



**HAL**  
open science

# Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) par *Laccaria* *laccata* souche S238

Robin Duponnois

► **To cite this version:**

Robin Duponnois. Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) par *Laccaria laccata* souche S238. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1992. Français. NNT : 1992NAN10023 . tel-01748135

**HAL Id: tel-01748135**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748135>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Nancy 1  
U.F.R. - S.T.B.  
G.F.D. Sciences du bois,  
Biologie végétale et forestière



CENTRE  
DE RECHERCHES FORESTIÈRES  
NANCY-AMANCE  
CHAMPENOUX 54280 SEICHAMPS (FRANCE)



ABRÉVIATION DE L'INRA : I.N.R.A. (Institut National de la Recherche Agronomique)  
NANCY - AMANCE  
CHAMPENOUX 54280 SEICHAMPS (FRANCE)

THESE

présentée à l'Université de Nancy 1  
pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Nancy 1

en Biologie forestière par

Duponnois Robin



Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas  
(*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)  
par *Laccaria laccata* souche S238

Soutenue publiquement le 14 février 1992

devant la Commission d'Examen:

MM	J. DEXHEIMER, Professeur à l'Université de Nancy 1	Président
	R. BARDIN, Professeur à l'Université Claude Bernard, Lyon	Rapporteur
	B. BOTTON, Professeur à l'Université de Nancy 1	Rapporteur
Mme	G. DEFAGO, Professeur à l'Institut Polytechnique de Zurich	Examineur
MM	F. LE TACON, Directeur de Recherches à l'INRA de Nancy	Examineur
	J. GARBAYE, Directeur de Recherches à l'INRA de Nancy	Examineur
Mme	P. GADILLE, Société BIOCEM	Membre invité

## Avant-propos

Ce mémoire est l'aboutissement de huit années d'études supérieures. *A posteriori* je peux distinguer deux phases: une phase finale (rédaction, correction des travaux et soutenance de la thèse) et tout le chemin qui m'a permis d'y arriver.

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Microbiologie Forestières de l'INRA Nancy et de la société BIOCEM (Groupe Limagrain) à Angers. J'exprime dans un premier temps toute ma reconnaissance et ma gratitude aux personnes étrangères à ces deux laboratoires qui ont accepté de juger ce travail:

Monsieur DEXHEIMER, professeur à l'Université de Nancy 1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse

Monsieur BOTTON, professeur à l'Université de Nancy 1, qui, après avoir examiné mon DEA, a une nouvelle fois accepté de juger mon travail

Je remercie Monsieur BARDIN, professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon, d'avoir accepté de faire partie de ce jury

J'apprécie aussi beaucoup la présence dans ce jury de thèse de Madame DEFAGO, professeur à l'Institut Polytechnique de Zurich.

Quatre facteurs principaux doivent être réunis pour conduire dans de bonnes conditions cette étude: les **idées**, l'**assistance technique**, le **soutien moral** dans les moments difficiles et l'**argent**.

Je remercie tout particulièrement Madame CANDELA qui dirige le laboratoire BIOCEM d'Angers. Elle a pris le risque de financer ces travaux et de nous faire confiance à une époque où les gens qui croyaient aux BAM se comptaient sur les doigts d'une main. Cet investissement du groupe Limagrain qui m'a employé en tant qu'ingénieur de recherches, et de l'INRA, a été décisive.

Il ne suffit pas de monter des expériences et de mesurer différents paramètres, il faut encore pouvoir les analyser et discerner les résultats les plus intéressants. Ceci nécessite un entourage scientifique de première qualité. J'ai eu la chance de pouvoir

bénéficiaire de telles conditions ; je pense plus particulièrement à F. LAPEYRIE, F. MARTIN et D. TAGUÉ, chercheurs du laboratoire de microbiologie forestière de l'INRA Nancy et à P. GADILLE (qui m'a fait l'honneur de faire partie du jury) et P. TALPE du laboratoire BIOCEM. Je leur dois beaucoup pour leur patience et tous les conseils qu'ils m'ont prodigués.

Lorsque la passion nous habite, nous avons tendance à imaginer de multiples protocoles. Leur écriture va demander quelques heures ou quelques jours mais nous avons tendance à minimiser les problèmes techniques liés à la réalisation de ces expériences. Il faut alors bénéficier d'un personnel, techniquement compétent, très ingénieux, adepte du "système D" et très diplomate. Ainsi, je tiens à remercier Messieurs D. BOUCHARD et J.L. CHURIN qui m'ont aidé dans toutes ces expériences de serre et de pépinières et qui, plus que des collègues de travail, sont devenus des amis. Ils ont su faire preuve de beaucoup de patience (étonnante pour l'un des deux, il se reconnaîtra!) face à ma tendance à en faire toujours plus et m'ont fait connaître et apprécier les travaux de terrain. Sans leur aide, une grande partie de cette étude n'aurait pu être réalisée. Je n'oublierai pas non plus d'associer D. VAIRELLES, pour sa disponibilité constante, ses qualités de photographe et tous les services qu'elle a pu me rendre.

L'ambiance dans le laboratoire constitue aussi un facteur de réussite non négligeable, pouvoir rire en travaillant procure un plaisir incalculable. Je remercie ainsi toutes les personnes qui m'ont donné ces joies et tout particulièrement: Mae, Fabienne, Thierry, Sophie, Eric, Dulcinéa, Isabelle, Valérie, Elna et Pascal.

Je remercie aussi Mlle C. BAGNARD, maître de conférences à l'Université de Dijon, qui a suivi avec intérêt l'évolution de mon travail et m'a toujours fait part de ses suggestions au cours de nos multiples rencontres. Je n'oublierai pas aussi ses conseils lorsque j'étais étudiant de deuxième cycle et son aide dans les moments difficiles que j'ai pu rencontrer dans ma première année de thèse.

Enfin, le meilleur étant toujours pour la fin, tout ceci n'aurait jamais pu être réalisé sans la présence de Messieurs J. GARBAYE et F. LE TACON. Les mots ne seront jamais assez forts pour exprimer ma reconnaissance et ma fierté de les avoir dans mon jury de thèse.

Après tout ce que j'ai écrit, il est évident que je ne considère pas cette thèse comme ma réalisation mais comme le résultat de différentes collaborations et d'un travail d'équipe.

## Sommaire

	Pages
Avant propos	1
Introduction générale	4
Présentation du modèle symbiotique étudié: Douglas/ <i>Laccaria laccata</i> S238	23
<b>1ère PARTIE: Mise en évidence du rôle des bactéries associées</b>	<b>28</b>
A/ Etude de l'effet des souches bactériennes sur la mycorhization du Douglas par <i>Laccaria laccata</i> S238	29
1/ Isolement des bactéries à partir des mycorhizes de Douglas/ <i>Laccaria laccata</i> S238 ou de carpophores de <i>Laccaria laccata</i> S238	29
B/ Tests de confrontation <i>in vitro</i> entre les bactéries rhizosphériques et le champignon ectomycorhizien <i>Laccaria laccata</i> S238	39
1/ Etablissement d'une hypothèse de travail permettant un criblage <i>a priori</i> parmi les souches bactériennes isolées	39
2/ Test de confrontation <i>in vitro</i> entre les bactéries et le champignon <i>Laccaria laccata</i> S238	41
C/. Mise en évidence de l'action des bactéries associées sur la mycorhization du Douglas par <i>Laccaria laccata</i> S238 en serre et en conditions axéniques	49
1/ Confrontation bactérie-champignon-plante hôte en serre, dans des conditions non axéniques, en période estivale (Expérience 1)	49

2/ Confrontation bactérie-champignon-plante hôte en serre chaude, dans des conditions non axéniques, en période hivernale (Expérience 2)	55
3/ Confrontation bactérie-champignon-plante hôte en serre non climatisée en période hivernale (Expérience 3)	59
4/ Confrontation bactérie-champignon-plante hôte en conditions axéniques (Expérience 4)	61
D/ Localisation des bactéries dans les mycorhizes du Douglas/ <i>Laccaria laccata</i> S238 en microscopie électronique à transmission (Expérience 5)	68
E/ Caractérisation de certaines bactéries auxiliaires de la mycorhization (Expérience 6)	73
F/ Conclusion de la première partie	79
<b>2ème PARTIE: Sélectivité des bactéries associées</b>	<b>83</b>
A/ Mise en évidence de la sélectivité des BAM sur l'infection du Douglas par différents champignons ectomycorhiziens	84
1/ Effet des BAM sur la mycorhization du Douglas par un champignon ectomycorhizien contaminant: <i>Thelephora terrestris</i> (Expérience 7)	84
2/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par deux champignons ectomycorhiziens <i>Laccaria laccata</i> S238 et <i>Thelephora terrestris</i> dans des conditions de serre (Expérience 8)	85
3/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par différentes souches fongiques de <i>Laccaria bicolor</i> dans des conditions de serre (Expérience 9)	87

4/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par différents champignons ectomycorhiziens en pépinière (Expérience 10)	94
5/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par différents champignons ectomycorhiziens en conditions axéniques (Expérience 11)	97
B/ Mise en évidence de l'absence de sélectivité des BAM sur l'infection de différentes plantes hôtes par <i>Laccaria laccata</i> S238	105
1/ Effet des BAM sur la mycorhization du chêne pédonculé ( <i>Quercus robur</i> ) par <i>Laccaria laccata</i> S238 en pépinière (Expérience 12)	105
2/ Effet des BAM sur la mycorhization de quatre conifères par <i>Laccaria laccata</i> S238 en serre (Expérience 13)	109
<b>3ème PARTIE: Etude des mécanismes d'action des Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization</b>	115
A/ Exposition du problème et des différentes hypothèses de travail	116
B/ Etude de la voie n°1: etude des mécanismes d'action des BAM sur la croissance des champignons ectomycorhiziens	119
1/ Confrontation des bactéries avec différents champignons ectomycorhiziens en conditions axéniques (Expériences 14 et 15)	119
2/ Interactions bactéries-champignons ectomycorhiziens en milieu aqueux dans le cas d'une stimulation bactérienne de la croissance fongique (Expériences 16, 17, 18 et 19)	123
3/ Interactions bactéries-champignons ectomycorhiziens en milieu aqueux dans le cas d'une inhibition bactérienne de la croissance fongique (Expérience 20)	133



4/ Interactions bactéries-champignons ectomycorhiziens en milieu gazeux (Expérience 21, 22, 23 , 24 et 25)	134
132	
C/ Etude de la voie n°2: action des BAM sur la plante seule	142
1/ Effet <i>in vitro</i> des bactéries sur l'élongation de la racine principale (Expérience 26)	142
2/ Effet de la production d'AIA par les bactéries (Expérience 27)	145
3/ Effet des bactéries <i>in vitro</i> sur substrat tourbe-vermiculite en conditions non axéniques et en chambre de culture (Expérience 28)	146
4/ Effet des bactéries sur substrat tourbe-vermiculite en conditions non axéniques en chambre de culture (Expérience 29)	148
5/ Effet des bactéries sur substrat tourbe-vermiculite en conditions non axéniques en serre (Expérience 30)	150
6/ Effet des bactéries sur la croissance du Douglas	150
7/ Solubilisation des phosphates peu solubles par les bactéries (Expérience 31)	154
8/ Activités enzymatiques des bactéries (Expérience 32)	155
D/ Comparaison de l'importance des voies 1 et 2 dans les stimulations de l'infection ectomycorhizienne obtenues avec les BAM	163
1/ Effet des BAM sur le taux de mycorhization en fonction du nombre de racines courtes mycorhizées ou non par <i>Laccaria laccata</i> S238	163
2/ Effet des BAM sur la croissance des semis de Douglas	164
E/ Conclusion de la 3ème partie	171

4ème PARTIE: Application des propriétés des BAM à la mycorhization contrôlée en pépinière forestière	175
A/ Introduction des BAM dans les techniques classiques de mycorhization contrôlée avec désinfection du sol	176
1/ Effet de la quantité de bactéries inoculées sur la mycorhization du Douglas par <i>Laccaria laccata</i> S238 (Expérience 33)	176
2/ Effet des bactéries (sur la mycorhization) avec l'inoculum fongique sous forme de billes d'alginate de calcium (Expérience 34)	177
3/ Effet des bactéries incluses dans des billes d'alginate en même temps que le champignon <i>Laccaria laccata</i> S238 (Expérience 35)	183
4/ Effet des bactéries incluses dans des billes d'alginate avec le champignon <i>Laccaria laccata</i> S238 en faisant varier la quantité d'inoculum (Expérience 36)	189
5/ Comparaison de 2 formulations d'inocula mixtes avec BBc6 (Expérience 37)	192
6/ Optimisation de l'inoculum mixte et conclusion de la section A/ (Expériences 38 et 39)	194
B/ Utilisation des BAM comme une alternative à la désinfection du sol	201
1/ Inoculation champignon + BAM en serre sur le sol de Peyrat le Château non désinfecté (Expérience 40)	201
2/ Inoculation champignon + BAM (inclus ensemble dans l'alginate) en serre avec le sol de Peyrat le Château non désinfecté (Expérience 41)	204
3/ Inoculation du champignon et des BAM en pépinière sans désinfection du sol (Expérience 42)	209
C/ Conclusion de la 4ème Partie	210

Conclusion et discussion générale

217

Bibliographie

225

Celui qui ne peut plus éprouver ni étonnement ni surprise est pour ainsi dire mort ; ses yeux sont éteints

A. EINSTEIN, *Comment je vois le monde* .

*Cette thèse est dédiée à mes parents, mon frère , ma soeur et ma grand mère*

Introduction

## INTRODUCTION GENERALE

### Les interactions biologiques dans la rhizosphère

La croissance et le développement des plantes sont conditionnés par de multiples facteurs écologiques (biotiques et abiotiques). Dans un écosystème donné, il s'établit un équilibre entre ces différentes interactions plante-environnement. Nous nous intéresserons uniquement à la composante sol du milieu.

La rhizosphère est le volume de sol conditionné par l'activité biologique des racines (Hiltner, 1904 ; Bowen, 1980). Elle a été divisée en deux parties: le rhizoplan, fraction du sol directement en contact avec la surface racinaire, et la rhizosphère proprement dite qui est la fraction du sol immédiatement environnante (Clark, 1949). La figure 1 schématise l'influence des racines sur ce compartiment du sol (Rovira, 1985 ; Linderman, 1988).

L'activité racinaire est révélée en particulier par une augmentation significative de l'activité microbienne dans la rhizosphère, qui peut être considérée comme un écosystème particulier où différentes populations de microorganismes sont en équilibre avec les facteurs physico-chimiques du milieu.

Cet "effet rhizosphère" (Katznelson *et al*, 1962) est un processus dynamique entretenu par l'exsudation et la sécrétion de composés organiques par la racine. Il est influencé par différents facteurs:

- Facteurs plante: espèce, âge, stade de développement,
- Facteurs sol: éléments minéraux, humidité, propriétés physiques,
- Conditions climatiques: lumière, température,
- Pratiques culturales: applications d'herbicides, fongicides, etc,
- Interactions microbiennes du sol. Ce dernier facteur sera plus particulièrement développé.

La rhizosphère diffère du sol par plusieurs facteurs. Le pH y est souvent moins élevé que dans le sol du fait de l'extrusion de protons lors de l'absorption de cations et de la production par la racine d'acides organiques. La pression partielle d'oxygène y est plus faible alors que la pression partielle de CO<sub>2</sub> est plus forte du fait de la respiration racinaire et microbienne.

Mais surtout, la concentration de composés carbonés simples est plus élevée à proximité de la racine. Ces composés peuvent être des sucres, acides aminés, acides organiques, etc (Slankis *et al*, 1964). Ils sont issus de l'exsudation racinaire et vont être utilisés comme sources énergétiques par différents microorganismes (Smith, 1969). Ceci

Fig.1: racine courte non-mycorhizée avec les différentes sources de nutriments pour les microorganismes rhizosphériques (d'après Linderman, 1988)

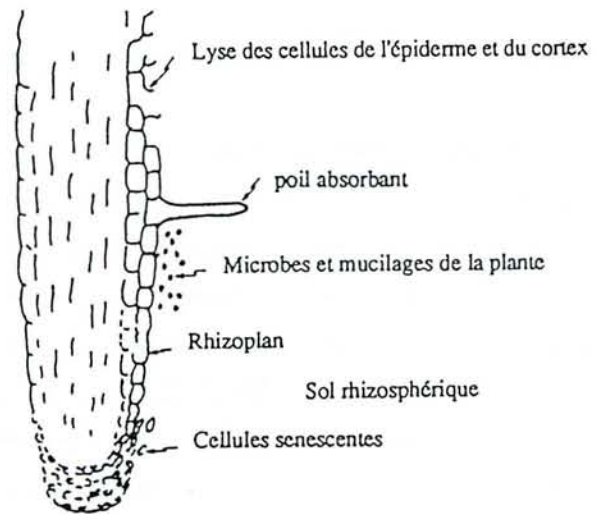


Fig.2: Modifications morphologiques d'une racine courte endomycorhizée (d'après Linderman, 1988)

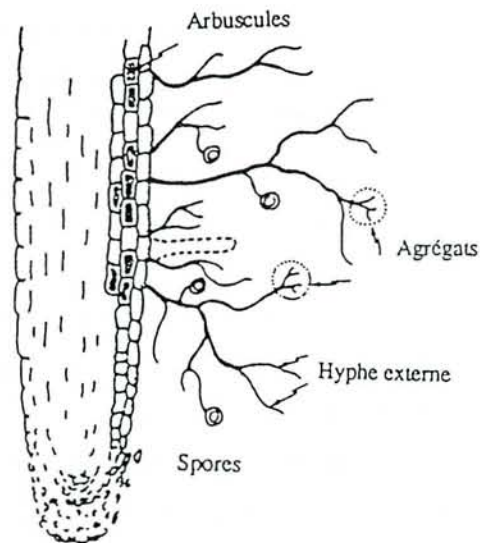
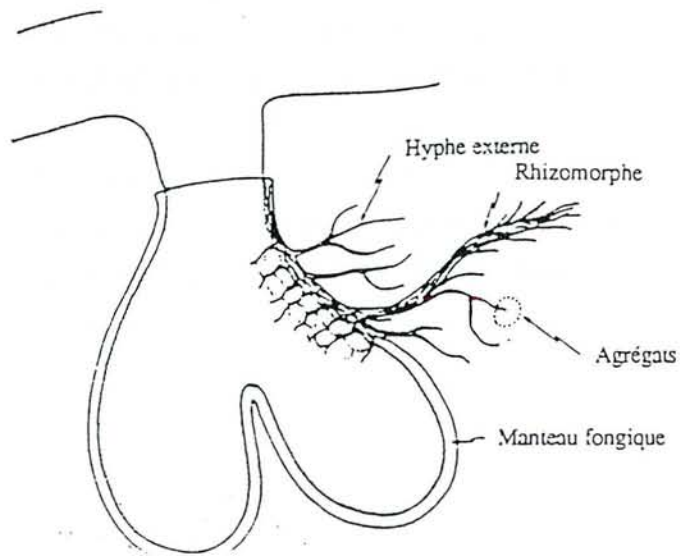


Fig.3: Modifications morphologiques d'une racine courte ectomycorhizée (d'après Linderman, 1988)



explique l'augmentation du nombre de microorganismes par gramme de sol dans la rhizosphère par rapport au sol non rhizosphérique (Katznelson, 1965 ; Rovira, 1965a,b ; Garbaye, 1991).

*Ainsi des processus dynamiques entretiennent "l'effet rhizosphère" (Katznelson, 1965 ; Bowen, 1980). Les interactions entre différents microorganismes y sont importantes. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes plus particulièrement orientés vers les interactions existant entre les champignons ectomycorhiziens, la plante et d'autres microorganismes rhizosphériques.*

La symbiose mycorhizienne est un phénomène général chez la plupart des végétaux terrestres (Harley & Harley, 1991). Une mycorhize est un organe complexe, résultant de l'association intime d'une racine et d'un champignon qui réalisent ensemble une symbiose vraie, mutualiste, une eusymbiose (Dommergues & Mangenot, 1970).

Deux principaux types de mycorhizes peuvent être distingués par des critères morphologiques: les endomycorhizes et les ectomycorhizes. Une structure intermédiaire est décrite sous le nom d'ectendomycorhize.

### Les endomycorhizes

Les endomycorhizes concernent 90% des plantes vasculaires. Ce type de symbiose entraîne peu de modifications dans la morphologie racinaire. Généralement, les poils absorbants sont moins nombreux et des hyphes sont présentes à la surface des racines et colonisent le sol environnant. L'observation microscopique montre que les hyphes pénètrent les cellules corticales de la racine mais n'atteignent jamais le cylindre central.

Plusieurs types morphologiquement différents sont classiquement distingués de la façon suivante (Richards, 1987): mycorhizes à vésicules et à arbuscules (MVA), mycorhizes arbutoïdes, mycorhizes monotropoïdes, mycorhizes éricoïdes, mycorhizes des orchidées.

Les mycorhizes à vésicules et à arbuscules (MVA) sont les plus abondantes. Les vésicules et arbuscules sont les deux types d'organes rencontrés dans les tissus végétaux infectés par le champignon (Fig 2). Les MVA sont rencontrées dans pratiquement tous les groupes taxonomiques de plantes en particulier chez plusieurs familles d'angiospermes économiquement importantes comme la famille des Fabaceae, Rosaceae et Poaceae.



Les champignons qui forment ce type de symbiose sont des champignons zygomycètes inférieurs (Ex: *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* et *Sclerocystis*).

### Les ectomycorhizes

Les ectomycorhizes concernent 5% des plantes vasculaires. Elles se rencontrent chez de nombreuses espèces forestières. L'infection ectomycorhizienne s'établit entre le champignon et l'arbre au niveau des racines courtes nourricières. Les ectomycorhizes sont formées par de nombreuses espèces de champignons basidiomycètes et ascomycètes supérieurs et cette symbiose est réalisée en particulier avec des arbres des familles des Pinaceae, Betulaceae, Fagaceae, Salicaceae et Myrtaceae (Linderman, 1988). Ce type de symbiose entraîne d'importantes modifications dans la morphologie racinaire (Figure 3): les poils absorbants disparaissent ; un manteau fongique engaine la racine et des hyphes la pénètrent en s'insinuant entre les cellules corticales pour former le réseau de Hartig ; à partir de ce manteau fongique, des hyphes et des cordons prolifèrent pour coloniser le milieu environnant.

La symbiose ectomycorhizienne améliore la nutrition minérale de la plante hôte grâce à l'augmentation du volume de sol prospecté par les hyphes extramatricielles et la production de divers composés (Ex: enzymes solubilisant les formes de P peu solubles, Lapeyrie *et al*, 1987, 1991). Cet effet positif est particulièrement marqué pour les éléments peu mobiles comme le phosphore, le zinc et le cuivre mais aussi pour les ions plus mobiles comme le S, Ca, K, Fe, Mg, Mn, Cl, Br et l'azote (Mosse, 1973 ; Tinker, 1984). De plus les champignons mycorhiziens peuvent réduire les effets de différents stress que peut subir la plante (Dehne, 1982 ; Chakravarty & Hwang, 1991). En contre partie, la plante hôte apporte des éléments carbonés au champignon (Le Tacon *et al*, 1991).

En conséquence, la physiologie des plantes, lorsqu'elles sont mycorhizées, est significativement modifiée. Par exemple, il y a des changements dans la concentration interne des régulateurs de croissance comme les auxines, cytokinines, gibbérellines et l'éthylène (Linderman & Paulitz, 1990). L'activité photosynthétique augmente et la répartition des photosynthétats entre les racines et les parties aériennes est remaniée. La symbiose mycorhizienne améliore la nutrition minérale de la plante, ce qui affecte la composition de ses tissus. Ceci peut entraîner des modifications structurales et biochimiques des cellules racinaires et en conséquence des changements de la perméabilité membranaire. La résultante de ces phénomènes sera la modification qualitative et quantitative des exsudats racinaires.

*Ainsi, ces relations symbiotiques induisent indirectement par des modifications de la physiologie et/ou de la morphologie racinaire, un nouvel équilibre microbien dans la rhizosphère (Linderman, 1988). De ce fait, Rambelli (1973) a employé le terme "mycorhizosphère" pour décrire la portion de sol influencée par les mycorhizes.*

Les hyphes extramatriciels issus des mycorhizes ont aussi un effet important sur le sol (Linderman, 1988 ; Abbott *et al*, 1991). De ce fait, Gilbert et Linderman (1971) ont introduit le terme "mycosphère" afin de décrire les phénomènes existant au niveau du sol conditionné par l'activité biologique des hyphes fongiques.

Dans cette introduction, nous nous intéresserons donc plus particulièrement aux événements pouvant se dérouler au sein de la rhizosphère ou de la mycorhizosphère et ceci suivant plusieurs points:

- ↳ les différents types fonctionnels de microorganismes constituant la communauté microbienne de la mycorhizosphère
- ↳ les relations de compétition entre ces différents microorganismes
- ↳ les relations synergiques entre les champignons mycorhiziens et différentes catégories de microorganismes mycorhizosphériques. Dans cette partie, des exemples montrant l'intérêt pour la plante de ce type d'interactions seront développés plus précisément.

#### ↳ *La communauté microbienne de la mycorhizosphère*

Cette communauté rassemble un grand nombre de types microbiens qui appartiennent à des groupes taxonomiques très variés (bactéries, champignons, protozoaires, animaux). L'ensemble des populations mycorhizosphériques peut se diviser en 5 groupes principaux (Garbaye, 1991):

##### - Les microorganismes strictement saprophytiques:

Ces organismes peuvent croître en utilisant de nombreux composés organiques complexes qui sont des lignines, protéines, des glycoprotéines, la cellulose ou d'autres polysaccharides. Etant donnée leur capacité à survivre à partir de cette large gamme de composés chimiques, ils ne sont pas spécifiques de la mycorhizosphère. Pourtant, ils sont plus nombreux dans la zone conditionnée par l'activité biologique de la racine (exsudation et sécrétion racinaire, cellules senescentes, corps microbiens morts, etc). Ce

type de microorganismes n'entre pas en compétition avec d'autres qui dépendent plus étroitement des caractéristiques de l'environnement rhizosphérique. Cependant, certains organismes saprophytiques peuvent coloniser rapidement la rhizosphère et produire des antibiotiques pouvant en éliminer d'autres (Ex: *Trichoderma* sp., bactéries: Shemakhanova, 1962 ; Bowen & Theodorou, 1979 ; Summerbell, 1987 ; De Oliveira, 1988).

#### - Les microorganismes rhizo/mycorrhizosphériques

Ces microbes ne possèdent pas les enzymes qui leur permettraient de croître à partir de composés organiques complexes et sont ainsi étroitement dépendants de métabolites simples produits par la racine (sucres, acides aminés, acides organiques, vitamines). Ils ne peuvent se multiplier significativement dans le sol non rhizosphérique à cause de la rareté de ces molécules. Le phénomène de compétition entre les microorganismes appartenant à ce groupe est très important lors de la colonisation racinaire. Divers types se rencontrent: des champignons, mais surtout des bactéries appelées "rhizobactéries". Ce terme regroupe plusieurs genres bactériens comme les pseudomonas, les bacilles, les bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques (*Azospirillum*). Certaines d'entre elles, comme des pseudomonas, ont la capacité de stimuler la croissance des plantes et sont regroupées sous le nom de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Le schéma de la figure 4 emprunté à Linderman & Paulitz (1990) résume bien la situation.

