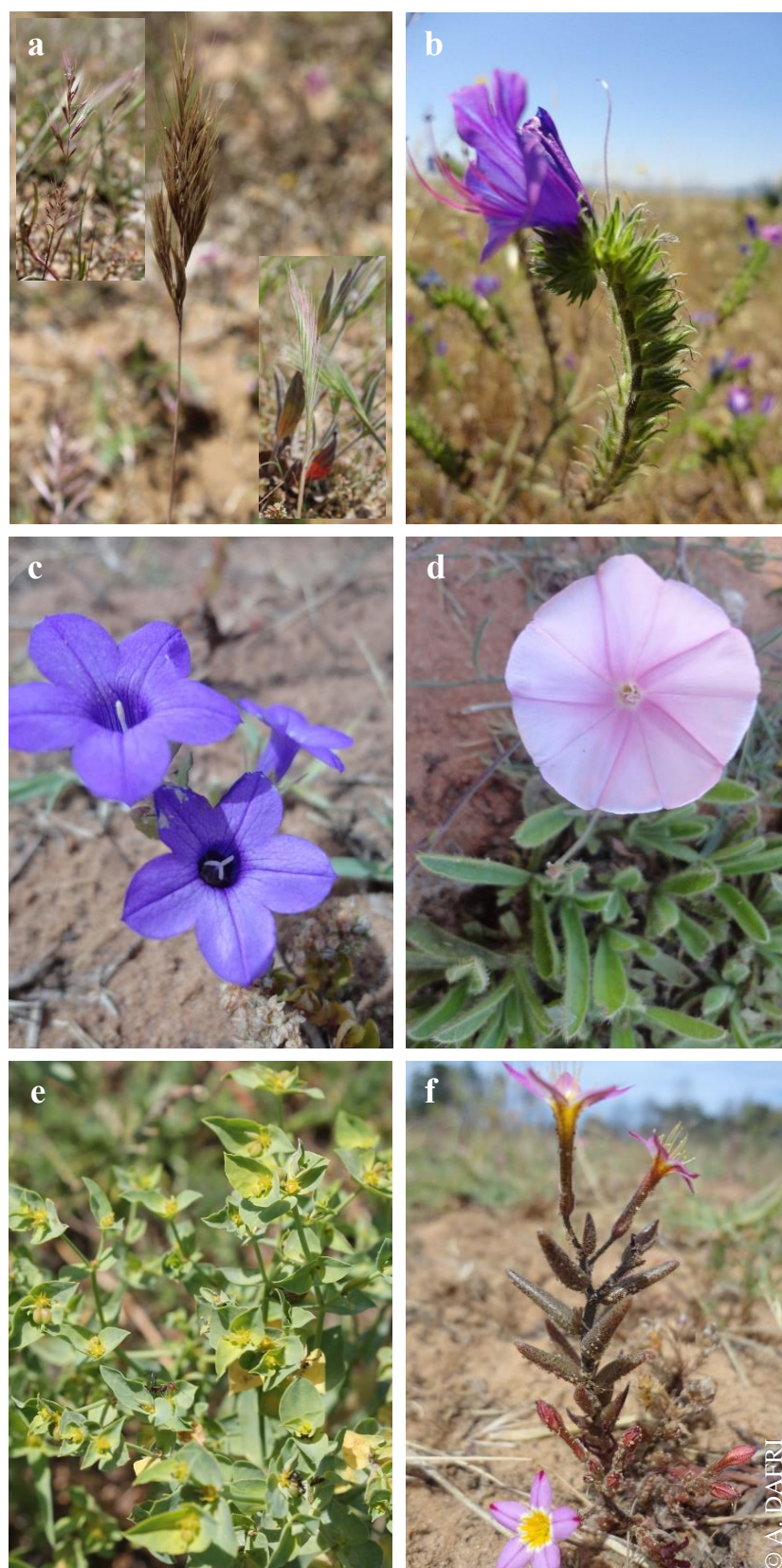


Fig. 25 La diversité floristique des sites à terfesse (B)

a : Poaceae, **b :** Boraginaceae (*Echium plantagineum*), **c :** Campanulaceae (*Campanula dichotoma*), **d :** Convolvulaceae (*Convolvulus arvensis*), **e :** Euphorbiaceae (*Euphorbia sp.*), **f :** Crassulaceae (*Pistorinia breviflora*).

- Des plantes du genre *Campanula*, de la famille Campanulaceae (les campanules).
- Des liserons appartenant au genre *Convolvulus* de la famille Convolvulaceae.
- Des plantes du genre *Euphorbia* (l'euphorbe), de la famille Euphorbiaceae.
- Une plante endémique et rare : *Pistorinia breviflora* subsp. *intermedia* Boiss., de la famille Crassulaceae. Synonyme *Cotyledon breviflora* subsp. *intermedia* (Quezel et Santa, 1962 ; Maire, 1977 [1952–1987]).

Ces plantes beaucoup moins fréquentes voir absentes de la quasi-totalité des sites à terfesses, sont principalement recensées dans le site 2 doté d'une diversité floristique remarquable.

3.2 Les plantes arbustives

Les jeunes arbres, arbrisseaux et sous arbrisseaux des sites à terfesse appartiennent à diverses familles botaniques. Les principales espèces sont (Fig. 26) :

- Le ciste jaune (*Halimium halimifolium*) de la famille Cistaceae.
- Le rétame (*Retama monosperma* subsp. *bovei*) de la famille Fabaceae.
- Le cade ou genévrier oxycèdre (*Juniperus oxycedrus*) de la famille Cupressaceae.
- Le daphné garou (*Daphne gnidium*) et la passerine hirsute (*Thymelaea hirsuta*) de la famille Thymelaeaceae.
- La morelle de Linné (*Solanum sodomium*) de la famille Solanaceae.
- De jeunes pins maritimes (*Pinus maritima*) de la famille Pinaceae.

Les espèces de cette liste se rencontrent particulièrement à côté du site 3 rarement dans les autres sites, à l'exception de *Pinus maritima*, abondant au niveau du site 2 confiné à côté d'une forêt de pin maritime.



Fig. 26 La diversité floristique des sites à terfesse (C) : Les arbustes

a : Cistaceae (*Halimium halimifolium*), **b** : Fabaceae (*Retama monosperma* subsp. *bovei*), **c** : Cupressaceae (*Juniperus oxycedrus*), **d, e** : Thymelaeaceae (d : *Daphne gnidium*, e : *Thymelea hirsuta*), **f** : Solanaceae (*Solanum sodomeum*).

III- Symbioses

1. Le partenaire végétal de la symbiose

La symbiose à terfesse dans les dunes étudiées est établie avec des plantes herbacées annuelles ou sub-pérennes du genre *Tuberaria* de la famille Cistaceae. L'espèce la plus répandue semble être l'hélianthème à goutte ou tubénaire à goutte au nom binominal : *Tuberaria guttata* (L.) Fourr. 1868, synonymes : *Helianthemum guttatum* (L.) Mill., *Cistus guttatus* Lk. (Quezel et Santa, 1963).

Ces plantes sont connues dans la région d'étude par *E'zahou*, un nom qui, grâce à son sens relatif à la joie et la bonne humeur, inspire la gaieté et évoque l'ambiance printanière dans laquelle elles fleurissent. Elles sont largement connues dans le pays pour être l'hôte des terfesses, d'où leurs appellations : *Oum E'terfess* (la mère des terfesses) ou *Quessis E'terfess*. Elles sont également appelées *E'rguigue*, un mot arabe qui signifie mince ou étroit, probablement en référence à la tige grêle. Ce mot rappelle également l'appellation en arabe soutenu « E'rakrouk » (الرفروق).

Ces plantes prolifèrent sur sols de texture limono-sableuse et de pH à tendance acide. Héliophile comme tous les hélianthèmes dont l'appellation désigne « fleurs soleils » (du grec : *hélíos* = soleil), elles poussent sur des parcelles jouissant d'un excellent ensoleillement.

Les espèces du genre *Tuberaria* rencontrées dans la région d'étude partagent plusieurs caractères, dont les suivant :

- Racine pivotante et lignifiée.
- Tige avec un diamètre de plus en plus petit que l'on se dirige vers le haut. Nombre d'entre-nœuds variant entre 3 et 4, le premier toujours plus ou moins velu, jamais glabre, plus velu et plus court que les autres (mesurant 1 cm de long en moyenne).
- Feuilles simples, entières, curvinervées, sessiles. Leur insertion sur la tige est opposée décussée, les basales en rosette souvent mortes à la floraison, toujours plus velues et plus grandes que les caulinaires ; leur taille (notamment la largeur) devient de plus en plus petite que l'on se dirige vers le haut, les basales sont elliptiques à lancéolées, les caulinaires lancéolées à presque linéaires, à sommet obtus à aigu (devenant plus aigu en se dirigeant vers le sommet), à tronquée (très rarement légèrement sagittée).
- Inflorescence en cyme scorpioïde parfois lâche (rarement en grappe).

- Fleurs hermaphrodites, pentamères, calice à face interne (ventrale) souvent plus ou moins velue, pièces de l'épicalice (2S) non ornementées, pièces du calice (3S) toujours entières. Corolle dialypétales, pétales jaunes, trapus à triangulaire, émarginés. Androcée avec étamines périgynes, pas toutes de même taille, nombreuses (toujours plus de 10). Gynécée avec stigmate trilobé, blanc neige, sessile, style nul, ovaire supère, globuleux ou subglobuleux à ovoïde, carpelle à 3 loges.
- Fruit : capsule à 3 loges, subglobuleuse à ovoïde, contenant un grand nombre de graines minuscules, globuleuses, subglobuleuses à ovoïdes, à surface chagrinée.

Ces espèces diffèrent cependant par plusieurs autres caractères :

- Tige simple ou ramifiée parfois dès sa base, allant jusqu'à plus de 30 cm de haut, de diamètre très variable, souple ou cassante, fragile ou rigoureuse, dotée d'une section cylindrique, rarement aplatie sur une face (irrégulière) ou sur les deux, souvent pleine parfois creuse, d'une surface velue ou glabre, lisse ou rarement striée, de couleurs très variables : face verte et face rougeâtre, vert brillant, vert grisâtre ou entièrement rougeâtre.
- Fleurs très variables, pièces de l'épicalice (2S) à bords simple et entier ou denticulé, toutes concolores ou à bord différent du reste du sépale (dans ce cas, le sépale est vert et le bord généralement brun rougeâtre), pièces du calice (3S) ornementées ou non de petits points brun noirâtre. Les sépales (5S) diffèrent également d'une sous-espèce à l'autre par la densité des poils qui les couvrent.
Pétales de différentes tailles et intensité de couleur, avec ou sans maculations caractéristiques brunes à noirâtres (leur couleur sous le stéréomicroscope paraît parfois mauve très foncé). Ces maculations occupent soit toute la base du pétale, soit forme un disque ou un pseudo-croissant plus ou moins irrégulier (ces variantes n'ont pas été prises en considération dans la description et la distinction des sous-espèces). Les pétales libres sont soit juxtaposés à leur extrémités latérales en forme d'éventail circulaire, soit insérés côte à côte sans la moindre juxtaposition. Les filets des étamines sont jaunes, ou noirs.

À l'issue de cette variabilité (Surface glabre ou velue, tige verte, vert rouge, ou rougeâtre, sépales pointillés ou non, velus ou glabres, pétales maculés ou non, étamines (filets) jaunes ou noires...), une diversité d'espèces et de sous espèces de *Tuberaria* se confirment présentes dans la région (Fig. 27, tableau 7, Fig. 28–35).

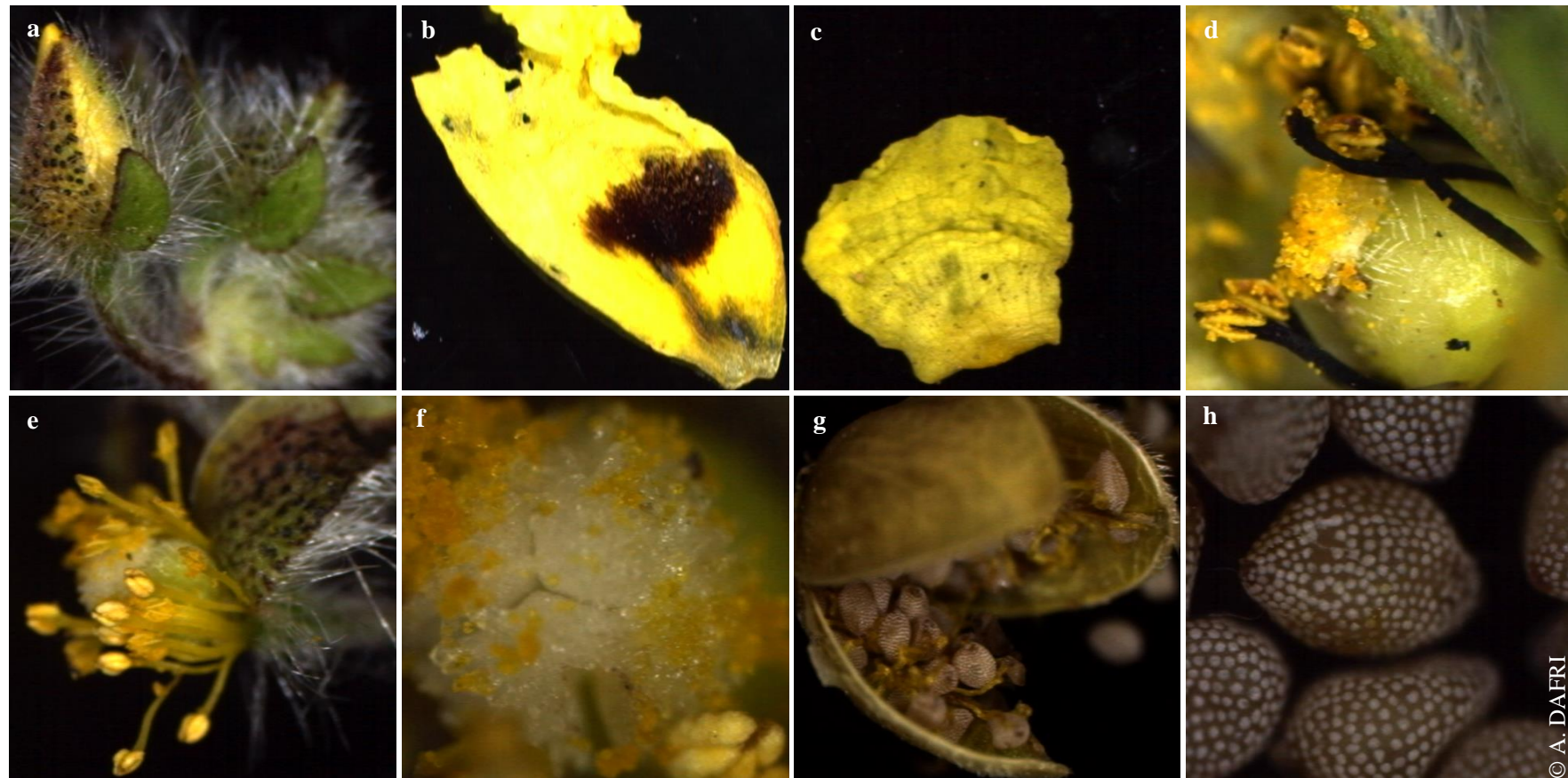


Fig. 27 Pièces florales, fruit et graines des différentes *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien

a : inflorescence en cyme fortement scorpioïde ; épicalice (2S) uni, glabre, à bord brun ; calice (3S) velu, ornementé de petits points noirs [x 10], **b** : pétale maculé [x 21], **c** : pétale non maculé [x 10], **d** : fleur renfermant des étamines à filets noirs [x 15], **e** : fleur renfermant des étamines à filets jaunes [x 39.5], **f** : stigmate blanc trilobé (la couleur jaune correspond au pollen collé sur le stigmate) [x 51], **g** : capsule (fruit de la plante) ouverte, laissant voir ses trois loges et les graines dans leur emplacement d'origine [x 18.45], **h** : graines à surface chagrinée [x 80].