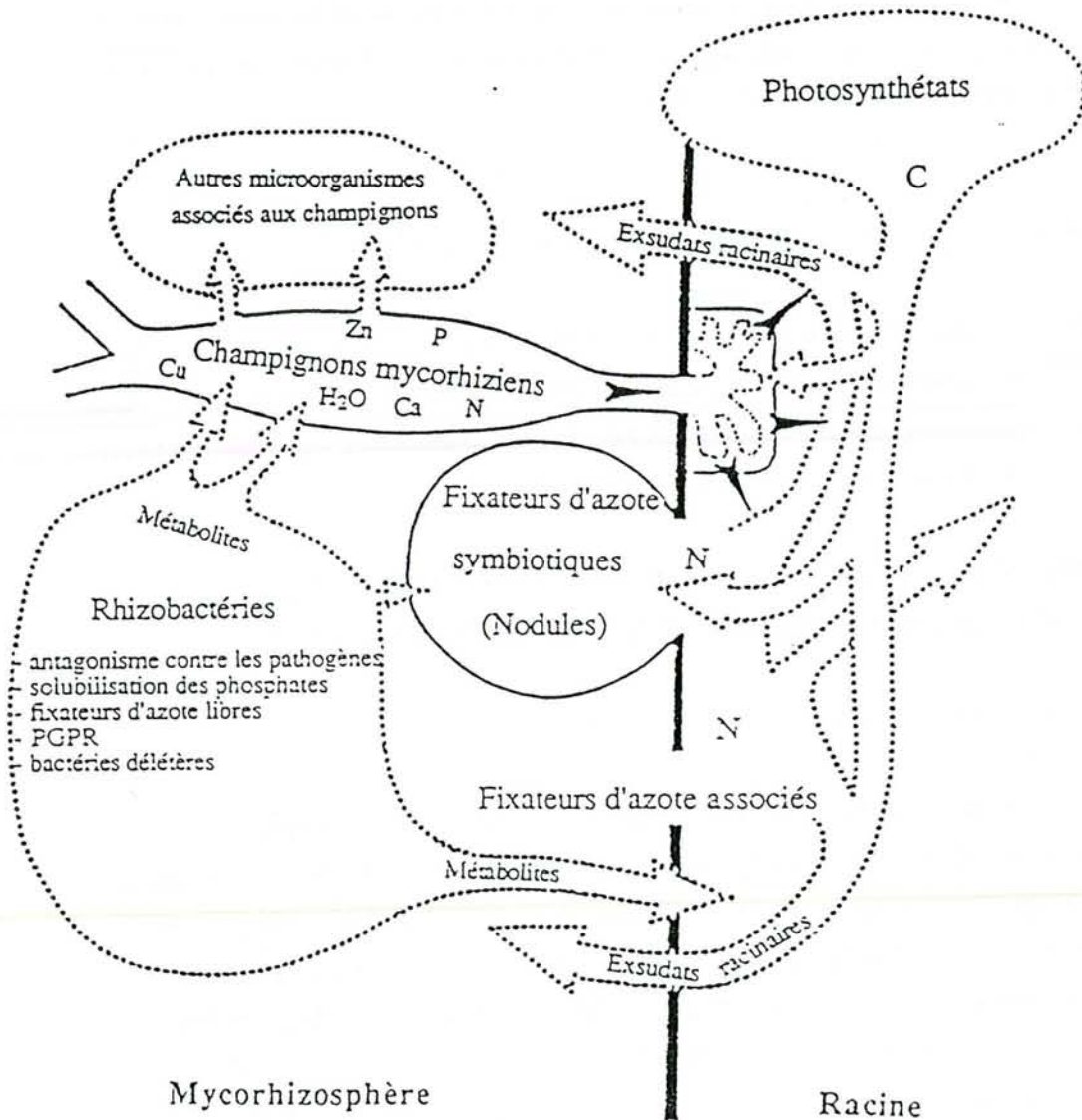
#### - Les microorganismes pathogènes de la racine

Ce type de microorganismes possède un cycle biologique divisé en deux parties: une phase se déroule en dehors de la racine et l'autre dans la racine, après leur pénétration dans les tissus racinaires. Les principaux dommages au niveau de la racine que provoquent ces pathogènes sont une altération des fonctions d'absorption et du métabolisme général de la plante. Ces organismes entrent en compétition pour les nutriments avec les autres composantes microbiennes de la rhizosphère. Ce groupe est composé par des bactéries mais surtout par des champignons comme les *Phytium* sp., les *Fusarium* sp., les *Rhizoctonia* sp. et les *Phytophthora* qui ont une importance majeure en agriculture.

#### - Les microorganismes symbiotiques

Ces microorganismes sont étroitement liés à la plante car ils ne peuvent utiliser pour leur croissance que les composés carbonés simples. Ils ont un intérêt pour la plante en améliorant en particulier leur nutrition minérale. Une phase de croissance saprophytique (d'où un phénomène de compétition avec les autres composantes

Fig.4: schéma représentant les possibles interactions entre les champignons mycorhiziens et les rhizobactéries (d'après Linderman & Paulitz, 1990)



microbiennes de la mycorrhizosphère), généralement très courte, est suivie d'une phase symbiotique entre le microorganisme considéré et la plante. Ces symbiotes peuvent améliorer la nutrition azotée de la plante en fixant l'azote atmosphérique (*Rhizobium* sp. et *Frankia* sp.) D'autres types de microorganismes symbiotiques améliorent la nutrition minérale de la plante hôte, en particulier la nutrition phosphatée (les champignons endo et ectomycorhiziens).

#### - Les prédateurs

Les organismes appartenant à ce groupe (protozoaires, nematodes, collemboles, larves d'insecte, etc) se nourrissent des organismes microbiens rhizosphériques et réduisent ainsi leurs populations. Il a été montré que des amibes consomment des spores de *Rhizopogon luteolus* dans la rhizosphère de *Pinus radiata* et réduisent ainsi l'infection ectomycorhizienne (Chakraborty *et al* , 1985).

#### ☞ *Les phénomènes de compétition dans la mycorrhizosphère (Fig.5)*

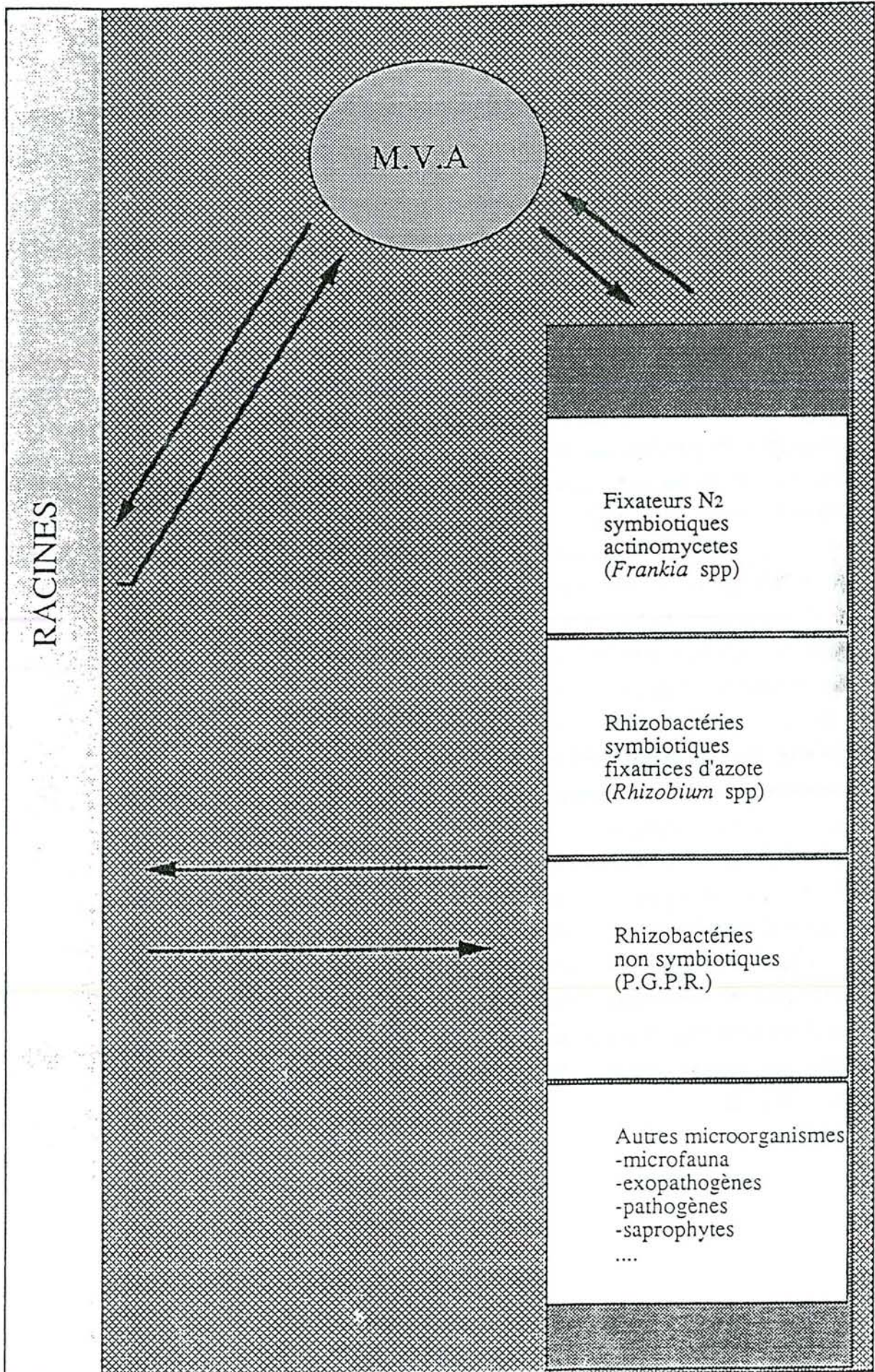
Plusieurs types d'interactions seront évoqués: compétitions microorganismes rhizo/mycorrhizosphériques / champignons mycorhiziens aboutissant à une inhibition de la symbiose mycorhizienne, compétitions pathogènes / champignons mycorhiziens et enfin compétitions entre différents champignons mycorhiziens.

#### - Interactions entre les champignons mycorhiziens et des microorganismes mycorrhizosphériques aboutissant à une inhibition de la symbiose mycorhizienne

##### - *Endomycorhizes à Vésicules et à Arbuscules.*

De nombreux microorganismes peuvent inhiber différentes étapes du développement des champignons endomycorhiziens (Wilson *et al*, 1988). Il a été montré que les spores de champignons endomycorhiziens ont leur germination affectée par une microflore inhibitrice (Tommerup, 1983, 1985). Dans certains cas, la production de spores par le champignon est inhibée par la microflore tellurique (Ross, 1980). Une inhibition de la colonisation racinaire par les champignons V.A., due à des microorganismes du sol, peut entraîner une moindre croissance de certaines plantes herbacées (Hetrick *et al*, 1990).

Fig.5: interactions entre la plante hôte, le champignon endomycorhizien et différents microorganismes dans la mycorrhizosphère (d'après Le Tacon *et al*, 1991)



- *Ectomycorhizes*

L'inhibition peut être effective au niveau du rhizoplan lors de la phase saprophytique du champignon au cours de la colonisation racinaire. Bowen et Theodorou (1979) ont montré que certaines souches bactériennes avaient un effet dépressif sur la croissance de *Rhizopogon luteolus* à la surface des racines longues de plantules de *Pinus radiata*. Garbaye et Bowen (1987) ont mis en évidence l'effet dépressif d'une microflore rhizosphérique sur l'infection ectomycorhizienne de *Pinus radiata* par *Paxillus involutus*. Ces mêmes auteurs ont testé l'effet de microorganismes isolés du manteau d'ectomycorhizes sur 3 paramètres préliminaires à l'infection ectomycorhizienne en conditions axéniques et non axéniques: la croissance fongique dans le sol à partir de propagules, la colonisation racinaire par le champignon et enfin l'infection ectomycorhizienne proprement dite. Un effet inhibiteur a été observé en conditions non axéniques avec un *Pseudomonas* fluorescent sur les 3 paramètres précédemment cités. Lorsque ces tests ont été effectués en conditions axéniques, aucun effet inhibiteur des souches bactériennes n'a été observé. Les isolats bactériens, individuellement inactifs, ont donc interagi avec certains composants microbiens pour inhiber les différentes étapes de la mycorhization. De Oliveira (1988) a testé des souches bactériennes isolées du sol sur ces 3 paramètres avec 2 champignons ectomycorhiziens (*Paxillus involutus* et *Hebeloma crustuliniforme*) symbiotes du hêtre. Des inhibitions de la croissance fongique par les bactéries ont été observées. Une inhibition de la mycorhization du hêtre avec *Hebeloma crustuliniforme* a été induite par une souche bactérienne. D'autres exemples d'inhibition de la mycorhization par des microorganismes rhizosphériques peuvent être cités. Les catégories d'organismes microbiens qui sont le plus souvent rencontrées dans ce type de phénomène sont des bactéries (Shemakhanova, 1962 ; Bowen & Theodorou, 1979) ou des champignons comme *Trichoderma* sp. (Summerbell, 1989). Les mécanismes régissant ces antagonismes bactéries-champignons ectomycorhiziens sont peu connus. Une explication peut être la production par les bactéries de substances toxiques pour le champignon (Brian *et al*, 1945) ou un phénomène de compétition pour les nutriments présents dans la rhizosphère et qui sont indispensables aux bactéries et aux champignons ectomycorhiziens, tout du moins dans les premiers stades de l'infection ectomycorhizienne.

### - Interactions entre des organismes pathogènes et les champignons mycorhiziens

De nombreuses études ont été entreprises pour démontrer l'influence de la symbiose mycorhizienne sur les pathogènes racinaires du fait de l'intérêt pratique dans la lutte biologique contre ces maladies en agriculture.

#### - *Les endomycorhizes*

L'expression du champignon pathogène *Fusarium oxysporum* a été inhibée par le champignon endomycorhizien *Glomus macrocarpum* (Bali & Mukerji, 1990). Cette protection dépendait en général de la souche du champignon, de la plante hôte et enfin de l'ordre dans lequel les infections ont lieu. En effet les jeunes plantules de *Chamaecyparis lawsoniana* ont été protégées du champignon pathogène *Phytophthora cinnamomi* seulement lorsque la symbiose endomycorhizienne était effective avant l'inoculation du pathogène (Bartschi *et al*, 1981). Cette antériorité de l'infection endomycorhizienne par rapport à l'inoculation du pathogène a dû aussi être respectée dans le cas de la protection de jeunes plants de Citrus contre *Phytophthora cinnamomi* lorsqu'ils sont mycorhizés par *Glomus fasciculatum* (Davis & Menge, 1980). Toutefois le champignon endomycorhizien *Glomus etunicatum* a protégé le Concombre de l'impact du pathogène *Pythium ultimum* alors que ces deux microorganismes étaient inoculés simultanément (Rosendahl & Rosendahl, 1990). Les mécanismes intervenant dans ce phénomène restent inconnus. Différentes hypothèses ont été émises. En particulier, le développement de la symbiose endomycorhizienne stimule la production d'isoflavonoïdes qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense de la plante (Morandi & Bailey, 1984). Lorsque l'effet est obtenu avec la co-inoculation du pathogène et du symbiote fongique, les mécanismes aboutissant à l'inhibition de l'effet du pathogène peuvent être dûs à la production de métabolites toxiques chez la plante induite par l'initiation de l'infection endomycorhizienne. Cependant elle peut être aussi due à la libération de différents composés issus des spores ou du mycélium (Rosendahl & Rosendahl, 1990).

#### - *Les ectomycorhizes*

Ce type de symbiose intéressant principalement les espèces forestières, les interactions ont surtout été étudiées avec des pathogènes rencontrés fréquemment dans les pépinières forestières. Par exemple, le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* est responsable d'une maladie appelée "fonte de semis". Ce pathogène provoque de gros dégâts en particulier dans les pépinières nord-américaines. Bien que de nombreux



fongicides puissent être employés afin de réduire les effets de ce pathogène, l'utilisation de champignons ectomycorhiziens s'avère être une alternative intéressante (Marx, 1972 ; Sinclair *et al* , 1975 et 1982 ; Peterson *et al*, 1984 ; Sampangi *et al* , 1986 ; Duchesne *et al*, 1987 ; Damm & Unestam, 1990). La production d'antibiotiques par la plante et/ou par le champignon, la barrière physique formée par le manteau fongique de la mycorhize et enfin les phénomènes de compétitions trophiques entre le pathogène et le champignon ectomycorhizien au sein de la mycorrhizosphère peuvent être responsables de cette protection par le symbiote (Kope & Fortin, 1990). Les champignons ectomycorhiziens produisent des composés volatils inhibant la germination des propagules champignons pathogènes (Krupa & Fries, 1971 ; Krupa & Nylund, 1972 ; Krupa *et al*, 1973).

Chakravarty & Hwang (1991) ont étudié les interactions existant entre *Fusarium oxysporum* et le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* avec la plante *Pinus banksiana*. Ces auteurs ont mis en évidence une inhibition de la croissance du *F. oxysporum* par *L. laccata* *in vitro*. La colonisation racinaire de *F. oxysporum* a été réduite par la mycorhization. La croissance du Pin a été significativement stimulée (par rapport au traitement *F. oxysporum* seul) dans les traitements de co-inoculation *F. oxysporum* et *L. laccata*.. Enfin le filtrat de culture du champignon ectomycorhizien a inhibé la germination des spores de *F. oxysporum*., ce qui suggère que *L. laccata* secrète des composés toxiques qui inhibent l'installation du pathogène.

Perrin & Garbaye (1982) ont étudié les interactions entre *Pythium ultimum* et 2 champignons ectomycorhiziens: *Hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus* . Leurs résultats ont montré que le champignon *Hebeloma crustuliniforme* réduisait la colonisation du substrat de culture par le pathogène et que , dans des conditions axéniques, la croissance du pathogène était fortement inhibée. Cette dernière expérience a montré que l'inhibition observée était due uniquement à la présence du champignon ectomycorhizien et non à d'autres microorganismes associés à la mycorhize.

#### - Interactions entre différents champignons mycorhiziens

Nous ne discuterons ici que les résultats obtenus avec les champignons ectomycorhiziens. Les espèces forestières sont généralement associées à de nombreuses espèces de champignons ectomycorhiziens simultanément présentes sur leurs racines (Zak, 1973 ; Voiry, 1981). Il est maintenant reconnu que la réussite d'une plantation sur un sol forestier est particulièrement influencée par l'état mycorhizien des jeunes plants. De plus, cet effet bénéfique est d'autant plus important que la souche fongique ayant mycorhizé le système racinaire est adaptée aux conditions de milieu de la plantation. Les critères de sélection de ces champignons ectomycorhiziens ont été définis par Garbaye (1991). Ainsi la souche fongique sélectionnée doit survivre dans le milieu naturel,

supporter ses variations, coloniser et infecter les racines nouvellement formées. En conséquence, le bénéfice procuré à la plante par ce champignon ectomycorhizien doit être supérieur à l'effet apporté par les souches fongiques indigènes (Danielson, 1988). Différents paramètres peuvent être retenus pour choisir cette souche fongique: la survie des propagules (Ba, 1990), l'aptitude du champignon à coloniser la rhizosphère et à infecter les racines courtes néoformées apparaissent comme des facteurs primordiaux. La production d'antibiotiques par ces champignons mycorhiziens pourrait aussi avoir des implications dans ces phénomènes de compétition dans la rhizosphère

#### ➤ *Relations synergiques entre les champignons mycorhiziens et différentes catégories de microorganismes rhizo/mycorhizosphériques*

Des effets bénéfiques de la microflore rhizosphérique sur la mycorhization ont été mis en évidence dans un premier temps par différentes expériences utilisant des filtrats de sol contenant la microflore du sol ou dans des expériences conduites en conditions non axéniques. Par exemple, il a été démontré que la germination des spores de champignons endomycorhiziens V.A. était stimulée par la présence de certaines bactéries contaminantes (Linderman & Paulitz, 1990). La même stimulation de l'infection endomycorhizienne a été obtenue en infectant des plants de luzerne avec des spores de *Glomus mossae* non désinfectées (Mosse, 1962). Le même effet a été observé en inoculant le substrat de culture avec un filtrat de spores non stérile (Azcon-Aguilar & Barea, 1985 ; Kothari *et al* , 1990). Dans le cas des ectomycorhizes, McAfee et Fortin (1988) ont constaté que l'infection ectomycorhizienne de *Larix laricina* était stimulée par l'addition d'un extrait de sol non stérile. Le même résultat a été obtenu par Garbaye et Bowen (1987).

A partir de ces observations mettant en évidence une action bénéfique des microorganismes rhizosphériques, des expériences de co-inoculation champignons symbiotiques / microorganismes rhizosphériques ont été réalisées. Ces microorganismes ont été choisis en fonction de leur propre effet sur la plante. Ces expériences avaient pour but d'additionner quantitativement les effets bénéfiques pour la plante hôte de la symbiose mycorhizienne et du type de microorganismes sélectionnés. Ces derniers ont été généralement retenus d'après les propriétés suivantes: la fixation de l'azote atmosphérique par des microorganismes symbiotiques ou non symbiotiques, la stimulation de la croissance des plantes (P.G.P.R.: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et enfin la solubilisation des phosphates du sol peu solubles. Chaque cas sera illustré par un exemple démonstratif issu de la littérature.

- Expériences de co-inoculation champignon endomycorhizien / bactérie fixatrice d'azote atmosphérique symbiotique (*Rhizobium* sp.)

Les interactions existant entre ces différents types de microorganismes ont été souvent étudiées (Mosse, 1977 ; Munns & Mosse, 1980). Les effets obtenus sur la légumineuse peuvent être additionnels: la nutrition azotée est assurée par les nodules de *Rhizobium* et le reste de la nutrition minérale (surtout en ce qui concerne le phosphore) est améliorée grâce aux endomycorhizes. Toutefois certains travaux montrent que les interactions entre les deux symbiotes sont plus complexes. Par exemple, la fixation d'azote est stimulée par la symbiose endomycorhizienne. De plus, l'intensité de cette stimulation dépend de la nature de la souche fongique utilisée.

Ndao (communication personnelle) qui a étudié le modèle *Faidherbia albida* (Mimosacée ligneuse africaine) inoculée avec *Glomus mossaea* et 3 différentes souches de *Rhizobium*, a montré que la croissance, la nutrition azotée et phosphatée et le poids sec des nodules étaient stimulés par la double inoculation.

Les mécanismes expliquant les interactions existant entre ces 2 types de microorganismes symbiotiques sont encore mal connus. Cette association M.V.A / *Rhizobium* / légumineuse est peut être un phénomène complexe où plusieurs flux métaboliques pourraient être impliqués (Linderman & Paulitz, 1990). En particulier, la stimulation de la croissance de la plante infectée par ces 2 microorganismes peut être expliquée par l'augmentation de la photosynthèse due à la symbiose endomycorhizienne. Ceci engendre une augmentation du flux de substances carbonées vers les nodules et les endomycorhizes. Il y a ainsi un nombre plus important de nodules plus gros, qui fixent plus d'azote pour la plante. Cette stimulation de la croissance des tissus nodulaires peut aussi être la conséquence d'un effet hormonal (Edress *et al*, 1984). Il est connu que la symbiose endomycorhizienne a un rôle important dans le cas de carences minérales. Elle améliore la nutrition minérale de la plante en particulier pour le phosphore et en conséquence l'alimentation en ions phosphore des nodules (Kawai & Yamamoto, 1986) et certains oligoéléments, en particulier le molybdène qui est impliqué dans le fonctionnement de la nitrogénase.

- Expériences de co-inoculation champignon endomycorhizien / actinomycète fixateur d'azote atmosphérique symbiotique (*Frankia* sp.)

Les actinomycètes fixateurs d'azote du genre *Frankia* forment des nodules avec des arbres et des arbustes comme *Alnus*, *Cercocarpus*, *Purshia*, *Ceanothus*, *Casuarina*, *Eleagnus* et *Hypophae*. Ces plantes hôtes colonisent habituellement des terrains pauvres en azote combiné (dunes, sols arides, etc). Les effets obtenus avec la double inoculation

*Frankia* / champignons mycorhiziens sont similaires à ceux obtenus avec la combinaison *Rhizobium* / champignons mycorhiziens. Les nodules sont plus nombreux, plus gros et l'activité nitrogénasique est plus importante que chez les plantes infectées uniquement par *Frankia*.

Fraga-Beddiar & Le Tacon (1989) ont étudié les interactions entre *Alnus glutinosa* inoculé par *Frankia* et *Glomus fasciculatum*. Leurs travaux ont montré que la co-inoculation a stimulé le nombre et le poids moyen des nodules par semis.

Les mécanismes qui régissent ces interactions ne sont pas connus. L'augmentation du nombre de points d'infection pour *Frankia* pourrait être due à un effet rhizosphérique. En effet la mycorhization modifie l'exsudation racinaire (effet mycorhizosphérique) ce qui pourrait affecter la croissance saprophytique ou la germination des spores de *Frankia* (Harris *et al*, 1985).

#### - Expériences de co-inoculation champignon endomycorhizien / rhizobactéries non symbiotiques

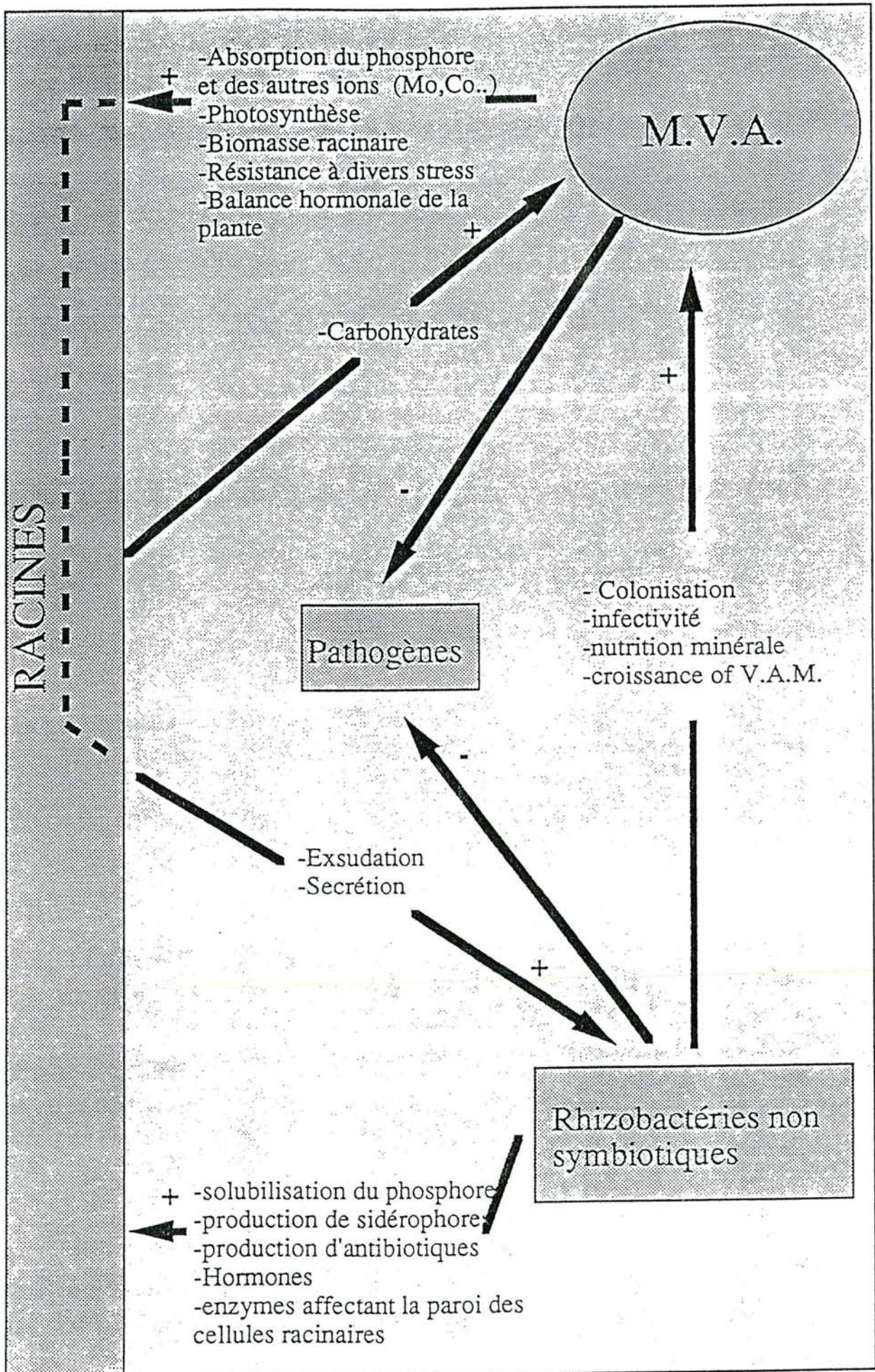
Nous distinguerons 2 types de rhizobactéries non symbiotiques: les bactéries fixatrices d'azote et d'autres bactéries pouvant aussi être bénéfiques pour la plante. Ces dernières sont qualifiées de PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Les différentes interactions existant entre la plante hôte, le champignon endomycorhizien VA et les PGPR sont résumées dans la figure 6.

##### - Les bactéries fixatrices d'azote non symbiotiques

Bien que la majeure partie de la fixation de l'azote soit réalisée par les bactéries symbiotiques, des bactéries non symbiotiques comme *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Azospirillum* ont un rôle non négligeable dans ce processus (Subba Rao *et al*, 1985a). Les *Azospirillum* spp. ont été plus particulièrement étudiées. En effet, ils sont fréquents dans le sol et leur colonisation des racines de plantes de grande culture peuvent amener de 10 à 20 kg d'azote par hectare dans le sol et stimuler significativement la biomasse des plantes (Tilak, 1985).

L'inoculation simultanée d'une souche d'*Azospirillum brasilense* et d'un champignon endomycorhizien a entraîné l'addition des effets bénéfiques obtenus lorsque ces deux microorganismes sont inoculés individuellement (Subba Rao *et al*, 1985a,b). D'autres études ont montré que la présence d'*Azospirillum brasilense* au niveau des racines stimulait la colonisation racinaire, la biomasse et le nombre de vésicules d'un champignon endomycorhizien V.A. (Barea *et al*, 1983).

Fig.6: interactions entre la plante, le champignon endomycorhizien et les PGPR. +: effet positif, -: effet négatif. D'après Le Tacon *et al* , 1991)



Des relations étroites ont souvent été observées entre ces fixateurs d'azote libres, les spores et le mycélium des champignons mycorhiziens. Par exemple, des souches d'*Azospirillum* spp. ont été isolées de racines mycorhizées d'oignon, dont la surface avait été préalablement désinfectée, ou de spores de champignons endomycorhiziens (Tilak *et al* , 1987a,b).

-Les bactéries appartenant au groupe *Pseudomonas fluorescens-putida*

Certaines rhizobactéries, comme les microorganismes fixateurs d'azote, ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes (Kloepper *et al* , 1980). La plupart de ces bactéries appartiennent au groupe *Pseudomonas fluorescens-putida*. Elles colonisent rapidement les racines et agissent par des mécanismes activement étudiés.

L'effet de ces bactéries est généralement attribué à un excellent pouvoir colonisateur de la rhizosphère, un pouvoir antagoniste contre différents pathogènes, une production de phytohormones ou de substances de croissance (Linderman & Paulitz, 1990).

La capacité qu'ont ces bactéries à coloniser la rhizosphère s'explique non seulement par leur affinité pour les exsudats racinaires (en particulier les acides aminés), mais aussi par leur temps de génération relativement court. Ainsi une souche de *P. fluorescens* a un temps de génération de 5 heures environ sur des racines à 25°C alors qu'un *Bacillus* spp. a un temps de génération d'environ 39 heures dans les mêmes conditions (Digat, 1983).

L'antagonisme de ces bactéries contre différents pathogènes semble lié à leur capacité à produire des pigments fluorescents (sidérophores) qui ont une grande capacité à chélater le fer ferrique (Neiland *et al* , 1980). Selon la souche de *P. fluorescens* , plusieurs types de pigments de structures voisines peuvent être produits. Ainsi, selon les auteurs, le pigment fluorescent est appelé "fluoresceïne" (King *et al* , 1948), "Pyoverdine" (Turfreijer, 1942) ou "Pseudobactine" (Kloepper *et al* , 1980). Ainsi, en capturant le fer ferrique, la bactérie rend ce composé moins disponible pour les autres microorganismes et exerce un antagonisme d'origine nutritionnelle. Cet antagonisme sera d'autant plus marqué que le sol sera déficient en fer (sols alcalins). Enfin, ce fer chélaté sera disponible pour la bactérie mais aussi pour la plante ce qui se répercutera sur sa croissance et son développement (Digat, 1986).

Ces bactéries de type PGPR peuvent aussi interagir avec des champignons mycorhiziens. Les résultats de cette double inoculation sur la plante hôte peuvent se traduire par une synergie des effets de chaque microorganisme. Meyer & Linderman (1986) ont montré que la double inoculation (champignon V.A. et *Pseudomonas putida* ) était bénéfique pour la croissance de la plante (*Trifolium subterraneum* ). Lorsque la

plante a été infectée par une souche de Rhizobium, le nombre de nodules par plant a aussi été stimulé grâce à cette co-inoculation.

La stimulation de la croissance de la plante hôte obtenue avec le traitement bactérie + champignon endomycorhizien pouvait être attribuée à plusieurs mécanismes:

- (1) une stimulation de la précocité de l'infection endomycorhizienne par la bactérie
- (2) une augmentation d'éléments minéraux ou organiques solubilisés par la bactérie et disponibles pour le champignon endomycorhizien
- (3) une stimulation par la bactérie et/ou le champignon de la formation ou de l'activité des nodules.

*Ainsi, de nombreux travaux ont montré l'effet synergique obtenu en inoculant simultanément un microorganisme type PGPR et un champignon endomycorhizien.*

Les études visant à montrer ce type d'effet synergique sont beaucoup moins nombreuses dans le cas des associations symbiotiques entre des champignons ectomycorhiziens et des espèces forestières. De Oliveira (1988) a montré que certaines souches bactériennes isolées du sol stimulaient l'infection ectomycorhizienne du hêtre (*Fagus silvatica*) par le champignon *Hebeloma crustuliniforme*. Garbaye & Bowen (1989) ont isolé des bactéries du manteau de mycorhizes formées par *Rhizopogon luteolus* et *Pinus radiata*. Certaines de ces souches ont stimulé significativement l'infection ectomycorhizienne. Déjà certains auteurs avaient émis l'idée que des souches bactériennes sélectionnées pouvait améliorer l'efficacité de l'inoculation ectomycorhizienne en pépinière forestière (Bowen & Theodorou, 1979 ; Garbaye & Bowen, 1987) et avaient introduit le concept de bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM).

Dans le cadre de l'étude qui va être présentée, nous avons choisi de travailler sur le modèle symbiotique *Laccaria laccata* S238 / Douglas et de sélectionner différentes souches bactériennes pouvant stimuler l'infection ectomycorhizienne de la plante hôte.

## Présentation du modèle symbiotique étudié: Douglas / *Laccaria laccata* S238

### La plante hôte: le Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)

L'aire du Douglas s'étend en Amérique du Nord des rivages du Pacifique jusqu'aux massifs montagneux des Cascades et des Montagnes Rocheuses et de l'Alaska jusqu'au Mexique. Il est particulièrement adapté à un climat tempéré, à des altitudes moyennes et à des sols profonds et modérément acides. Il fut introduit en France en 1842 et à partir de 1975, il y est devenu la première espèce de reboisement, supplantant l'Epicéa.

L'ampleur de son implantation est expliquée par ses qualités: croissance rapide, bonne longévité, bonne résistance aux gelées, aux parasites et à l'élagage. De plus il produit un bois de qualités supérieures à celles de beaucoup de résineux indigènes.

### Le champignon ectomycorhizien: *Laccaria laccata*

Le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* (Scop ex Fr.) est appelé communément Laccaire laqué, Clitocybe laqué ou Agaric laqué. C'est un Homobasidiomycète Hyménomycète très commun en été et en automne dans des stations humides sous couvert feuillus ou résineux.

Sa description est la suivante (d'après Marchand, 1973):

**Chapeau** 1,5-5 cm, globuleux puis convexe, un peu déprimé au centre ou même ombiliqué. Marge très mince, arrondie, irrégulière avec l'âge, unie, puis longuement striée par transparence, fissile, concolore. Cuticule séparable, pelliculaire, sans aucune ténacité, sèche, roux carné décolorant à fauve ochracé pâle, presque lisse, puis farineuse-squamuleuse.

**Lames** espacées, inégales par des lamelles et lamellules arrondies en arrière, larges de 4 à 8 mm, épaisses, fissiles en travers, un peu arquées, adnées, fragiles, rose carné, enfin pruineuses par les spores. Arête plutôt obtuse, un peu érodée, concolore. Sporée blanche.

**Pied** 5-8 x 0,4-0,8 cm, cylindracé, parfois épaissi en haut et en bas, souvent tortueux et bosselé, tenace, plein, ferme, puis carverneux sous le disque, cortiqué, concolore au chapeau, sec, fibrillo-strié.

**Chair** mince, hygrophane, fibreuse dans le pied, rose carné pâle. Saveur douce. Odeur faible.

La souche utilisée dans cette étude (*Laccaria laccata* S238) a été isolée aux USA (Oregon, aire naturelle du Douglas) sous *Tsuga mertensiana* par R. Molina et J.M. Trappe. Il est à noter que de récentes études (Martin *et al*, 1991) ont montré que cette



souche était très proche de l'espèce *bicolor*. Nous conserverons cependant au cours de cette étude la dénomination *L. laccata* S238.

En culture pure, le mycélium est de couleur blanche ou plus ou moins rose ou mauve selon le milieu de culture utilisé (Duponnois & Garbaye, 1991). Les hyphes sont caractérisées par l'abondance des anses d'anastomoses. Ce champignon forme avec le Douglas des mycorhizes qui sont souvent longues et tortueuses (planche 1). Le manteau est épais et formé par 2 couches: une externe prosanchymateuse qui disparaîtra après les premiers stades de développement et une interne de nature pseudoparenchymateuse ce qui explique son aspect lisse à maturité.

De nombreux travaux menés au Laboratoire de Microbiologie Forestière de l'INRA Nancy par Le Tacon *et al* ont montré l'intérêt d'associer le Douglas à la souche fongique *Laccaria laccata* S238. En pépinière, ce champignon stimule la croissance en hauteur des semis de Douglas de 80,7% (par rapport au témoin) en première année et de 67% en deuxième année (Le Tacon, 1991).

Cet effet bénéfique du champignon sur la croissance de la plante hôte se maintient après que les plants mycorhizés aient été transplantés en forêt (Le Tacon, 1991) et enfin le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* était un remarquable compétiteur vis à vis de la microflore indigène (Villeneuve *et al*, 1991).

*L'association Douglas, L. laccata S238 présente donc toutes les qualités pour une application à grande échelle. Les principaux intérêts à inoculer les semis de Douglas par L. laccata S238 sont: une meilleure croissance en pépinière, une résistance plus importante des plants à la crise de transplantation et enfin une croissance plus rapide des plants en forêt.*

D'autre part, il est connu que les carpophores de *L. laccata* contiennent toujours des bactéries, ce qui rend son isolement difficile. La présence de bactéries libres fixatrices d'azote comme *Clostridium* sp. et *Azospirillum* sp. a même été notée dans des carpophores de *L. laccata* (Li & Hung, 1987).

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes proposés de mettre en évidence l'effet des différentes composantes bactériennes de cette population sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238.

La présentation de ce travail sera articulée suivant plusieurs points:

- la mise en évidence du rôle des bactéries mycorrhizosphériques sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 et de l'existence de bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM)
- la spécificité d'action de ces BAM vis à vis du champignon ectomycorhizien et de la plante hôte
- l'étude des mécanismes d'action impliqués dans ces différents phénomènes
- la possibilités d'utiliser ces BAM pour l'inoculation ectomycorhizienne des plants forestiers en pépinière avec la mise au point de différents types d'inoculum mixte (champignon + bactérie).

## PLANCHE 1

Photo 1: macrographie d'une mycorhize de Douglas avec *Laccaria laccata* S238.

Grossissement: x 50

Photo 2: coupe transversale d'une mycorhize de Douglas avec *Laccaria laccata* S238

Grossissement: x 1000

Photo 3: macrographie de carpophores de *Laccaria laccata* S238

Grossissement: x 0,5



Photo 1

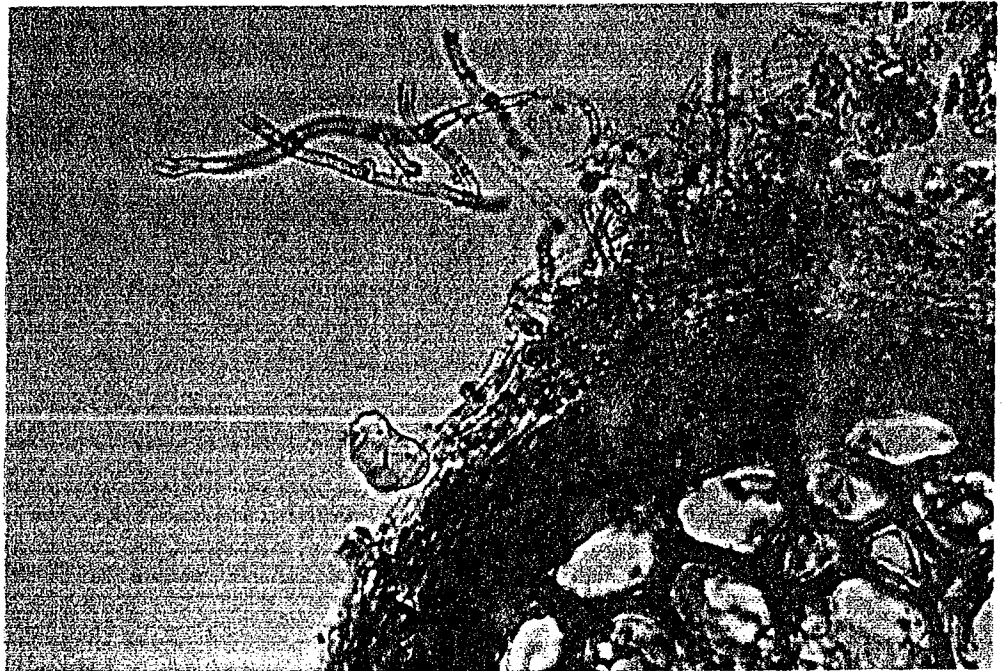


Photo 2

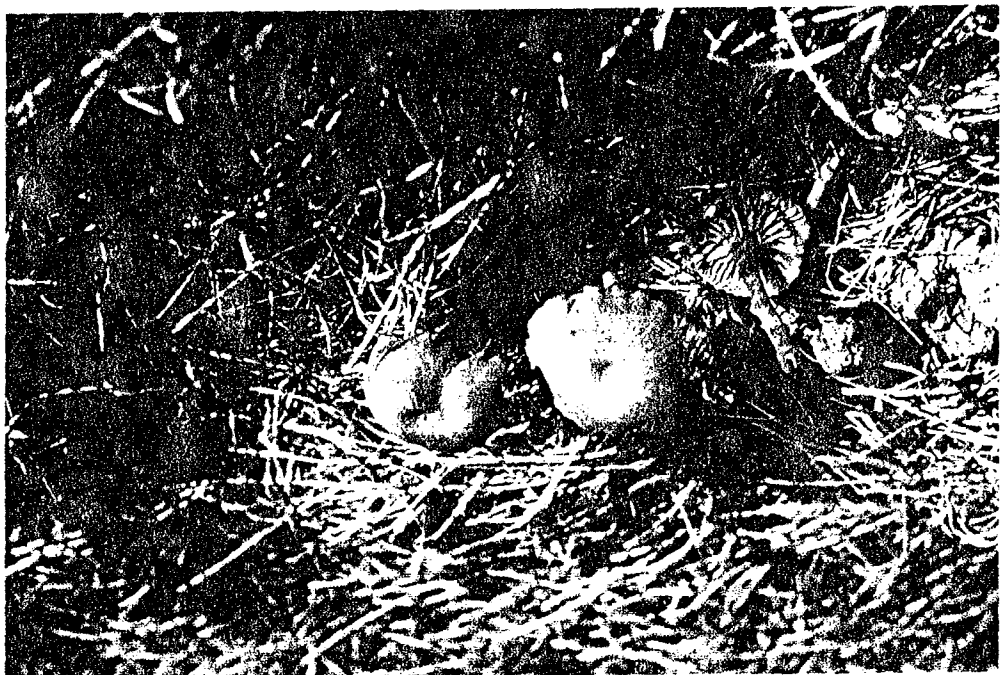


Photo 3

1ère PARTIE:

Mise en évidence du rôle  
des Bactéries associées

## 1ère PARTIE: Mise en évidence du rôle des bactéries associées sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238

### A/ Etude de l'effet de souches bactériennes sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238

Le champignon *Laccaria laccata* S238 est étroitement associé à d'importantes populations bactériennes situées dans les mycorhizes et dans les carpophores. Deux hypothèses principales, non exclusives l'une de l'autre, peuvent être émises:

- les bactéries seraient présentes dans ces organes uniquement pour des raisons nutritionnelles. Ces microorganismes pourraient alors être qualifiés "d'opportunistes" et ne participeraient pas de manière active au processus de mycorhization ou de fructification.
- une deuxième hypothèse serait que certaines bactéries, présentes dans ces organes, ne le seraient pas uniquement pour des raisons trophiques, mais interagiraient directement avec la plante et/ou le champignon dans le processus de mycorhization. Ces souches bactériennes auraient donc un rôle actif dans cette symbiose et pourraient être considérées comme des bactéries auxiliaires de la mycorhization.

#### 1/ Isolement des bactéries à partir des mycorhizes de *L. laccata* S238 / Douglas ou des carpophores de *L. laccata* S238.

Ces isolements ont été réalisés par JL Wahl (1989) dans le cadre d'un DEA de l'université de Nancy 1.

##### 1.1/ Origines géographiques des différents prélèvements

Des prélèvements de mycorhizes ou de carpophores ont été réalisés dans différentes expériences d'inoculation contrôlée de Douglas par *L. laccata* S238 effectuées par Le Tacon *et al* (1988). Leurs localisations géographiques étaient les suivantes:

☞ Deux prélèvements dans une pépinière du **Morvan** aux lieux dits **Colonchère** et **Lacloue**, sur des plants de 2 ans, sur des sols bruns acides, sur une roche mère granitique. Les isolats bactériens ont été notés MBx (bactérie isolée d'une mycorhize) ou

Tableau 1: Caractéristiques physicochimiques des différents sols. nd: non déterminé.

	MORVAN		VOSGES		LIMOUSIN
	Colonchère	La Cloue	Brouvelieure	Ste.Hélène	Peyrat
<b>Granulométrie</b> (pour mille)					
- argile	170,0	157,0	153,0	210,0	115,0
- Limon fin	124,0	166,0	59,0	370,0	146,0
- Limon grossier	51,0	69,0	18,0	247,0	72,0
- Sable fin	87,0	94,0	151,0	93,0	185,0
- Sable grossier	568,0	514,0	619,0	80,0	482,0
<b>M.O.totale</b> (Anne) (pour mille)	29,0	33,5	260,5	136,5	74,9
<b>N (Kjeldahl)</b> (pour mille)	1,68	1,73	5,2	4,31	3,2
<b>Rapport C/N</b>	10,05	11,27	29,1	18,42	13,62
<b>pH eau</b>	5,6	5,6	4,0	4,1	5,4
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b> (Duchauffour) (pour mille)	0,92	0,99	0,1	0,10	0,78
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b> (Olsen) (pour mille)	0,127	0,127	nd	nd	0,072
<b>Cap.d'échange</b> (Metson) (meq%)	9,7	8,5	28,4	17,2	12,0
<b>Ca.échangeable</b> (meq pour cent g)	nd	nd	1,1	0,8	1,3
<b>Mg échangeable</b> (meq pour cent g)	0,49	0,53	0,29	0,29	0,15
<b>K échangeable</b> (meq pour cent g)	0,913	0,583	0,401	0,384	0,451
<b>Mn échangeable</b> (ppm)	4,7	4,6	nd	nd	nd
<b>Cuivre total</b> (ppm)	nd	nd	nd	nd	6,3
<b>Fer libre (Deb)</b> (pour cent)	0,58	0,84	nd	nd	nd

MBcx (bactérie isolée d'un carpophore) avec x représentant le numéro de la souche bactérienne.

➤ Un prélèvement dans des carpophores associés à des plants de Douglas d'un an dans les serres de l'INRA de Nancy à partir d'essais d'inoculation sur substrat tourbe-vermiculite. Ces isolats bactériens ont été désignés par SBx ou SBcx.

➤ Deux prélèvements dans des plantations expérimentales réalisées en collaboration avec l'Office National des Forêts (ONF) situées dans les Vosges à **Brouvelieures** (sol podzolique sur grès vosgien) et à **Sainte Hélène** (sol brun acide sur limons). Les plants mycorhizés par *L. laccata* S238 dans la pépinière de Peyrat le Château (Haute Vienne) avaient 3 ans. Les isolats bactériens ont été notés BBX ou BBcX dans le cas de Brouvelieures et SHBX ou SHBcX dans le cas de Sainte Hélène.

Les caractéristiques des sols de ces différents lieux de prélèvements sont indiquées dans le tableau 1.

### 1.2/ Isolement des bactéries

Les carpophores de *Laccaria laccata* ont été nettoyés grossièrement à sec. Puis un fragment de tissus fongique a été prélevé aseptiquement au niveau de la partie haute du pied du carpophore. Ce fragment a été pesé et mis dans un tube contenant 10 ml d'eau stérile puis broyé avec un homogénéiseur Ultraturax. Une gamme de dilution a été réalisée ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ). Une aliquote de 50  $\mu$ l de chaque dilution a été étalée sur des milieux sélectifs permettant l'expression des divers groupes bactériens (bactéries sporulantes, *Pseudomonas* fluorescents, actinomycètes). Un milieu supplémentaire permettait la croissance de toutes les bactéries (milieu bactéries totales). Deux répétitions ont été faites pour chaque dilution et pour chaque milieu sélectif. C'est la moyenne de ces deux répétitions qui a été prise en compte pour les calculs du nombre de colonies par boîte et ainsi par milligramme de poids frais. Le Gram des bactéries isolées a été déterminé par un test enzymatique (Cerny, 1976). La composition de ces différents milieux sélectifs est indiquée dans le tableau 2.

Les mycorhizes ont été séparées du système racinaire préalablement lavé à l'eau courante. La surface des mycorhizes a été stérilisée en les immergeant dans une solution de NaClO 1,5% pendant une minute sous agitation. Ensuite les mycorhizes ont été soigneusement rincées afin d'éliminer toutes traces de NaClO. L'isolement des bactéries situées dans la mycorhize a été réalisé de la même façon que celui effectué dans le cas des



Tableau 2: formulation des différents milieux sélectifs

- Milieu bactéries totales (Meyer & Linderman, 1986b)

a/ Milieu de base: TSA 0,3%, pH=7

- TSB (Tryptic Soy Broth, DIFCO)	3,0 g
- Bacto-Tryptone	1,7 g
- Bacto-Soytone	0,3 g
- Bacto-Dextrose	0,25 g
- Chlorure de sodium	0,5 g
- Phosphate dipotassique	0,25 g
- Agar-agar	20 g
- Eau distillée	1000 ml

b/ Cycloheximide (en solution alcoolique) 75,0 mg

- Bactéries sporulantes

Afin de discerner les bactéries sporulantes, des suspensions bactériennes ont été chauffées à 80°C au bain-marie pendant 15 min avant d'être étalées sur le milieu "bactéries totales".

- Milieu "Actinomycètes": Milieu SAA (d'après Williams & Davies, 1965)

a/ Milieu de base

- Amidon	10,0 g
- Caséine	0,3 g
- Nitrate de potassium	2,0 g
- Phosphate dipotassique	2,0 g
- Chlorure de sodium	2,0 g
- Sulfate de magnésium	0,05 g
- Carbonate de sodium	0,02 g
- Sulfate de fer	0,01 g
- Agar-agar	20 g
- Eau distillée	1000 ml

b/ Antibiotiques (masses ajoutées par litre de milieu)

- Cycloheximide	75,0 mg
- Polymyxine B sulfate	5,0 mg
- Benzyl pénicilline de sodium	1,0 mg

- Milieu "Pseudomonas fluorescent": milieu B de King (King *et al*, 1954)

- Protéose Peptone n° 3	20 g
- Glycérol	10 ml
- Phosphate dipotassique	1,5 g
- Sulfate de magnésium	1,5 g
- Agar-agar	20 g
- Eau distillée	1000 ml

- Milieu "Pseudomonas fluorescent": milieu ACC (Simon & Ridge, 1974)

a/ Milieu de base: TSA 0,3%, pH=7

b/ Antibiotiques par litre de milieu

- Cycloheximide	75,0 mg
- Chloramphénicol	12,5 mg
- Ampicilline	50,0 mg

Rq: dans le cas de ces 2 milieux "Pseudomonas fluorescent", les étalements bactériens après 2 jours d'incubation à 25°C dans l'obscurité, sont observés sous lumière UV (365 nm) afin d'identifier les souches de Pseudomonas fluorescents.

- Milieu "Bactéries GRAM -"

a/ Milieu de base: Milieu "bactéries totales"

b/ Cristal violet (par litre de milieu) 10,0 mg

carpophores. Une aliquote de la dernière eau de rinçage a aussi été étalée sur le milieu "Bactéries totales" afin de vérifier que les bactéries isolées provenaient bien de l'intérieur du manteau et non de la surface de la mycorhize ou de différentes contaminations intervenues lors de l'isolement.

Certaines colonies bactériennes avaient des ressemblances entre elles. Dans ces groupes, nous avons choisi de ne garder qu'une colonie représentative. Après un comptage total des bactéries isolées dans chaque échantillon de mycorhize ou de carpophore, nous en avons éliminé pour en garder cent cinq qui avaient des aspects plus ou moins différents.

### 1.3/ Résultats et discussion

La majeure partie des souches bactériennes ont été isolées des mycorhizes (78%) alors que les bactéries isolées des carpophores ne représentaient que 22% du nombre total d'isolats bactériens (Fig.7). Les bactéries Gram - sont majoritaires (72%) alors que les bactéries gram + ne représentaient que 28% du nombre total (Fig.6). Les actinomycètes, les *Pseudomonas* fluorescents et les bactéries sporulantes représentaient respectivement 16, 8 et 8% du nombre total de bactéries (Fig.7).

La figure 8 montre que 75% des bactéries proviennent du Morvan. Celles isolées dans la serre de Nancy, à Brouvelieures et à Sainte Hélène ne représentaient respectivement que 10, 10 et 5% du nombre total des isolats bactériens.

Toutes les bactéries isolées dans la serre de Nancy et à Brouvelieures provenaient de carpophores alors qu'elles ont toutes été isolées de mycorhizes à Sainte Hélène. En ce qui concernent les isolements effectués dans le Morvan, 92% des bactéries provenaient de mycorhizes et 8% de carpophores.

Des comptages bactériens ont été effectués dans les prélèvements correspondant aux différents sites géographiques. En moyenne les résultats étaient les suivants:

- Morvan (mycorhizes):  $6,10 \cdot 10^5$  bactéries / mg de poids frais
- Morvan (carpophore):  $2,5 \cdot 10^2$  bactéries / mg de poids frais
- Serre Nancy (carpophore):  $1,42 \cdot 10^6$  bactéries / mg de poids frais
- Sainte Hélène (mycorhizes):  $4,6 \cdot 10^5$  bactéries / mg de poids frais
- Brouvelieures (carpophores):  $7,75 \cdot 10^6$  bactéries / mg de poids frais

Ces comptages montrent que les tailles des populations bactériennes associées aux mycorhizes sont assez constantes et sont de l'ordre de  $10^6$  bactéries / mg de poids frais. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Katznelson *et al* (1962) sur des

Fig.7: répartition (en %) des types de bactéries par rapport au nombre total de bactéries isolées (P. fluo.: *Pseudomonas fluorescens*, Actino: actinomycètes, bact. spor.: bactéries sporulantes.). Répartition (en %) des bactéries en fonction de l'organe où elles ont été isolées (myco.: mycorhize, carpo.: carpophore).

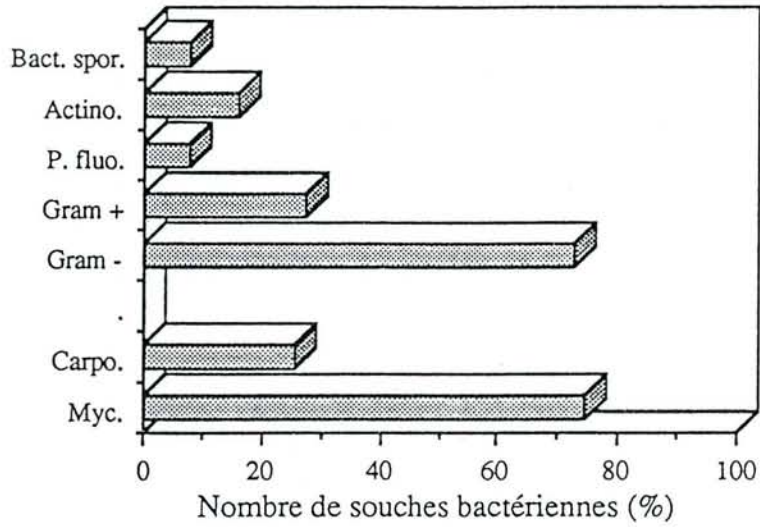
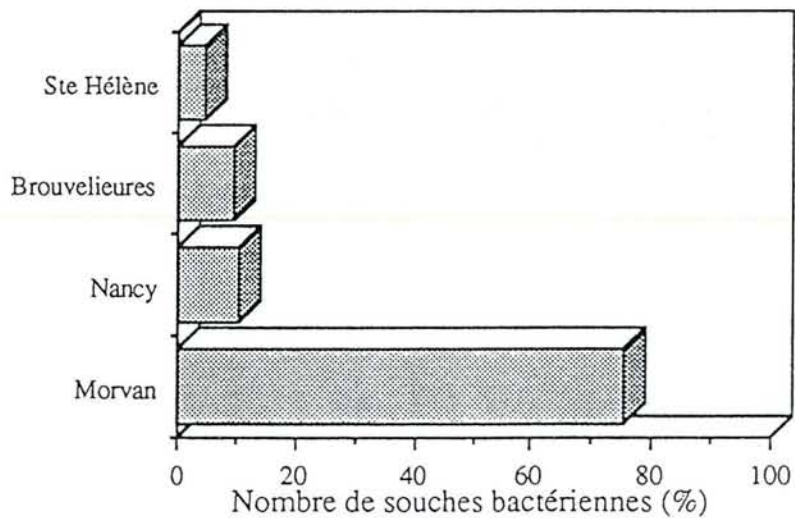


Fig.8: répartition du nombre de souches bactériennes en fonction du lieu géographique de l'isolement.



racines de bouleau mycorhizées ou par Garbaye & Bowen (1989) sur des mycorhizes de *Pinus radiata* et *Rhizopogon luteolus*.

Dans tous les sites de prélèvements, les bactéries retenues étaient majoritairement de type Gram - (Fig.9, 10,11 et 12) et représentaient de 70 à 90% du nombre total. La présence de *Pseudomonas* fluorescents a été plus ou moins irrégulière (absence dans les prélèvements effectués dans la serre de Nancy) mais ils pouvaient représenter jusqu'à 20% (Sainte Hélène) du nombre total de bactéries. Cette irrégularité a aussi été observée dans le cas des actinomycètes et des bactéries sporulantes (absence dans les prélèvements effectués à Brouvelieures et à Sainte hélène) mais ces 2 types pouvaient respectivement représenter jusqu'à 45 et 18% (Serre de Nancy) du nombre total de bactéries isolées dans cet endroit.

La répartition des types bactériens dans les mycorhizes ou dans les carpophores en fonction du site géographique est difficile à interpréter. En effet, dans certains cas, le nombre de bactéries isolées est faible (11 à Nancy, 10 à Brouvelieures et 5 à Sainte Hélène). Seul le nombre de bactéries retenues dans l'échantillonnage effectué dans le Morvan permet d'être interprété. La diversité des bactéries isolées des mycorhizes est beaucoup plus grande (environ 1000 fois) que celle observée à partir des carpophores.

Dans chaque isolement effectué, le nombre de bactéries Gram - sélectionnées est supérieur à celui des Gram +.