Tableau 7 Présentation de la variabilité morphologique des *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est Algérien ⁽¹⁾

	Tige	Feuilles ⁽²⁾	Fleurs	NB
Espèce 1	<ul style="list-style-type: none"> - Ramifiée dès la base (4 branches) - Cylindrique - Pleine - Section blanche - Glabre ⁽³⁾ - Face verte, face rouge - 21 x 0.15 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trinervées, uninervées - Velues, glabres - 3.7 x 1.1, 2.3 x 0.2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : long (≈ 0.9 cm) - Épicalice (2S) : bord brun rouge, denticulé, glabre, 0.3 x 0.1 cm - Calice ⁽⁴⁾ (3S) : pointillés, velus, 0.6 x 0.2 cm - Pétales : non maculés - Étamines : jaunes ⁽⁵⁾, nombreuses (≈ 20) ⁽⁶⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> - Cyme scorpioïde hélicoïdale
Espèce 2	<ul style="list-style-type: none"> - Non ramifiée, rigoureuse et pas souple (cassante) - Cylindrique - Pleine - Section verte - Glabre, striée, 2 sillons - Vert vif et brillante - 30 x 0.25 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trinervées, uninervées - Velues, très peu velues - 6.5 x 1.8, 4 x 0.4 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : long (jusqu'à 1.2 cm) - Épicalice (2S) : entiers, glabres, 0.5 x 0.15 cm - Calice (3S) : pointillés, velus, 0.6 x 0.2 cm - Pétales : maculés, grands (≈ 0.7 x 0.7 cm) ⁽⁷⁾ - Étamines : jaunes, très nombreuses (≈ 32) 	<ul style="list-style-type: none"> - Odeur forte et agréable (rappelle l'odeur du henné) - Sous pin
Espèce 3	<ul style="list-style-type: none"> - Ramifiée dès la base (une seule branche développée) - Cylindrique - Pleine - Section verte - Velue - Vert grisâtre - 18 x 0.18 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trinervées, uninervées - Velues, velues - 3 x 0.7, 2.6 x 0.4 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : long (≈ 1 cm) - Épicalice (2S) : entiers, très velus, 0.3 x 0.15 cm - Calice (3S) : pointillés, très velus, 0.6 x 0.2 cm - Pétales : base plus foncée, grands (≈ 0.9 x 0.7 cm) - Étamines : jaunes, nombreuses 	<ul style="list-style-type: none"> - Dernières feuilles alternes
Espèce 4	<ul style="list-style-type: none"> - Ramifiée dès la base (/ simple ⁽⁸⁾) - Cylindrique - Pleine - Section blanc verdâtre - Velue, pubescente - Vert rougeâtre (grisâtre) - (9–)13 x (0.1–)0.15 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trinervées, uninervées (trinervées) - Velues, velues - 2.5(–3) x 0.6(–1.1), 2.5 (–3) x 0.3(0.6) cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : moyen (/ long) (0.6 (–0.9) cm) - Épicalice (2S) : entiers, velus, 0.2 (–0.3) x 0.1 cm - Calice (3S) : uni ⁽⁹⁾, très velus, 0.3(–0.5) x 0.2(–0.3) cm - Pétales : non maculés, 0.4(–0.5) x 0.3 (0.4) cm - Étamines : noires, très nombreuses (≈ 32–34) 	<ul style="list-style-type: none"> (- Dernières feuilles larges ⁽¹⁰⁾) - Odeur forte et agréable (\approx henné) - Sépales acuminés

Tableau 7. Présentation de la variabilité morphologique des *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est Algérien (suite)

Espèce 5	<ul style="list-style-type: none"> - Non ramifiée - Cylindrique - Pleine - Section verdâtre - Entièrement velue - Vert grisâtre - $\geq 6 \times 0.5$ cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trinervées, trinervées - Velues, velues - 2.5×0.4, 2×0.2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle ≈ 0.7 cm - Épicalice (2S) : entiers, velus, 0.2×0.1 cm - Calice (3S) : petits points, velus, 0.5×0.3 cm - Pétales : maculés, petits - Étamines : noires, peu nombreuses (≈ 12) 	/
Espèce 6	<ul style="list-style-type: none"> - Non ramifiée - Cylindrique - Pleine - Section blanche - Velue (quelques poils) - Brune rougeâtre - 11×0.08 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Trinervées, trinervées - Velues, velues - 2.5×0.4, 2×0.2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : longueur variable ($0.4\text{--}0.7$ cm) - Épicalice (2S) : entiers, +/- velus, 0.2×0.08 cm - Calice (3S) : pointillé, +/- velus, 0.4×0.2 cm - Pétales : non maculés, petits (0.4×0.3 cm) - Étamines : jaunes, nombreuses (≈ 20) 	/
Espèce 7	<ul style="list-style-type: none"> - Rigoureuse, très ramifiée dès la base (5–7 branches) - Cylindrique - Pleine - Section blanche - Très velue, sauf dernier entre-nœud glabre - Vert claire, rougeâtre - 7×0.15 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pentanervées, trinervées - Très velues, très velues - 9×1.6, 6.5×0.8 cm (feuilles remarquablement larges, mêmes les dernières) 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : très court (0.2 cm) - Épicalice (2S) : bord brun rougeâtre, denticulé, velus à la base - Calice (3S) : pointillé, très densément velus - Pétales : absents (dans la présente sélection) - Étamines : jaunes, entre 12 et 20 	- Pièces de l'épicalice plus grandes que celles du calice
Espèce 8 (14)	<ul style="list-style-type: none"> - Cylindrique (aplatie) - Pleine - Section blanche - 1^{er} et 2^{ème} entre-nœud velus, reste glabre, striée, pubescente, 2 sillons - Vert claire, rougeâtre - Plus de 30×0.2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pentanervées, trinervées - Velues, glabres - 10×2.1, 4×0.5 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : court - Épicalice (2S) : entier, glabre - Calice (3S) : pointillé, glabre - Pétales : absents (dans la présente sélection) - Étamines : jaunes 	<ul style="list-style-type: none"> - Plante sub-pérenne ou vivace - Pièces de l'épicalice plus grandes que celles du calice

Tableau 7. Présentation de la variabilité morphologique des *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est Algérien (suite)

Espèce 9	<ul style="list-style-type: none"> - Rigoureuse et ramifiée dès la base - Cylindrique - Pleine - Section blanchâtre - Entièrement velue - Face verte, face rouge - 21 x 0.2 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pentanervées, trinervées - Toutes très velues et soyeuses - 8 x 0.5, 6.5 x 0.4 cm 	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicelle : 0.6 cm - Épicalice (2S) : très velus, 0.5 x 0.2 cm, - Calice (3S) : pointillé, très velus, 0.4 x 0.1 cm - Pétales : maculés, petits (0.4 x 0.4 cm) - Étamines : jaunes, nombreuses (≈ 30) 	<ul style="list-style-type: none"> - Dernières feuilles alternes - Calice grand - Épicalice plus grand que le calice
----------	--	---	---	---

(1) : Le tableau représente principalement les caractères différents. Les caractères communs entre les différentes espèces et sous-espèces sont résumés dans le paragraphe (III 1) ci-avant. Les valeurs avancées pour les tailles des différentes parties de la plante ont été mesurées sur différents pieds, cependant, les chiffres avancés sur le tableau représentent les mesures prélevées sur le(s) pied(s) représentatif(s) de l'espèce en question.

(2) : Feuilles inférieures ; feuilles supérieures.

(3) : Surface de la tige à l'exception du 1^{er} entre-nœud toujours plus ou moins velu.

(4) : Concerne la face externe (dorsale) des sépales. La face interne (ventrale) est souvent velue.

(5) : Couleur des filets des étamines.

(6) : Nombre approximatif (des étamines).

(7) : Longueur des deux axes les plus longs.

(8) : les caractères entre parenthèses correspondent à une autre plante apparemment appartenant à la même espèce.

(9) : uni = de couleur unie, sans ornementation, non pointillé.

(10) : Différent du cas le plus général où la largeur des dernières feuilles est réduite.



Fig. 28 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 1



Fig. 29 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 2



Fig. 30 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 3

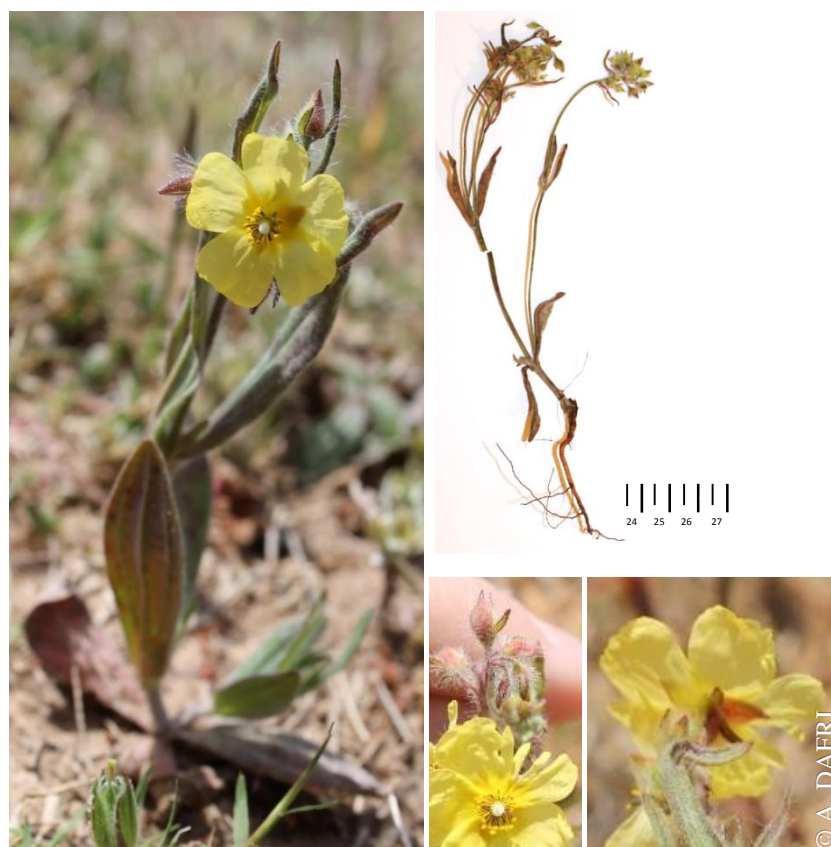


Fig. 31 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce 4



Fig. 32 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce [5](#)



Fig. 33 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèce [6](#)



Fig. 34 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèces [7](#) et [8](#)



Fig. 35 *Tuberaria* des dunes littorales du Nord-Est algérien : Espèces [9](#)

Les plantes venant d'être décrites semblent ne pas correspondre toutes à la même espèce. Néanmoins, elles appartiennent, fort probablement, au même genre : « *Tuberaria* ».

L'espèce 8 peut être morphologiquement identifiée comme *Tuberaria vulgaris* Willk. Une Cistaceae vivace décrite sur différentes flores de la région méditerranéenne, dont la flore d'Algérie (Quezel et Santa, 1963) et la flore de la Tunisie (Potier-Alapetite, 1979). Quezel et Santa (1963) ont avancé pour l'espèce une tige velue et soyeuse et un pédicelle long, pendant que les présentes observations proclament une tige velue à sa base, glabre dans le haut, et un pédicelle court ne dépassant pas le double de la longueur du calice ; des observations qui correspondent parfaitement à la description du *T. vulgaris* de la Tunisie (Potier-Alapetite, 1979).

L'espèce 9, quant à elle, a été jugée proche du *Tuberaria echioides* (Lamk.) Willk, notamment par ses pédicelles de quelques millimètres, ses pétales maculés ainsi que son épicalice plus grand que le calice et bien d'autres caractères analogues à ceux décrits par Quezel et Santa (1963) pour le *T. echioides* des pâturages sablonneux Algériens.

Les autres plantes, nettement différentes de *T. vulgaris* de par la surface du calice (glabre chez *T. vulgaris* et velue chez les autres), et de *T. echioides*, à pédicelles très courts, de par leurs pédicelles moyens à longs (4 à 12 millimètres), semblent être des sous-espèces de *Tuberaria guttata*.

La distinction de ces sous-espèces et l'identification de chacune d'elles, ne puissent se baser simplement sur la morphologie, en raison de leur proximité ainsi que de la difficulté de comparer les plantes actuellement étudiées avec celles présentées dans les flores où les caractères décrits ne permettent pas toujours la distinction des espèces parfois différentes par d'autres caractères que les flores ne mentionnent pas.

L'espèce 2, grâce à son vert gai, sa rigidité et sa tige glabrescente, rappelle *T. guttata* ssp. *bupleurifolia* (Lamk.) Comb. nov., à laquelle elle correspond de par tous les caractères mentionnés dans les deux flores, d'Algérie (Quezel et Santa, 1963) et de la Tunisie (Potier-Alapetite, 1979), utilisées dans l'identification.

La sous-espèce 3 cendrée-villeuse, grêle et non guttée paraît conforme au *T. guttata* ssp. *Praecox* Salzm.

La sous-espèce 4 aux sépales acuminés et pétales immaculés se référerait éventuellement au *T. guttata* ssp. *Villosissima* (Pomel) Comb. nov. avec cependant, une inflorescence en cyme scorpioïde au lieu de la grappe dense invoquée par Quezel et Santa (1963).

La sous-espèce 5, avec ses pétales maculés, petits, à peine plus longs que les sépales (sinon plus courts) rappelle *T. guttata* ssp. *Inconspicua* (Thib.) Comb. nov. Néanmoins, le pédicelle cilié de l'espèce représente un caractère de divergence avec l'*inconspicua* dotée, d'après Quezel et Santa (1963), d'un pédicelle très glabre.

La sous-espèce 7 aux pétales absents (voir nuls), correspond parfaitement à la description du *T. guttata* ssp. *Lipopetalum* (Murb.) Comb. nov., telle qu'avancée par Potier-Alapetite (1979), pour ne s'en distinguer que par un seul point souligné par Quezel et Santa (1963) : pièce de l'épicalice plus courtes que celles du calice, ce qui s'oppose nettement à la présente observation.

2. Le partenaire fongique de la symbiose

Les terfesses récoltées (Fig. 36) montrent une variabilité morphologique (notamment microscopique) suggérant différentes espèces. Cependant, outre le *Tuber gennadii* identifié morphologiquement (Dafri et Beddiar, 2017), la biologie moléculaire des ascocarpes non contaminés a confirmé la présence de deux espèces. Il s'agit de : *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe (1971) et *Terfezia fanfani* (Mattiolo) 1900.

2.1 *Terfezia arenaria*

Terfezia arenaria (Moris) Trappe (1971) est l'espèce la plus répandue, et la seule rencontrée dans tous les sites.

L'ascocarpe est globuleux, subglobuleux, conique ou irrégulier. Il mesure environ 1.5–8 x 1–7 cm de diamètre et présente des fentes erratiques d'une largeur de 1 à 5 mm.

Le périidium est lisse ou finement granuleux, de couleur allant du blanc au brun foncé, plus ou moins recouvert par des taches noires.

La glèbe est caractérisée par des ilots fertiles de couleur jaunâtre ou rosâtre, devenant brune à maturité. Ces ilots sont séparés par des veines stériles de 0.1 à 5 mm de large.

Les asques sont hyalins, subglobuleux à ovoïdes, mesurant 80 µm de diamètre en moyenne. Leur observation dans leur emplacement d'origine laisse voir autour, des hyphes d'environ 1.25 à 2.5 µm de diamètre.

Les ascospores souvent au nombre de 8 à l'intérieur de chaque asque, sont subglobuleuses à globuleuses, mesurant en moyenne 20–27 x 20–25 µm de diamètre (ornementation comprise). Elles sont ornementées de verrues tronquées allant jusqu'à 5 µm de long. Leur couleur est brune à maturité (voir Fig. 1 et 2).



Fig. 36 Quelques ascocarpes de terfesses récoltés au cours des années d'étude

a : 2013, site 4, **b** : 2013, site 1, **c** : 2015, site 9, **d** : 2016, site 9, **e** : 2017, site 4, **f** : 2017, site 7.

Les ascocarpes de l'espèce sont parfois pédonculés ou le plus souvent muni d'une petite protubérance à l'endroit du pédicelle très facilement détachable et qui reste souvent dans le sol à la récolte. Au cours de cette étude, un seul pédicelle a pu être récolté attaché à son ascocarpe. Il était d'une longueur d'environ 5 cm (Fig. 37).

Ce pédicelle, ainsi que tous les autres observés sous stéréomicroscope, montre un amas de particules de sols, de fragments racinaires et d'hyphes fongiques. Il laisse voir sous microscope, des hyphes segmentées de taille égale ou supérieure à celle des hyphes rencontrées à l'intérieur

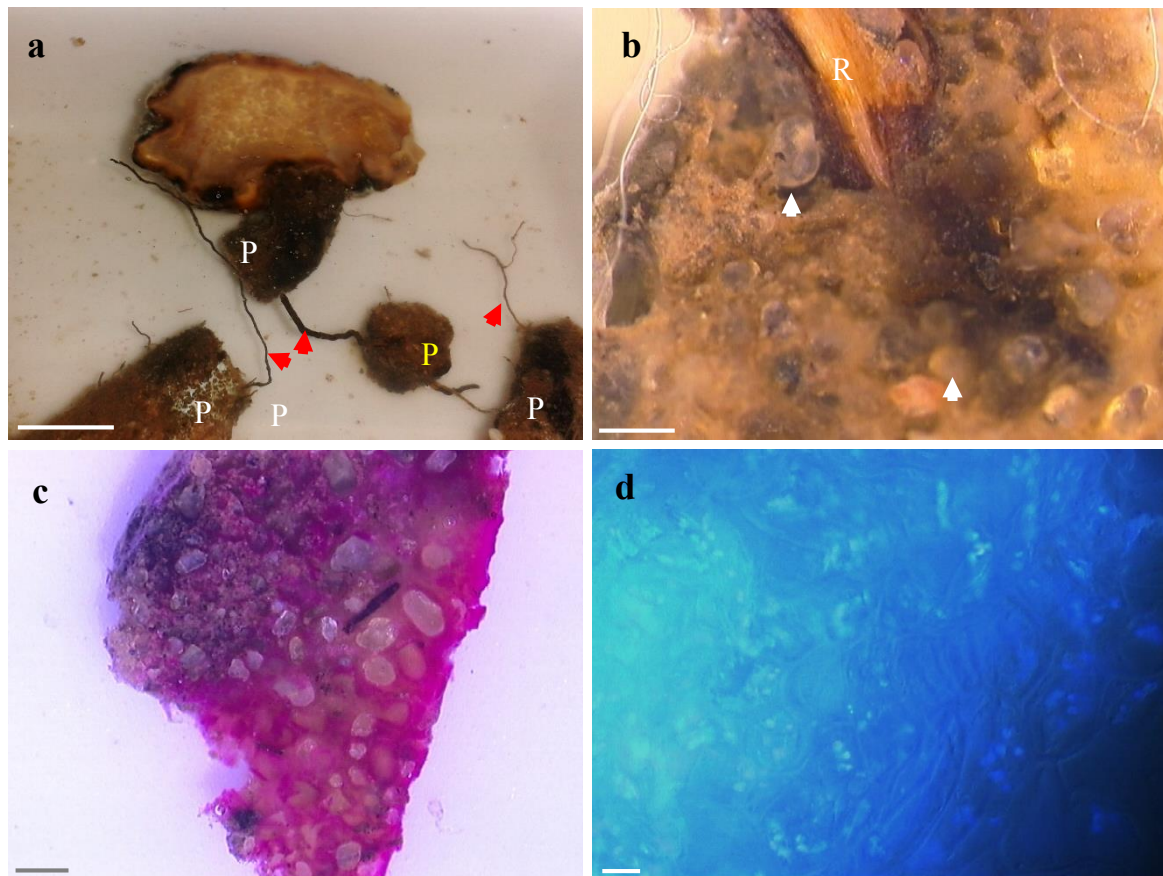


Fig. 37 Pédicelle de *Terfezia arenaria*

a : coupe longitudinale dans un ascocarpe pédicellé montrant la glèbe et le pédicelle fragmenté (P), les flèches indiquent les racines de la plante hôte rattachées au pied, **b** : pied sous loupe binoculaire laissant voir une racine (R) et des particule de sols (indiquées par les flèches), **c** : pied après coloration au DAPI montrant clairement les particules de sols restées incolores, **d** : pied coloré au DAPI montrant sous microscope des hyphes viables et en division (fluorescentes). Échelle barres [a] = 1 cm, [b, c] = 1 mm, [d] = 5 μ m.

des ascocarpes. L'analyse microscopique après coloration au DAPI a révélé une inflorescence référant à des hyphes en division même plusieurs mois après récolte.

2.2 *Terfezia fanfani*

Terfezia fanfani (Mattiolo) 1900 est pour la première fois citée en Algérie.

Les ascocarpes confirmés appartenant à cette espèce après identification moléculaire semblent morphologiquement similaires à ceux de la même espèce récoltée en Espagne et décrites par Bordallo *et al.* (2013). Ils sont globuleux d'environ 4 x 2 cm de diamètres, souvent fermes et inodores.

Le périidium est généralement lisse parfois légèrement rugueux, épais et inséparable de la glèbe. Il est brun rouge, avec des taches noires. Sa couleur s'assombrit à maturité.

La glèbe est blanche dans les ascocarpes immatures et est caractérisée par des ilots fertiles de couleur vert olive à maturité.

Les asques sont subglobuleux à ovoïdes, non pédicellés, mesurant $70\text{--}80 \times 55\text{--}70 \mu\text{m}$ de diamètre et renfermant généralement 8 ascospores (Fig. 38).

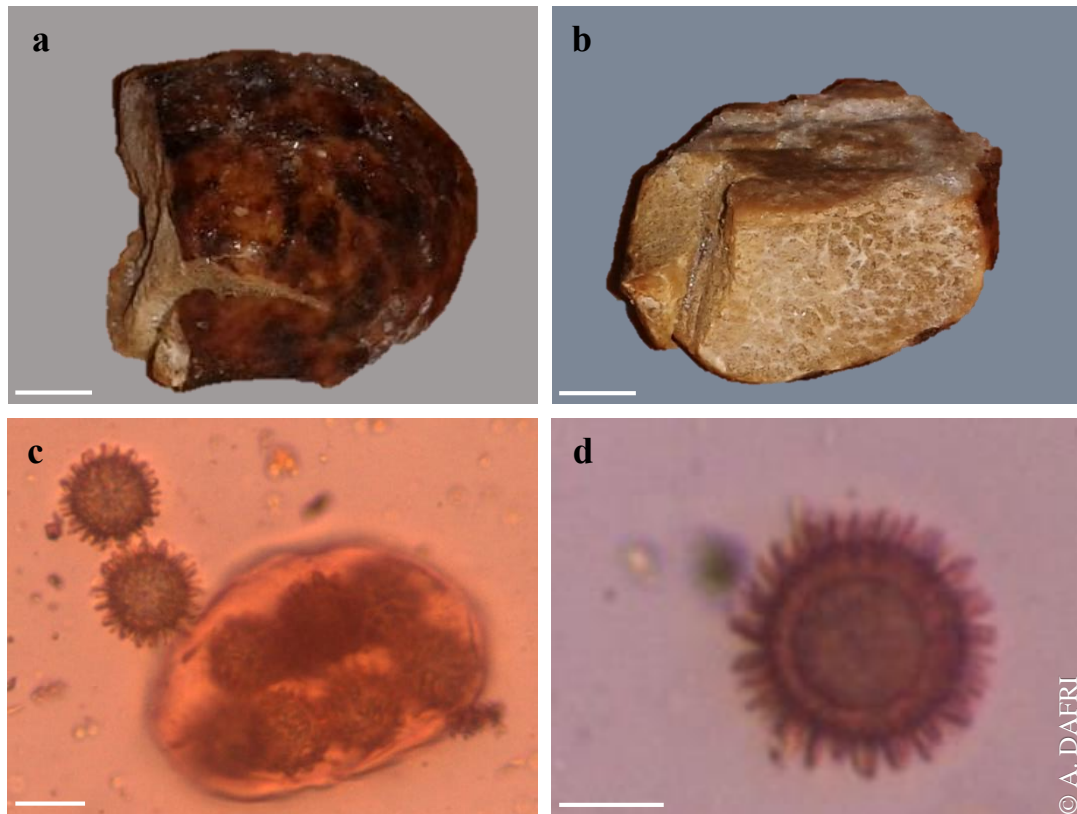


Fig. 38 *Terfezia fanfani* (Mattiolo) 1900

a : péridium, **b** : glèbe avec des îlots fertiles vert olive séparés de veines stériles blanches, **c** : asque contenant 8 ascospores, **d** : ascospore mature ornementée d'épines et laissant voir une immense granule lipidique. Échelle barres [a, b] = 1 cm, [c] = 20 μm , [d] = 10 μm .

Les ascospores sont globuleuses mesurant 20 μm de diamètre en moyenne et ornementées d'épines de 1 μm de large à la base.

Cette diversité morphologique a également été authentifiée par les analyses moléculaires qui associent à chaque phénotype un génotype correspondant. L'arbre phylogénétique inféré au maximum de vraisemblance répartit les séquences en deux clades principaux (Fig. 39) correspondant chacun à une espèce. Ainsi, il a été démontré que le *T. fanfani*, cité pour la première fois en Algérie, se distingue nettement du *T. arenaria* aussi bien phénotypiquement que génotypiquement. Le premier clade regroupant les *T. arenaria* témoigne de la monophylie de l'espèce. La région d'étude comporterait donc une lignée pure de *T. arenaria* et la question soulevée au début du travail concernant la possibilité d'occurrence de différentes sous-espèces retrouve ici sa réponse. Ce caractère monophylétique vient en argument aux résultats obtenus par Díez *et al.* (2002).

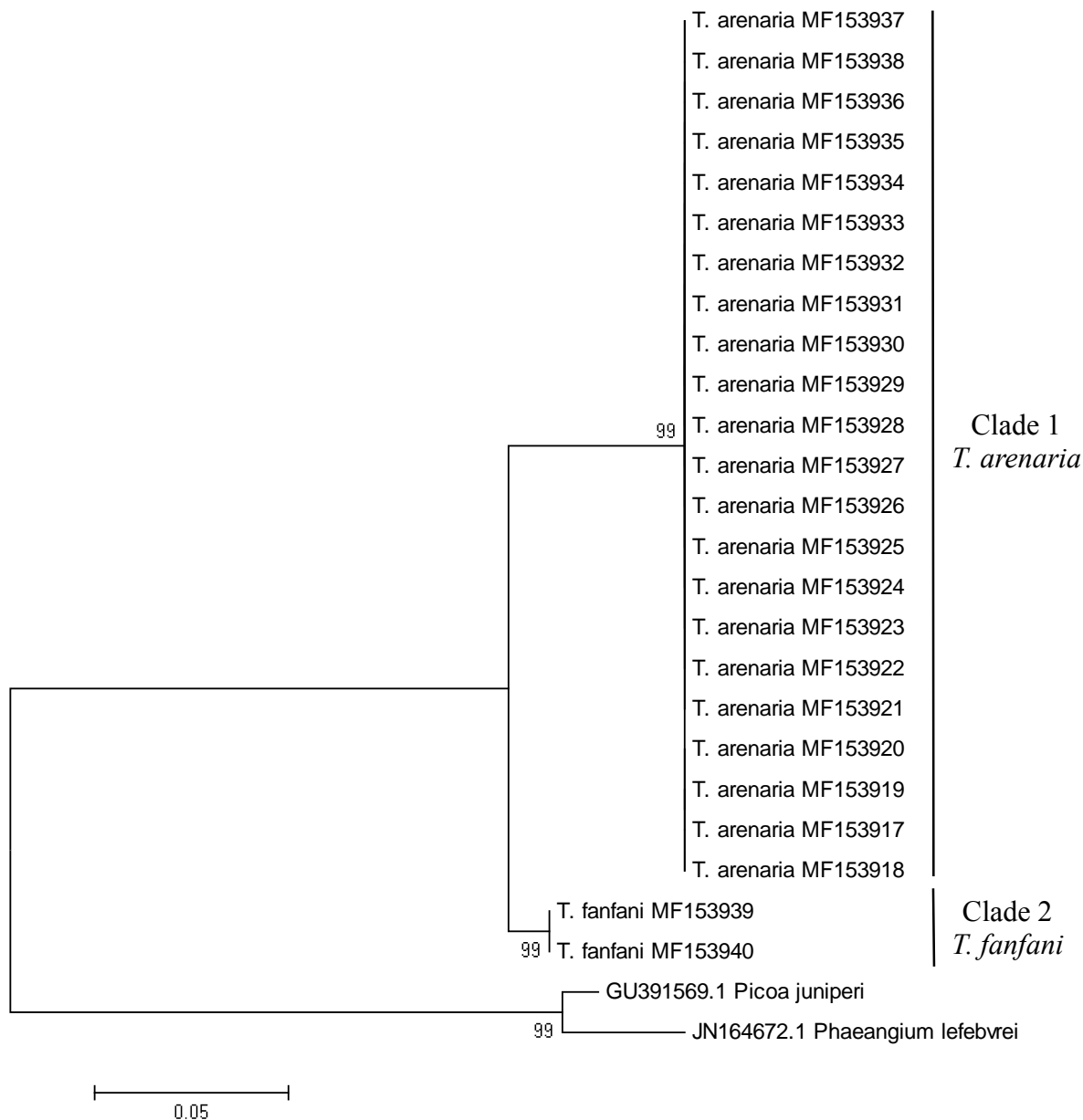


Fig. 39 Phylogénie des espèces de terfesse identifiées inférée au maximum de vraisemblance

3. La relation symbiotique

L'étude de la mycorhization montre différents morphotypes parfois difficiles à classer sous un rang donné, un pourcentage d'ectomycorhization (estimé avant coloration) relativement faible, un pourcentage d'endomycorhization (estimé après coloration) très élevé et un système mycorhizien très variable. Plusieurs structures (hyphales notamment) ont pu être observées, dont certaines sont pour la première fois détectées sur les racines de la plante étudiée.

3.1 Les morphotypes de mycorhizes

Les formes observées sur les racines de *Tuberaria guttata* étudiées sont parfois difficiles à classer sous un morphotype ou un autre. Cependant, elles peuvent être subdivisées en deux principales catégories :

3.1.1 Les mycorhizes simples

Ces mycorhizes sont simples, non ramifiées. Il en existe plusieurs morphotypes de longueur variable entre 1 et 2 mm et de largeur, couleurs et forme plus ou moins diverses (Fig. 40a, b) :

- **Mycorhize 1** : C'est une mycorhize sessile, oblongue à bout arrondi et dotée de très légers étranglements tout au long. Elle se caractérise par une couleur beige jaunâtre, et mesure entre 0.35 et 0.5 mm de diamètre environ.
- **Mycorhize 2** : Ce morphotype, peu distinct du premier, est caractérisé par une couleur brune, une forme linéaire, sans pédoncule, différent de la M1 par son apex plus ou moins acuminé. Il mesure environ 0.1 à 0.2 mm de diamètre.

3.1.2 Les mycorhizes ramifiés

Ces mycorhizes sont caractérisées par leur aspect ramifié. Elles peuvent être subdivisées en différents morphotypes (Fig. 40c, d, e, f) (la liste ci-après constitue la suite de sa précédente) :

- **Mycorhize 3** : C'est une mycorhize à deux branches, d'où le nom « mycorhize bifurquée ». Elle est caractérisée par des bouts arrondis, une couleur jaunâtre à marron, sessile sur les racines naturelles.
- **Mycorhize 4** : Il s'agit là de toute mycorhize ramifiée portant plus de deux branches. Les ramifications diffèrent par leur forme et leur orientation, donnant ainsi différents aspects à la mycorhize.

3.1.3 Autres mycorhizes

- **Mycorhize 5** : C'est un morphotype sessile, courbé, ramifié ou non, avec un dôme au sommet (Fig. 40g).
- **Mycorhize 6** : C'est une mycorhize linéaire et ornementée par de petites extensions courtes, larges, globuleuses et à bouts bien arrondis (Fig. 40h).
- **Mycorhize 7** : Ce morphotype est nettement distinct de par sa couleur blanche. Il est ramifié ou non, parfois doté d'un très court pédicelle brun ou porté sur une petite branche racinaire (Fig. 40i).

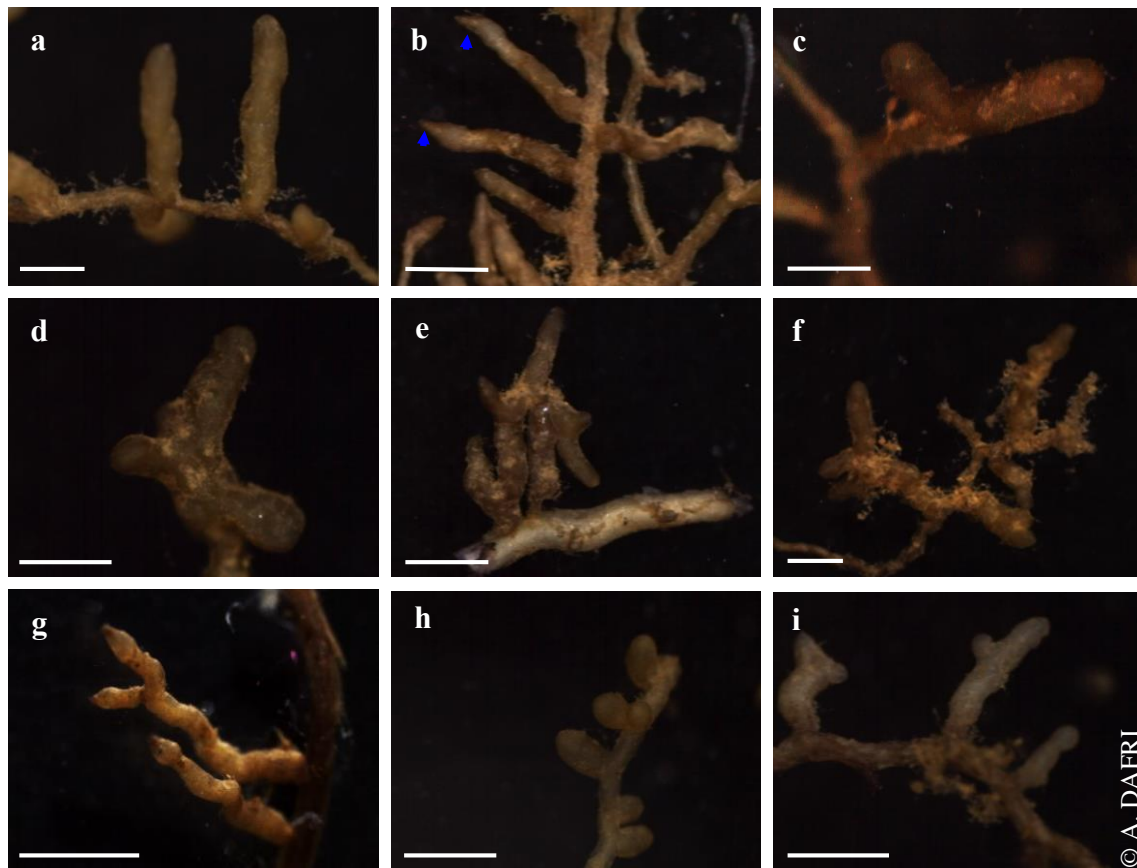


Fig. 40 Morphotypes de mycorhizes observés sur racines naturelles de *Tuberaria guttata*
a : mycorhize simple à bouts arrondis (M1), **b** : mycorhize simple à bouts acuminés (M2), **c** : mycorhize bifurquée (M3), **d, e, f** : mycorhizes ramifiées avec plus de deux branches (M4), **g** : mycorhizes courbées avec dômes aux sommets (M5), **h** : mycorhize caractérisées par ses formes globuleuses (M6), **i** : mycorhizes blanches (M7).
 Échelle barres = 1 mm.

Les mycorhizes venant d'être listées ne peuvent être confirmées comme morphotypes distincts en raison de la similarité de plusieurs d'entre elles. En effet, les deux premières (M1 et M2) peuvent correspondre au même morphotype à bout tantôt arrondi tantôt acuminé. Il en est de même pour le morphotype (M6) pouvant référer à des mycorhizes simples (M1) ou bifurquées (M3) en début de formation.

3.2 Le statut mycorhizien

Le statut mycorhizien représenté dans l'histogramme de la figure 41 ci-après, représente les taux d'ectomycorhization correspondant au nombre des petites racines mycorhizées contre celles non mycorhizées, et donne une évaluation de la surface de la racine envahie par le champignon par rapport à la surface radiculaire totale.