Fig.9: différents types bactériens (en %) isolés dans le Morvan (légende: voir fig.7)

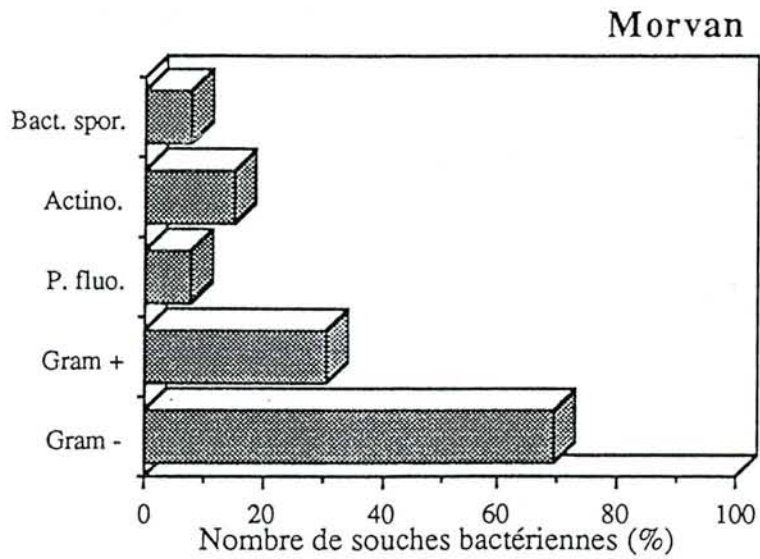


Fig 10: différents types bactériens (en %) isolés dans les serres de Nancy (légende: voir fig.7)

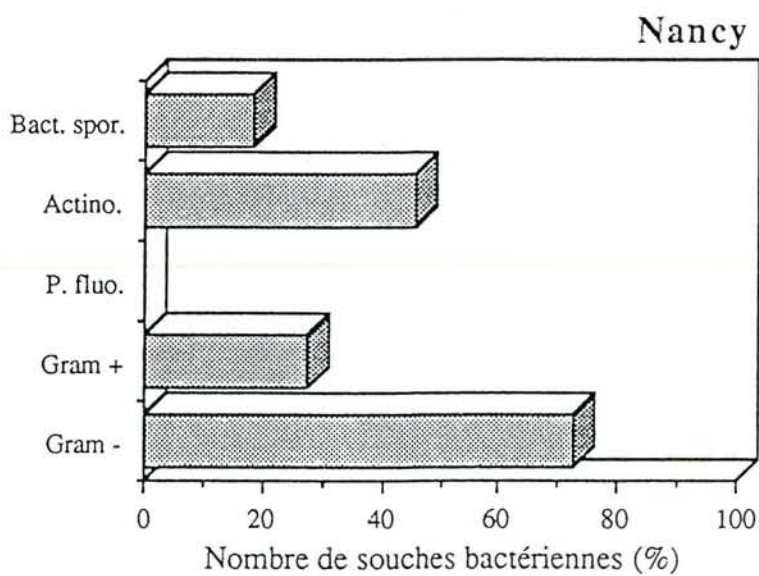


Fig.11: différents types bactériens (en %) isolés à Brouvelieures dans des carpophores  
(légende: voir fig.7)

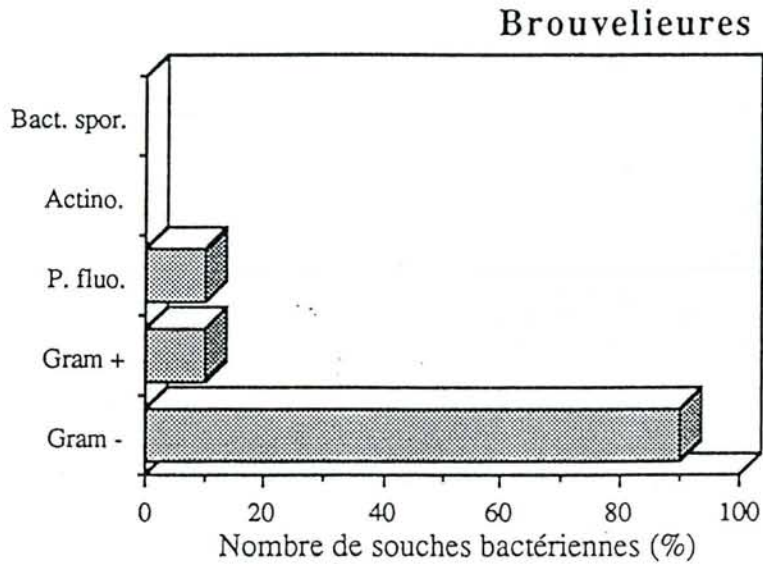
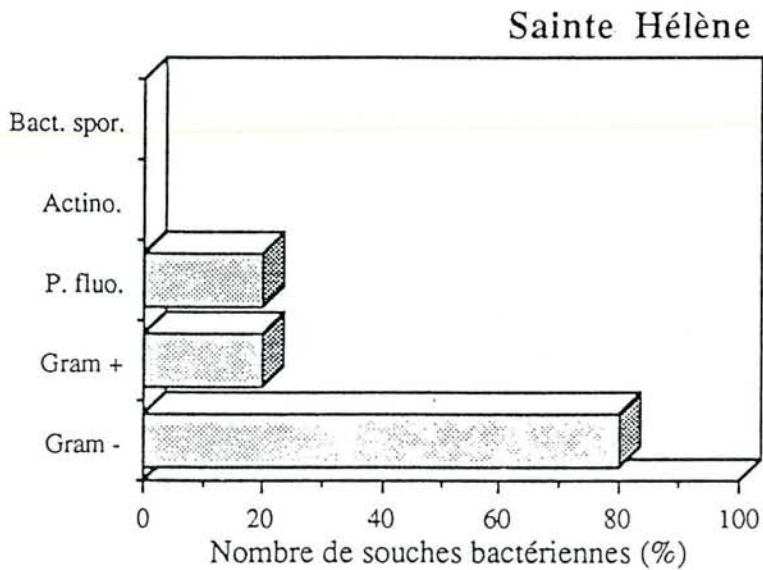


Fig.12: différents types bactériens (en %) isolés à Sainte Hélène dans des mycorhizes  
(légende: voir fig.7)



## B/ Tests de confrontation in vitro entre les bactéries rhizosphériques et le champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* S238

### 1/ Etablissement d'une hypothèse de travail permettant un criblage *a priori* parmi les souches bactériennes isolées

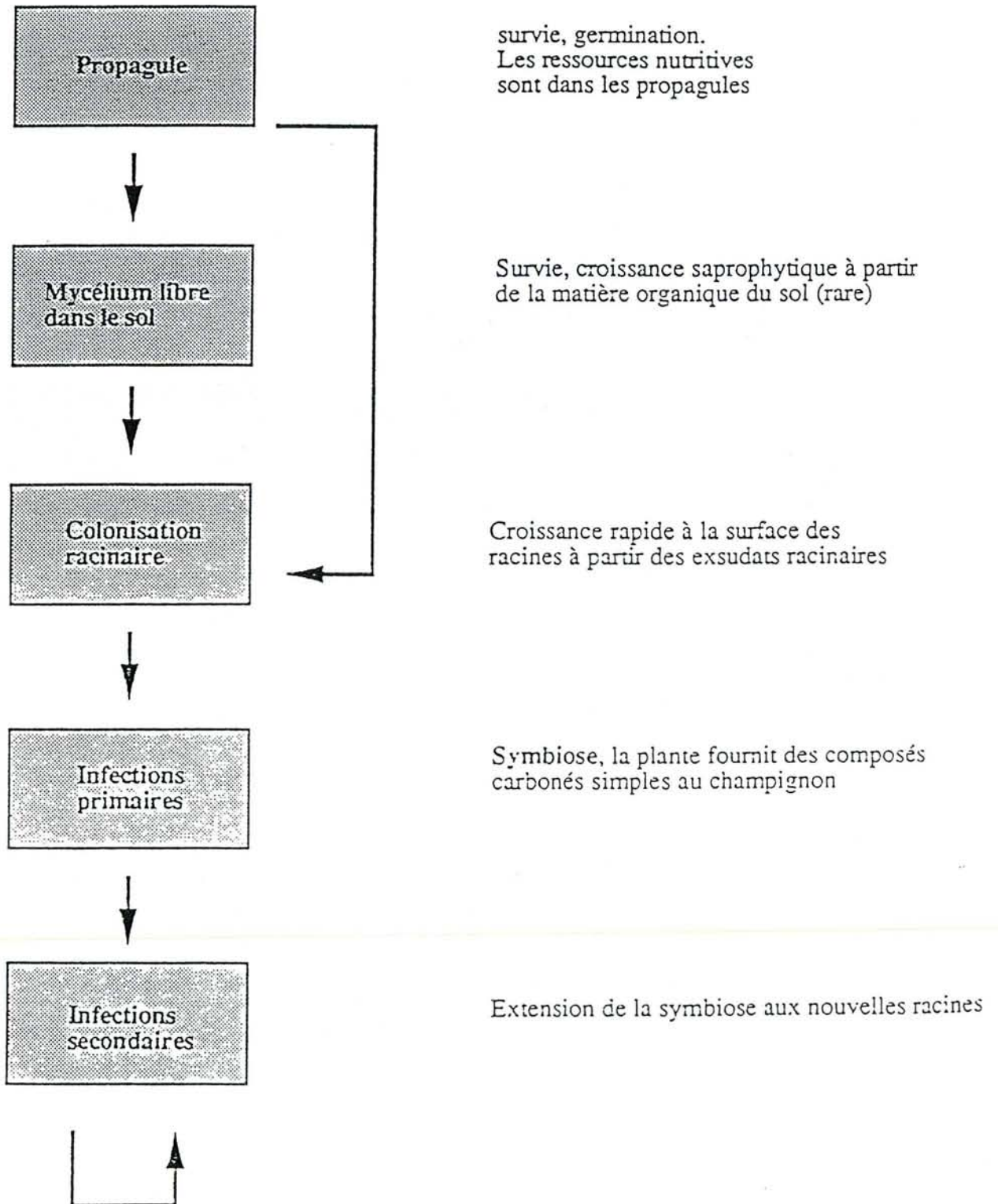
Vu le grand nombre de bactéries (105 souches), il aurait été difficile d'étudier une à une leur effet sur la mycorhization du Douglas. Il nous a fallu établir une hypothèse de travail et l'étudier avec un test rapide et facile à mettre en oeuvre au laboratoire permettant de mettre en évidence l'incidence des souches bactériennes sur un paramètre choisi *a priori*, en minimisant le risque d'éliminer des souches actives.

Le phénomène de mycorhization peut être schématisé par la succession de différentes étapes (Fig.13). Dans ce modèle, la phase de croissance saprophytique dans le sol est critique pour un champignon ectomycorhizien, qui est généralement dépourvu de l'équipement enzymatique lui permettant de survivre dans un environnement ne contenant que des composés carbonés complexes (cellulose, lignine, pectine.etc)(Ramstedt & Söderhäll, 1983). En conséquence, le champignon doit le plus rapidement possible infecter la plante qui lui procurera, dans le cadre de la symbiose, des hydrates de carbone qu'il pourra assimiler afin d'assurer la croissance végétative des hyphes et la formation des carpophores (Harley, 1969 ; HacsKaylo, 1973). Certaines souches bactériennes pourraient aider le champignon à survivre pendant cette étape et ainsi améliorer sa capacité à mycorhizer la plante-hôte.

*Ainsi les bactéries pourraient stimuler la croissance du champignon de façon à diminuer la durée de la phase non symbiotique. Le premier test utilisé pour le criblage des 105 souches est donc basé sur l'hypothèse qu'une bactérie stimulant in fine l'infection mycorhizienne a de fortes chances de stimuler (ou tout du moins de ne pas inhiber) le développement du champignon dans sa phase saprophytique.*



Fig. 13: schématisation des différentes étapes de la mycorhization



## 2/ Test de confrontation *in vitro* entre les bactéries et le champignon *Laccaria laccata* S238

### 2.1/ Principes

De nombreux tests ont été mis au point afin de rechercher, dans un but de lutte biologique, des inhibitions de croissance de certains champignons pathogènes par des souches bactériennes (Thomashow & Weller, 1988 ; Chae Gun Phae *et al* , 1990). Ces tests effectués dans des boîtes de Pétri en conditions axéniques, utilisent des milieux riches en composés nutritifs. Dans le cas qui nous intéresse ici, où des stimulations de croissance doivent être mises en évidence, ce type d'approche n'a pas été retenu, et ceci pour deux raisons principales: (1) le test doit se rapprocher le plus possible des conditions naturelles et il a été souligné que le sol était en général pauvre en composés carbonés directement assimilables par le champignon, (2) un milieu riche ne permettrait pas l'expression d'éventuels effets de stimulation trophique direct

*Le test qui a été retenu devait répondre aux exigences suivantes:*

- *minimiser les ressources nutritives du système*
- *il doit être réalisé dans des conditions axéniques*
- *il doit être peu coûteux en temps et en matériel afin de pouvoir tester dans une courte période de temps un nombre élevé de souches bactériennes*
- *les résultats obtenus doivent être facilement interprétables. L'effet sur la croissance doit résulter uniquement de l'action bactérienne*

Un test de confrontation effectué en conditions axéniques répondant à ces critères avait déjà été mis au point dans notre laboratoire (De Oliveira, 1988).

### 2.2/ Réalisation (fig.14)

Le champignon a été cultivé en conditions axéniques dans des boîtes de Petri en polystyrène (Diamètre: 9 cm) sur milieu moût (moût de brasserie, sucres: 180 à 200 g.l<sup>-1</sup>) dilué au 1/10ème et solidifié avec de l'agar à raison de 20 g.l<sup>-1</sup>. La quantité de

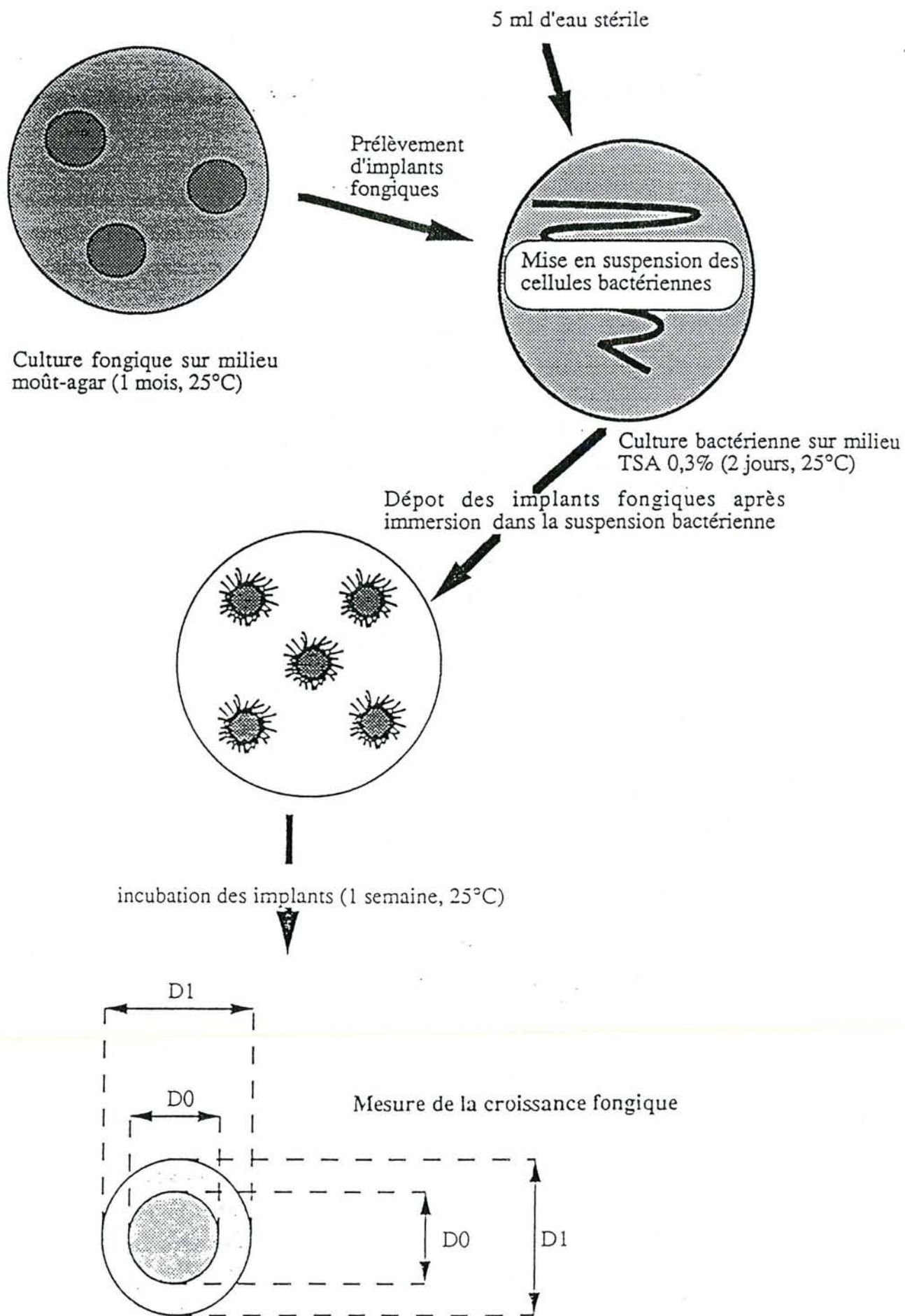


Fig.14: schéma du protocole du test de confrontation

milieu versée dans chaque boîte est calculée de façon à obtenir une épaisseur de gélose de 4 mm. Ces boîtes sont scellées avec du ruban adhésif et mises à incuber dans une chambre de culture (25°C, obscurité) pendant 2 à 3 semaines. Des implants gélosés sont prélevés à la périphérie de chaque colonie fongique à l'aide d'un emporte-pièce (diamètre: 6 mm) et déposés dans des boîtes de Petri vides, le mycélium orienté vers le haut. Ces boîtes de Petri ont été mises à incuber (25°C, obscurité) pendant 2 jours. Les implants présentant une reprise de croissance régulière ont été sélectionnés pour la suite du test.

Les bactéries sont cultivées dans des boîtes de Petri (diamètre: 9 cm) sur le milieu TSA (Trypsin Soy Broth, DIFCO, 3 g.l<sup>-1</sup> + Agar 20 g.l<sup>-1</sup>). Après 2 jours de culture (25°C, obscurité), les cellules bactériennes de chaque boîte de culture sont mises en suspension dans 5 ml d'eau stérile à l'aide d'une spatule en verre. Le traitement témoin a été réalisé en versant 5 ml d'eau stérile dans une boîte contenant le milieu TSA, 0,3% sans bactéries.

Les implants fongiques sont immergés dans les suspensions bactériennes pendant quelques minutes puis déposés dans des boîtes de Petri vides (diamètre: 9 cm), le mycélium orienté vers le haut. Chaque traitement est représenté par 2 boîtes contenant chacune 5 implants fongiques. Les boîtes sont mises à incuber dans une chambre de culture (25°C, obscurité) pendant 8 jours.

Après la période d'incubation, les implants fongiques sont observés à l'aide d'une loupe binoculaire et la croissance radiale mycélienne moyenne ( $\alpha$ ), exprimée en mm, a été calculée suivant 2 axes perpendiculaires de la façon suivante:

$$\alpha = ((D_1 - D_0) + (D_2 - D'_0)) / 2 \quad \text{avec}$$

$D_1$  : diamètre total en mm de l'implant fongique sur le premier axe (implant gélosé + longueur des hyphes à la périphérie de l'implant).

$D_0$  : diamètre en mm de l'implant gélosé sur le 1<sup>er</sup> axe.

$D_2$  : diamètre total en mm de l'implant fongique sur le deuxième axe (implant gélosé + longueur des hyphes à la périphérie de l'implant).

$D'_0$  : diamètre en mm de l'implant gélosé sur le 2<sup>ème</sup> axe.

Ces diamètres sont mesurés à l'aide d'un micromètre oculaire. Les deux diamètres  $D_0$  et  $D'_0$  sont inégaux car au cours de la période d'incubation l'implant gélosé s'est progressivement desséché et a perdu sa forme cylindrique.

Les mesures des diamètres sont effectuées sur les 10 implants fongiques de chaque traitement. Les moyennes ont été calculées et comparées statistiquement à celle du témoin avec le test "t" de Student (10 couples de mesures) au seuil de probabilité de 5%. Les résultats des différents traitements sont présentés en pourcentage de la moyenne obtenue dans le traitement témoin où la croissance radiale était en moyenne égale à 1mm.

Quatre vingt seize des 105 souches bactériennes préalablement isolées ont été testées (9 bactéries n'ayant pu être conservées en culture pure): Ste Hélène: 5 souches provenant toutes de mycorhizes; Morvan: 74 isolats (69 provenaient des mycorhizes et 5 de carpophores); Brouvelieures: 10 bactéries provenant toutes de carpophore, serre de Nancy: 7 souches provenant toutes de carpophores de *Laccaria laccata* .

### 2.3/ Résultats et discussion (tableau 3 ; fig.15, 16 et 17)

Les effets des différentes bactéries sont reportés dans le tableau 3. En considérant la totalité de l'échantillon (96 bactéries), nous avons obtenu 35 souches stimulatrices, 39 souches inhibitrices et 22 souches neutres vis à vis de la croissance fongique de *L. laccata* S238.

Les résultats obtenus sont présentés suivant l'origine géographique (fig.15), l'organe où a eu lieu l'isolement (mycorhize ou carpophore, fig.16) et enfin suivant leur type (fig.17).

Le faible nombre de souches bactériennes isolées à Sainte Hélène, serre de Nancy et Brouvelieures, ne nous permet pas de discuter de façon certaine leur répartition en fonction de leurs effets sur le champignon. Il semble pourtant qu'une majorité des souches isolées à partir du carpophore (86% à Nancy et 70% à Brouvelieures) stimulent la croissance du champignon (Fig.15). Pour les souches isolées dans le Morvan et à Sainte Hélène, les 3 classes de bactéries sont de taille semblable (Fig.15).

Lorsque les effets sont observés en fonction de l'organe d'origine (Fig.16), le pourcentage des classes de bactéries inhibitrices ou stimulatrices est semblable. Celui des bactéries isolées du carpophore et qui n'ont aucun effet sur la croissance fongique est très faible (9%) comparé à ceux obtenus pour les deux autres groupes (59% pour les bactéries stimulatrices et 32% pour les bactéries inhibitrices).

La répartition des bactéries selon leur type (fig.17) est semblable à celle obtenue en fonction de l'organe d'origine (Fig.16). Cependant 71% des 7 souches isolées à partir du milieu *Pseudomonas fluorescents* ont une action inhibitrice. Mais le faible nombre des souches ne nous permet pas de tirer des conclusions certaines.

Tableau 3: effet des bactéries sur la croissance radiale du champignon après 8 jours de confrontation. Les résultats sont exprimés en % de celle obtenue dans le traitement témoin. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05). (+): effet stimulateur ou (-) inhibiteur ou (0) non significatif des bactéries sur la croissance du champignon.

Bactéries	Croissance	Bactéries	Croissance	Bactéries	Croissance
MB1(-)	63,1*	MB5(0)	90,0	MB6(+)	141,5*
MB2(-)	0*	MB7(0)	115,5	MB8(+)	116,8*
MB3(-)	0*	MB10(0)	100,0	MB12(+)	149,3*
MB4(-)	0*	MB11(0)	92,6	MB15(+)	126,3*
MB9(-)	68,9*	MB13(0)	92,5	MB21(+)	137,8*
MB14(-)	68,6*	MB20(0)	90,3	MB28(+)	148,8*
MB16(-)	78,4*	MB24(0)	110,5	MB29(+)	126,5*
MB17(-)	0*	MB30(0)	104,2	MB34(+)	122,6*
MB18(-)	62,7*	MB32(0)	111,0	MB36(+)	139,6*
MB19(-)	64,2*	MB33(0)	115,2	MB45(+)	148,8*
MB22(-)	72,6*	MB38(0)	96,8	MB48(+)	111,6*
MB23(-)	62,4*	MB40(0)	116,1	MB49(+)	121,3*
MB25(-)	77,9*	MB51(0)	105,3	MB50(+)	119,6*
MB26(-)	72,8*	MB55(0)	97,9	MB52(+)	112,4*
MB27(-)	74,2*	MB58(0)	108,1	MB53(+)	132,4*
MB31(-)	79,3*	MB61(0)	96,5	MB60(+)	121,6*
MB35(-)	33,6*	MB64(0)	99,6	MB62(+)	143,2*
MB37(-)	64,7*	MB68(0)	104,6	MB63(+)	123,0*
MB39(-)	76,8*	SHB2(0)	94,9	MB65(+)	128,9*
MB41(-)	78,4*	SHB3(0)	113,2	MB69(+)	154,8*
MB42(-)	45,6*	BBc4(0)	102,7	SHB1(+)	138,9*
MB43(-)	80,6*	BBc10(0)	101,0	SHB4(+)	122,7*
MB44(-)	65,0*			SBc1(+)	112,3*
MB46(-)	79,2*			SBc2(+)	124,3*
MB47(-)	53,7*			SBc3(+)	112,3*
MB54(-)	71,5*			SBc4(+)	151,3*
MB56(-)	71,3*			SBc5(+)	122,7*
MB57(-)	79,5*			SBc6(+)	169,1*
MB59(-)	63,1*			BBc1(+)	125,8*
MB66(-)	82,6*			BBc2(+)	140,4*
MB67(-)	73,2*			BBc3(+)	124,3*
SHB5(-)	66,3*			BBc5(+)	160,0*
SBc7(-)	71,5*			BBc6(+)	126,1*
MBc1(-)	69,2*			BBc8(+)	165,6*
MBc2(-)	89,6*			BBc9(+)	131,3*
MBc3(-)	61,8*				
MBc4(-)	81,8*				
MBc5(-)	44,2*				
BBc7(-)	71,5*				

Fig.15: répartition du nombre de bactéries (en %) en fonction de leur effet sur la croissance du champignon et en fonction du site géographique où elles ont été isolées (Effet (+): effet stimulateur, effet (-): effet inhibiteur, effet (0): effet neutre)

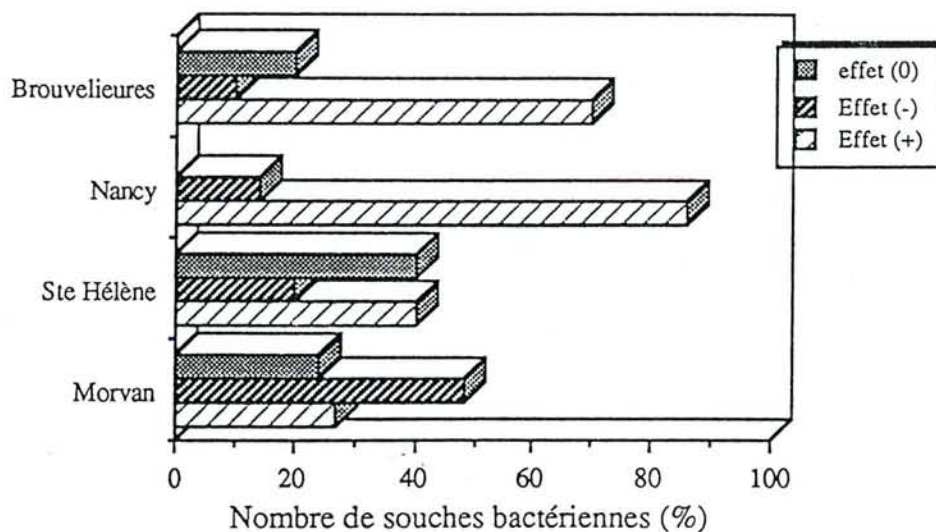


Fig 16: répartition du nombre de bactéries (en %) en fonction de leur effet sur la croissance du champignon et en fonction de l'organe (mycorhize ou carpophore) où elles ont été isolées

(Effet (+): effet stimulateur, effet (-): effet inhibiteur, effet (0): effet neutre)

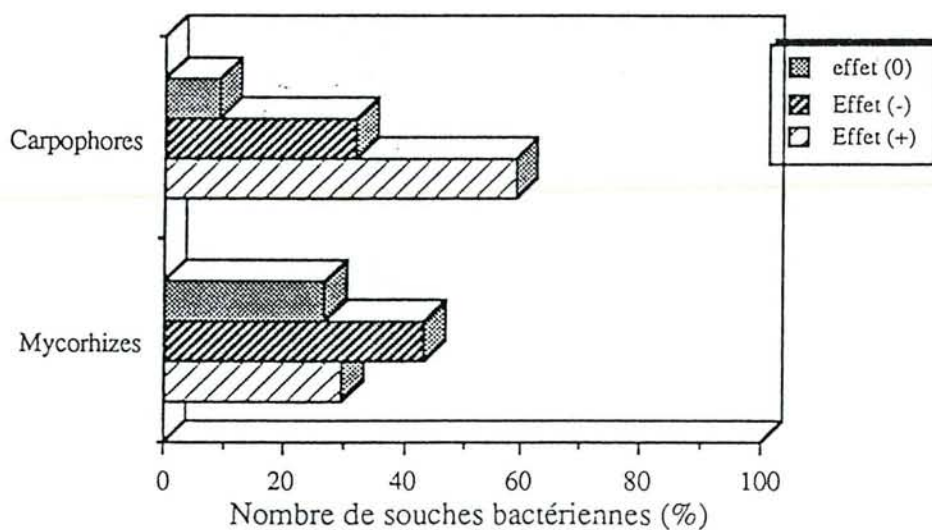
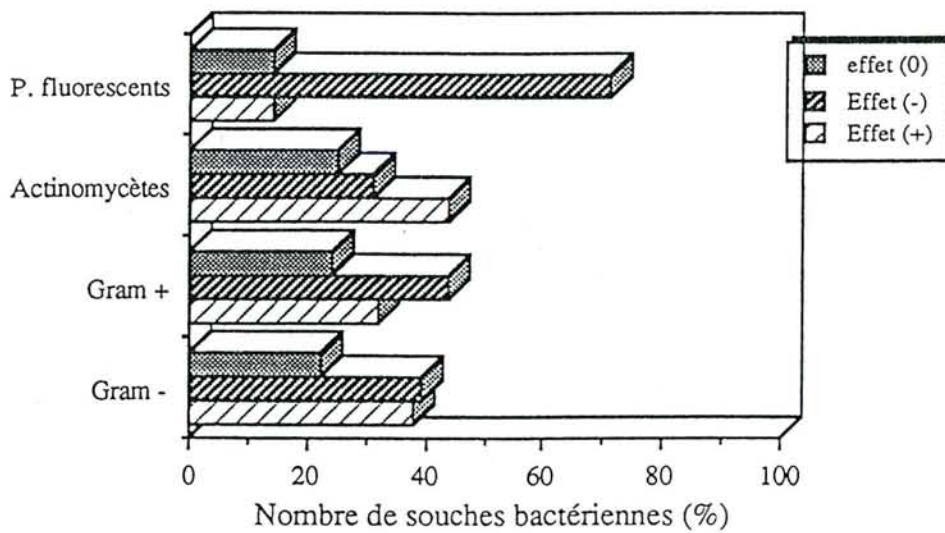


Fig 17: répartition du nombre de bactéries (en %) en fonction de leur effet sur la croissance du champignon et en fonction de leur type (Gram +, Gram -, actinomycètes, P. fluorescents).