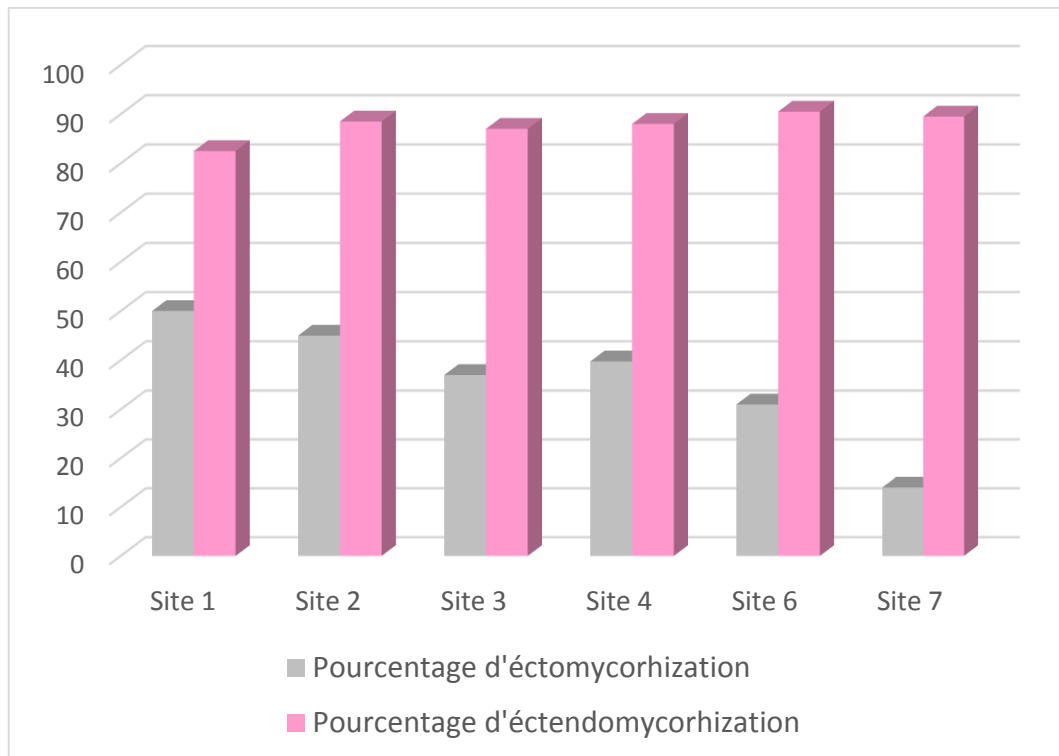


Fig. 4I Statut mycorhizien des racines naturelles de *Tuberaria guttata*

La figure montre que le pourcentage d'ectomycorhization est considérablement variable d'un site à l'autre, contrairement au pourcentage d'ectendomycorhization élevés et peu variable.

Les taux d'ectomycorhization varient entre 14 % au site 7 et 50 % au site 1, contre des taux d'ectendomycorhization entre 82 % au site 1 et 90.5 % au site 6.

Les taux élevés d'ectendomycorhization témoignent d'une bonne affinité entre les racines de la plante et les hyphes du champignon.

Ces valeurs démontrent une certaine corrélation négative entre l'ectomycorhization et l'ectendomycorhization, dont les valeurs minimales (< 31 %) et maximales (> 89 %) respectives sont observées sur les mêmes racines (site 6 et 7). Inversement, la valeur maximale d'ectomycorhization et la valeur minimale d'ectendomycorhization sont également observées sur les racines du même site (1).

3.3 Le système mycorhizien

La mycorhization sur les racines étudiées est variable :

3.3.1 Système ectomycorhizien

La colonisation ectomycorhizienne des terfesses sur les racines de la plante hôte est caractérisée par le mycélium extra-radiculaire formant ou pas un manteau fongique autour de la racine.

3.3.2 Système endomycorhizien

Plusieurs structures mycéliennes provenant des terfesses ont été observées à l'intérieur des racines. Parmi ses structures le mycélium enroulé formant des pelotons et le mycélium segmenté renfermant des nucléoles. En plus de ces structures, d'autre ont été observées. Il s'agit d'hyphes reliant une spore mature à la racine de la plante hôte, des hyphes (probablement ascogènes) montrant une cloison caractéristique (ébauche de l'asque) et une mosaïque hyphale correspondant à l'architecture du manteau fongique formé par les terfesses sur les racines de la plante hôte (Fig. 42). La présence sur la même racine de mycorhizes à terfesse et de mycorhizes à arbuscules a également été observée.

Les éctomycorhizes avec manteau fongique sur racines naturelles se contrarient aux résultats de Gutiérrez *et al.* (2003) qui n'ont décrit, sur les racines naturelles d'*Helianthemum almeriense*, que des endomycorhizes. Le système endomycorhizien des racines naturelles est par contre conforme aux résultats observés par ces auteurs.

La variabilité des systèmes mycorhiziens est semblable à celle observée par Zitouni *et al.* (2014). Elle témoigne de la plasticité de l'espèce végétale (*T. guttata.*) aussi bien que celle fongique (*Terfezia sp.*) à former des endo-, des éctendo-, ou des éctomycorhizes. Cependant, les raisons de la formation d'un système mycorhizien ou d'un autre restent ici non justifiées en raison de la provenance naturelle des racines.

Cette variabilité rappelle également le « continuum » reporté par Navarro-Ródenas *et al.* (2013). Elle peut donc être expliquée par la théorie avancée par ces mêmes auteurs selon laquelle le type mycorhizien est assujetti à la disponibilité de l'eau dans le milieu, de façon à ce que le système tende vers l'endomycorhization avec la sécheresse, et s'oriente vers l'éctomycorhization suivant la disponibilité de l'eau dans le milieu.

L'architecture de l'assise externe du manteau fongique présentement démontrée rappelle celle observée par Zitouni *et al.* (2014) sur les racines de *Pinus halepensis* et *Cistus salvifolius* mycorhizés par *T. leptoderma*, et les racines de *Cistus incanus* colonisées par *T. claveryi*.

Les hyphes reliant la spore à la racine de la plante hôte n'étaient point prévues. La spore mature est reliée par des hyphes à la racine de la plante hôte et aucun autre détail de ce lien n'est fourni.

Cette observation et bien d'autres, peuvent être ultérieurement (après plus d'analyses et confirmation) utilisées dans la compréhension et l'illustration de certains petits détails du cycle biologique des terfesses, en s'appuyant notamment sur les résultats de Roth-Bejerano *et al.* (2004) et Kagan-Zur *et al.* (2008) sur le cycle biologique des terfesses.

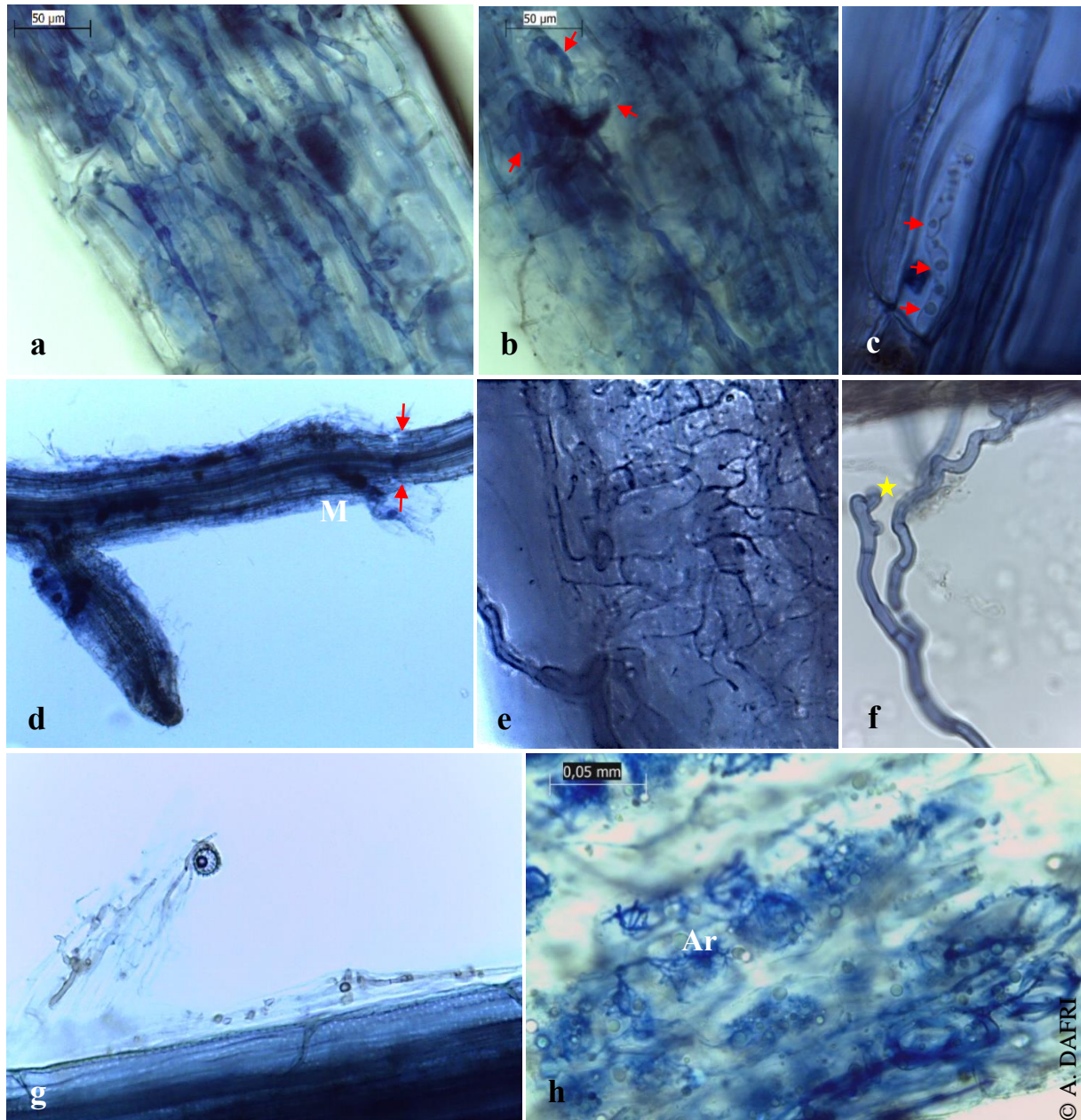


Fig. 42 Système mycorhizien des racines naturelles de *Tuberaria guttata*

a : hyphes segmentées caractéristiques des *Terfezia*, **b** : mycélium enroulé à l'intérieur du système racinaire en forme de pelotons (indiqués par les flèches), **c** : mycélium intracellulaire segmenté laissant clairement voir les nucléoles [x 1000], **d** : éctomycorhize avec manteau fongique développé (M), les flèches indiquent la limite du manteau [x 100], **e** : architecture de l'assise externe du manteau fongique [x 1000], **f** : Mycélium fongique infectant la racine hôte ; la photo montre un mycélium ascogène formant une cloison (★) et le point d'ancrage du mycélium sur la racine [x 1000], **g** : spore mature reliée par des hyphes à la racine hôte [x 400], **h** : racine portant des hyphes en peloton appartenant à des mycorhizes de terfesses et des arbuscules (Ar) appartenant aux champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).

IV- Biotechnologie

1. Production des plantes

1.1 Culture *in vivo*

La production en pots des plantes de *Tuberaria guttata* a montré un bon pourcentage de la germination des graines. Parmi les 96 alvéoles, aucun n'a signé l'absence totale de plante. Dans chacun, au moins une des quatre graines semées a germé. Ceci, affirme la viabilité des graines récoltées, l'exactitude de la scarification et l'adéquation des conditions de culture utilisées.

1.2 Culture *in vitro*

Les graines d'hélianthème ont également bien germé *in vitro*. La micropropagation des plantules a aussi aboutie et les plantules non transférées pouvaient se maintenir en vie, voir continuer à se développer même des mois (près de 5 mois) sur le même substrat. Certaines plantules en jarre sont même parvenues au stade de la floraison (Fig. 43).

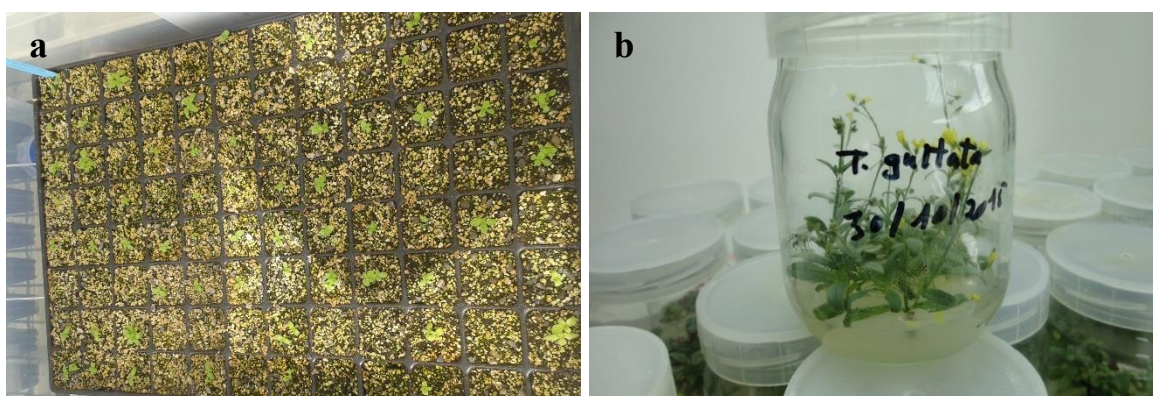


Fig. 43 Plantules de *Tuberaria guttata* produites *in vivo* et *in vitro*

a : plantules *in vivo* (sur substrat sous serre), **b :** plantules *in vitro* (sur milieu gélosé en chambre de culture)

2. Production de l'inoculum

2.1 Solution sporale

La préparation de la solution sporale en elle-même est très facile et il n'y a quasiment pas de résultat à en tirer si ce n'est le temps requis pour le séchage pouvant varier d'une espèce à l'autre. Cependant, la viabilité des ascospores est à espérer, leur maturité est absolument à vérifier rigoureusement avant de s'investir dans la production de l'inoculum qui sera utilisé dans une expérience dont le résultat dépend de chaque petite étape depuis le début de l'expérience et jusqu'à l'analyse des résultats.

2.2 Culture mycélienne

2.2.1 Isolement de *Terfezia arenaria*

La culture mycélienne de *Terfezia arenaria* des dunes littorales étudiées s'est montrée quasi impossible. Depuis l'étude préliminaire de 2012 et tout au long des années du doctorat, la culture de l'espèce à partir d'un fragment de la glèbe sur milieux gélosés n'a pas été possible. Les mêmes contaminations envahissent les boîtes à chaque fois. Ceci nous a mené à penser que l'espèce abrite des microorganismes endogènes qui s'insèrent à l'intérieur de l'ascocarpe pendant sa formation. Cette hypothèse est à vérifier pour l'espèce en question dans des études futures, notant que ce genre de travail a déjà été entrepris sur *Tuber melanosporum* par Antony-Babu *et al.* (2014). En outre, ce qui a bien pu être vérifié c'est le fait qu'un bon nombre d'ascocarpe de *T. arenaria*, soit contaminé. Ceci a pu être approuvé par le résultat du séquençage qui montre la présence de contaminations sur plus d'une cinquantaine d'ascocarpe.

2.2.2 Isolement de *Terfezia fanfani*

Contrairement au *Terfezia arenaria*, le *T. fanfani* n'était pas impossible à cultiver *in vitro* à partir de fragments de la glèbe. Cependant, sa germination ne s'est pas montrée rapide. Elle a nécessité entre deux et trois mois en milieu solide à une température de plus de 35 °C.

Le mycélium du *T. fanfani* était d'abord blanc, caractérisé par des hyphes fines tissées en toile et qui ne se propagent au-delà d'une surface de 2 cm de diamètre sur le milieu de culture. Avec l'âge, une sorte de seconde couche se superposait à la première, la couleur virait vers un gris à vert olive rappelant la glèbe de l'espèce à maturité (Fig. 44).

Le temps de développement du mycélium au deuxième repiquage sur milieu solide est le même que le premier (entre deux et trois mois). Ce temps a pu être considérablement raccourci par une méthode de culture propre à ce présent travail.

La culture *in vitro* des terfesses à partir de fragment de la glèbe a été ciblée par quelques chercheurs. Morte et Honrubia (1994) et Gutiérrez *et al.* (1995) ont réalisé la culture de *Terfezia claveryi* sur milieu MMN modifié, Bouziani *et al.* (2006) ont tenté la production *in vitro* sur trois milieux de cultures MMN, M1 et M2, de trois espèces de terfesse : une *Tirmania*, et deux *Terfezia*. Pour ces auteurs, la culture *in vitro* de *Terfezia claveryi* à partir de la glèbe n'a abouti sur aucun des trois milieux utilisés. Cependant, celle de *Tirmania sp.*, et *Terfezia boudieri* a réussi sur les trois milieu avec un développement meilleur et un temps de latence réduit sur les deux milieux gélosé M1 et M2 dont les auteurs n'ont avancé aucune composition chimique.

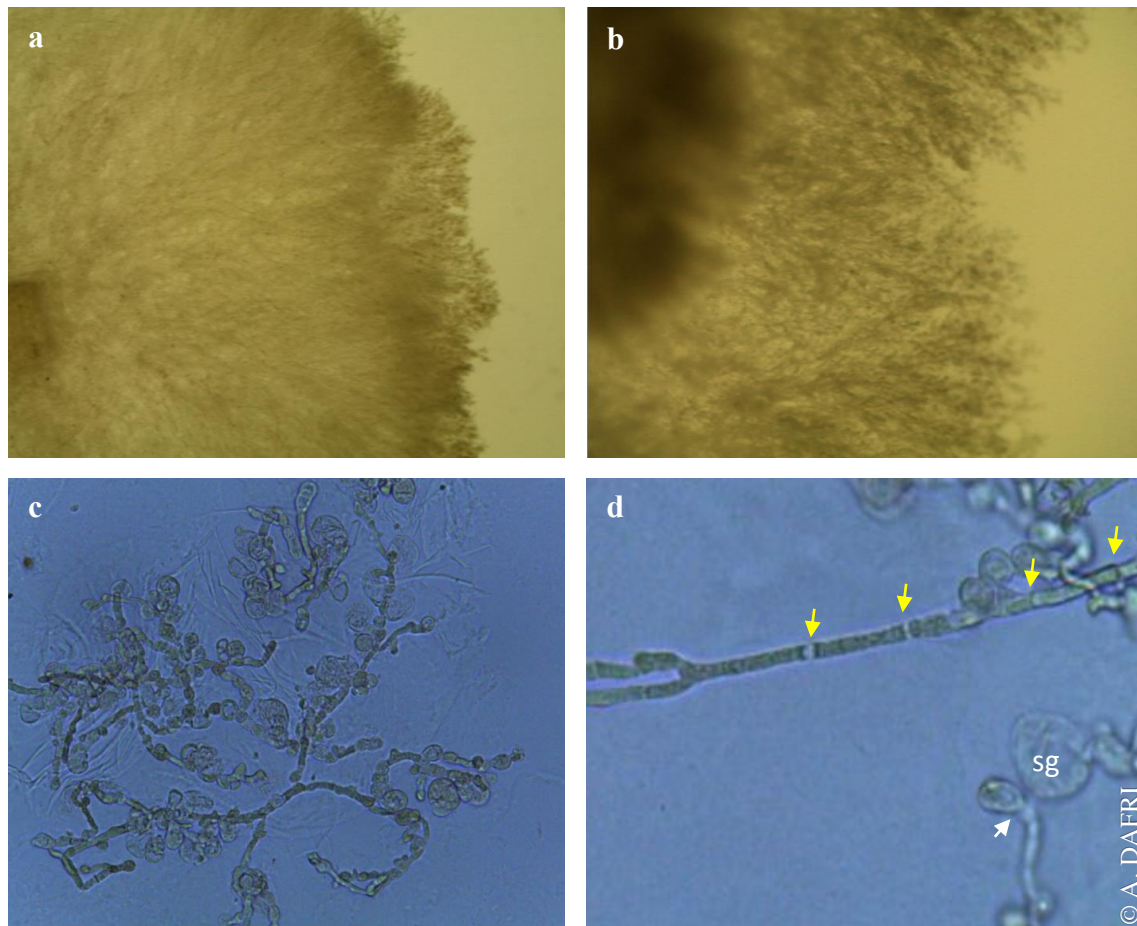


Fig. 44 Culture mycélienne de *Terfezia fanfani*

a, b : prolifération du champignon sur le milieu gélosé [a : x 10, b : x 37,5], **c** : aspect général du mycélium [x 400], **d** : photo montrant le mycélium septé (les flèches jaunes indiquent les segmentations) et une spore germée (sg) ayant multiplié son volume et émis son tube germinatif (indiqué par la flèche blanche) [x 800].

En 2008, Morte *et al.* ont synthétisé l'ensemble des méthodes possibles pour la production de plants d'hélianthe mycorhizés, dans un chapitre où ils ont évoqué l'efficacité des milieux de culture MMN et PDA pour la production *in vitro* de culture mycélienne de terfesses. De telles observations ont également été faites au cours des expériences préliminaires réalisées en appui au présent travail.

Les publications concernant les cultures mycéliennes des terfesses *in vitro* à partir des fragments de la glèbe sont très peu nombreuses, probablement en raison de la difficulté de l'aboutissement de ces expériences, attribuable à plusieurs raisons dont la dormance des ascospores. Cette dormance provoquant une latence de la germination sur milieu de culture, est, dans la nature, surmontée par l'effet abrasif des grains de sable entre lesquels prolifèrent les ascocarpes de terfesse. Cet effet permet la levée de la dormance des graines, ce qui les apprête à germer à la prochaine saison (Fortas et Chevalier, 1992b).

L'ensemencement direct des ascospores peut être considéré comme une alternative à la mise en culture de fragment de la glèbe. Cette méthode d'ensemencement direct d'ascospore a été tentée par plusieurs chercheurs (Awameh et Alsheikh, 1980 ; Fortas et Chevalier, 1992b ; Bouziani *et al.*, 2006) et a abouti dans la plupart des cas.

3. Inoculation

3.1 Inoculation plantes *in vivo* x champignon *in vivo*

Les résultats de l'expérience *in vivo* ont été analysés 6 mois après l'inoculation des plantules de *Tuberaria guttata* produites en pots par la solution sporale de *Terfezia arenaria*. L'étude des résultats de l'expérience ont porté sur les paramètres suivants :

3.1.1 Les morphotypes de mycorhizes

L'observation des racines avant coloration a permis de lister 4 différents morphotypes de mycorhizes de taille variable entre 0.2 et 2 mm (Fig. 45) :

- **Mycorhize 1'** : ce morphotype (Fig. 45a) correspond à des mycorhizes simples, parfois sessiles, mais plus généralement pédonculées (dotées d'un long pédicelle brun foncé presque noir).
- **Mycorhize 2'** : C'est une mycorhize caractérisée par un apex marron ramifié et un long pédicelle brun foncé (Fig. 45b).
- **Mycorhize 3'** : Elle est similaire à la précédente et n'en diffère pratiquement que par la couleur. Elle est faite d'un apex noir présentant plus de deux branches, inséré au bout d'un long pédicelle brun (Fig. 45c).
- **Mycorhize 4'** : Ce morphotype rappelle parfaitement les mycorhizes dites capitulées qui tirent leur nom de leur aspect de chapeau au sommet d'une branche. Elles varient par leurs couleurs et la morphologie de la branche qui les porte. La mycorhize actuellement décrite se présente comme une coiffe dorée au sommet d'une ramification de couleur brune (Fig. 45d).

Les morphotypes de mycorhizes à terfesse non pas était amplement étudiés ni dans la nature, ni sur racines produites. Pratiquement, le seul travail qui donne une description de ces morphotypes serait celui de Gutiérrez *et al* (2003). Les mycorhizes décrites par ces auteurs, mesurant entre 6 et 8 µm, sont de quelques dizaines voire quelques centaines de fois plus petites que celles décrites ci-présent.

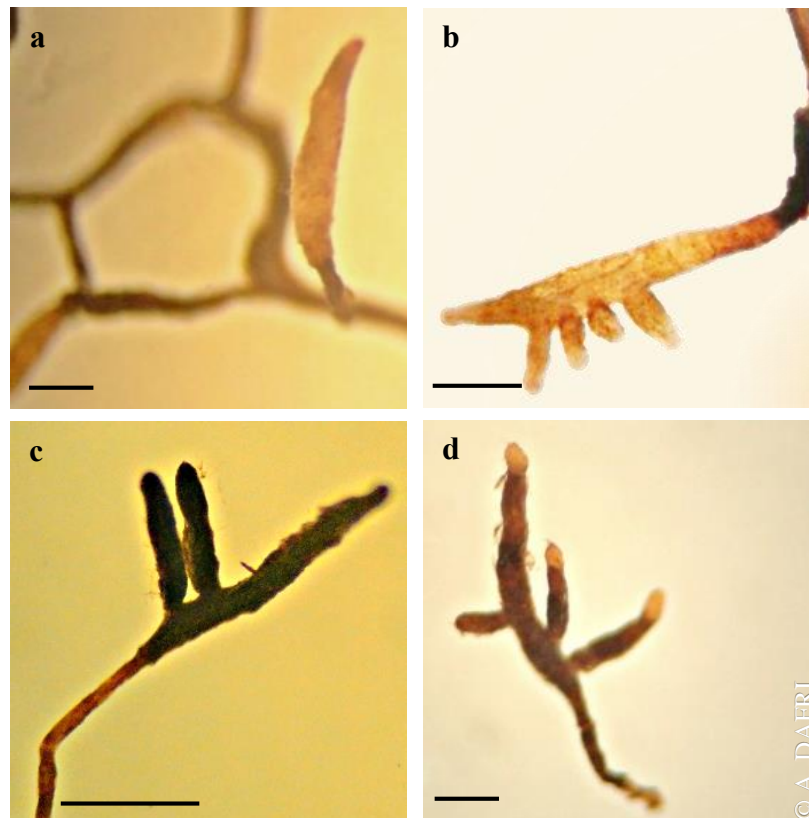


Fig. 45 Morphotypes de mycorhizes observés sur racines de *Tuberaria guttata* produites et inoculées *in vivo* par *Terfezia arenaria*

a : mycorhize simple avec un long pédicelle (M1'), **b** : mycorhize ramifiée marron avec pédicelle brun foncé (M2'), **c** : mycorhize ramifiée noire avec un long pédoncule marron (M3'), **d** : mycorhizes capitulée (M4'). Échelle barres = 0.5 mm.

Les deux premiers morphotypes (M1' et M2') sont conformes à ceux observés par Gutiérrez *et al* (2003), tandis que les mycorhizes capitulées (M4') sont différentes de celles observées par ses mêmes auteurs notamment par leur couleur.

3.1.2 Le statut mycorhizien

Les moyennes des pourcentages de la mycorhization estimés avant et après coloration des racines sont représentées sur l'histogramme de la figure 46.

Elles révèlent un pourcentage plus élevé de la mycorhization des petites racines par rapport à l'intégralité du système racinaire. Ceci peut signifier que, dans ces conditions de culture, la mycorhization a commencé d'abord au niveau des petites racines avant de s'étendre sur le reste du système racinaire.

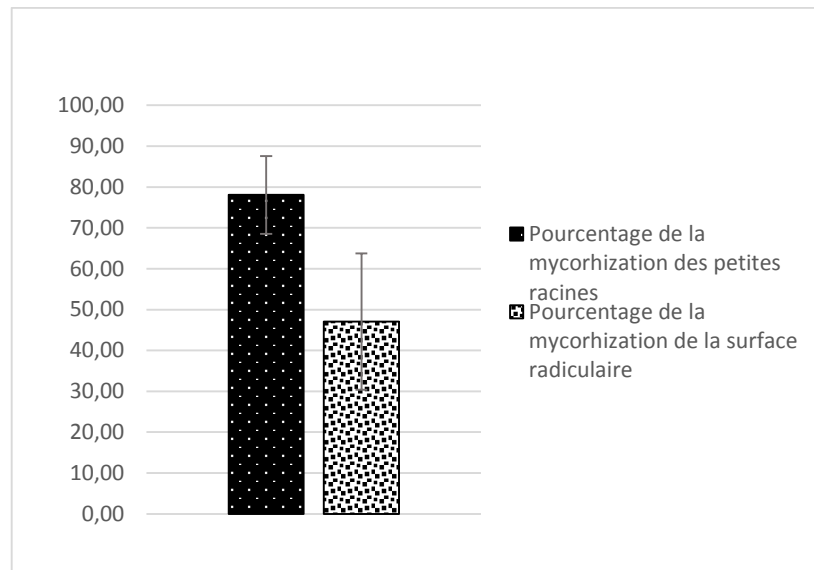


Fig. 46 Statut mycorhizien des racines de *Tuberaria guttata* produites et inoculées *in vivo* par *Terfezia arenaria*

3.1.3 Le système mycorhizien

L'observation des racines issues de cette expérience montre deux différents systèmes mycorhiziens :

3.1.3.1 Éctomycorhizes sans manteau

Ces ectomycorhizes sont caractérisées par la présence d'hyphes intercellulaires formant le réseau de Hartig et d'hyphes extra radiculaires non organisées en véritable manteau. Ce résultat est conforme à celui obtenu par Gutiérrez *et al.* (2003) en culture *in vivo*. Il rappelle également les ectomycorhizes obtenues par Fortas et Chevalier (1992a) sur les inoculations induites de *Tuberaria guttata* x *Terfezia arenaria* et *Terfezia claveryi* qui a donné des ectomycorhizes sans manteau en présence de taux élevés en phosphate.

3.1.3.2 Éctomycorhizes avec manteau

Ce type de système mycorhizien est le premier de son genre dans une telle combinaison d'espèces végétale et fongique induite *in vivo*. Il est semblable au premier dans la présence des hyphes intercellulaires formant le réseau de Hartig, mais en diffère par la présence d'un véritable manteau fongique (Fig. 47).

Ce résultat rappelle celui obtenu par Zitouni *et al.* (2014) sur les racines du pin d'Alep inoculées *in vivo* également. Toutefois, le présent travail proclame pour la première fois un véritable manteau fongique dans la culture *in vivo* d'une plante herbacée inoculée par les terfesses.

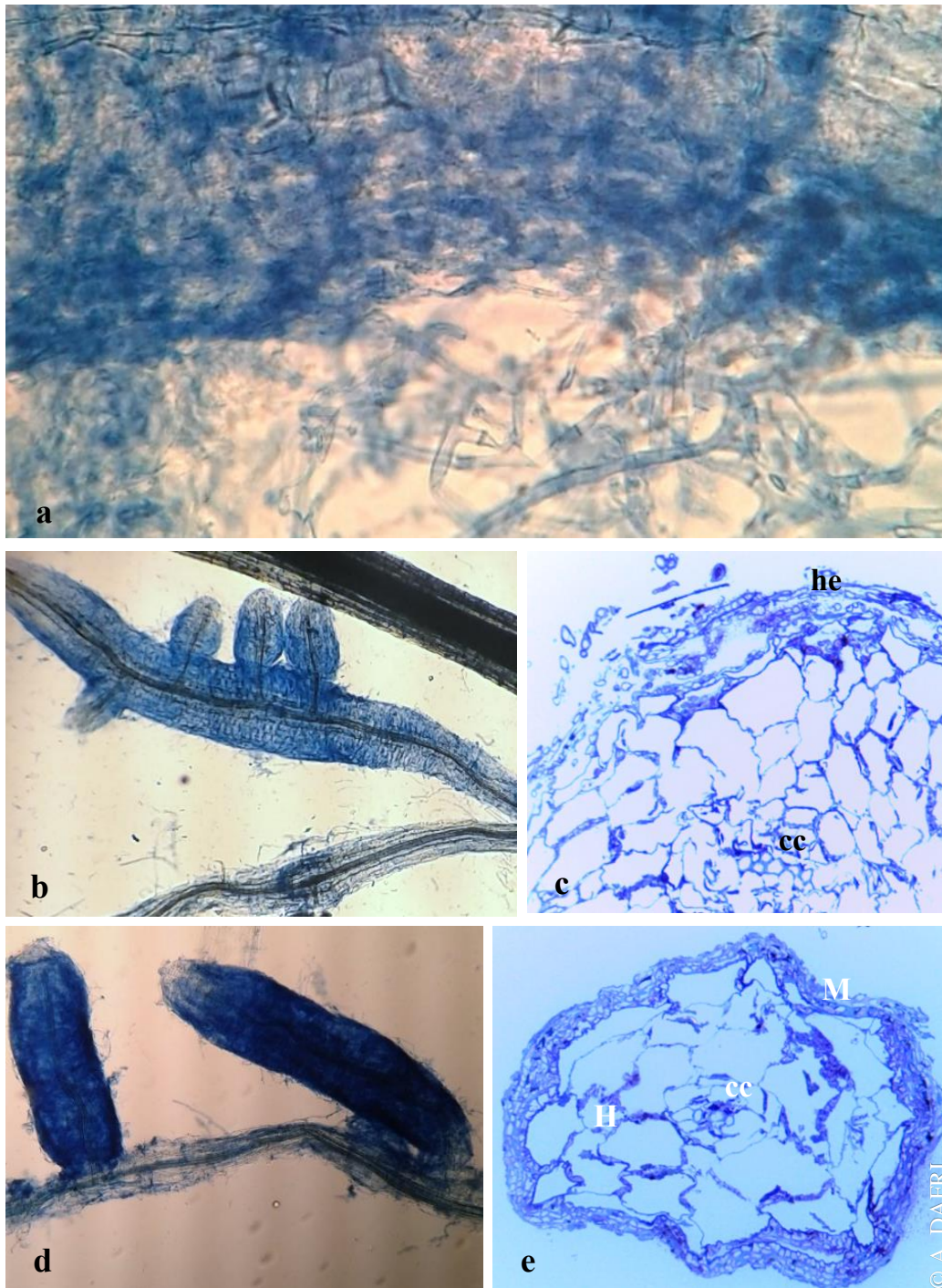


Fig. 47 Système mycorhizien de *Tuberaria guttata* produite et inoculée *in vivo* par *Terfezia arenaria*

a : mycélium segmenté caractéristique de *Terfezia arenaria* envahissant la racine de la plante hôte (*Tuberaria guttata*) [x 400], **b** : morphotype ramifiée montrant un système éctomycorhizien sans manteau fongique [x 100], **c** : coupe semi-fine d'une éctomycorhize montrant le cylindre central de la racine et des hyphes extra radiculaires (he) non organisées en un véritable manteau fongique [x 1000], **d** : morphotypes simples correspondant à des éctomycorhizes avec manteau fongique [x 100], **e** : coupe semi-fines d'une éctomycorhize avec un véritable manteau fongique (M) [x 400].

Ces résultats s'opposent (pareillement à ceux des racines naturelles) aux conclusions de Gutiérrez *et al.* (2003) qui ont avancé que les conditions de cultures influencent le type de mycorhization. Cela pour la simple raison que le système mycorhizien soit variable d'endo à ecto avec ou sans manteau fongique sur les racines naturelles et principalement ecto avec ou sans manteau fongique également *in vivo*.

Pris conjointement avec les aboutissements de la mycorhization naturelle, les résultats de la mycorhization induite *in vivo* joignent encore une fois ceux de Navarro-Ródenas *et al.* (2013) sur l'influence de la disponibilité de l'eau sur le type mycorhizien. Dans l'expérience *in vivo* où l'eau ne faisait pas défaut, les plantes étaient irriguées à volonté, la colonisation était strictement ectomycorhizienne avec formation de manteau fongique sur quelques racines. Au contraire, sur le terrain où l'irrigation n'est pas contrôlée, souvent limitée aux eaux de pluies, rares voir absentes pendant les périodes sèches et abondante pendant les périodes humides, la colonisation varie nettement entre endo et ectomycorhizienne.

La présente formation du manteau fongique *in vivo* ne puisse être attribuée au champignon tel que suggéré par Zitouni *et al.* (2014) du fait que les mêmes partenaires montrent l'absence du manteau sur quelques racines et sa présence sur d'autres. Ce manteau ne puisse non plus être expliqué par une surface de culture étroite et un taux élevé en saccharose comme l'ont avancé Gutiérrez *et al.* (2003) dans leur interprétation de la mycorhization *in vitro* de *Hélianthemum almeriense*. Cependant, le présent manteau fongique peut être expliqué par la théorie de Read et Armstrong (1972) qui l'ont expliqué par le déficit et la localisation d'un facteur limitant, dans leur cas : l'oxygène.