(Effet (+): effet stimulateur, effet (-): effet inhibiteur, effet (0): effet neutre)





*Ainsi, avec ces résultats concernant l'effet des bactéries sur la croissance fongique et dans les limites qui nous sont imposées par la taille de l'échantillonnage et la technique de criblage in vitro utilisée, il semble que la qualité de l'effet bactérien ne soit pas liée à l'origine de l'isolement, au type bactérien et à l'organe (mycorhize ou carpophore).*

C/ Mise en évidence de l'action des bactéries associées sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 en serre et en conditions axéniques

**1/ Confrontation bactérie - champignon - plante hôte en serre, dans des conditions non axéniques, en période estivale (Expérience 1)**

L'objectif de la seconde étape de cette étude était de mettre en évidence l'effet de différentes souches bactériennes sur l'infection ectomycorhizienne. Nous avons choisi de les tester en serre, dans des conditions non axéniques pour des raisons pratiques. En effet ce type d'expérience et le type de matériels utilisés nous a permis d'étudier un nombre assez important de souches bactériennes.

Afin de vérifier notre hypothèse de travail, des isolats bactériens ayant stimulé la croissance du champignon *in vitro* (29 souches parmi les 35 souches ayant stimulé la croissance fongique dans l'expérience de criblage) ont été retenues. De plus, 8 souches bactériennes neutres et 10 inhibitrices ont aussi été testées, à titre de témoins.

L'expérience de confrontation bactérie - champignon - plante en conditions de serre a été effectuée au cours de l'été 1989. Les variations de température y étaient importantes (de 15 à plus de 30°C).

1.1/ Matériels et méthodes

1.1.1/ Inoculum fongique

Le mélange tourbe blonde de sphagnes - vermiculite expansée a été choisi comme support de culture du champignon (Marx & Bryan, 1975). Des bocaux en verre (Vol.: 1,6 l) ont été remplis par 1,3 litre du mélange tourbe-vermiculite (1:5, 4:5, v:v) puis autoclavés (120°C, 20 min). Après cette première stérilisation, le substrat a été humidifié par 600 ml de milieu liquide Pachlewski modifié (la concentration en tartrate d'ammonium a été augmentée de 5mM à 25 mM (Pachlewski & Pachlewska, 1974). Les bocaux ont été ensuite fermés à l'aide de bouchons vissés et percés d'un trou (diamètre: 1 cm). Ce trou a été obstrué par un morceau de coton cardé ce qui permettait les échanges gazeux entre l'extérieur et l'intérieur des bocaux d'inoculum afin d'avoir une croissance fongique normale.

Les bocaux ainsi préparés ont été autoclavés une deuxième fois ( 120°C, 20 min ). Après refroidissement du mélange tourbe - vermiculite, une dizaine d'implants gélosés issus de cultures de *Laccaria laccata* en boîte de Petri ont été introduits aseptiquement dans chaque bocal. Les bocaux ont ensuite été placés dans une chambre de culture, à une température de 25°C et à l'obscurité pendant environ 5 semaines.

#### 1.1.2/ Inoculum bactérien

Les isolats bactériens retenus ont été cultivés dans des flacons de 90 ml contenant 10 ml de milieu TSB 0,3% à 25°C, sous agitation continue, pendant environ 8 jours. Ces cultures ont ensuite été centrifugées (2400g, 15 min, centrifugeuse JOUAN type E 82 S ). Puis le surnageant a été éliminé et les cellules bactériennes composant le culot ont été remises en suspension dans 10 ml de solution de sulfate de magnésium 0,1 M. Ces suspensions bactériennes ont été diluées 25 fois avec de l'eau osmosée juste avant l'inoculation.

#### 1.1.3/ Dispositif expérimental

Les semences de Douglas provenaient de la zone 421 de l'état de Washington (USA). Dans cette expérience les graines ont été prétraitées par une stratification dans de la tourbe humide, au froid ( 4°C ) pendant 1 mois

Les 3 composantes du système (Bactérie-Champignon-Plante) ont été confrontées dans des conteneurs type HIKO en polyéthylène. Ceux ci sont constitués par 40 alvéoles de 95 ml chacune.

Les conteneurs ont été remplis avec le mélange tourbe-vermiculite (1:1, v:v) contenant l'inoculum fongique (1:10, v:v). Dans chaque alvéole, 5 ml d'une suspension bactérienne ont été injectés à l'aide d'une seringue. Un traitement bactérien était représenté par un conteneur, soit 40 semis. Cinq millilitres de tampon MgSO<sub>4</sub> 0,1M ont été injectés dans chaque alvéole du traitement témoin.

Trois graines ont ensuite été semées par alvéoles. Au stade cotylédonnaire, les plants ont été démarriés afin de ne garder qu' un semis par alvéole.

Pendant 5 semaines après le semis, les jeunes plants ont été arrosés avec de l'eau osmosée puis une solution nutritive a été apportée à raison de 2 arrosages par semaine. Cette solution nutritive a été mise au point au laboratoire de l'INRA de Nancy afin que les semis ne soient pas carencés en éléments minéraux mais sans gêner le processus de mycorhization. Cette solution avait la composition suivante: KNO<sub>3</sub>: 8,0g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 18,8g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1H<sub>2</sub>O: 0,9g, MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 7,4g, H<sub>2</sub>O osmosée: 100 l

Après différents temps de culture (2, 3 et 4 mois), 10 plants ont été prélevés au hasard dans chaque conteneur. Le taux de mycorhization ( nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales ) a été calculé en comptant toutes les racines courtes de chaque semis après 2 mois et sur un échantillon de 100 racines courtes après 3 et 4 mois de culture. Le poids sec des parties aériennes et racinaires ont été déterminés pour chaque plant dans chaque traitement. La moyenne de ces différents paramètres dans chaque traitement a été comparée à celle du témoin par le test "t" de Student au risque de 5%. En ce qui concerne le taux de mycorhization, les valeurs obtenues ont été préalablement transformées par la fonction Arc sin  $\sqrt{x}$ .

Pendant la durée de l'expérience, les plaques HIKO ont été déplacées sur la table afin de ne pas introduire un biais dans les résultats car certains paramètres (température, luminosité) sont variables d'une extrémité de la table à l'autre.

### 1.2/ Résultats et discussion (tableaux 4, 5 et 6)

Seuls les effets bactériens obtenus sur la mycorhization seront exposés dans cette partie.

Après 2 mois de culture (tableau 4), 3 isolats bactériens (SBc2, SBc5 et MB3) ont significativement stimulé la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 (de 60 à respectivement 88, 88 et 89%). Vingt deux souches bactériennes (MB8, MB21, MB29, MB49, MB50, MB52, MB53, MB65, SBc4, SBc6, BBc2, BBc3, BBc5, MB5, MB10, MB20, MB51, MB55, MB1, MB2, MBc3 et MBc4) ont significativement inhibé la mycorhization. Les 22 autres souches bactériennes testées n'ont eu aucun effet significatif.

Après 3 mois de culture (tableau 5), 2 isolats bactériens (MB69 et MB3) ont significativement stimulé la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 (de 64 à respectivement 89 et 90%). Des inhibitions significatives ont été observées avec les souches bactériennes MB10, MB51, MB55 et MB23. Les 41 autres isolats bactériens testés n'ont eu aucun effet significatif.

Après 4 mois de culture (tableau 6), une stimulation du taux de mycorhization (de 67 à plus de 97%) a été observée dans 14 traitements bactériens (MB6, MB8, MB28, MB29, MB69, SHB1, SBc4, SBc5, BBc1, BBc3, BBc6, MB38, MB2 et MB3). Deux traitements bactériens (MB10 et MB51) ont significativement inhibé ce phénomène. Les autres traitements n'ont eu aucun effet significatif (31 bactéries).

Tableau 4: effets bactériens sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 2 mois de culture dans l'expérience 1.

Traitements	Taux de mycorhization (%)	traitements	Taux de mycorhization (%)
Témoin	60,0		
MB6 (+)	43,4	BBc3 (+)	21,4*
MB8 (+)	20,0*	BBc5 (+)	15,2*
MB21 (+)	32,7*	BBc6 (+)	51,4
MB28 (+)	52,5	BBc8 (+)	45,0
MB29 (+)	21,2*	BBc9 (+)	40,6
MB36 (+)	57,6	MB5 (0)	25,9*
MB45 (+)	41,9	MB10 (0)	18,4*
MB48 (+)	54,3	MB20 (0)	32,1*
MB49 (+)	29,0*	MB38 (0)	50,2
MB50 (+)	34,7*	MB51 (0)	13,7*
MB52 (+)	22,9*	MB55 (0)	21,3*
MB53 (+)	20,7*	MB61 (0)	52,5
MB62 (+)	46,1	BBc4 (0)	49,0
MB65 (+)	24,8	MB1 (-)	23,5*
MB69 (+)	66,2	MB2 (-)	25,4*
SHB1 (+)	70,7	MB3 (-)	89,3*
SBc1 (+)	54,8	MB4 (-)	41,6
SBc2 (+)	88,5*	MB23 (-)	45,3
SBc3 (+)	53,7	MB35 (-)	68,7
SBc4 (+)	17,0*	MBc3 (-)	36,0
SBc5 (+)	87,9*	MBc4 (-)	19,0*
SBc6 (+)	32,7*	MBc5 (-)	61,1
BBc1 (+)	66,6	BBc7 (-)	66,1
BBc2 (+)	23,6*		

Les sigles désignant les souches bactériennes sont suivis par leur effet sur la croissance fongique: (+): effet stimulateur ; (-): effet inhibiteur ; (0): effet neutre.

Taux de mycorhization = (Nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) x 100.

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

Tableau 5: effets bactériens sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 3 mois de culture dans l'expérience 1.

Traitements	Taux de mycorhization (%)	traitements	Taux de mycorhization (%)
Témoin	64,3		
MB6 (+)	81,3	BBc3 (+)	64,3
MB8 (+)	55,3	BBc5 (+)	31,9*
MB21 (+)	47,7	BBc6 (+)	83,6
MB28 (+)	61,3	BBc8 (+)	55,4
MB29 (+)	39,3*	BBc9 (+)	75,1
MB36 (+)	71,0	MB5 (0)	51,8
MB45 (+)	44,3	MB10 (0)	36,7*
MB48 (+)	62,0	MB20 (0)	67,8
MB49 (+)	70,7	MB38 (0)	68,2
MB50 (+)	57,7	MB51 (0)	30,7*
MB52 (+)	44,6	MB55 (0)	24,3*
MB53 (+)	77,3	MB61 (0)	72,0
MB62 (+)	73,4	BBc4 (0)	53,0
MB65 (+)	64,8	MB1 (-)	53,0
MB69 (+)	89,3*	MB2 (-)	50,7
SHB1 (+)	84,0	MB3 (-)	90,3*
SBc1 (+)	59,7	MB4 (-)	68,3
SBc2 (+)	82,0	MB23 (-)	33,3*
SBc3 (+)	61,2	MB35 (-)	60,2
SBc4 (+)	77,0	MBc3 (-)	49,7
SBc5 (+)	74,0	MBc4 (-)	58,7
SBc6 (+)	55,1	MBc5 (-)	71,3
BBc1 (+)	72,0	BBc7 (-)	63,7
BBc2 (+)	53,3		

Les sigles désignant les souches bactériennes sont suivis par leur effet sur la croissance fongique: (+): effet stimulateur ; (-): effet inhibiteur ; (0): effet neutre.

Taux de mycorhization = (Nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) x 100.

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

Tableau 6: effets bactériens sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 4 mois de culture dans l'expérience 1.

Traitements	Taux de mycorhization (%)	traitements	Taux de mycorhization (%)
Témoin	67,3		
MB6 (+)	<b>87,6*</b>	BBc3 (+)	<b>84,0*</b>
MB8 (+)	<b>85,7*</b>	BBc5 (+)	68,6
MB21 (+)	71,7	BBc6 (+)	<b>82,7*</b>
MB28 (+)	<b>84,0*</b>	BBc8 (+)	74,0
MB29 (+)	<b>92,7*</b>	BBc9 (+)	74,3
MB36 (+)	76,6	MB5 (0)	68,0
MB45 (+)	71,7	MB10 (0)	45,9*
MB48 (+)	69,3	MB20 (0)	80,3
MB49 (+)	54,7	MB38 (0)	<b>86,7*</b>
MB50 (+)	66,0	MB51 (0)	40,3*
MB52 (+)	64,7	MB55 (0)	73,0
MB53 (+)	77,0	MB61 (0)	75,3
MB62 (+)	51,0	BBc4 (0)	80,2
MB65 (+)	71,7	MB1 (-)	70,7
MB69 (+)	<b>92,3*</b>	MB2 (-)	<b>85,0*</b>
SHB1 (+)	<b>89,3*</b>	MB3 (-)	<b>97,3*</b>
SBc1 (+)	70,3	MB4 (-)	80,3
SBc2 (+)	77,6	MB23 (-)	74,7
SBc3 (+)	55,7	MB35 (-)	72,7
SBc4 (+)	<b>86,0*</b>	MBc3 (-)	80,0
SBc5 (+)	<b>90,0*</b>	MBc4 (-)	75,3
SBc6 (+)	57,7	MBc5 (-)	70,3
BBc1 (+)	<b>92,0*</b>	BBc7 (-)	61,3
BBc2 (+)	75,7		

Les sigles désignant les souches bactériennes sont suivis par leur effet sur la croissance fongique: (+): effet stimulateur ; (-): effet inhibiteur ; (0): effet neutre.

Taux de mycorhization = (Nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) x 100.

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

Ces résultats montrant les différents effets des bactéries sur l'infection ectomycorhizienne nous ont amené à définir plusieurs types bactériens (Fig.18) suivant les effets obtenus après 2 et 4 mois de culture (Ex: type (+,+): les bactéries ont stimulé l'infection ectomycorhizienne pendant toute la durée de l'expérience. Deux isolats bactériens appartiennent à ce groupe: SBc5 et MB3.

Les deux types bactériens (0,0) et (-,0) regroupent la majorité des souches testées (Fig.19). Les types (0,+) et (-,+) regroupent respectivement 15% et 11% de l'ensemble des bactéries. Les types (+,+) et (-,-) ne représentent chacun que 4% des isolats bactériens. Enfin le type (+,0) n'est représenté que par une bactérie (SBc2) soit 2% de l'ensemble. Il est à noter que les types (+,-) et (0,-) ne sont pas représentés dans cette expérience.

*Cette expérience a permis de montrer l'existence de souches bactériennes isolées de mycorhizes ou de carpophores qui peuvent stimuler la mycorhization du Douglas par Laccaria laccata S238. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'effet obtenu sur la mycorhization et le critère de sélection des bactéries in vitro.*

Afin de vérifier les résultats obtenus avec les souches des types (+,+) et (0,+) dans cette expérience 1, une autre expérience a été conduite en serre.

## 2/ Confrontation bactérie - champignon - plante hôte en serre chaude, dans des conditions non axéniques, en période hivernale (Expérience 2)

Dans cette expérience, les souches bactériennes testées ont été choisies en fonction de leurs effets dans l'expérience 1. Les 14 bactéries qui avaient stimulé la mycorhization après 4 mois de culture (types (+,+) et (0,+)) ont été retenues. Il s'agissait des isolats bactériens MB6, MB8, MB28, MB29, MB69, SHB1, SBc4, SBc5, BBc1, BBc3, BBc6, MB38, MB2 et MB3. Des bactéries appartenant au type (0,0) (MB4, MB48, BBc7, BBc9, SBc1, SBc3 et MBc5) ont été testées. Enfin les bactéries MB20, MB21, MB50 et MB52 appartenant au type (-,0) ont aussi été retenues.



Fig 18: évolution en fonction du temps du taux de mycorhization moyen calculé dans chaque type bactérien. Expérience 1.

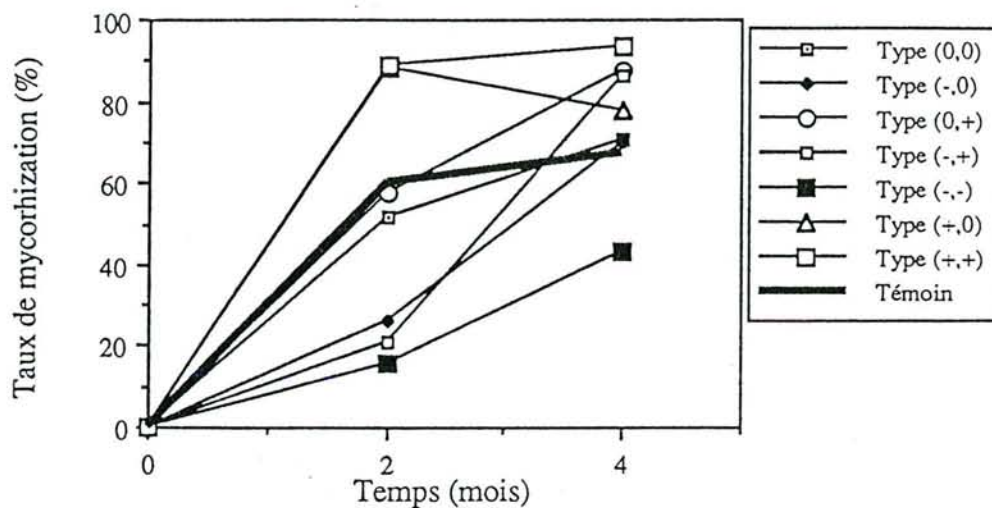
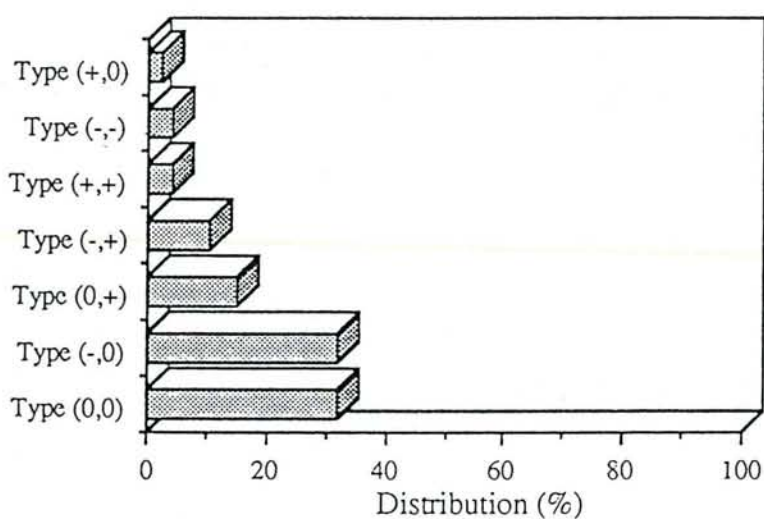


Fig.19: distribution du nombre de souches bactériennes représentant chaque type bactérien parmi les 47 souches testées



L'expérience de confrontation bactérie - champignon - plante en conditions de serre a été effectuée au cours de l'hiver 1989/90 où des variations de température y étaient importantes (de moins de 10°C à plus de 25°C).

### 2.1/ Matériels et méthodes

Cette expérience a été conduite de la même manière que celle retenue dans l'expérience 1 sauf que les semis ont été examinés après 2 et 5 mois de culture et que les graines de Douglas (zone 422 de l'état de Washington, USA) ont été immergées dans l'eau oxygénée 30% pendant 90 minutes sous agitation et lavées à l'eau distillée pendant 4 heures.

Le taux de mycorhization a été calculé en comptant toutes les racines courtes des systèmes racinaires.

### 2.2/ Résultats et discussion (tableaux 7 et 8)

- Après 2 mois de culture (tableau 7), les traitements bactériens MB2, MB8, MB38, MB48, MB50, MB52, MB69, BBc1, BBc3, BBc6, SBc3 et SHB1 ont stimulé significativement l'infection ectomycorhizienne (de 35 à plus de 87%). Les autres souches bactériennes n'ont eu aucun effet significatif.

- Après 5 mois de culture (tableau 8), les traitements bactériens MB8, MB29, MB48, BBc3, SBc1, SBc5 et SHB1 ont significativement stimulé l'infection ectomycorhizienne (de 70 à plus de 93%). Les autres traitements bactériens n'ont pas induit d'effets significatifs.

Aucune inhibition de la mycorhization par les bactéries n'a été observée, ce qui ne contredit pas les résultats de la première expérience qui, pourtant, ont été obtenus dans des conditions climatiques différentes. Après cinq mois de culture, 7 souches bactériennes ont stimulé la mycorhization. Cinq d'entre elles (MB8, MB28, BBc3, SBc5 et SHB1) étaient du type (+,+) ou (0,+) et les deux autres (SBc1 et MB48) étaient du type (0,0). Si nous considérons globalement les résultats obtenus après 2 et 5 mois de culture, parmi toutes les bactéries du type (+,+) ou (0,+), seules MB3, MB6, MB28 et SBc4 n'ont pas stimulé l'infection ectomycorhizienne.

*En conséquence, cette expérience 2 conduite dans des conditions climatiques différentes de l'expérience 1, a permis de retrouver les effets positifs de la majorité des*

Tableau 7: effets bactériens sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 2 mois de culture dans l'expérience 2.

Traitements	Taux de mycorhization (%)	traitements	Taux de mycorhization (%)
Témoin	35,9		
MB6 (+)	36,9	SBc5 (+)	54,2
MB8 (+)	82,9*	BBc1 (+)	75,2*
MB21 (+)	57,3	BBc3 (+)	81,2*
MB28 (+)	62,5	BBc6 (+)	61,3*
MB29 (+)	63,1	BBc9 (+)	51,3
MB48 (+)	74,9*	MB20 (0)	51,7
MB50 (+)	59,4*	MB38 (0)	68,3*
MB52 (+)	85,9*	MB2 (-)	77,3*
MB69 (+)	87,7*	MB3 (-)	48,7
SHB1 (+)	62,7*	MB4 (-)	51,9
SBc1 (+)	45,2	MBc5 (-)	36,8
SBc3 (+)	77,1*	BBc 7 (-)	45,9
SBc4 (+)	46,9		

Les sigles désignant les souches bactériennes sont suivis par leur effet sur la croissance fongique: (+): effet stimulateur ; (-): effet inhibiteur ; (0): effet neutre.

Taux de mycorhization = (Nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) x 100.

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

Tableau 8: effets bactériens sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 5 mois de culture dans l'expérience 2.

Traitements	Taux de mycorhization (%)	traitements	Taux de mycorhization (%)
Témoin	69,8		
MB6 (+)	74,2	SBc5 (+)	85,4*
MB8 (+)	90,1*	BBc1 (+)	75,1
MB21 (+)	81,8	BBc3 (+)	90,8*
MB28 (+)	67,4	BBc6 (+)	80,3
MB29 (+)	87,1*	BBc9 (+)	82,5
MB48 (+)	93,3*	MB20 (0)	63,9
MB50 (+)	79,3	MB38 (0)	72,7
MB52 (+)	72,7	MB2 (-)	78,4
MB69 (+)	87,7*	MB3 (-)	77,6
SHB1 (+)	89,6*	MB4 (-)	77,4
SBc1 (+)	88,2*	MBc5 (-)	77,0
SBc3 (+)	83,5	BBc 7 (-)	73,7
SBc4 (+)	79,3		

Les sigles désignant les souches bactériennes sont suivis par leur effet sur la croissance fongique: (+): effet stimulateur ; (-): effet inhibiteur ; (0): effet neutre.

Taux de mycorhization = (Nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) x 100.

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

*bactéries (10 parmi 14 isolats bactériens) qui avaient stimulé la mycorhization dans l'expérience 1.*

Afin de vérifier si ces résultats étaient reproductibles, une troisième expérience en serre a été réalisée.

### **3/ Confrontation bactérie - champignon - plante hôte en serre non climatisée en période hivernale (Expérience 3)**

Cette expérience a débuté en octobre 1989 dans la serre climatisée utilisée pour les 2 premières expériences. Après 2 mois de culture, les conteneurs ont été transférés dans une serre non climatisée pour des raisons pratiques. Les prélèvements ont été effectués 2 mois après ce transfert, donc après un temps de culture total de 4 mois.

Quinze isolats bactériens ont été testés. Huit faisaient partie des types (+,+) ou (0,+) de l'expérience 1 (SHB1, SBc5, MB2, MB3, MB8, MB69, BBc3 et BBc6). Le type (0,0) était représenté par 4 bactéries (MB4, MB48, SBc1 et BBc7). Enfin 3 bactéries classées dans le type (-,0) (MB49, MB50 et MB52) ont été retenues.

#### 3.1/ Matériels et méthodes

Ils étaient identiques à ceux de l'expérience 1 sauf qu'un seul prélèvement a été effectué après 4 mois de culture. Le taux de mycorhization a été déterminé en comptant toutes les racines courtes des systèmes racinaires.

#### 3.2/ Résultats et discussion (tableau 9)

Parmi les bactéries des types (+,+) et (0,+), seulement 3 n'ont pas stimulé significativement la mycorhization (MB69, MB3 et MB8). Toutes les autres ont eu un effet positif sur le taux de mycorhization (de 44 à plus de 83%). Toutes les bactéries ayant été classées dans le type (0,0) et MB49, bactérie du type (-,0), ont stimulé significativement la mycorhization. (MB50 et MB52) n'ont eu aucun effet significatif.

Les effets des bactéries des types (+,+) et (0,+) ont été reproduits pour 5 d'entre elles (SHB1, SBc5, BBc6, BBc3 et MB2), les autres n'ayant pas eu d'effets significatifs. D'autres bactéries qui n'avaient pas eu d'effet positif dans l'expérience 1 ont

Tableau 9: effets bactériens sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 4 mois de culture dans l'expérience 3.

Traitements	Taux de mycorhization (%)	traitements	Taux de mycorhization (%)
Témoin	44,0		
MB8 (+)	51,2	SBc5 (+)	79,3*
MB48 (+)	68,5*	BBc3 (+)	76,6*
MB49 (+)	80,8*	BBc6 (+)	73,2*
MB50 (+)	41,2	MB2 (-)	73,7*
MB52 (+)	24,3	MB3 (-)	64,1
MB69 (+)	53,7	MB4 (-)	79,3*
SHB1 (+)	83,5*	BBc7 (-)	76,1*
SBc1 (+)	61,0*		

Les sigles désignant les souches bactériennes sont suivis par leur effet sur la croissance fongique: (+): effet stimulateur ; (-): effet inhibiteur ; (0): effet neutre.

Taux de mycorhization = (Nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) x 100.

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

cette fois stimulé la mycorhization (SBc1, MB48, MB4, BBc7 et MB49). Pourtant, dans cette troisième expérience en serre, les résultats obtenus ne sont pas en contradiction avec ceux observés dans les 2 expériences précédentes puisque qu'aucune inhibition de la mycorhization n'a été observée.

*Il a été démontré une nouvelle fois dans cette troisième expérience réalisée dans des conditions climatiques différentes des 2 premières que certaines souches bactériennes pouvaient stimuler l'infection ectomycorhizienne. Les résultats obtenus confirment dans certains cas les effets obtenus avec quelques bactéries mais n'infirment pas les conclusions émises à l'égard des autres isolats .*

*Grâce à ces 3 expériences, nous avons pu obtenir une collection de souches bactériennes qui stimulent la mycorhization du Douglas par Laccaria laccata S238 (de 67% pour le témoin à plus de 97% avec certaines bactéries) et qui peuvent en conséquence être appelées bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM).*

Pourtant, une inconnue demeure: cet effet positif est-il dû directement aux bactéries ou alors est-ce la conséquence indirecte de leur présence? La bactérie pourrait en effet agir sur des microorganismes antagonistes susceptibles de gêner la mycorhization ou certains contaminants naturels qui par contre pourraient stimuler l'infection (Malajczuk & Mc Comg, 1979 ; Nesbitt *et al* , 1981 ; Malajczuk, 1988 ; De Oliveira & Garbaye, 1989). Une expérience en conditions axéniques mettant en jeu uniquement la plante hôte, le champignon et une BAM donnée était donc nécessaire.