3.2 Inoculation plantes *in vitro* x champignon *in vivo*

L'expérience de l'inoculation des plantules de *Tuberaria guttata* micropropagées *in vitro* par la solution sporale du champignon (*in vivo*) n'a pas abouti. Les plantes micropropagées ont été mises en sol après avoir coupé les racines à une longueur adéquate, ou mises directement pour celles dont la taille n'excédait déjà pas la longueur voulue. Toutes les racines ayant été plantées (à titre d'essai) avec leur système racinaire entier ou coupé à une longueur supérieure à la longueur voulue, sont mortes quelques heures, voir quelques jours après leur plantation. Les autres plantes (racines soigneusement choisies ou coupées) se sont bien développées sur le substrat. Leurs racines ont été observées environ 2 mois après inoculation et n'ont révélé aucune mycorhization. Les coupes ultrafines des racines de ces plantes ont confirmé le non aboutissement de la mycorhization (Fig. 48), un résultat qui a été discuté afin d'en déduire les raisons possibles de l'absence de la mycorhization qui peut être attribué à plusieurs facteurs,

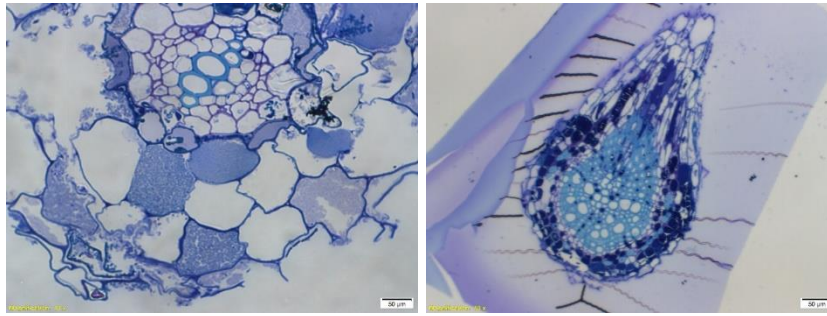


Fig. 48 Coupe semi-fines de racines de *Tuberaria guttata* micropropagées *in vitro* indemnes de mycorhization

dont ceux avancés dans les hypothèses suivantes (Il ne s'agit pas là de résultats vérifiés mais d'hypothèses avancées afin de pouvoir présenter des justificatifs logiquement possibles à l'absence de la mycorhization sur les racines des plantes inoculées) :

➤ Non maturité des spores

Les spores utilisées dans l'inoculation des plantes n'étaient probablement pas matures pour pouvoir germer et émettre un mycélium qui puisse mycorhizer les plantes. Cette cause est la plus probable. Elle explique l'avantage de l'utilisation de l'inoculum produit *in vitro* où la présence du mycélium produit sur milieu de culture est sûre, ce qui multiplie les chances de l'obtention de la mycorhization.

➤ Faute d'acclimatation

Étant donné le temps cours du séjour prévu à Murcia pour ce travail, les plantes issues de la micropropagation n'ont pas été acclimatées avant inoculation comme convenu dans les protocoles de production de plants mycorhizés (Morte *et al.*, 2008). Les deux phases d'inoculation et d'acclimatation ont donc été entreprises simultanément. Ainsi, les racines des plantes n'étaient peut-être pas prêtes à la mycorhization pour quelque raison (physiologique par exemple).

➤ Faute de temps

Enfin il est nécessaire de signaler que l'absence de mycorhization peut n'avoir de raison qu'un temps cours attribué aux deux partenaires avant la récolte des racines. Une période de 6 mois a été attribué à l'expérience *in vivo* tandis que celles-ci (*in vitro*) n'a bénéficié que de deux mois (moins que ça pour les racines sur lesquelles les coupes ont été réalisées)

Discussion générale

Les résultats venant d'être exposés et discutés séparément se rejoignent d'une certaine manière. Ces résultats qui ont montré que les terfesses présentement étudiées se développent sur des dunes littorales gouvernées par un climat de type Cs (selon la classification de Koppen-Geiger (Kottek *et al.*, 2006)), sont conformes aux conclusions de Bonifacio et Morte (2014) qui ont cités la présence des terfesses dans toutes les régions du monde soumises à ce type de climat. L'originalité de cette région d'étude réside cependant, dans l'étage bioclimatique subhumide à humide chaud contre des étages semi-arides dans les autres régions productrices des terfesses dans le monde et soumises au même type de climat (Honrubia *et al.*, 1992 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Jamali et Banihachemi, 2012 ; Kagan-Zur et Akyuz, 2014).

Les données climatiques qui ont enregistré plus de 700 mm de pluies reçus chaque année par la région d'étude, ont également montré que la répartition de ses pluies aurait une influence plus significative que ne l'aurait leur quantité. Un résultat, bien que basé sur une estimation peu fiable de la production des terfesses au cours des années d'étude, trouve sens dans sa conformité aux résultats de Bradai *et al.* (2014b).

La texture limono-sableuse, le pH à tendance acide, la faible conductivité électrique et la faible fertilité des sols à terfesse des dunes littorales du Nord-Est algérien, ne leur sont pas exclusifs. Des résultats pareils ont amplement été reportés par les chercheurs dans différentes régions productrices des terfesses en Algérie et dans le monde (Honrubia *et al.*, 1992 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Slama *et al.*, 2006 ; Aïbeche, 2008 ; Zitouni, 2010 ; Jamali et Banihashemi, 2012 ; Bordallo *et al.*, 2013 ; Bonifacio et Morte, 2014 ; Bradai *et al.*, 2014) . Cependant, ces conditions ne sont pas les seules adéquates à la prolifération des terfesses, d'autres conditions ont également été citées, avec quelques caractères similaires et un ou quelques caractères différents d'une région à l'autre. Ceci aboutit à un large éventail de variantes écologiques pour les régions productrices de ce champignon. Ce qui a été justifié par Bonifacio et Morte (2014) par la diversité des espèces de terfesse elles-mêmes ou la diversité des partenaires végétaux de la symbiose.

La diversité des hôtes à terfesses (venant d'être invoquée), a été confirmée par les résultats de l'étude du partenaire vert des symbioses à terfesses. Ces partenaires étant essentiellement des Cistaceae du genre *Tuberaria*, ont largement été cités par les chercheurs comme hôtes des terfesses en général et des espèces de terfesses ici identifiées en particulier (Honrubia *et al.*,

1992 ; Fortas et Chevalier, 1992a, b ; Khabar *et al.*, 2001 ; Díez *et al.*, 2002 ; Bordallo *et al.*, 2013).

Les résultats de l'identification des terfesses récoltées au cours de cette étude ont révélé deux espèces distinctes : *Terfezia arenaria*, largement répandu dans les sites d'études, le pays et les zones à terfesse dans le monde, et *Terfezia fanfani*, moins répandu dans les sites d'étude et cité là pour la première fois en Algérie. Cette première découverte, rappelle le *Tuber gennadii* également découvert pour la première fois en Algérie en 2012 sur ces mêmes dunes littorales (Dafri, 2012 ; Dafri et Beddiar, 2017). Ces deux découvertes servent de bonne preuve à la richesse patrimoniale du cordon dunaire nord-est algérien, et donnent d'avantage d'arguments au choix de la zone comme réserve mondiale de la biosphère par l'UNESCO.

La présence conjointe de ces deux espèces (*T. arenaria* et *T. fanfani*) sur les mêmes sites, a déjà été remarquée en Espagne par Bordallo *et al.* (2013) dont les résultats affirment les observations présentes concernant le partage, entre les deux espèces, de l'hôte et la saison de fructification (les deux espèces sont printanières) avec seulement un peu d'avance pour *T. fanfani* par rapport à *T. arenaria*.

Ces deux espèces sont morphologiquement distinguables grâce à l'ornementation de leurs spores circulaires avec des verrues tronquées chez *T. arenaria* et des épines chez *T. fanfani*. Cette différenciation morphologique est appuyée par les résultats de la biologie moléculaire qui les distingue en deux clades (donc deux génotypes) différents, ainsi que par les résultats des études précédentes, notamment celle menée par Bordallo *et al.* (2013).

Ces variabilités d'espèces végétales et fongiques, n'ont pas été les seules détectées. Différentes structures hyphales ont aussi été observées sur les racines de la plante hôte. Parmi ses structures, les hyphes reliant les spores aux racines sont les plus curieuses.

Une diversité de morphotypes et de systèmes mycorhiziens allant d'endo, à éctomycorhizes a aussi été observée. Cette variabilité de système parfois enregistrée sur la même racine, vient en argument au « continuum » reporté par Navarro-Ródenas *et al.* (2013), et peut être expliquée par la théorie des mêmes auteurs qui l'attribuent à la teneur en eau dans le milieu.

Ces systèmes éctomycorhiziens avec et sans manteau fongique observés sur les racines naturelles de la plante hôte, ont également été observés sur les racines issues des expériences de la mycorhization induite. Ces dernières ont permis de mettre en évidence les conditions de production et d'inoculation *in vivo* des plantules de *Tuberaria guttata*, ainsi que leur production *in vitro* et leur micropropagation selon des protocoles similaires aux méthodes décrites par

Morte *et al.* (2008) pour *Helianthemum almeriense*, avec adaptations de ces méthodes (notamment la préparation des graines et les caractéristiques des milieux) aux espèces étudiées. Le non aboutissement de la culture mycélienne pure de *T. arenaria* à partir d'un fragment de la glèbe a été attribué aux microorganismes endogènes. L'isolement de cette même espèce a été tenté par plusieurs chercheurs (Awameh et Alsheikh, 1980 ; Fortas et Chevalier, 1992b ; Bouziani *et al.*, 2006 entre autres) qui n'ont avancé de résultats favorables que pour la culture directe de spores préalablement traitées. Au contraire, l'obtention de la culture pure de *T. fanfani* a permis d'élucider plusieurs points importants en relation avec la prolifération de l'espèce, et ont même indirectement appuyé l'hypothèse des microorganismes endogènes de *T. arenaria* repiquée dans les mêmes conditions d'asepsie.

L'inoculation *in vivo* des plantules micropropagées (*in vitro*), quant à elle, peut expliquer son échec par plusieurs hypothèses, dont principalement la non maturité ou la non viabilité des spores fongiques contenues dans la solution sporale ayant servi d'inoculum, l'indispensabilité de la phase d'acclimatation des plantules micropropagées conformément aux protocoles de Morte *et al.* (2008), ou plus simplement encore la récolte et l'observation des racines avant que la mycorhization ne s'installe. Ces deux derniers points (acclimatation sautée et récolte précipitée) ont eu lieu suite à un manque de temps qui a obligé d'accélérer au maximum le déroulement de l'expérience.



Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

À l'essor de cette recherche, plusieurs objectifs ont été fixés dans le but de répondre à la problématique posée concernant la production biotechnologique des terfesses à partir des plantes hôtes et/ou des espèces fongiques croissant dans les dunes littorales du Nord-Est algérien. Le travail réalisé a permis d'atteindre la quasi-totalité de ces objectifs.

Nombreuses prospections du terrain, ont permis de détecter de nouveaux sites à terfesse dans la région d'étude, augmentant ainsi le nombre de sites de 7 (au début des investigations en 2013) à 10 (en 2017).

Les données climatiques ont démontré que la région d'étude reçoit plus de 700 mm de pluie par an (abondante en hiver et rare en été), et est caractérisées par des moyennes mensuelles de températures variant entre 9.3 et 29.7 °C.

Les analyses physico-chimiques nous ont permis de conclure que les sols des sites d'étude sont tous dotés d'une texture limono-sableuse, un pH plus ou moins acide, non salés, généralement pauvre en matière organique, en azote et en phosphore.

Ces conditions écologiques des sites à terfesses permettent la prolifération d'un nombre non négligeable de plantes herbacées qui partagent les sites avec le partenaire végétal de la symbiose, lequel a été identifié comme Cistaceae du genre *Tuberaria*.

L'étude morphologique approfondie de ces plantes a révélé la présence de quelques espèces appartenant, probablement, toutes à ce même genre (*Tuberaria*). La plus répandue étant *Tuberaria guttata* représenté par des sous-espèces différentes.

Ces plantes assurent l'approvisionnement des terfesses en matière organique pendant la phase symbiotique indispensable à l'accomplissement de leur cycle biologique et à leur fructification dont résultent les tubercules ou ascocarpes de terfesses recherchés.

L'analyse morphologique et biomoléculaire de ces tubercules a permis d'identifier deux espèces appartenant au genre *Terfezia*. La première et la plus propagée est *T. arenaria*, très commune dans les sites d'étude, comestible et très recherchée par les habitants, dont le goût pour les terfesses se voit nettement à travers le temps et l'intérêt qu'ils accordent à leur cueillette. La deuxième est *T. fanfani*, beaucoup plus rare encore, identifiée en 2016 et venant d'être citée pour la première fois en Algérie. Ce résultat ajoute aux dunes littorales étudiées, une deuxième « première découverte en Algérie » en termes de terfesse, après *Tuber gennadii*

découvert au cours de la recherche préliminaire sur laquelle s'est basé le présent travail, témoignant ainsi d'avantage, de la richesse patrimoniale naturelle de ce cordon dunaire d'importance majeure.

L'étude de la symbiose à terfesse a montré que la relation entre les deux partenaires (végétal (*Tuberaria*) et fongique (*Terfezia*)) varie parfois sur la même racine, d'endo à éctomycorhizienne avec ou sans manteau fongique. Il en résulte plusieurs structures hyphales d'intérêt dans l'élucidation de quelques secrets du cycle biologique des terfesses.

Les résultats synthétisés ci-avant, constituent le fruit des deux premiers volets (écologie et symbioses) de la recherche qui s'est ensuite orientée vers la production biotechnologique de plants mycorhizés par les terfesses et qui s'est articulée sur plusieurs expériences.

Cette étude à travers l'inoculation *in vivo* des plantules de *Tuberaria* produites en serre par l'inoculum de terfesse à base de solution sporale, montre qu'une bonne germination des graines de *Tuberaria guttata* est assujettie à une bonne scarification, une stérilisation adéquate, suivis d'un ensemencement (dès les premières heures qui suivent la stérilisation) sur un substrat contenant de la tourbe entre autres. Le maintien d'un taux assez élevé d'humidité au début de la germination et la création des conditions environnementales favorables (en serre) ont aussi été prouvés nécessaires pour l'obtention d'un grand nombre de plantes saines et rigoureuses.

Par la même, la culture *in vitro* du *Tuberaria guttata* a permis de conclure que ces plantes se développent bien (après préparation des graines) sur milieu MS gélosé à pH acide (pH = 5.8), en conditions strictement stériles et contrôlées. Cette expérience a également démontré que la micropropagation de ces plantules réussit dans les mêmes conditions.

L'expérience d'inoculation des plantules micropropagées (la seule avec la culture pure du *T. arenaria* à n'avoir pas abouti), a révélé beaucoup de points importants dans la réussite de la mycorhization des plantules micropropagées et inoculées *in vivo*. Parmi ces points : l'indispensabilité de l'acclimation et l'importance du choix exacte de l'âge (et par conséquent de l'état du système racinaire) de la plantule micropropagée dans sa survie en dehors des conditions *in vitro*.

La culture des deux espèces de terfesses récoltées, à partir de fragments de la glèbe, sur milieu gélosé a mené à penser à des micro-organismes endogènes à l'intérieur des ascocarpes de *T. arenaria* et a permis de mettre en évidence les conditions favorables à la culture mycélienne pure du *T. fanfani* qui croit *in vitro*, comme dans la nature, sur milieu à tendance plus ou moins acide, et à des températures allant jusqu'à plus de 30 °C. Il a également été prouvé que le temps

de culture, notamment lors du deuxième repiquage, peut être raccourci suivant un protocole propre au présent travail.

- ❖ L'inoculation des plantules produites *in vivo* et/ou *in vitro* par l'inoculum mycélien n'a pu se faire en raison de l'obtention tardive de la culture pure du champignon en 2016. Ainsi, l'expérience d'inoculation est à envisager dans un futur proche. Cette étude n'aurait éventuellement pas l'unique objectif de produire des plants mycorhizés par les terfesses, mais également de mieux comprendre les raisons de l'échec de l'inoculation *in vivo* des plantules micropropagées.
- ❖ La culture de *T. arenaria* est aussi à envisager avec ensemencement des spores traitées sur milieu de culture au lieu de la mise en culture directe de fragments de la glèbe qui induit des contaminations rapides et inévitables sur plusieurs milieux de cultures, différents pH et diverses conditions. L'étude de la présence de micro-organismes endogènes à l'intérieur des ascocarpes de l'espèce est aussi à planifier.

En plus de ces points restés à éclaircir et ces expériences restées à élaborer, le présent travail ouvre les portes sur plusieurs autres perspectives dont les suivantes :

- ◆ Authentification des espèces et sous-espèces de *Tuberaria* par le biais de la biologie moléculaire et étude (morphologique et biomoléculaire) des racines de chaque espèce dans le but de confirmer la ou les espèce(s) et/ou sous-espèce(s) symbiotiques des terfesses dans la région.
- ◆ Identification biomoléculaire des terfesses nouvellement récoltées (printemps 2017) et recherche éventuelle d'espèces différentes de celles déjà authentifiées.
- ◆ Poursuite des prospections sur le terrain au niveau de tout l'Est algérien notamment dans les régions de Skikda et Jijel.
- ◆ Étude comparative de la composition chimique des espèces de terfesses des dunes entre elles et avec celles d'autres régions du pays et même du monde.
- ◆ Étude de l'activité antimicrobienne des terfesses et recherche des constituants fongiques responsables de cette activité.



Travaux cités

- Ackermen, L. G. J., Wyk, P. J., & Du Plessis, L. M. (1975). Some aspects of the composition of the Kalahari truffle or N'abba. *S Afr Food Rev*, 2:145–146.
- Agnello, C., & Kaounas, V. (2011). *Tuber asa* and *T. gennadii*. A close morphological study of two species often confused in the past with a brief historical bibliographic summary. *Ascomycète.org*, 3(4):65–74.
- Ahmed, A. A., Mostafa, A. M., & Hami, M. A. (1981). Libyan truffles “*Terfezia boudieri* Chatin:” Chemical composition and toxicity. *Journal of food science*, 46:927–929.
- Aïbeche, C. (2008). Caractéristiques écologiques et mycologiques d'une espèce de terfez de littoral ouest algérien. Thèse de Magister. Univ Oran, Algérie, 85 p.
- Aldebasi, Y. H., Nouh, W. G., Abdel-Atti, N. M., Salem-Bekhit, M. M., Qureshi, M. A., & Aly, S. M. (2012). Comparative pathological studies on the healing effect of natural (*Terfezia claveryi*) and synthetic (Vigamox) antimicrobial on corneal ulcers in rabbits. *J Pharm Biomed Sci*, 2(6):66–77.
- Al-Delaimy, K. S. (1977). Protein and amino acid composition of truffles. *Can Inst Food Sci Technol J*, 10:221–222.
- Al-Kazwini زكرياء بن محمد بن محمود القزويني (2000). عجائب المخلوقات و الحيوانات و غرائب الموجودات. مؤسسة الأعلمي للطبوعات، بيروت، لبنان، 396 ص.
- Al-Laith, A. A. A. (2010). Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J Food Comp Anal*, 23:15–22.
- Al-Laith, A. A. A. (2014). Nutritional and antioxidant properties of the white desert truffle *Tirmania nivea* (Zubaidi). In: V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) *Desert truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Soil Biology, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 275–297.
- Al-Marzouki, A. (1981). Al Kamaa from the manna and its water is cure for eye. In : *First World Conference on Islamic Medicine*. Kuwait.

- Al-Shabibi, M. M. A., Toma, S. J., & Haddad, B. A. (1982). Studies on Iraqi Truffles. I. Proximate analysis and characterization of lipids. *Can Inst Food Sci Technol J*, 3:200–202.
- Alsheikh, A. M. (1994). Taxonomy and mycorrhizal ecology of the desert truffles in the genus *Terfezia*. An abstract of the doctoral thesis.
- Alsheikh, A. M., & Trappe, J. M. (1983). Desert truffles: the genus *Trimania*. *Trans Br Mycol Soc*, 81:83–90.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389–3402.
- Alvarado, P., Moreno, G., & Manjón, J. L. (2012). Comparison between *Tuber gennadii* and *T. oligospermum* lineages reveals the existence of the new species *T. cistophilum* (Tuberaceae, Pezizales). *Mycologia*, 104(4):894–910.
- Anderson, I. C., Campbell, C. D., & Prosser, J. I. (2003a). Diversity of fungi in organic soils under a moorland–Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environ Microbiol*, 5:1121–1132.
- Anderson, I. C., Campbell, C. D., & Prosser, J. I. (2003b). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol*, 5:36–47.
- Antony-Badu, S., Deveau, A., Van Nostrand, D. J., Zhou, J., Le Tacon, F., Robin, C., . . . Uroz, S. (2014). Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environ Microbiol*, 16(9):2831–47.
- Awameh, M. S., & Alsheikh, A. M. (1979). Laboratory and field study of four kinds of truffle (kamah), *Terfezia* and *Tirmania* species, for cultivation. *Mush Sci*, 10:507–517.
- Awameh, M. S., & Alsheikh, A. M. (1980). Features and Analysis of Spore Germination in the Brown Kamé *Terfezia claveryi*. *Mycologia*, 72(3):494–499.
- Awameh, M. S., Alsheikh, A. M., & Al-Ghawas, S. (1979). Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium*, *H. salicifolium* and four species of the genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospore germination.

- In : Fourth North American Conference on Mycorrhizae. Colorado State University, Fort Collins, pp. 22–23.
- Baize, D. (2000). Guide des analyses en pédologie : choix, expression, présentation, interprétation. INRA, Paris, 245 p.
- Bencivenga, M., & Urbani, G. (1996). Yields white truffles in a truffle ground cultivated for three years. *Informatore-Agrario*, 52:25–26.
- Benslama, M., Andrieu-Ponel, V., Guiter, F., Reille, M., De Beaulieu, J. L., Migliore, J., & Djamali, M. (2010). Nouvelles contributions à l’histoire tardiglaciaire et holocène de la végétation en Algérie : Analyses polliniques de deux profils sédimentaires du complexe humide d'El-Kala. *C R Biologies*, 333:744–754.
- Bentouili, M. Y. (2007). Inventaire et qualité des eaux du parc national d'El Kala (N. Est algérien). Thèse de Magister. Univ d'Annaba, Algérie, 134 p.
- Benyakoub, S. (1993). Ecologie de l’avifaune forestière nicheuse de la région d’El-Kala (Nord-Est algérien). Thèse de Doctorat. Univ de Bourgogne, France, 280 p.
- Bokhary, H. A., & Parvez, S. (1992). Soil mycoflora from truffle native areas of Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 118:103–107.
- Bokhary, H. A., & Parvez, S. (1993). Chemical composition of desert truffle *Terfezia claveryi*. *Journal of food composition and analysis*, 6(3):285–293.
- Bokhary, H. A., Suleiman, A. A., & Basalah, M. O. (1989). Fatty acid components of the desert truffle “Al-Kamah” of Saudi Arabia. *Can Inst Food Sci Technol J*, 20:336–341.
- Bonifacio, E., & Morte, A. (2014). Soil properties. In : V. kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) Desert truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication. *Soil Biology*, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 57–67.
- Bordallo, J. J., Rodriguez, A., Muñoz-Mohedano, J. M., Suz, L. M., Honrubia, M., & Morte, A. (2013). Five new species from the Iberian Peninsula. *Mycotaxon*, 124:189–208.
- Boussouak, R. (1999). Etude synchronique du dynamisme de la végétation des dunes et des falaises littorales (Numidie orientale). Thèse de Magister. Univ Annaba, Algérie.
- Bouziani, N., Bouakka, M., Belabed, A., & Tahir, E. H. (2006). Caractérisation biochimique du terfez du Maroc oriental : Isolement et culture *in vitro*. In : Congrès International de Biochimie. Agadir, Maroc, pp. 519–522.

- Bradai, L., Bissati, S., & Chenchouni, H. (2014a). Desert truffles of the north Algerian Sahara: Diversity and Bioecology. *Emir J food Agric*, 26(5):425–435, doi: 10.9755/ejfa.v26i5.16520.
- Bradai, L., Bissati, S., Chenchouni, H., & Amrani, K. (2014b). Effects of climate on the productivity of desert truffles beneath hyper-arid conditions. *Int J Biometeorol*, 59(7):907–15, doi: 10.1007/s00484-014-0891-8.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajky, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *Aust Cent Intern Agric Kessae*, 140–180.
- Callot, G. (1999). *La truffe, la terffe, la vie*. INRA, Paris, 210 p.
- Chatin, A. (1869). *Etude des conditions générales de la production truffière*. Imprimerie et librairie Bouchard-Huzard, Paris, 200 p.
- Chatin, A. (1892a). *La truffe : Botanique de la truffe et des plantes truffières*. JB Baillièrre, Paris, 330 p.
- Chatin, A. (1892b). Contribution nouvelle à l’histoire chimique de la truffe. Parallèle entre les terfâs ou kamés d’Afrique et d’Asie et les truffe d’Europe, sous les rapports de la composition chimique des terres et des tubercules. *Compt Rend Acad Sci, Paris, Sér 3*, 114:46–53.
- Chatin, A. (1892c). Nouvelle contribution à l’histoire botanique de la truffe : Kamés de Bagdad (*Terfezia hafizi*, *T. metaxasi*) et de Smyrne (*T. leonis*) Parallèle entre les terfaz ou kamés d’Afrique et d’Asie et les truffes de France. *Bull Soc Bot France*, 39:10–20.
- Chatin, A. (1893). Sur une truffe du Caucase, La Touboulane. *Bull Soc Bot France*, 40:301–304.
- Chatin, A. (1894a). Truffe (Terfâs) de Tunisie et de Tripoli. *Compt Rend Acad Sci, Paris, Sér 3*, 119:485–487.
- Chatin, A. (1894b). Truffe (Domalan) de Smyrne. *Compt Rend Acad Sci, Paris, Sér 3*, 119:523–526.
- Chatin, A. (1895a). Terfas du Maroc et de Sardaigne. *Bull Soc Bot France*, 42:489–493.
- Chatin, A. (1895b). Truffes (terfas) de Chypre, de Smyrne et de La Calle. *Bull Soc Bot France, Sér 3*, 42:549–551.
- Chatin, A. (1895c). Truffe (*Terfezia hanotauxii*) de Téhéran. *Bull Soc Bot France*, 43:619–623.

- Chatin, A. (1896a). Un terfas d'Espagne et trois nouveaux terfas du Maroc. *Bull Soc Bot France*, 43:397–399.
- Chatin, A. (1896b). Truffes (terfaz) de Grèce, *Terfezia gennadii*. *Bull Soc Bot France*, 43:611–617.
- Chatin, A. (1897). Un nouveau terfas (*Terfezia aphroditis*) de l'île de Chypre. *Bull Soc Bot France*, Sér 3, 44:290–292.
- Chevalier, G. (2014). The European Desert truffles. In : V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) *Desert Truffles Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. *Soil Biology*, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 121–141.
- Claus, R., Hoppen, H. O., & Karg, H. (1981). The secret of truffles: A steroidal pheromone? *Experientia*, 37:1178–1179.
- Clérvet, A., Alami, I., Berton, F., Gracia, D., & Sanier, C. (2013). Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta Tela-Botanica*, 143(6):531–538.
- Cordier, F-S. (1797–1876). *Les champignons : histoire, description, culture et usages*. J Rothschild, Paris, Vol 1, 438 p.
- Dafri, A. (2012). Les terfezs des dunes littorales du Nord-Est algérien : Localisation, Identification et Symbiose. Mémoire de master. Univ Annaba, Algérie, 85 p.
- Dafri, A., & Beddiar, A. (2017). Desert truffles from northeastern Algerian coastal dunes: Ecology, Identification and Symbiosis. *J Fundam Appl Sci*, 9(1):153–169, doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i1.11>.
- Danell, E., & Eaker, D. (1992). Amino acid and total protein content of edible mushroom *Cantharellus cibarius*. *J Sci Food Agric*, 60:333–337.
- De Maisonneuve, D. (1846–1849). *Flore d'Algérie : Cryptogamie*. Imprimerie impériale, Paris, 631 p.
- Dexheimer, J., Gérard, J., Leduc, J. P., & Chevalier, G. (1985). Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorhiziennes *Helianthemum salicifolium*–*Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium*–*Terfezia leptoderma*. *Can J Bot*, 63:582–591.
- Dib-Bellahouel, S. (2012). Etude du pouvoir antimicrobien et mycorhizien de deux espèces de terfez : *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon et *Terfezia leptoderma* Tul. Thèse de Doctorat. Univ Oran, Algérie, 199 p.

- Dib-Bellahouel, S., & Fortas, Z. (2011). Antibacterial activity of various fractions of ethyl acetate extract from the desert truffle, *Tirmania pinoyi*, preliminary analysed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *African J Biotech*, 10(47):9694–9699, doi: 10.5897/AJB10.2687.
- Dickie, I. A., Xu, B., & Koide, R. T. (2002). Vertical distribution of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol*, 156:527–535.
- Díez, J., & Manjón, J. L. (2001). Biology of desert truffles in Mediterranean dehesa type forests. In : *Le 5ème Congrès International Science et Culture de la Truffe*. Aix-en-Provence, France (1999). Fédération Française des Trufficulteurs, Paris, pp. 140–141.
- Díez, J., Manjón, J. L., & Martin, F. (2002). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia*, 94(2):247–259.
- Doggan, H. H., & Aydin, S. (2013). Determination of antimicrobial effect, antioxidant activity and phenolic contents of desert truffles in Turkey. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10(4):52–58.
- Duggar, B. M., & Pinoy, E. (1907). Sur le parasitisme des terfaz. *Soc Bot France, Session extraordinaire*, 5(3):72–73.
- Dunedar, A., Faruk, O., Acay, H., Okumus, V., Ozdemir, S., & Yildiz, A. (2012). Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. *Food Sci Technol Int*, 18:317–328.
- El Enshasy, H., A-Elsayed, E., Aziz, R., & A-Wadaan, M. (2013). Mushrooms and truffles: Historical biofactories for complementary medicine in Africa and in the Middle East. *Hindawi Publishing Corporation*, 1–10, doi: 10.1155/2013/620451.
- Farel, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *Farrel and Alexandre BMC Research Notes*, 5:257.
- Ferdman, Y., Aviram, S., Roth-Bejerano, N., Trappe, J. M., & Kagan-Zur, V. (2005). Phylogenetic Studies of *Terfezia pfeilii* and *Choiromyces echinulatus* (Pezizales) Support New Genera for Southern African truffles: *Kalaharituber* and *Eremoimyces*. *Mycol Res*, 109:237–245.

- Fischer, E. (1897). Ascomyceten: Tuberaceen und Hemiasceen. In : Rabenhort's Kryptogamen Flora Von Deutschland, 1:1–131.
- Fortas, Z. (1990). Etude de trois espèces de terfez : Caractères culturaux et cytologie du mycélium isolés et associé à l'*Helianthemum guttatum*. Thèse de Doctorat. Univ Oran, Algérie, 166 p.
- Fortas, Z., & Chevalier, G. (1992a). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. Can J Bot, 70:2453–2460.
- Fortas, Z., & Chevalier, G. (1992b). Caractéristiques de la germination des ascocarpes de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe récoltée en Algérie. Cryptogamie Mycol, 13:21–29.
- Fries, E. M. (1823). Systema mycologicum. Lund, Vol 2, pp. 276–620.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular ecology, 2:113–118.
- Gea, I., Norman, L., Vian, B., & Gay, G. (1994). Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum Romagnesi*. New Phytol, 128:651–670.
- Gillet, M., & Magne, M. J.-H. (1873). La nouvelle flore française. Garnier frère, libraires-éditeurs, 739 p.
- Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol, 84:227–230.
- Gouzi, H., Belyagoubi, L., Abdelali, K. N., & Khelifi, A. (2011). *In vitro* antibacterial activities of aqueous extracts from Algerian desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*, Ascomycetes) against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Int J Med Mushrooms, 13(6):553–558.
- Gutiérrez, A., Honrubia, M., Morte, A., & Díaz, G. (1995). Edible fungi adapted to arid and semiarid areas, molecular characterization and *in vitro* mycorrhization of micropropagated plantlets. Cah Options Mediterr, 20:139–144.

- Gutiérrez, A., Morte, A., & Honrubia, M. (2003). Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia clavaryi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza*, 13:299–307.
- Hall, I. R., Brown, G. T., & Zambonelli, A. (2007). Taming the truffle: The history, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom. Timber press, 380 p.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp*, 41:95–98.
- Hansen, K., Læssøe, T., & Pfister, D. H. (2001). Phylogenetics of the Pezizaceae, with an emphasis on *Peziza*. *Mycologia*, 93:958–990.
- Hansen, K., Lo-Buglio, K. F., & Pfister, D. H. (2005). Evolutionary relationships of the cup-fungus genus *Peziza* and Pezizaceae inferred from multiple nuclear genes: RPB2, beta-tubulin and Lsu rDNA. *Mol Phylogenet Evol*, 36:1–23.
- Hasler, C. M. (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*, 52(2):57–62.
- Honrubia, M., Cano, A., & Molina-Ninriola, C. (1992). Hypogeous fungi from southern Spanish semiarid lands. *Persoonia*, 14(4):647–653.
- Hussain, G., & Al-Ruqaie, I. M. (1999). Occurrence, chemical composition and nutritional value of truffles: An overview. *PJBS*, 2(2):510–514.
- Innis, M. A., & Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. In : M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. Sninsky, & T. J. White (eds) PCR protocols. Academic Press, New York, pp. 3–12.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., & Brow, M. A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(24):9436–9440.
- Itai, C. (1999). Role of phytohormones in plant response to stresses. In : H. R. Lerner (ed) Plant responses to environmental stresses: from phytochrome to genome reorganization. Marcel Dekker, New York, NY.
- Izzo, A., Agbowo, J., & Bruns, T. D. (2005). Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol*, 166:619–630.