#### **4/ Confrontation bactérie - champignon - plante hôte en conditions axéniques (Expérience 4)**

Afin de montrer si la stimulation de la mycorhization pouvait être attribuée à la bactérie seule, nous avons confronté les 3 organismes (plante hôte, champignon, bactérie) dans une expérience en conditions axéniques. Cette expérience devait se rapprocher le plus possible des conditions dans lesquelles s'étaient déroulées les 3 expériences en serre. En particulier, nous ne devons pas apporter des composés carbonés simples dans le substrat de culture (par exemple le glucose qui est souvent apporté dans les expériences de synthèse de mycorhizes *in vitro* ). Les éléments carbonés

servant de nutriments énergétiques au champignon et aux bactéries devaient donc provenir de l'exsudation racinaire. En conséquence, les semis ne devaient pas avoir une photosynthèse perturbée par les conditions expérimentales. Une technique de culture répondant à ces impératifs a dû être mise au point: le système racinaire est maintenu dans des conditions stériles alors que les parties aériennes sont situées à l'extérieur du tube (conditions non axéniques) donc dans une atmosphère non confinée.

#### 4.1/ Matériels et méthodes

##### 4.1.1/ Désinfection des graines de Douglas

Les graines de Douglas sont connues pour avoir une dormance assez profonde. Ceci entraîne, en particulier pour des graines qui ont été conservées pendant quelques années, une diminution du pouvoir germinatif et une levée lente et irrégulière des semis (Bonnet-Masimbert & Muller, 1974). Un certain nombre de procédés physiques sont utilisés pour lever cette dormance: trempage dans l'eau à 55°C durant quelques heures, trempage instantané dans l'eau bouillante, traitement par le froid humide (stratification), trempage dans l'azote liquide. Certains pépiniéristes utilisent des traitements chimiques: trempage dans l'eau oxygénée, exposition à l'éthylène et traitement par l'acide abscissique et l'acide gibbéréllique.

Dans le cadre de cette expérience en conditions axéniques, l'objectif était d'obtenir une germination importante, rapide, et de disposer de graines germées normales et indemnes de contaminants. Nous avons essayé et comparé plusieurs techniques de désinfection des graines, en travaillant en atmosphère stérile dans une hotte à flux laminaire. Ces graines provenaient de l'état de Washington (zone 412).

##### - Technique Mejstrik & Krause (1973)

Les graines sont trempées dans l'eau à 5°C pendant 72 heures puis 1 heure dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%, puis sont rincées dans l'eau stérile pendant 4 heures.

##### - Technique Marx & Bryan (1970)

Les graines sont trempées pendant 5 jours dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1% et à 5°C, puis désinfectées superficiellement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% pendant 20 minutes et rincées dans l'eau stérile pendant 4 heures.

- Technique Chu Chou (1979)

Cette technique utilisant l'hypochlorite de calcium (CaClO, 0,7%) se déroule en 2 étapes.

- 1<sup>ère</sup> étape: les graines sont lavées en continu pendant 2 heures à l'eau du robinet. Ensuite elles sont trempées pendant quelques secondes dans l'alcool à 95% puis pendant 20 minutes dans l'hypochlorite de calcium. Les graines ainsi traitées sont soigneusement rincées dans l'eau stérile puis conservées dans l'eau stérile à 5°C pendant 12 heures.

- 2<sup>ème</sup> étape: les graines sont trempées pendant 2 minutes dans l'hypochlorite de calcium puis rincées dans l'eau stérile pendant 4 heures.

- Technique Kabre (1982), originellement utilisée pour la désinfection des graines de *Pinus caribaea*

Les graines sont trempées pendant 2 à 3 minutes dans de l'acide sulfurique concentré puis sont rincées abondamment dans l'eau stérile pendant 4 heures.

- Technique Kabre modifiée

Les graines sont trempées pendant une minute dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré puis 10 minutes dans l'eau oxygénée à 30%. Ensuite les graines sont soigneusement rincées dans l'eau stérile pendant 4 heures.

- Techniques utilisant uniquement l'eau oxygénée à 30%

Les graines sont trempées dans l'eau oxygénée 30% pendant 30 ou 60 ou 90 minutes puis rincées abondamment dans l'eau stérile.

Ces diverses modalités de désinfection ont été testées sur des lots de 20 graines. Les graines traitées ont été mises à incuber dans des boîtes de Petri (diamètre: 9cm) à raison de 5 graines par boîte, sur de l'eau gélosée. Les taux de germination ont été calculés après 10 jours d'incubation à 25°C, à l'obscurité.

Le tableau 10 montre que les techniques n'utilisant pas l'eau oxygénée seule n'ont pas donné de résultats concluants tant au niveau de la germination (de 0 à 25% de germination) que de la désinfection des graines. Lorsque l'eau oxygénée a été utilisée seule, le meilleur traitement s'est avéré être celui où les graines étaient trempées pendant 90 minutes (taux de germination de 73% et très peu de graines contaminées). Nous avons donc choisi d'utiliser ce procédé pour l'expérience conduite en conditions axéniques. Le milieu de germination utilisé dans ces différentes expériences était composé uniquement d'eau gélosée. Afin de permettre à toutes les contaminations éventuelles de se développer,

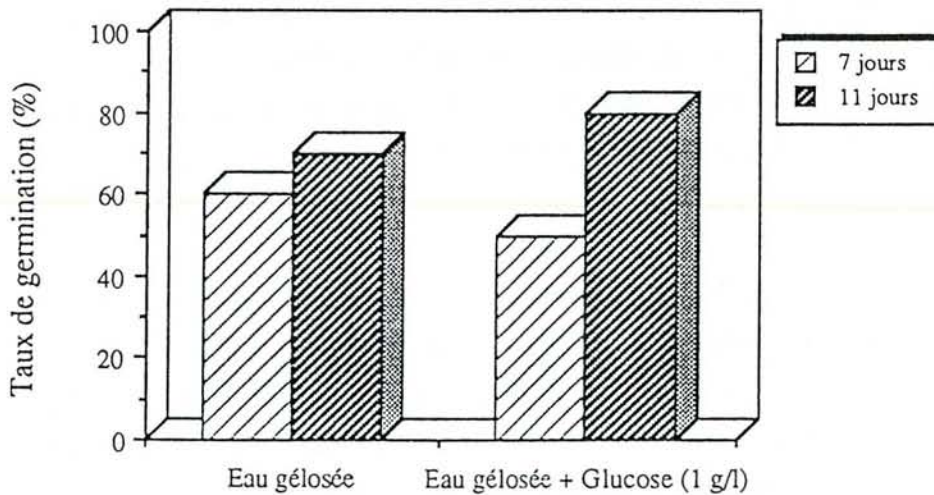


Tableau 10: efficacité des différentes techniques de désinfection sur la germination en conditions axéniques

Techniques de désinfection (%)	Contaminations	Taux de germination
Mejstrik & Krause <sup>(1)</sup>	++ <sup>(2)</sup>	15,0
Marx & Bryan	++	15,0
Chu Chou	+++	10,0
Kabre	+++	25,0
Kabre modifiée	0	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 min)	+++	13,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (60 min)	++	33,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (90 min)	+	73,3

: le protocole de ces différentes techniques est indiqué dans le texte

: 0: pas de contaminations ; +: environ 10% des graines sont contaminées ; ++: environ 50% des graines sont contaminées ; +++: environ 90% des graines sont contaminées.

Fig. 20: comparaison de deux types de milieu sur la germination des graines désinfectées (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (90 min)) après 7 et 11 jours d'incubation.

nous avons testé un autre milieu d'incubation en rajoutant du glucose à une concentration de  $1 \text{ g.l}^{-1}$ . Les graines ont été trempées pendant 90 minutes dans l'eau oxygénée à 30% puis soigneusement lavées à l'eau stérile pendant 4 heures. Elles ont ensuite été mises à germer dans des boîtes de Petri sur 2 types de milieu: eau gélosée ou eau gélosée + glucose ( $1 \text{ g.l}^{-1}$ ). La figure 21 montre que la présence de glucose n'interfère pas avec la germination des graines.

Ainsi le protocole choisi a été le suivant:

- *trempage des graines pendant 90 minutes dans de l'eau oxygénée à 30%*
- *lavage des graines à l'eau stérile pendant 4 heures sous agitation*
- *mise en germination sur un milieu eau gélosée + glucose ( $1 \text{ g/l}$ )*

#### 4.1.2/ Préparation des inocula bactériens et fongiques

Les inocula ont été préparés de la même manière que pour l'expérience 1 (page 49).

#### 4.1.3/ Préparation des tubes de cultures

Des tubes à essai en verre (3x15cm) préalablement autoclavés ( $120^{\circ}\text{C}$ , 20 min), ont été remplis sous la hotte à flux laminaire avec le mélange tourbe - vermiculite (1:1, v:v) humidifié par la solution nutritive utilisée dans l'expérience 1 (page 49). L'inoculum fongique a été mélangé à ce substrat dans des proportions de 1 pour 10 (v:v). Un millilitre d'une suspension bactérienne concentrée (plus de  $10^8 \text{ cfu.ml}^{-1}$ ) dans du sulfate de magnésium 0,1 M est injecté dans chaque tube. Le traitement témoin est réalisé en injectant 1 ml de  $\text{MgSO}_4$  0,1 M sans bactéries. Les tubes ont été bouchés par des morceaux de papier d'aluminium autoclavés ( $120^{\circ}\text{C}$ , 20 min). Une graine germée ayant une racine de 1 à 2 cm a été introduite dans chaque tube dans un trou réalisé dans le papier d'aluminium. L'espace entre la périphérie du trou et la racine a été comblé par du mastic (Terosta 2, Térosion) autoclavé ( $120^{\circ}\text{C}$ , 20 min).

Ce système de culture a permis de tester 7 souches bactériennes (MB3, MB6, MB28, SHB1, BBc1, BBc6 et SBc5) qui avaient stimulé la mycorhization en serre. Les tubes (10 par traitement) ont été placés pendant 4 semaines dans une chambre de culture (Température jour:  $23^{\circ}\text{C}$ , nuit:  $17^{\circ}\text{C}$ , photopériode: 16h, luminosité:  $240 \mu\text{E. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , humidité relative: 80%). Après cette période d'incubation, le taux de mycorhization (nombre de racines courtes mycorhizées/nombre de racines courtes totales) a été

déterminé pour chaque plant dans chaque traitement. Les valeurs obtenues ont été transformées par la fonction  $\text{Arc sin}(\sqrt{x})$ . Les moyennes obtenues ont été comparées à celle du témoin par le test "t" de Student ( $P=0,05$ ).

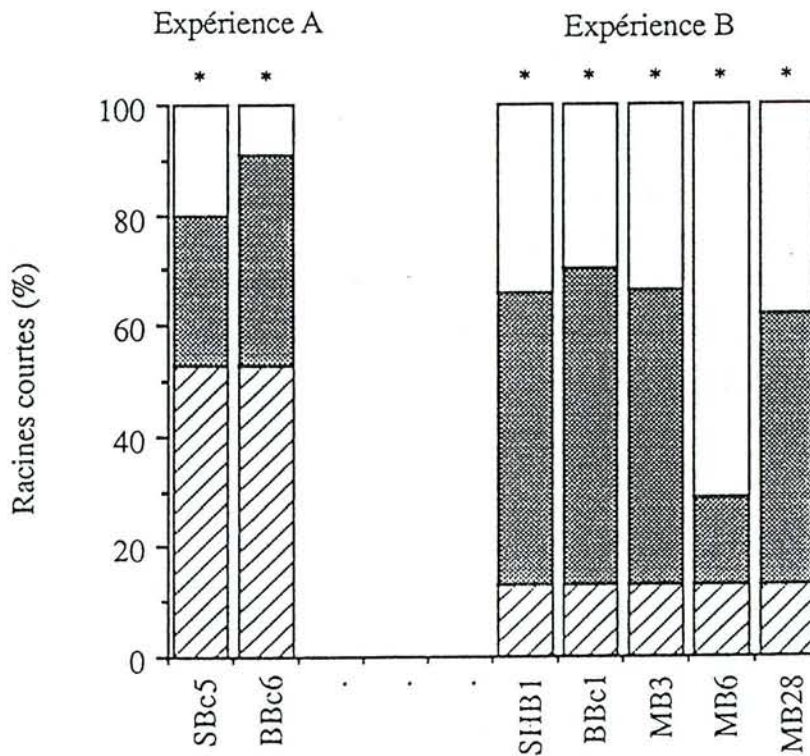
#### 4.2/ Résultats et discussion (fig.21)

Les résultats ont été obtenus à partir de deux séries d'expériences (A et B) ce qui explique les taux de mycorhization différents dans les traitements témoins. Toutes les bactéries testées ont stimulé significativement l'infection ectomycorhizienne. Cette augmentation a été dans certains cas très importante puisque le taux de mycorhization est passé de 15 à plus de 60% avec les bactéries SHB1, BBc1 et MB3.

*Nous avons ainsi démontré que des bactéries auxiliaires de la mycorhization existent et sont présentes dans la mycorhize ou le carpophore et que l'effet obtenu était dû à l'action directe de l'isolat bactérien sur le champignon et/ou la plante hôte.*

Il nous restait donc à visualiser les bactéries dans la mycorhize et à d'identifier les souches bactériennes présentant un intérêt pour la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238.

Fig 21: Effets des souches bactériennes sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 en conditions axéniques.



\*: différence significative par rapport au traitement témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05)

Légende:

- hachuré: taux de mycorhization dans le traitement témoin
- pointillé: stimulation du taux de mycorhization
- blanc: racines courtes non mycorhizées (en %)

## D/ Localisation des bactéries dans les mycorhizes du Douglas / *Laccaria laccata* S238 en microscopie électronique à transmission (expérience 5)

### 1/ Matériels et méthodes

#### 1.1/ Préparation des échantillons

Des mycorhizes matures (sans manteau externe, surface lisse) de *Laccaria laccata* S238 / Douglas ont été prélevées à partir de systèmes racinaires de plants d'un an dans la pépinière de l'INRA de Champenoux. Elles ont été découpées en petits fragments (coupe transversale) dans une goutte de fixateur sous la loupe binoculaire.

Les fragments ont ensuite été fixés et inclus dans de la résine selon le protocole suivant:

- les échantillons ont été baignés dans un fixateur à 0°C pendant 7 heures. Le fixateur était composé de glutaraldéhyde 2,5% et de rouge de ruthénium 0,1% dans un tampon phosphate 0,1M, pH 7,2.

- dix rinçages ont été effectués à 0°C avec une solution de rouge de ruthénium 0,1% dans un tampon phosphate 0,1M, pH=7,2.

- la post-fixation des échantillons a été réalisée à 0°C pendant une heure avec un deuxième fixateur composé de tétraoxyde d'osmium 2% et de rouge de ruthénium 0,1% dans un tampon phosphate 0,1M, pH 7,2.

- les objets ont été progressivement déshydratés en respectant le protocole suivant:

- bain d'acétone 10% pendant 15 min,
- bain d'acétone 40% pendant 15 min,
- deux bains d'acétone 60% d'une durée de 15 min chacun,
- un bain d'acétone 80% pendant une nuit,
- deux bains d'acétone 95% d'une durée de 15 min chacun,
- deux bains d'acétone pur d'une durée de 15 min chacun.

- les objets ont ensuite été imprégnés progressivement par la résine:

- solution SPURR:Acétone (1:4, v:v) le 1er jour,
- solution SPURR:Acétone (2:3, v:v) le 2ème jour,
- solution SPURR:Acétone (3:2, v:v) le 3ème jour,
- solution SPURR:Acétone (4:1, v:v) le 4ème jour,
- solution SPURR:Acétone pur le 5ème jour,

- les objets ont été laissés dans cette dernière solution pendant 2 jours puis le bain a été renouvelé et les échantillons ont été de nouveau immergés dans cette solution pendant 2 jours.

- le 9ème jour, les objets ont été placés dans un moule, parallèlement au côté de plus grande longueur, puis recouverts de résine et placés à l'étuve à 70°C pendant 2 jours.

La composition de la résine SPURR était la suivante:

Nonenylsuccinic anhydre pure, PM=224,3. Serna	61,76% (v:v)
ERL 4206 (Vinylcyclohexane dioxyde), PM=140,2. Serna	23,75% (v:v)
DER 736 (Diglycidyl Ether of polypropylene Glycol) Agar Scientific Ltd	14,25% (v:v)
DMAE (Diméthylaminoéthanol), PM=89,14. Agar Scientific Ltd	0,24% (v:v)

Le bloc de résine a ensuite été taillé à l'aide d'une lame de rasoir sous la loupe binoculaire de façon à amener l'objet au sommet d'une pyramide ayant des faces lisses et une base solide.

A la suite de cette préparation des échantillons, des coupes ont pu être réalisées au microtome à couteau de diamant, soit de type semi-fines (20-30  $\mu\text{m}$ ) pour l'observation en microscopie photonique, soit fines (6-10  $\mu\text{m}$ ) qui ont été recueillies sur des grilles Cuivre/Rhodium pour l'observation en microscopie électronique à transmission (microscope électronique à transmission Zeiss)..

### 1.2/ Technique de double coloration

Les coupes fines ont été recueillies sur la face Rhodium des grilles Cuivre/Rhodium. Ces dernières ont été déposées sur une goutte d'acétate d'uranyle (Valentines, 1961) pendant 15 min. Ce produit ayant été éliminé après des rinçages à l'eau distillée, les grilles ont été déposées sur une goutte de citrate de plomb (Reynolds, 1963) pendant 15 min. Ces manipulations ont été réalisées dans une boîte de Petri contenant des pastilles d'hydroxyde de potassium qui complexe le dioxyde de carbone avec lequel précipite le plomb, ce qui aurait gêné les observations.

### 2/ Résultats et discussion (Planche 2)

La planche 2 montre le type d'image obtenue.

Dans toutes les observations les bactéries étaient seulement localisées dans la partie extérieure du manteau, dans un ciment probablement de nature polysaccharidique

(Dexheimer, communication personnelle). Ceci explique leur résistance à la désinfection de surface réalisée avant l'isolement des souches bactériennes. Par contre, aucune bactérie n'a pas pu être observée dans les parties plus profondes du manteau et dans le réseau de Hartig.

*Les bactéries sont donc situées uniquement à la superficie de la mycorhize mais incluses solidement dans une matrice probablement de nature polysaccharidique.*

## PLANCHE 2

Section transversale d'une mycorhize de Douglas avec *Laccaria laccata*  
S238

Double coloration Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Gr.: x 10000

Abbreviations:

H: Hyphe

B: Bactérie

C: ciment (polysaccharidique?)





## E/ Caractérisation de certaines bactéries auxiliaires de la mycorhization (expérience 6)

Cette caractérisation a porté sur les 14 isolats bactériens (MB2, MB3, MB6, MB8, MB38, MB69, SHB1, MB28, MB29, SBc4, SBc5, BBc1, BBc3, BBc6) qui avaient stimulé la mycorhization dans l'expérience 1.

### 1.1/ Matériels et méthodes

Les caractéristiques morphologiques (forme générale, motilité et présence d'endospores) ont été mises en évidence avec des suspensions bactériennes de 4 jours en utilisant un microscope à contraste de phase. Afin de détecter la fluorescence émise par certaines bactéries, les isolats ont été cultivés sur le milieu King B (King *et al* , 1954). Dans ce dernier cas, les colonies, incubées deux jours à 25°C, ont été observées sous lumière ultra-violette (365 nm) pour confirmer la présence ou l'absence de fluorescence, les colonies fluorescentes émettant une lumière verdâtre intense.

Les caractéristiques physiologiques ont été déterminées en utilisant des galeries API (API System SA, BioMérieux, Montalieu-Vercieu, France). Le choix du type de galerie API a été déterminé d'après le Gram des bactéries et les résultats de deux tests: présence de  $\beta$ -galactosidase (Test ONPG: Ref. 55601, BioMérieux, France) et présence de cytochrome oxydase (Test oxydase: Ref. 55922, BioMérieux, France).

Le test ONPG a été réalisé en utilisant des petits disques de papier imprégnés par de l'orthonitrophényl- $\beta$  D-galactopyranoside (ONPG) utilisé comme substrat pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. Les cultures bactériennes ont été incubées pendant un à deux jours à 37°C. Chaque colonie a été mise en suspension dans un tube sérologique contenant 0,5 ml d'eau stérile. Le disque ONPG a été plongé dans cette suspension. L'ensemble a été mis à incuber à 37°C dans un bain-marie. Après 15 à 30 minutes d'incubation, une réaction positive était éventuellement observée grâce à l'apparition d'une coloration jaune due à la dégradation de l'ONPG en nitrophénol par l'enzyme  $\beta$ -galactosidase.

Le test oxydase a été réalisé en utilisant des petits disques de papier imprégnés par du diméthyl-p-phénylène diamine. Ces disques, préalablement humidifiés par de l'eau stérile, ont été déposés sur de jeunes colonies bactériennes âgées de 2 jours. Une réaction positive se manifestait par l'apparition sur ces disques d'une coloration violette.

Les résultats obtenus avec ces 3 types de test (Gram, ONPG, oxydase) ont permis de déterminer les types de galerie API qui ont été utilisés pour l'identification des bactéries Gram - (type 20 NE, Réf. API 2005) et des bactéries Gram + (type 50 CH, Réf. 5043).

Le système d'identification API 20NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation pour l'identification des bacilles Gram - appartenant principalement aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* etc. Les tests conventionnels et d'assimilation sont les suivants: nitrate réductase (Nit), tryptophanase (Trp), fermentation du glucose (Glu), arginine dihydrolase (ADH), uréase (Ure), B-glucosidase (Esc), protéase (Gel), B-galactosidase (Onpg), assimilation du glucose (Glu), arabinose (Ara), mannose (Mne), mannitol (Man), N-acétyl-glucosamine (Nag), maltose (Mal), gluconate (GNT), caprate (Cap), Adipate (Adi), malate (Mlt), citrate (Cit), phenylacetate (Pac) et enfin présence de cytochrome oxydase (Ox).

Le système d'identification API 50CH permet l'étude de la fermentation de 49 sucres. Ces composés carbonés sont les suivants: glycérol (Gly), érythrol (Ery), D-arabinose (D Ara), L-arabinose (L Ara), ribose (Rib), D-xylose (D Xyl), L-xylose (L xyl), adonitol (Ado), B-méthyl-D-xyloside (Mdx), galactose (Gal), glucose (Glu), fructose (Fru), mannose (Man), rhamnose (Rha), dulcitol (Dul), inositol (Ino), mannitol (Mat), sorbitol (Sor),  $\alpha$ -méthyl-D-mannoside (Mbm),  $\alpha$ -méthyl-D-glucoside (Mdg), N-acetyl glucosamine (Nag), amygdaline (Amy), arbutine (Arb), esculine (Esc), salicine (Sal), cellobiose (Cel), maltose (Mal), lactose (Lac), mélibiose (Mel), saccharose (Sac), tréhalose (tre), L-sorbose (L Sor), inuline (Inu), mélézitose (Mlz), raffinose (Raf), amidon (Amd), glycogène (Glg), xylitol (Xlt), gentiobiose (Gen), D-turanose (D Tur), D-lyxose (D Lyx), D-tagatose (D Tag), D-fucose (D Fuc), L-fucose (L Fuc), D-arabitol (D Ar), L-arabitol (L Ar), gluconate (Gnt), 2 kéto-gluconate (2 Kg), 5 kéto-gluconate (5 Kg).

### 1.2/ Résultats et discussion (tableaux 11, 12 et 13)

Ces résultats ont permis d'identifier certaines des souches bactériennes étudiées:

- |                    |                           |
|--------------------|---------------------------|
| - SHB1, MB8, MB38: | <i>Bacillus</i> sp.       |
| - MB2, MB3:        | <i>Bacillus subtilis</i>  |
| - MB6:             | <i>Bacillus circulans</i> |
| - MB69:            | <i>Bacillus macerans</i>  |

Tableau 11: caractéristiques morphologiques des isolats bactériens (Mot.= Motilité ; Spor. = Sporulation ; Fluo. = Fluorescence)

Bactéries	Gram	Morphologie	Mot.	Spor.	Fluo
MB2	+	Grands bâtonnets	+	-	-
MB3	+	Grands bâtonnets	-	-	-
MB6	+	Bâtonnets courts et épais	-	-	-
MB8	+	Longs bâtonnets en chaîne (Pseudomycélium)	-	-	-
MB38	+	Grands bâtonnets	-	+	-
MB69	+	Bâtonnets +/- longs	-	+	-
SHB1	+	Courts bâtonnets	-	-	-
MB28	-	Petits bâtonnets	-	-	-
MB29	-	Petits bâtonnets	+	-	-
SBc4	-	Petits bâtonnets	-	-	-
SBc5	-	Petits bâtonnets	+	-	-
BBc1	-	Courts bâtonnets	+	-	-
BBc3	-	Courts bâtonnets	-	-	+
BBc6	-	Courts bâtonnets	-	-	+

Tableau 12: caractéristiques physiologiques des isolats bactériens (Gram -). Les lectures ont été effectuées à partir des galeries API 20NE. (Pour la légende, voir texte).

	MB28 <sup>(1)</sup>	MB29	BBc1	BBc3	BBc6	SBC4	SBC5
Nit	nd	-	+	-	-	+	-
Trp	nd	-	-	-	-	-	-
Glu	nd	-	-	-	-	-	-
Adh	nd	-	-	+	+	-	-
Ure	nd	-	-	+	-	-	+
Esc	nd	+	+	-	-	+	+
Gel	nd	-	+	-	-	+	-
Onpg	nd	-	+	-	-	+	+
Glu	nd	+	+	+	+	+	+
Ara	nd	+	+	+	+	+	+
Mne	nd	+	+	+	+	+	+
Man	nd	+	+	+	+	+	+
Nag	nd	+	+	+	+	+	+
Mal	nd	+	+	-	-	+	+
Gnt	nd	+	+	+	+	+	+
Cap	nd	-	-	+	+	-	+
Adi	nd	-	-	+	+	-	+
Mlt	nd	+	+	+	+	+	+
Cit	nd	-	+	+	+	+	+
Pac	nd	-	-	+	+	-	-
Ox	nd	+	+	+	+	+	+

nd: non déterminé, cette bactérie ne s'est pas développée dans les cupules de la galerie 20NE

Tableau 13: caractéristiques physiologiques des isolats bactériens (Gram +). Les lectures ont été effectuées à partir des résultats obtenus avec les galeries API 50CH (pour la légende, voir texte).

Tests	MB2	MB3	MB6	MB8	MB38	MB69	SHB1
Gly	+	+	+	+	+	+	+
Ery	-	-	-	-	-	-	-
D Ara	-	-	-	-	-	-	-
L Ara	+	+	+	+	+	+	+
Rib	+	+	-	+	+	+	+
D Xyl	+	+	-	+	+	+	+
L Xyl	-	-	-	-	-	-	-
Ado	-	-	-	-	-	-	-
Mdx	-	-	-	-	-	+	+
Gal	+	-	+	+	-	+	+
Glu	+	+	+	+	+	+	+
Fru	+	+	+	+	+	+	+
Man	+	+	+	+	+	+	+
L Sor	-	-	-	-	-	-	-
Rha	-	-	-	-	-	+	-
Dul	-	-	-	-	-	-	-
Ino	+	+	-	-	+	-	-
Mat	+	+	+	+	+	+	+
Sor	+	+	-	-	-	-	-
Mdm	-	-	-	-	-	-	-
Mdg	+	+	+	-	-	+	+
Nag	-	-	-	+	-	-	+
Amy	+	+	+	+	+	+	+
Arb	+	+	+	+	-	+	+
Esc	+	+	+	+	+	+	+
Sal	+	+	+	+	+	+	+
Cel	+	+	+	+	+	+	+
Mal	+	+	+	+	+	+	+
Lac	+	+	+	+	-	+	+
Mel	+	+	+	+	+	+	+
Sac	+	+	+	+	+	+	+
Tre	+	+	+	+	+	+	+
Inu	-	-	+	-	+	+	-
Mlz	-	-	-	-	-	+	-
Raf	+	+	+	+	+	+	+
Amd	+	+	+	+	-	+	+
Glg	+	+	+	+	-	+	+
Xlt	-	-	-	-	-	-	-
Gen	+	+	+	+	+	+	+
D Tur	+	+	-	+	-	+	+
D Lyx	-	-	-	-	-	-	+
D Tag	-	-	-	-	-	+	+
D Fuc	-	-	-	-	-	-	-
L Fuc	-	-	-	-	-	-	-
D Ar	-	-	-	-	-	-	-
L Ar	-	-	-	-	-	-	-
Gnt	-	-	+	-	-	-	-
2 Kg	-	-	-	-	-	-	-
5 Kg	-	-	-	-	-	-	-

- MB29, SBc4, SBc5, BBc1: *Pseudomonas* sp.
- BBc3, BBc6: *Pseudomonas fluorescens*

Des inconnues subsistent en ce qui concernent les noms d'espèce de certains isolats bactériens. D'après les différents profils obtenus, SHB1 et MB8 pourraient être *Bacillus circulans* ou *Bacillus polymixa* et MB38 *Bacillus subtilis* ou *Bacillus megasterium*, MB29 *Pseudomonas paucimobilis*, BBc1 et SBc4 *Pseudomonas cepacia*. Par contre, en ce qui concerne SBc5, aucun profil connu ne s'en approche. Toutefois ces résultats doivent être considérés avec précaution. En effet les galeries API sont surtout conçues pour un usage en bactériologie médicale et donc performantes avec les microorganismes rencontrés dans ce domaine d'étude. Une approche utilisant les techniques de biologie moléculaire aurait permis d'identifier plus précisément ces bactéries.

*La diversité taxonomique des bactéries montre qu'il n'existe aucune corrélation entre leur position taxonomique et leur effet sur la mycorhization.*

## F/ Conclusion de la première partie

Les résultats obtenus dans les quatre expériences mises en oeuvre dans cette 1ère partie sont rassemblés dans le tableau 14. Environ 30% des bactéries isolées des mycorhizes ou des carpophores de *Laccaria laccata* peuvent agir comme des bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM). Ceci suggère que des interactions mutualistes existent entre ces bactéries et le champignon.

L'augmentation du taux de mycorhization en fin d'expérience est très importante: de 53 et 67% dans le traitement témoin jusqu'à respectivement 91 et 97% lorsque la bactérie BBc6 est inoculée avec le champignon.

L'ampleur de la réponse de la symbiose ectomycorhizienne à l'inoculation bactérienne peut varier d'une expérience à l'autre en fonction des conditions dans lesquelles la plante se développe, ce qui peut expliquer que certaines différences n'aient pas été significatives. Toutefois, aucune souche bactérienne ayant stimulé la mycorhization dans une expérience n'a donné un résultat contraire dans les autres expériences.

Ce type de résultat (stimulation de l'infection ectomycorhizienne) a souvent été attribué à une inhibition d'organismes antagonistes de la mycorhization susceptibles de gêner l'établissement de la symbiose (Malajczuk & McComb, 1979 ; Nesbitt *et al* , 1981 ; Malajczuk, 1988 ; De Oliveira & Garbaye, 1989). Les résultats obtenus dans l'expérience conduite en conditions axéniques, où seuls le champignon ectomycorhizien, la souche bactérienne et la plante hôte sont présents, infirment cette hypothèse. De plus ils confirment les résultats obtenus en serre, ce qui montre que les BAM peuvent agir positivement même en présence d'une microflore incontrôlée.

La bactérie SHB1 a donné des résultats positifs dans les quatre expériences alors que les isolats bactériens BBc6, BBc3, SBc5 et MB3 ont stimulé la mycorhization dans trois cas sur quatre. L'objectif de ces expériences était d'isoler certaines souches bactériennes susceptibles d'être utilisées dans les expériences de mycorhization contrôlée en pépinières forestières afin de rendre plus efficace l'inoculum fongique. Les 5 bactéries (MB3, BBc3, BBc6, SHB1 et SBc5) devront donc être testées dans ces conditions.

Ces conclusions sont en accord avec celles de Garbaye & Bowen (1989) qui ont travaillé avec un modèle différent: *Pinus radiata* et *Rhizopogon luteolus* . Toutefois ces



Tableau 14: Effets des isolats bactériens sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 à la fin de chaque expérience. +: stimulation, 0: pas d'effet significatif, -: inhibition, pas de signe: non déterminé. \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*: stimulation dans respectivement 1,2,3 ou 4 conditions.

Isolats bactériens	Expériences				
	1	2	3	4 ( <i>In vitro</i> )	
à partir des mycorhizes					
	MB1	0			
**	MB2	+	0	+	
***	MB3	+	0	+	
*	MB4	0	0	+	
	MB5	0			
**	MB6	+	0	+	
**	MB8	+	+	0	
	MB10	-			
	MB20	0	0		
	MB21	0	0		
	MB23	0			
**	MB28	+	0	+	
**	MB29	+	+		
	MB35	0			
	MB36	0			
*	MB38	+	0		
	MB45	0			
**	MB48	0	+	+	
*	MB49	0		+	
	MB50	0	0	0	
	MB51	-			
	MB52	0	0	0	
	MB53	0			
	MB55	0			
	MB61	0			
	MB62	0			
	MB65	0			
*	MB69	+	0	0	
****	SHB1	+	+	+	
à partir des carpophores					
	MBc3	0			
	MBc4	0			
	MBc5	0	0		
**	SBc1	0	+	+	
	SBc2	0			
	SBc3	0	0		
*	SBc4	+	0		
***	SBc5	+	0	+	
	SBc6	0			
**	BBc1	+	0	+	
	BBc2	0			
***	BBc3	+	+	+	
	BBc4	0			
	BBc5	0			
***	BBc6	+	0	+	
*	BBc7	0	0	+	
	BBc8	0			
	BBc9	0	0		
Taux de mycorhization dans le témoin (%)		67	70	44	13 et 53

auteurs ont inoculé le champignon et une souche bactérienne donnée sur des plants qui avaient déjà des racines réceptives à l'infection. Ainsi, ces deux microorganismes n'ont pas eu à subir les 2 étapes critiques que sont la survie dans le sol avant la germination des graines et la phase de colonisation racinaire. Nos résultats montrent qu'un grand nombre de BAM peut résister à ces 2 étapes, ce qui rend envisageable leur inclusion dans toute formulation d'inoculum fongique ou leur incorporation dans un matériau utilisé dans l'enrobage des graines avec le mycélium ou les spores fongiques.

En ce qui concerne les techniques expérimentales utilisées, trois remarques principales peuvent être avancées:

(1) la mise en évidence de l'effet positif des souches bactériennes peut être plus facilement réalisée lorsque le taux de mycorhization dans le traitement témoin est faible et quand ce dernier est identique dans les différentes expériences. Ceci n'a pas été maîtrisé dans les différentes expériences en serre où le taux de mycorhization dans le traitement témoin était élevé (67 et 70% dans les expériences 1 et 2) et différent en fonction de l'expérience (44% dans l'expérience 4). Ainsi, les différents résultats obtenus dans ces expériences peuvent être attribués à ce défaut de standardisation des expériences en serre.

(2) la standardisation du test en conditions axéniques n'a pas pu être réalisée. Les différences obtenues dans les taux de mycorhization du traitement témoin (13 et 53%) dans les 2 séries d'expériences *in vitro* le montrent clairement. L'âge de l'inoculum fongique et son homogénéité devront être soigneusement contrôlés afin d'obtenir une bonne reproductibilité.

(3) les synthèses mycorhiziennes en conditions axéniques sont nécessaires pour étudier les interactions microbiennes existant dans la mycorhizosphère. Les techniques de synthèse couramment utilisées emploient des milieux de culture contenant des substrats carbonés facilement assimilables par les microorganismes. De plus, les parties aériennes se développent à l'intérieur des récipients et donc dans un environnement où les concentrations en CO<sub>2</sub> sont anormales, ce qui entraîne une activité photosynthétique éloignée des conditions naturelles. Comme les interactions rhizosphériques sont conditionnées par l'exsudation de composés carbonés par les racines, ces techniques amènent des conclusions erronées sur la nature de ces interactions. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une méthode où les parties aériennes se développent en dehors du tube et où le substrat de culture contient uniquement une solution minérale nécessaire à la plante.

En conséquence, après avoir isolé des bactéries auxiliaires de la mycorhization, nous avons choisi d'étudier pour la suite de notre travail quatre bactéries: MB3, SBc5, BBc6 et SHB1. La bactérie BBc3 étant identique à BBc6 a été éliminée. Les critères qui ont permis d'effectuer ce choix étaient les suivants:

☞ chaque isolat a stimulé la mycorhization dans au moins 3 expériences sur 4.

☞ l'origine géographique de chaque bactérie était différente: MB3 (Morvan), SBc5 (Serre de Nancy), BBc6 (Brouvelieures) et SHB1 (Sainte Hélène)

☞ deux bactéries ont été isolées de carpophores (SBc5 et BBc6) et deux à partir de mycorhizes (MB3 et SHB1)

☞ deux bactéries appartiennent au genre *Bacillus* (MB3: *Bacillus subtilis* ; SHB1: *Bacillus* sp.) et deux au genre *Pseudomonas* (SBc5: *Pseudomonas* sp.; BBc6: *Pseudomonas fluorescens* )

---

---

---

---

**2ème PARTIE: Sélectivité des bactéries  
associées**

## **2ème PARTIE: Sélectivité des bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM) associées au champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* S238.**

Nous avons suggéré dans la conclusion de la première partie que des relations mutualistes pouvaient exister entre les bactéries et le champignon ectomycorhizien. Une autre question concernant l'importance de la plante hôte dans l'effet des BAM pouvait être posée. Il était donc nécessaire de tester les BAM sur la mycorhization par différents champignons ectomycorhiziens de différentes plantes hôtes.

### **A/ Mise en évidence de la sélectivité des BAM sur l'infection du Douglas par différents champignons ectomycorhiziens**

#### **1/ Effet des BAM sur la mycorhization du Douglas par un champignon ectomycorhizien contaminant: *Thelephora terrestris* (Expérience 7)**

Cette expérience a été réalisée parallèlement à l'expérience 2 (voir page 55). Son objectif originel était de mettre en évidence l'effet des bactéries, inoculées seules, sur la rhizogénèse et la croissance des semis de Douglas. Cette expérience a donc été réalisée sans inoculation fongique. Après 5 mois de culture, les semis de Douglas ont été infectés par le champignon ectomycorhizien *Thelephora terrestris*. Ce champignon, un contaminant commun dans les serres, se propage par l'intermédiaire de basidiospores abondants dans l'atmosphère. Ses mycorhizes sont caractérisées par un manteau blanc pur ou légèrement crème, très épais, de structure lâche (feutrée) en surface et porte une "brosse" de poils courts (Garbaye, 1990).

##### 1.1/ Matériels et méthodes

L'expérience a été conduite de la même façon que l'expérience 2 (voir page 55) sauf que le substrat n'a pas été inoculé par *Laccaria laccata* S238. Le taux de mycorhization a été déterminé en comptant toutes les racines courtes de chaque système racinaire.

## 1.2/ Résultats et discussion(fig.22)

Les bactéries SBc5, BBc1, SBc4, SBc1, BBc7 et MB3, qui avaient favorisé la formation de mycorhizes par *L. laccata* S238 dans l'expérience 1, ont inhibé significativement la mycorhization par *T. terrestris*. Dans la majorité des autres traitements (sauf pour BBc6), les taux de mycorhization obtenus ont été inférieurs à celui du témoin.

Ceci suggère une sélectivité dans l'action des BAM. Pourtant cette expérience a été réalisée en ne contrôlant pas l'inoculation du champignon. En effet, le champignon ayant contaminé les cultures par voie aérienne, la répartition des spores en fonction de l'emplacement des conteneurs sur la table a dû s'effectuer de manière très aléatoire et hétérogène. Il était nécessaire de répéter cette expérience en contrôlant cette fois l'inoculation ectomycorhizienne, tant au niveau de la souche fongique que des doses d'inoculum apportées.

## 2/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par deux champignons ectomycorhiziens *Laccaria laccata* S238 et *Thelephora terrestris* dans des conditions de serre (Expérience 8)

### 2.1/ Matériels et méthodes

Cette expérience a été réalisée de la même façon que l'expérience 2 (voir page 55) sauf qu'elle a été répartie en 3 blocs. Après 3 mois de culture, 10 plants ont été prélevés au hasard dans chaque conteneur de chaque bloc. La moyenne, calculée sur ces 10 plants, du taux de mycorhization par *Thelephora terrestris* Schmidt (inoculé de la même façon que *L. laccata* S238) et par *Laccaria laccata* S238 (nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) a été déterminée d'après un échantillon de 100 racines courtes pour chaque traitement dans chaque bloc. Les valeurs obtenues ont été préalablement transformées par la fonction Arc sin vx et ont été comparées à celles du témoin par l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement) au risque de 5%.

Fig.22: effet des souches bactériennes sur l'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Thelephora terrestris* après 5 mois de culture en serre.

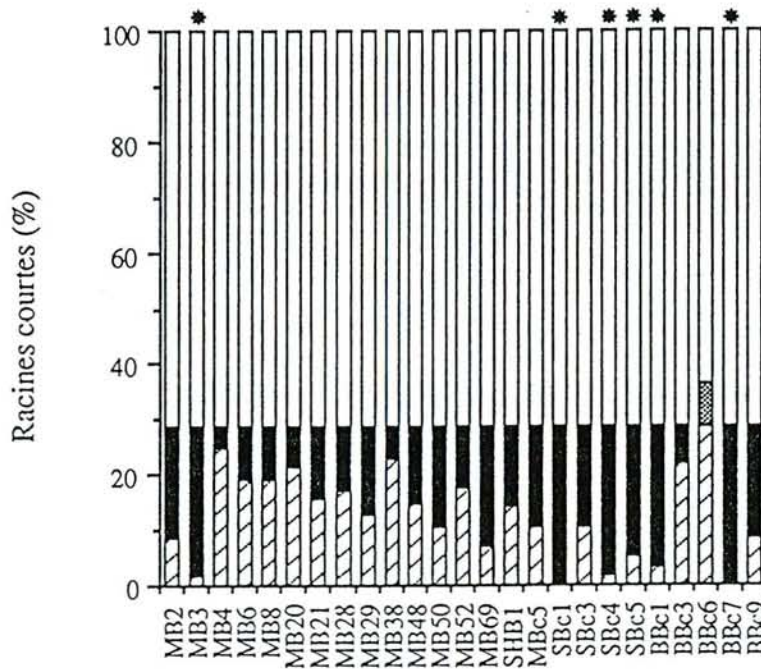
hachuré: taux de mycorhization dans le traitement témoin

pointillé: stimulation de l'infection ectomycorhizienne

noir: inhibition de l'infection ectomycorhizienne

blanc: racines courtes non mycorhizées (%)

\*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05)



## 2.2/ Résultats et discussion (fig.23 et 24)

Les bactéries ont eu un effet positif sur l'infection ectomycorhizienne par le champignon à partir duquel elles ont été isolées (*Laccaria laccata* ) et négatif sur la mycorhization du Douglas par un champignon aphylophorale ayant une position taxonomique éloignée du genre *Laccaria* (*Thelephora terrestris* ).

*Ceci implique, comme nous l'avions suggéré précédemment, une action sélective des BAM sur le champignon ectomycorhizien, en particulier pour les bactéries qui ont été isolées de mycorhizes de Laccaria laccata .*

Cette expérience n'a été réalisée qu'avec deux champignons différents. Afin de vérifier la généralité du phénomène, il était nécessaire de tester les mêmes bactéries sur d'autres champignons ectomycorhiziens.

## 3/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par différentes souches fongiques de *Laccaria bicolor* dans des conditions de serre (Expérience 9)

### 3.1/ Matériels et méthodes

Les différentes souches de *Laccaria bicolor* étaient les suivantes:

- *Laccaria bicolor* 993 isolé au Québec (Canada)
- *Laccaria bicolor* S-3 issu du croisement de 2 monocaryons obtenus à partir de spores d'un carpophore de *Laccaria bicolor* présent sous *Pseudotsuga menziesii* . Cette souche a été obtenue par W. Yang dans un travail d'amélioration génétique.
- *Laccaria bicolor* A4B3xA1B2 qui est aussi un dicaryon reconstitué mais dont les origines parentales sont inconnues.

Un témoin positif a été réalisé en utilisant le champignon *Laccaria laccata* S238, dont nous avons déjà souligné la "parenté" étroite avec l'espèce *bicolor* .

Le même protocole que l'expérience 1 (voir page 55) a été suivi sauf que l'inoculation fongique a été réalisée au 1/20ème (v:v) et que les graines (zone 422, état de



Fig.23: effet des bactéries SBc5, BBc6, MB3 et SHB1 sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance au seuil de 5%. La légende est expliquée dans la figure 22.

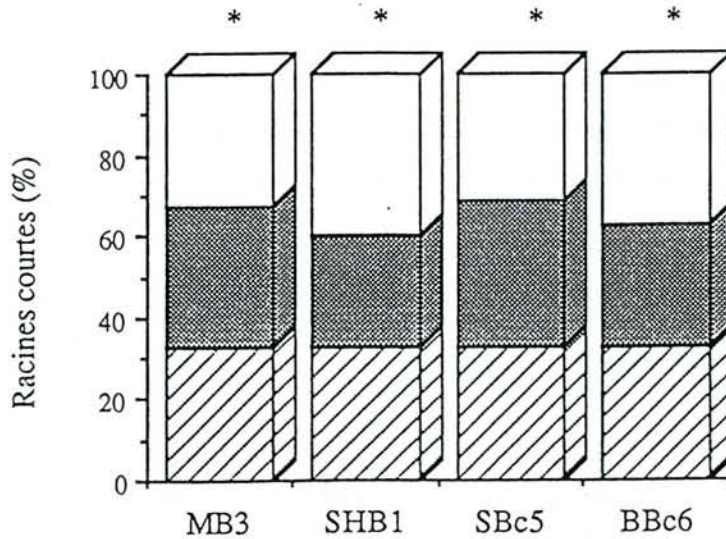
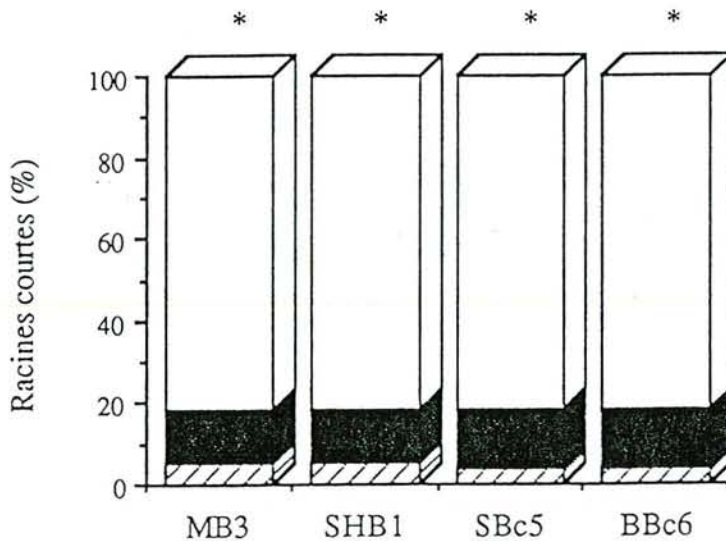


Fig.24: effet des bactéries SBc5, BBc6, MB3 et SHB1 sur la mycorhization du Douglas par *Thelephora terrestris* Schmidt \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance au seuil de 5%. La légende est expliquée dans la figure 22.



Washington, USA) ayant été prétraitées par une stratification au froid (4°C) dans de la tourbe humide ont été mises à germer dans la serre climatisée dans des conteneurs contenant de la vermiculite. Après environ 2 semaines de culture, les semis ont été repiqués à raison d'une plantule par alvéole.

Cette expérience a été réalisée avec 4 blocs. Après 4 mois de culture, 8 plants ont été prélevés au hasard dans chaque conteneur de chaque bloc. Les moyennes, calculées sur ces 8 plants du taux de mycorhization par les différentes souches de *Laccaria bicolor* et par *Laccaria laccata* S238 (nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales), ont été déterminées pour chaque traitement dans chaque bloc. Les valeurs obtenues ont été transformées par la fonction  $\text{Arc sin } \sqrt{x}$  et ont été comparées à celle du témoin par l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement) au risque de 5%.

### 3.2/ Résultats et discussion (fig.25 à 28)

Toutes les souches fongiques ont mycorhizé le Douglas. Certaines des mycorhizes obtenues différaient par leur forme et leurs dimensions (Planche 3).

Les effets positifs des BAM sur la mycorhization par *L. laccata* S238 ont de nouveau été observés (fig.25). La mycorhization par *Laccaria bicolor* 993 a aussi été stimulée significativement par les 4 bactéries (fig.26). MB3 et SHB1 ont augmenté significativement les taux de mycorhization par *Laccaria bicolor* S-3 alors que SBc5 et BBc6 n'ont pas entraîné de différences significatives malgré des taux de mycorhization très différents du témoin (respectivement 20,8 et 19,6% alors que le taux de mycorhization dans le traitement témoin était de 5,2%, fig.27). L'infection ectomycorhizienne du Douglas par *Laccaria bicolor* A4B3xA1B2 a été significativement stimulée par MB3 et SBc5. Les autres bactéries n'ont pas eu d'effets significatifs (fig.28).

*Ainsi, les 4 bactéries stimulent la mycorhization du Douglas par différentes souches de Laccaria bicolor. Dans le cas de l'expérience conduite avec Laccaria bicolor S-3, la présence des bactéries est apparue nécessaire. En effet dans le traitement témoin (sans bactéries), le taux de mycorhization était pratiquement nul (environ 5%) alors qu'avec les bactéries, le pourcentage de racines courtes mycorhizées atteignait 30%.*

## PLANCHE 3

Photo 1: macrographie d'une mycorhize de Douglas avec *Laccaria bicolor* 993.

Grossissement: x50

Photo 2: macrographie d'une mycorhize de Douglas avec *Laccaria bicolor* A4B3xA1B2.

Grossissement: x50

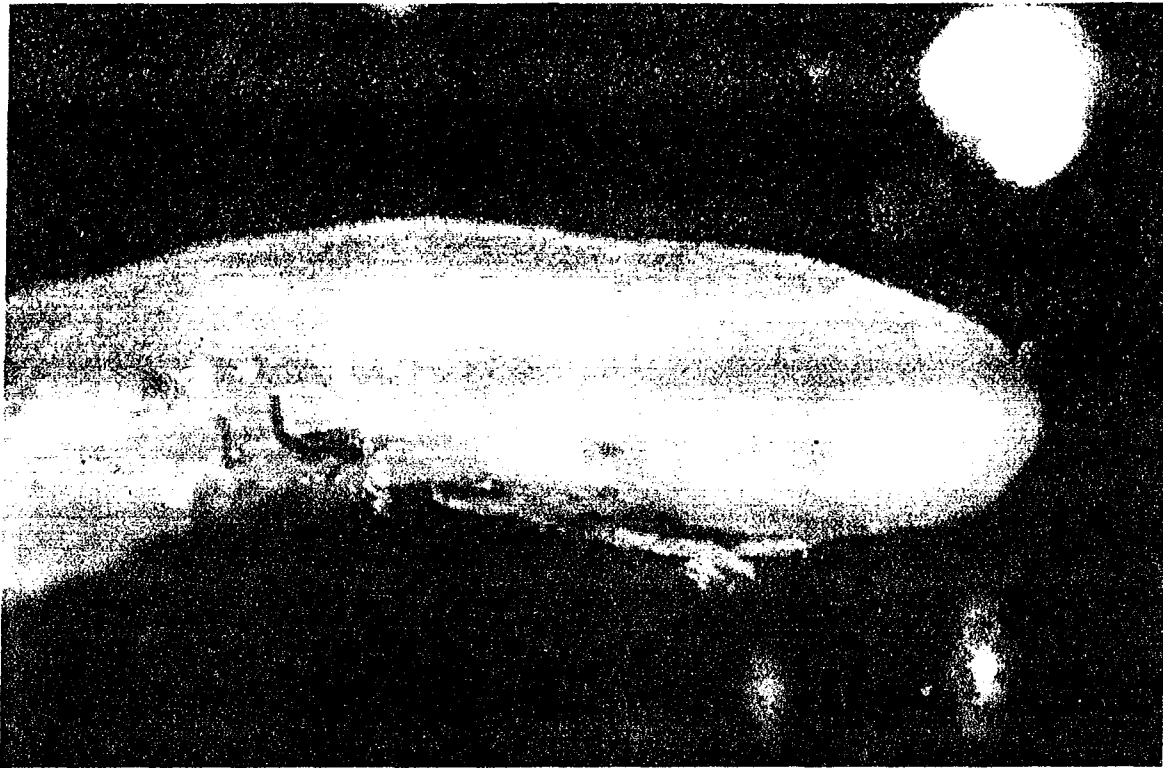


Photo 1



Photo 2

Fig.25: effets des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 4 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance au seuil de 5%. la légende est expliquée dans la figure 22.

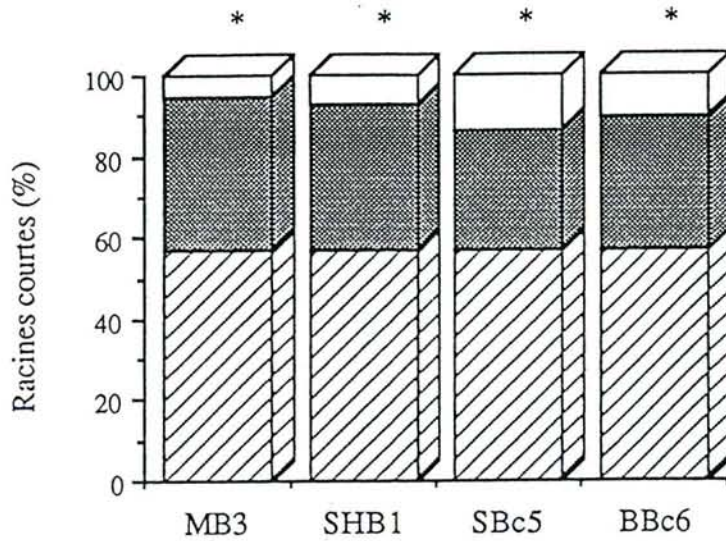


Fig.26: effets des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria bicolor* 993 après 4 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance au seuil de 5%. la légende est expliquée dans la figure 22.

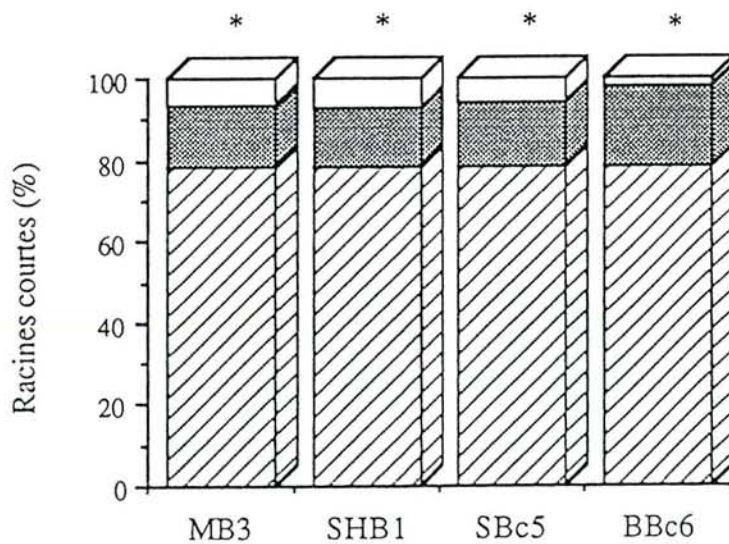


Fig.27: effets des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria bicolor* S-3 après 4 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance au seuil de 5%. la légende est expliquée dans la figure 22.

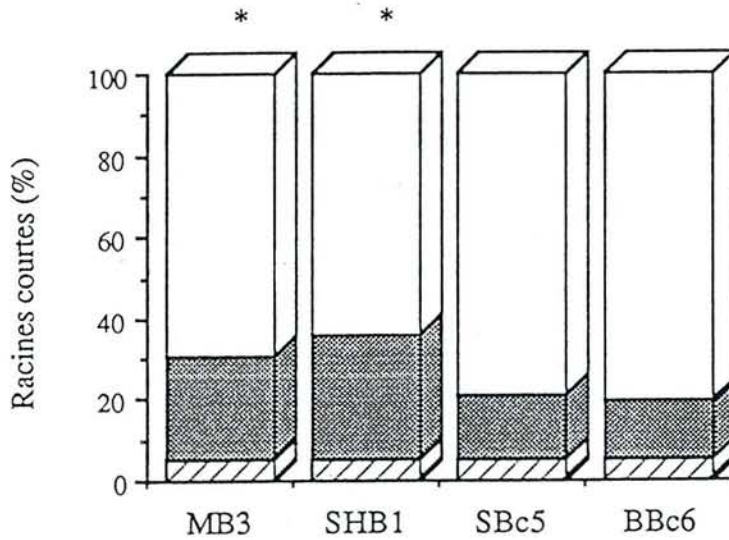
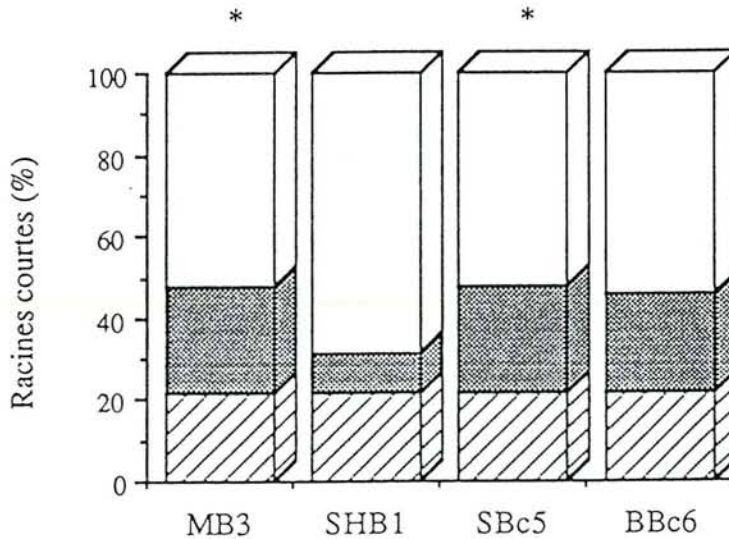


Fig.28: effets des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria bicolor* A4B3xA1B2 après 4 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance au seuil de 5%. la légende est expliquée dans la figure 22.



Afin d'affirmer que les BAM étudiées ont une action sélective sur la mycorhization du Douglas par le champignon *Laccaria bicolor*, il nous fallait tester ces bactéries sur la mycorhization du Douglas par d'autres champignons ectomycorhiziens.