- Jamali, S., & Banihashemi, Z. (2012). Fungi associated with ascocarps of desert truffles from different parts of Iran. *J Crop Prot*, 1:41–47.
- Jami' At-Tirmidhi. Chapters on medicine, Chapter 22: What has been related about truffles and Al-‘Ajwah. English translation (2007) by Abou Khalil (USA). Maktaba Dar us Salam, Vol 4, hadith: 2066–2069.
- Janakat, S. M., Al-Fakhiri, S. M., & Sallal, A. K. (2004). A promising peptide antibiotic from *Terfezia claveryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus in vitro*. *Phytother Res*, 18:810–813.
- Janakat, S. M., Al-Fakhiri, S. M., & Sallal, A. K. (2005). Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia claveryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med J*, 26(6):952–955.
- Joleaud, L. (1936). Etude géologique de la région de Bône et de la Calle. Bulletin du service de la Carte géologique d'Algérie. Imp. Typo – Litho et Cie, Alger, Sér 2, 185 p.
- Kagan-Zur, V., & Akyuz, M. (2014). Asian mediterranean desert truffles. In : V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) Desert truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication. Soil Biology, Soringer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 159–172.
- Kagan-Zur, V., & Roth-Bejerano, N. (2008). Desert truffles. *Fungi*, 1(3):32–37.
- Kagan-Zur, V., Taylor, F. W., & Roth-Bejerano, N. (2001). Identification of plant hosts of the Kalahari desert truffle *Terfezia pfeilii*. In : The Fifth International Congress, Science and Cultivation of Truffle. Aix-en-Provence, France (1999). Federation française des trufficulteurs, Paris, pp. 82–86.
- Kagan-Zur, V., Zaretsky, M., Sitrit, Y., & Roth-Bejerano, N. (2008). Hypogeous Pezizaceae: Physiology and molecular genetics. In : A. Varma (ed) Mycorrhiza. Springer-Verlag, Berlin, pp. 161–183.
- Khabar, L., Najim, L., Janex-Favre, M., & Parguey-Leduc, A. (2001). Contribution à l'étude de la flore mycologique du Maroc. les truffes marocaines (Discomycètes). *Bull Soc Mycol Fr*, 117(3):213–229.
- Klamer, M., Roberts, M. S., Levine, L. H., Drake, B. G., & Garland, J. L. (2002). Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated

- with terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol*, 68:4370–4376.
- Kottek, M., Gresier, J., Beck, C., Rudolf, B., & Rubel, F. (2006). World map of the Koeppen-Geiger classification updated. *Meteorol Z*, 15:259–263.
- Kovács, G. M., Jakucs, E., & Bagi, I. (2007). Identification of host plants and description of sclerotia of the truffle *Mattirolomyces terfezioides*. *Mycol Progs*, 6:19–26, doi: 10.1007/s11557-006-0520-y.
- Kovács, G., & Trappe, J. M. (2014). Nomenclatural history and genealogies of desert truffles. In : V. Kagana-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) *Desert truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. *Soil Biology*, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 21–37.
- Kües, U., & Liu, Y. (2000). Fruiting body production in Basidiomycetes. *Springer-Berlag Appl Microbiol Biotechnol*, 54:141–152.
- Læssøe, T., & Hansen, K. (2007). Truffle trouble: What happened to the Tuberales? *Mycol Res*, 111:1075–1099, doi: 10.1016/j.mycres.2007.08.004.
- Laurent, P. (1996). *Picoa carthusiana* Tulasne: Observation d'une espèce hypogée rare. *Documents mycologiques, Fascicule 103*.
- Le Floch, E., Boulos, L., & Véla, E. (2010). Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie. *Banque Nationale des Gènes, Tunisie*, 504 p.
- Léon l'Africain. (1830). *De l'Afrique. La description de ce pays*. Traduction de Jean Temporal. Paris, Tome 2.
- Loizides, M., Hobart, C., Konstandinides, G., & Yiangou, Y. (2011). Desert truffles: The mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology*, 13(1):17–21, doi: 10.1016/j.fldmyc.2011.12.004.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Presses Polytechnologiques et Universitaires Romandes, 1ère édition, 216 p.
- Maire, R. (1906). Contribution à l'étude de la flore mycologique de l'Afrique du Nord. *Bull Soc Bot France*, 53:180–215.
- Maire, R. (1952–1987). *Flore de l'Afrique du Nord*. Lechevalier, Paris, Vol I–XVI, 5559 p.

- Mandeel, Q. A., & Al-Laith, A. A. (2007). Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini people of the kingdom of Bahrain. *Journal of Ethnopharmacology*, 110:118–129.
- Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of mycological methods*, Elsevier, 71(1):7–14, doi: 10.1016/j.mimet.2007.06.016.
- Marx, D. H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59(2):153–163.
- Mathieu, C., & Lozet, J. (2011). *Dictionnaire encyclopédique de science du sol*. Lavoisier, 733 p.
- Mattila, P., Salo-Vaananen, P., Konko, K., Aro, H., & Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *J Agric Food Chem*, 50:6419–6422.
- Moreno, G., Alvarado, P., & Manjón, J. L. (2014). Hypogeous desert fungi. In : V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) *Desert truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Soil Biology, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 3–20.
- Moreno, G., Díez, J., & Manjón, J. L. (2000). *Picoa lefebvrei* and *Tirmania nivea*, two rare hypogeous fungi from Spain. *Mycol Res*, 104:378–381.
- Moreno, G., Díez, J., & Manjón, J. L. (2002). *Terfezia boudieri*, first records from Europe of a rare vernal hypogeous mycorrhizal fungus. *Persoonia*, 17(4):637–641.
- Moreno, G., Lizàrraga, M., Esqueda, M., Galàn, R., & Alvarado, P. (2012). New records of little known species of *Carbomyces* (Carbomycetaceae Ascomycota). *Mycotaxon*, 120:89–98, doi 10.5248/120.89.
- Moreno-Arroyo, B., Recio, J., Gomez, J., & Pulido, E. (2001). *Tuber oligospermum* from Morocco. *Mycologist*, 15(1):41–42.
- Morte, A., & Honrubia, M. (1994). Método para la micorrización *in vitro* de plantas micropropagadas de *Helianthemum* con *Terfezia claveryi*. Patent P9402430, Madrid.

- Morte, A., Honrubia, M., & Gutiérrez, A. (2008). Biotechnology and cultivation of desert truffles. In : A. Varma (ed) Mycorrhiza. Springer-Verlag, Berlin, pp. 467–483.
- Morte, A., Lovisolo, C., & Schubert, A. (2000). Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia claveryi*. Mycorrhiza, 10(3)/115–119.
- Morte, A., Zamora, M., Gutiérrez, A., & Honrubia, M. (2009). Desert truffle cultivation in semiarid Mediterranean areas. In : C. Azcon-Aguilar, J. M. Barea, S. Gianinazzi, & V. Gianinazzi-Pearson (eds) Mycorrhizas: Functional processes and ecological impact. Springer, New York, NY, pp. 221–233.
- Muller, J. L. (1995). Le genre *Picoa*. Récupéré sur http://www.societe-mycologique-du-haut-rhin.org/fichiers/Le_genre_Picoa_1995.pdf
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum, 15(3):473–497.
- Murcia, M. A., Martínez-Tomé, M., Jiménez, A., Vera, A., Honrubia, M., & Parras, P. (2002). Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): Losses during industrial processing. J Food Protect, 65:1614–1622.
- Murcia, M. A., Martínez-Tomé, M., Vera, A., Morte, A., Gutiérrez, A., Honrubia, M., & Jiménez, A. M. (2003). Effect of industrial processing on desert truffles *Terfezia claveryi* Chatin and *Picoa juniperi* Vittadini: Proximate composition and fatty acids. J Sci Food Agric, 83:535–541.
- Navarro-Ródenas, A., Barzana, G., Nicolas, E., Carra, A., Schubert, A., & Morte, A. (2013). Expression analysis of aquaporins from desert truffle mycorrhizal symbiosis reveals a fine tuned regulation under drought. Mol Plant Microbe Interac, 26(9):1068–1078, doi: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0178-R>.
- Navarro-Ródenas, A., Morte, A., & Pérez-Gilabert, M. (2009). Partial purification, characterization and histochemical localization of alkaline phosphatase from ascocarps of the edible desert truffle *Terfezia claveryi* Chatin. Plant Biol, 11(5):678–85, doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00172.x.
- Navarro-Ródenas, A., Pérez-Gilabert, M., Torrente, P., & Morte, A. (2012). The role of phosphorus in the ectendomycorrhiza continuum of desert truffle mycorrhizal plants. Mycorrhiza, 22:565–575, doi: 1007/s00572-012-0434-2.

- Norman, J. E., & Egger, K. N. (1999). Molecular phylogeny analysis of *Peziza* and related genera. *Mycologia*, 91:820–829.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N. S., & Trappe, J. M. (1997). Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89:48–65.
- Ozneda, P. (1991). Flore et végétation du sahara. SNRS, Paris, 3ème édition, 660 p.
- Patouillard, N. (1894a). Les terfés de la Tunisie. *J Bot (Morot)*, 8(8):153–156.
- Patouillard, N. (1894b). Les terfés de la Tunisie (2ème note). *J Bot (Morot)*, 8(10):181–182.
- Patouillard, N. (1899). Champignons du Nord de l'Afrique. *Bull Soc Mycol France*, 15:54–59.
- Percudani, R., Trevisi, A., Zambonelli, A., & Ottonello, S. (1999). Molecular phylogeny of truffles (Pezizales: Terfeziaceae, Tuberaceae) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Mol Phylogenet Evol*, 13:169–180, doi: 10.1006/mpev.1999.0638.
- Philips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Brit Mycol Soc*, 55:158–161.
- Pottier-Alapetite, G. (1979). Flore de la Tunisie, Angiosperme-Dicotylédones, Apétales-Dialypétales. Imprimerie officielle de la république tunisienne, 655 p.
- Quezel, P., & Santa, S. (1962–1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, Vol 1 (1962) & Vol 2 (1963), 1170 p.
- Read, D. J., & Armstrong, W. (1972). A relationship between oxygen transport and the formation of the ectotrophic mycorrhizal sheath in conifer seedlings. *New phytol*, 71:49–53.
- Riley, H. P. (1963). Families of flowering plants of southern Africa. University of Kentucky Press, Lexington, Xviii.
- Roth-Bejerano, N., Li, Y. F., & Kagan-Zur, V. (2004). Homocaryotic and heterocaryotic hyphae in *Terfezia*. *Kluwer Academic Publishers, Antonie Van Leeuwenhoek*, 85:165–168.
- Roth-Bejerano, N., Navarro-Ródenas, A., & Gutiérrez, A. (2014). Types of mycorrhizal association. In : V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, N. Sitrit, & A. Morte (eds) Desert

- truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication. Soil biology, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, pp. 69–80.
- Sahih Al Bukhari. The book of medicine, Chapter 20: *Al-Mann* heals eye diseases. English translation (1997) by Dr. Muhammad Muhsin Khan. Maktaba Dar us Salam, Vol 7, hadith: 5708.
- Sahih Muslim. Book 23: The book of drinks, Chapter 26: Excellence of truffles and their use as a medicine for eyes. English translation (2009) by Abd-al-Hamid Siddiqui. Mika'il al-Almany, Hadith: 5084–5089.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S., & Saxena, D. C. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, 41(3):387–394.
- Sawaya, W. N., Al-Shalhat, A., Al-Sogar, A., & Al-Mohammed, M. (1985). Chemical composition and nutritive value of truffles of Saudi Arabia. *J Food Sci*, 50:450–453.
- Sbissi, I., Neffati, M., Boudabous, A., Murat, C., & Gtari, M. (2010). Phylogenetic affiliation of the desert truffles *Picoa juniperi* and *Picoa lefebvrei*. *A Van Leeuw J Microb*, 98:429–436, doi: 10.1007/s10482-010-9456-y.
- Schützdendübel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-included oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53:1351–1365, doi: <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1351>.
- Shavit, E. (2008). Truffles roasting in the evening fires. Pages from the history of desert truffles. *Fungi*, 1(13):18–23.
- Shavit, E., & Shavit, E. (2014). The medicinal value of desert truffles. In : V. Kagan-Zur, N. Roth-Bejerano, Y. Sitrit, & A. Morte (eds) *Desert truffles: Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*. Soil Biology, Springer-Verlag, Berlin, Vol 38, PP. 323–332.
- Slama, A., Fortas, Z., Boudabous, A., & Neffati, M. (2010). Cultivation of an edible desert truffle (*Terfezia boudieri* Chatin). *Afr J Microbiol Res*, 2350–2356.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10:512–526.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725–2729.
- Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity distribution and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20:2017–63, doi: 10.1007/s00572-009-0274-x.
- Trappe, J. M. (1971). Synopsis of the Carbomycetaceae and Terfeziaceae (Tuberales). *Trans Br Mycol Soc*, 57:85–92.
- Trappe, J. M. (1990). Use of truffles and false truffles around the world. In : M. Benisevenga, & B. Granetti (eds) *Atti del secondo congresso internazionale sul tartufo*. Spoleto, Italy 1988. Com Mont Dei martini, italy Pub, pp. 19–30.
- Trappe, J. M., & Castellano, M. A. (1991). Keys of the genera of truffles (Ascomycetes). *Mcilvainea*, 10:45–65.
- Trappe, J. M., & Weber, N. S. (2001). Desert truffles: The genus *Carbomyces*. *Havard Papers in Botany*, 6:209–214.
- Trappe, J. M., Claridge, A. W., Arora, D., & Smit, W. A. (2008). Desert truffles of the African Kalahari: Ecology, ethnomycology and taxonomy. *Econ Bot*, 62:521–529.
- Trappe, J. M., Kovács, G. M., & Claridge, A. W. (2010). Comparative taxonomy of desert truffles of the Australian outback and the African Kalahari. *Mycol Progress*, 9:131–143.
- Tulasne, L-R., & Tulasne, C. (1845). De gen. Choiromyces et Picoa e Tuberacearum familia. *Ann Sci Nat, Sér 3*, 3:348–353.
- Tulasne, L-R., & Tulasne, C. (1851). *Fungi hypogæ: Histoire et monographie des champignons hypogés*. Apud Friedrich Klincksieck, Paris, 222 p. (+ planches).
- Turgeman, T., Ben-Asher, J., Roth-Bejerano, N., Kagan-Zur, V., Kapulnik, Y., & Sitrit, Y. (2011). Mycorrhizal association between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum* alters plant physiology and fitness to arid conditions. *Mycorrhiza*, 21:623–630, doi: 10.1007/s00572-011-0369-z.
- Vittadini, C. (1831). *Monographia Tuberacearum*. Milan, 88 p.
- Watson, A. (1992). Desert soils. In : I. P. martini, & W. Chesworth (eds) *Weathering soils and paleosoils*. Elsevier, Amsterdam, pp. 225–260.

- Wenkart, S., Roth-Bejerano, N., Mills, D., & Kagan-Zur, V. (2001). Mycorrhizal associations between *Tuber melanosporum* mycelia and transformed roots of *Cistus incanus*. *Plant Cell Rep*, 20:369–373.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (eds) *PCR protocols - A guide to methods and applications*. Academic press, San Diego, CA, pp. 315–322.
- Zitouni, F. E-H. (2010). Etude des conditions mycorrhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées. Thèse de Magister, Univ Oran, Algérie, 264 p.7.
- Zitouni, F. E-H., Fortas, Z., & Chevalier, G. (2014). Morphological characterization of mycorrhizae formed between three *Terfezia* species (desert truffles) and several Cistaceae and Aleppo pine. *Mycorrhiza*, 24(5):397–403, doi: 10.1007/s00572-013-0550-7.
- Zitouni-Haouar, F. E-H., Alvarado, P., Sbissi, I., Boudabous, A., Fortas, Z., Moreno, G., . . . Gtari, M. (2015). Contrasted genetic diversity, relevance of climate and host plants, and comments on the taxonomic problems of the genus *Picoa* (Pyronemataceae, Pezizales). *Plos One*, doi: 10.1371/journal.pone.0138513.
- الجامع الصحيح سنن الترمذي. الإمام محمد بن عيسى الترمذي، كتاب الطب عن رسول الله (ﷺ)، باب ما جاء في الكمأة والعجوة، حديث 2066–2069.
- صحيح البخاري. محمد بن إسماعيل أبو عبد الله البخاري الجعفي، كتاب الطب، باب المن شفاء للعين. حديث 5708 (5381) الناشر: دار طوق النجاة (مصورة عن السلطانية بإضافة ترقيم محمد فؤاد عبد الباقي)، الطبعة الأولى 1422 هجري.
- صحيح مسلم. الإمام مسلم بن حجاج. باب فضل الكمأة و مداواة العين بها، حديث 2049.

Sitographie

Site web 1: <http://atilf.atilf.fr/>

Site web 2: <http://www.trufamania.com/desert-truffles.htm>

Site web 3: <http://www.trufamania.com/Terfezia%20arenaria%20English.htm>

Site web 4: <http://www.trufamania.com/Terfezia%20boudieri%20English.htm>

Site web 5: <http://www.trufamania.com/Terfezia%20claveryi%20English.htm>

Site web 6: <http://www.fungipedia.org/hongos/terfezia-leptoderma.html>

Site web 7: <https://sites.google.com/site/hongoshipogeos/ascomycetes/terfezia-leptoderma-tul-1844>

Site web 8: <http://www.ambmuggia.it/forum/topic/5186-tirmania-nivea/>

Site web 9: <http://mushroomhobby.com/Gallery/Truffles/Tirmania%20pinoyi/>

Site web 10: <http://www.funghiitaliani.it/?showtopic=70958>

Site web 11: <http://www.ambmuggia.it/forum/topic/7340-picoa-carthusiana/>

Site web 12: <http://www.mycodb.fr/fiche.php?genre=Picoa&espece=carthusiana>

Site web 13: <http://ascofrance.fr/forum/7416/picoa-lefebvrei>

Site web 14: <http://www.ambmuggia.it/forum/topic/5448-picoa-lefebvrei/>

Site web 15: <http://www.trufamania.com/Tuber%20gennadii%20English.htm>

Site web 16: <http://www.trufamania.com/Tuber%20oligospermum%20English.htm>

Site web 17: http://www.smnf.fr/Photos_SMNF/Photos_SMNF_T/Tuber_oligospermum.htm

Site web 18: http://www.fungoceva.it/tav_tuber_oligospermum.htm

Site web 19: <https://sites.google.com/site/hongoshipogeos/basidiomycetes/descomyces-albus-berk-bougher-y-castellano-1993>

Site web 20: <https://sites.google.com/site/hongoshipogeos/basidiomycetes/hydangium-carneum-wallr-1839>

Site web 21: <https://sites.google.com/site/hongoshipogeos/basidiomycetes/hymenogaster-luteus-vittad-1831>

Site web 22: <http://manitarilesvos.blogspot.com/2013/03/1-hysterangium-cistophilum.html>

Site web 23:
http://static.intellego.fr/uploads/1/1/1/163/media/dijon%20schemas/600_mycorhyzes.gif

Site web 24: <https://sites.google.com/site/hongoshipogeos/ascomycetes/balsamia-vulgaris-vittad-1831>

Site web 25: <https://sites.google.com/site/hongoshipogeos/ascomycetes/choiromyces-meandriformis-vittad-1831>

Site web 26: <http://www.who.int/blindness/causes/priority/fr/index2.html>

Site web 27: <http://www.maphill.com/algeria/el-tarf/maps/satellite-map/>

Site web 28: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/>

Site web 29: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20FR/Module%2006.pdf>

Site web 30: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

(Sites web parcourus le 15 Juin 2017, sauf 7 & 17 : dernière connexion 2016)