#### **4/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par différents champignons ectomycorhiziens en pépinière (Expérience 10)**

Cette expérience a été réalisée dans la pépinière du Fond Forestier National à Peyrat le Château (Haute Vienne).

##### 4.1/ Matériels et méthodes

##### 4.1.1/ Préparation de l'inoculum fongique

Différents champignons ectomycorhiziens ont été utilisés dans cette expérience: *Laccaria laccata* S238 (témoin positif), *Laccaria bicolor* D-101 (témoin positif), *Hebeloma cylindrosporum* D-15, *Laccaria proxima* 415 et *Paxillus involutus* QBC. Leurs origines sont indiquées dans le tableau 15.

L'inoculum fongique a été préparé en utilisant la même technique que celle indiquée dans l'expérience 1 (voir page 49)

##### 4.1.2/ Préparation de l'inoculum bactérien

Les isolats bactériens (SBc5 et BBc6) ont été cultivés pendant 8 jours sous agitation dans des erlens de 300ml contenant 100ml de milieu TSB 0,3% dans une chambre de culture (25°C, obscurité). Ces suspensions ont ensuite été centrifugées (2400g, 10 min), le surnageant a été éliminé et les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans 100ml de sulfate de magnésium 0,1M. Cette suspension bactérienne a été diluée dans 7,5 litres d'eau osmosée. La suspension finale contenait environ  $10^{12}$  cellules bactériennes. Pour le traitement témoin (sans bactérie), 100ml de  $MgSO_4$  0,1M ont été dilués dans 7,5 litres d'eau.

Tableau 15: Origine des souches fongiques utilisées dans l'expérience 10.

Champignons	Souches	Origine géographique	Plante
<i>Laccaria bicolor</i>	D-101	Québec (Canada)	inconnue
<i>Laccaria proxima</i>	415	Suède	Conifères
<i>Hebeloma cylindrosporum</i> <sup>(1)</sup>	D-15	France	<i>Pinus pinaster</i>
<i>Paxillus involutus</i>	QBC	Québec (Canada)	<i>Picea mariana</i>

(1) : dicaryon reconstitué (Meyselle *et al* , 1990).

Tableau 16 : caractéristiques physicochimiques du sol de la pépinière de Peyrat le Château

Granulométrie (pour mille)	
Argile	115,0
Limon fin	146,0
Limon grossier	72,0
Sable fin	185,0
Sable grossier	482,0
Matière organique totale (Anne)(pour mille)	
	74,9
Azote (Kjeldahl)(pour mille)	
	3,2
Rapport C/N	
	13,6
pH H <sub>2</sub> O	
	5,4
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Duchaufour)(pour mille)	
	0,78
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Olsen)(pour mille)	
	0,072
Capacité d'échange (Metson)(meq pour cent g)	
	12,0
Calcium échangeable (meq pour cent g)	
	1,3
Magnésium échangeable (meq pour cent g)	
	0,15
Potassium échangeable (meq pour cent g)	
	0,45
Manganèse échangeable (meq pour cent g)	
	0,0
Cuivre total (ppm)	
	6,3
Fer libre (Deb)(%)	
	Traces



#### 4.1.3/ Conditions expérimentales dans la pépinière de Peyrat le Château

Cette pépinière est installée sur un sol brun podzolique développé sur granite. L'horizon superficiel a été modifié par 20 ans de culture de plants de conifères. Ses caractéristiques physico-chimiques sont indiquées dans le tableau 16. Trois semaines avant l'inoculation et le semis, le sol a été désinfecté avec du bromure de méthyle froid ( $75\text{g/m}^2$ , la surface prévue pour l'expérience ayant été recouverte par un film de polythène pendant 4 jours). Ce film de polythène a été enlevé environ 8 jours avant le début de l'expérience afin de permettre le dégazage des composés toxiques résultant de la désinfection. La planche (1 m de largeur) a été divisée en placeaux de  $0,5\text{m}^2$  séparés les uns des autres par une surface de  $0,5\text{m}^2$  ni semée, ni inoculée.

Les graines de Douglas (zone 422, Cascade Range, Oregon, USA) ont été prétraitées au froid ( $4^\circ\text{C}$ ) pendant environ un mois dans de la tourbe humide et ont été semées au printemps à raison de 1500 graines par  $\text{m}^2$ .

L'inoculation fongique a été réalisée à raison de 2 litres d'inoculum par  $\text{m}^2$ . Un traitement non inoculé a été effectué.

Les bactéries diluées dans de l'eau ont été inoculées à l'aide d'un arrosoir à raison de 2,5 litres par placeau ( $10^{12}$  cfu. $\text{m}^{-2}$ ).

Ces 2 applications ayant été réalisées, les 2 inoculums ont été mélangés au sol jusqu'à une profondeur de 10 cm environ.

Les traitements (3 répétitions) ont été répartis au hasard dans 3 blocs. Après 4 mois de culture, 10 semis ont été prélevés au hasard dans chaque placeau. Le taux de mycorhization (nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales) a été déterminé sur un échantillon de 100 racines courtes et transformé par la fonction  $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ .

Les résultats ont été traités par l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement). Les moyennes ont été comparées par le test de Newman à la probabilité de 5%.

#### 4.2/ Résultats et discussion (fig.29 à 34)

Les bactéries SBc5 et BBc6 ont stimulé la mycorhization par *L. laccata* et *L. bicolor* (fig.29 et 30), n'ont pas eu d'effet avec *L. proxima* (fig.31) et ont inhibé l'infection ectomycorhizienne par *H. cylindrosporium* (fig.32). En ce qui concerne *P. involutus*, les deux bactéries n'ont eu aucun effet significatif sur la mycorhization (fig.33) mais, pourtant, les taux de mycorhization étaient très inférieurs à celui du témoin.

Un champignon ectomycorhizien a contaminé régulièrement les traitements non inoculés par une des souches fongiques testées. Les mycorhizes étaient grises avec un mycélium extramatriciel en forme de "mèches" ressemblant aux mycorhizes formées par un *Rhizopogon* sp. SBc5 a inhibé la mycorhization par ce champignon contrairement à BBc6 qui n'a eu aucun effet (fig.34).

*Ces expériences, montrant la sélectivité des bactéries, ont été conduites en serre et en pépinière. Afin de déterminer si cet effet était dû à une action directe de la souche bactérienne inoculée, il était nécessaire de reproduire ces tests en conditions axéniques.*

## **5/ Effet de quatre BAM (BBc6, SBc5, MB3 et SHB1) sur la mycorhization du Douglas par différents champignons ectomycorhiziens en conditions axéniques (Expérience 11)**

### 5.1/ Matériels et méthodes

#### 5.1.1/ Inoculum bactérien

Les souches bactériennes ont été cultivées dans des Erlenmeyers (V=300ml) dans 50 ml de milieu TSB 0,3% pendant 4 jours sous agitation dans une chambre de culture (obscurité, 25°C). Les suspensions ont été ensuite centrifugées (2400g, 15 min). Le surnageant a été éliminé et les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans du sulfate de magnésium 0,1M.

Des séries de 10 tubes d'Ependorf autoclavés (120°C, 20 min) ont été remplis par 0,9ml d'eau stérile. Cent microlitres de chaque inoculum bactérien ont été ajoutés et 10 dilutions successives (1/10ème chacune) ont été effectuées. Des volumes de 10µl ont été prélevés dans chacun des tubes correspondant à une série de dilutions et déposés sur une boîte de Petri contenant du milieu TSB 0,3% gélosé. Dans chaque boîte étaient déposés 10 spots. Après 2 jours d'incubation (25°C, obscurité), les colonies bactériennes apparaissant au niveau de chaque dépôt ont été comptées et les concentrations ont été calculées en cfu/ml de suspension bactérienne.

Fig.29: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 dans l'expérience en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ). La légende est expliquée dans la fig.22.

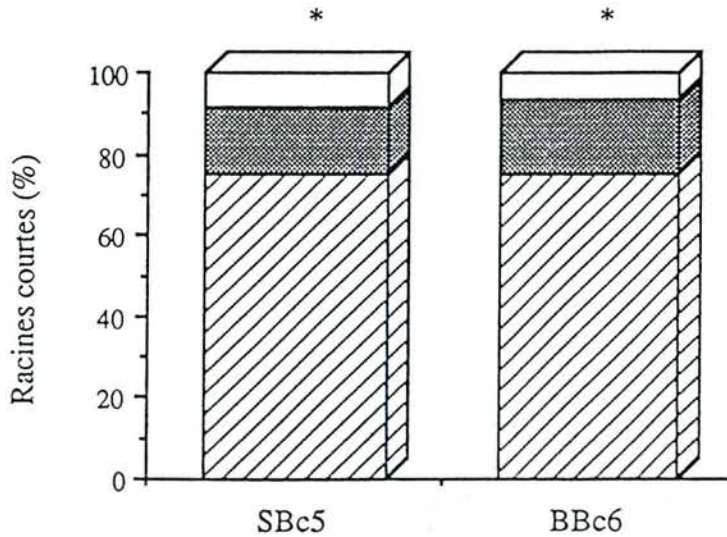


Fig.30: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria bicolor* D101 dans l'expérience en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ). La légende est expliquée dans la fig.22.

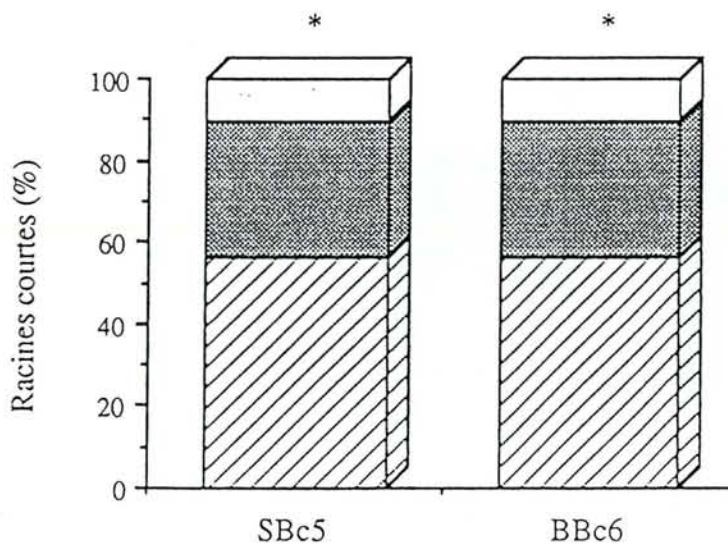


Fig.31: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria proxima* 415 dans l'expérience en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ). La légende est expliquée dans la fig.22.

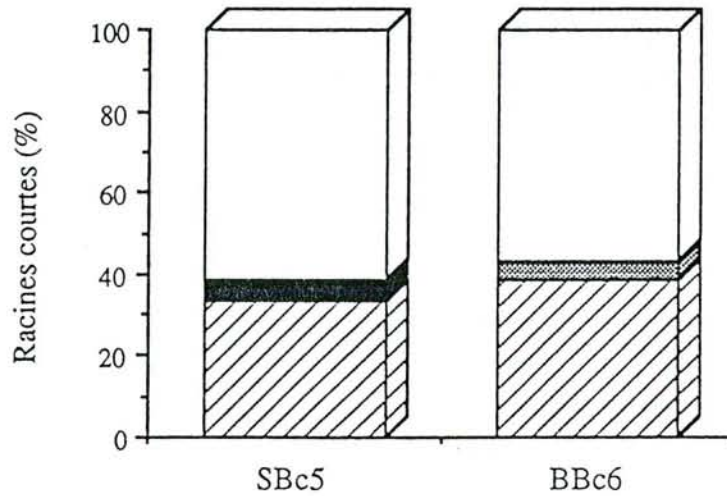


Fig.32: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du Douglas par *Hebeloma cylindrosporium* D15 dans l'expérience en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ). La légende est expliquée dans la fig.22.

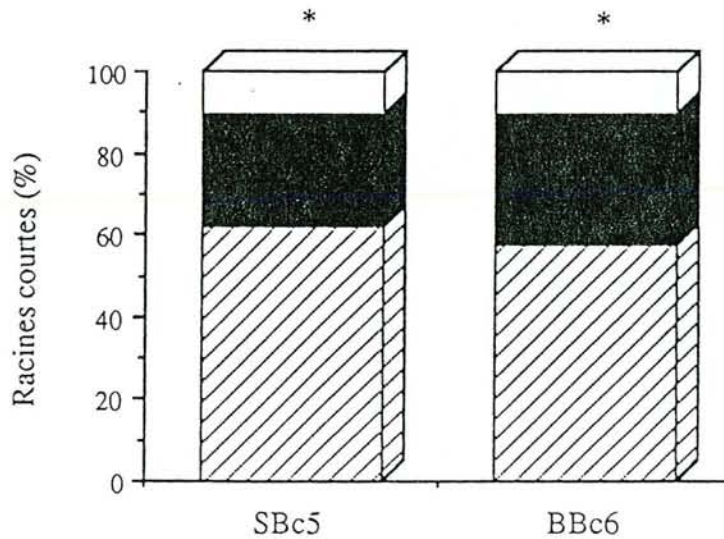


Fig.33: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du Douglas par *Paxillus involutus* QBC dans l'expérience en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ). La légende est expliquée dans la fig.22.

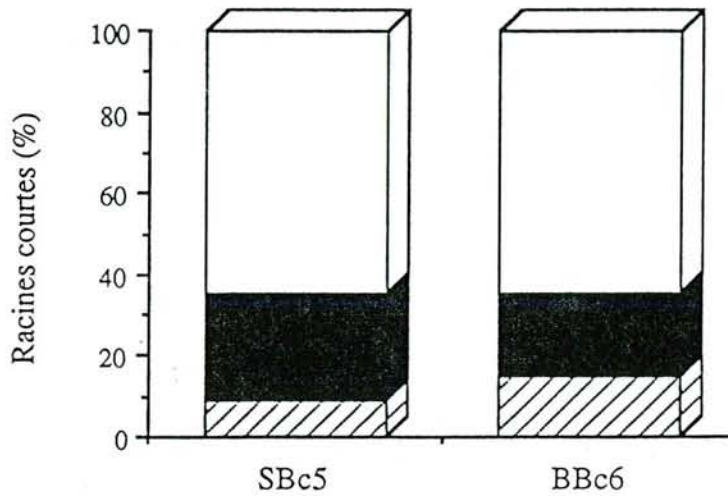
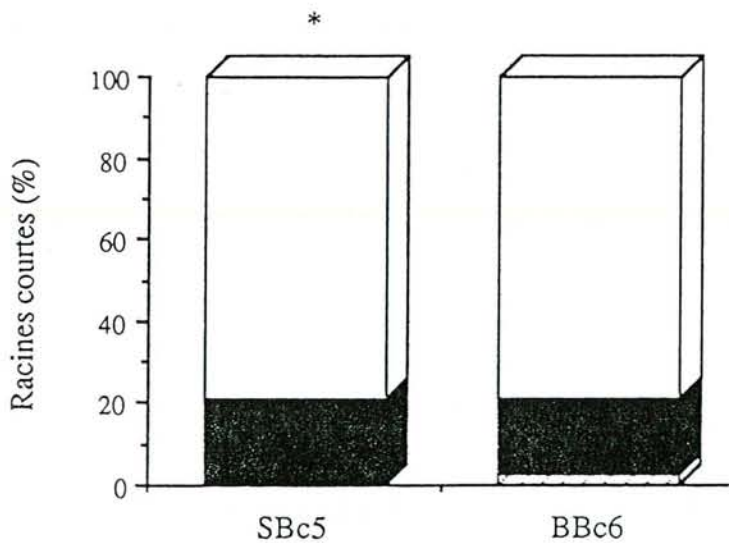


Fig.34: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du Douglas par le champignon indigène type *Rhizopogon* sp. dans l'expérience en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ). La légende est expliquée dans la fig.22.



### 5.1.2/ Préparation des tubes de culture

La plante a été cultivée avec la même technique que celle utilisée dans l'expérience 4 (voir page 61).

Les champignons ectomycorhiziens qui ont été testés avec les 4 bactéries étaient les suivants: *Laccaria laccata* S238, *Hebeloma cylindrosporium* D15, *Paxillus involutus* QBC et *Cenococcum geophilum* SIV (isolé en France sous *Picea abies*). Les bactéries ont été inoculées à raison de  $2.10^7$  cfu par tube pour MB3,  $2.10^8$  pour SHB1 et SBc5, et  $1.10^9$  pour BBc6.

Après 1 mois de culture (3 mois pour *C. geophilum* qui forme des mycorhizes avec le Douglas beaucoup plus lentement), les taux de mycorhization (nombre de racines courtes mycorhizées / nombre de racines courtes totales), ont été calculés et transformés par la fonction  $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ . La longueur de la colonisation de la racine principale par le champignon a été mesurée dans les cas où le manchon mycélien était bien visible à la loupe binoculaire. Les valeurs obtenues ont été comparées à celles du témoin par le test "t" de Student (P=0,05).

### 5.2/ Résultats et discussion(fig.35 à 40)

Les 3 bactéries MB3, SHB1 et BBc6 ont augmenté significativement le taux de mycorhization par *Laccaria laccata* S238 (fig.35), mais toutes ont inhibé l'infection ectomycorhizienne par les autres champignons (fig.36, 37 et 38). La colonisation racinaire par les champignons *H. cylindrosporium* D15 et *P. involutus* QBC a aussi été significativement inhibée par les 4 bactéries (fig.39 et 40).

L'action sélective de ces 4 bactéries a été de nouveau observée dans des conditions axéniques et peut donc être attribuée à la présence de la souche bactérienne qui agit directement sur la mycorhization du Douglas par un champignon donné.

*En conclusion, nous pouvons affirmer que les bactéries auxiliaires de la mycorhization agissent sur la mycorhization de manière:*

*- positive lorsque le champignon est très proche taxonomiquement de la souche fongique (même genre et espèce) où ont été isolées les bactéries.*

Fig.35: effet des isolats bactériens sur la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 après 1 mois de culture en conditions axéniques. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05\%$ ). La légende est expliquée dans la figure 22.

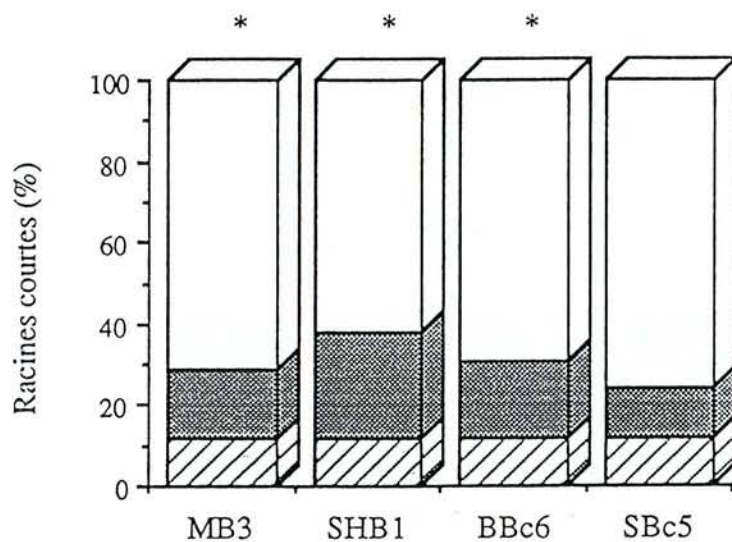


Fig.36: effet des isolats bactériens sur la mycorhization du Douglas par *Hebeloma cylindrosporium* D15 après 1 mois de culture en conditions axéniques. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05\%$ ). La légende est expliquée dans la figure 22.

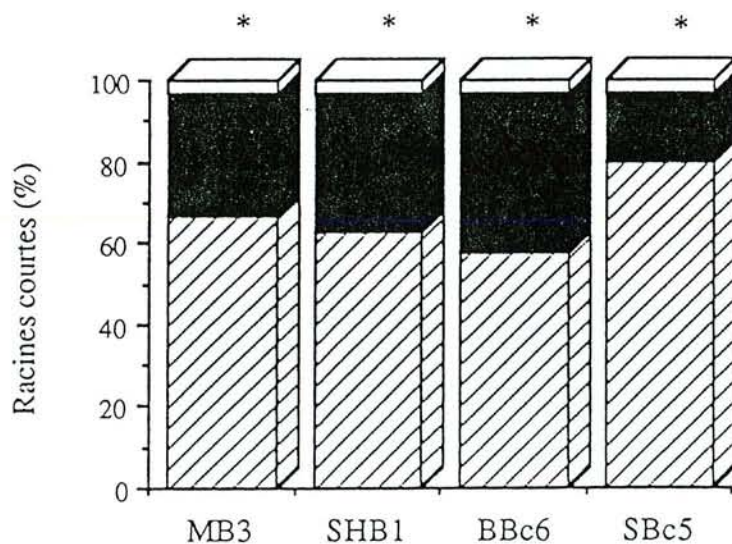


Fig.37: effet des isolats bactériens sur la mycorhization du Douglas par *Paxillus involutus* QBC après 1 mois de culture en conditions axéniques. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05\%$ ). La légende est expliquée dans la figure 22.

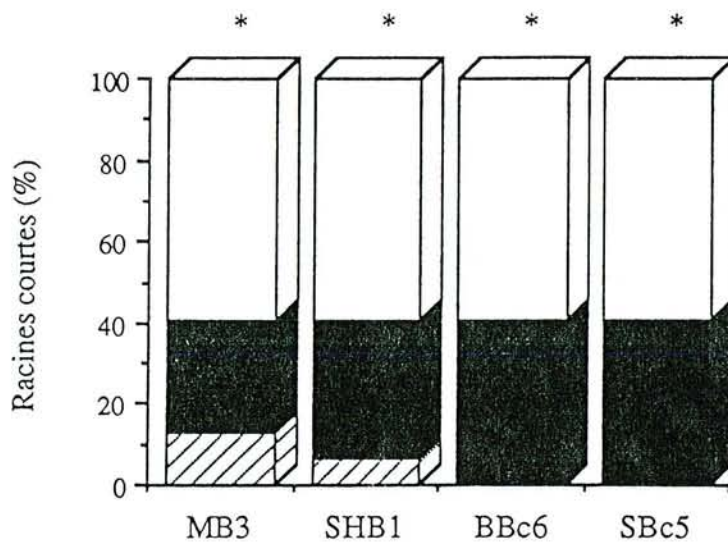


Fig.38: effet des isolats bactériens sur la mycorhization du Douglas par *Cenococcum geophilum* SIV après 3 mois de culture en conditions axéniques. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05\%$ ). La légende est expliquée dans la figure 22.

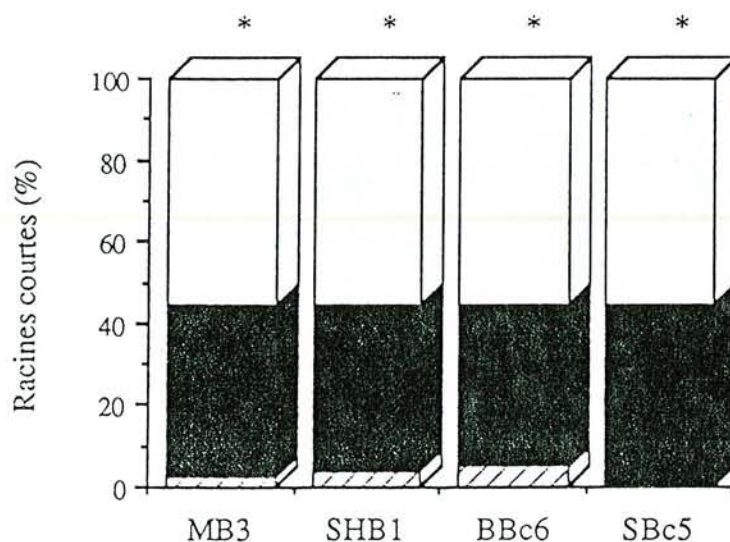




Fig.39: effet des isolats bactériens sur la colonisation de la racine principale du Douglas par le champignon *Hebeloma cylindrosporum* D15 en conditions axéniques. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

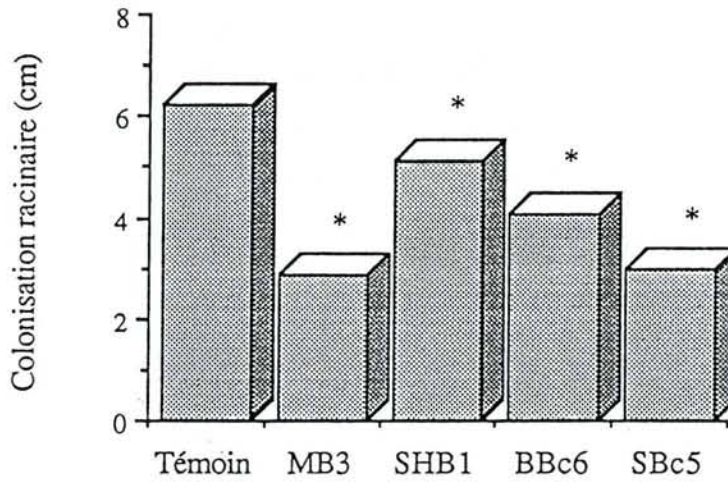
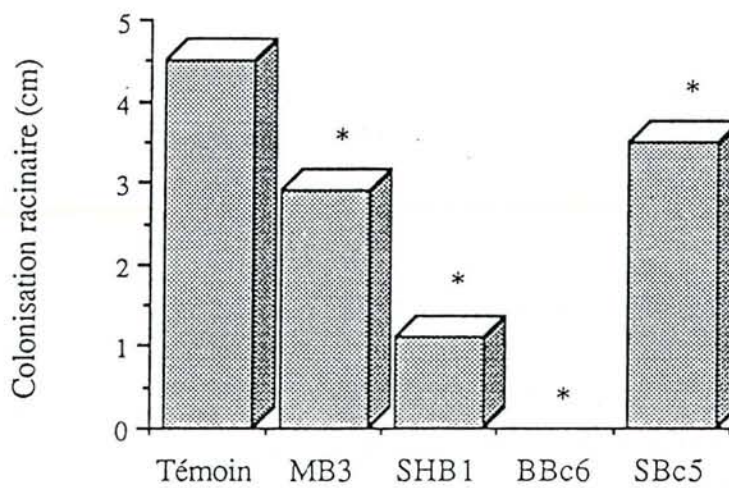


Fig.40: effet des isolats bactériens sur la colonisation de la racine principale du Douglas par le champignon *Paxillus involutus* QBC en conditions axéniques. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).



- négative lorsque le champignon est taxonomiquement éloigné de la souche fongique d'origine

Cette propriété de sélectivité que possèdent les BAM pourrait être attribuée à une co-évolution entre le champignon ectomycorhizien et certaines souches bactériennes mycorhizosphériques. Ceci pourrait être vérifié en étudiant des BAM de mycorhizes de champignons différents du *Laccaria laccata* S238 (Ex: *T. terrestris* ) et en adoptant la même démarche expérimentale que celle qui vient d'être présentée.

B/ Mise en évidence de l'absence de sélectivité des BAM sur l'infection de différentes plantes hôtes par *Laccaria laccata* S238

Nous avons montré précédemment que les BAM étaient sélectives vis-à-vis du partenaire fongique de la symbiose. Une autre question, concernant l'importance de la plante par rapport à l'effet de ces BAM, avait été posée. Afin d'y répondre, nous avons testé ces bactéries sur la mycorhization de différentes plantes hôtes par le même champignon *Laccaria laccata* S238.

1/ Effet des BAM sur la mycorhization du chêne pédonculé (*Quercus robur* ) par *Laccaria laccata* S238 en pépinière (Expérience 12)

1.1/ Matériels et méthodes

1.1.1/ Plante hôte

Les glands de chêne pédonculé (*Quercus robur* L., zone 02, nord-est de la France) ont été récoltés en automne 1989, immergés dans de l'eau à 41°C pendant 2 heures afin d'éviter la pourriture noire causée par *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald (Delatour, 1978). Ils ont ensuite été poudrés avec de l'iprodione à raison de 1 g.kg<sup>-1</sup>. Ce fongicide évite la prolifération de *Penicillium* spp. et des autres champignons saphrophytes pendant la période de conservation au froid. Les glands ainsi traités ont été

conservés au froid à 4°C. Il a été vérifié par ailleurs que ce fongicide n'avait pas d'effet sur l'établissement des mycorhizes.

Ils ont été semés en avril 1990 et couverts par une couche de 3 cm de tourbe neuve. La densité des plants à la fin de la saison de végétation était de 76 m<sup>-2</sup>.

#### 1.1.2/ Inoculum fongique

L'inoculum de *L. laccata* S238 était du type tourbe-vermiculite et était préparé de la même manière que celle indiquée précédemment (voir expérience 1, page 49). L'inoculation a été réalisée juste avant le semis en le mélangeant à la tourbe à raison de 2 l.m<sup>-2</sup>.

#### 1.1.3/ Inoculum bactérien

Deux bactéries ont été testées: SBc5 et BBc6. Les bactéries ont été cultivées pendant une semaine dans 500ml de TSB 0,3%, sur une table d'agitation, à 25°C. Ces cultures ont été ensuite centrifugées (2400g, 15min) et les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans 600ml de sulfate de magnésium 0,1M.

Dans la pépinière, 200ml de cette suspension bactérienne ont été dilués dans 10 litres d'eau qui ont été uniformément répandus sur 1,8 m<sup>2</sup> à l'aide d'un arrosoir. Cette inoculation bactérienne a été réalisée entre l'inoculation fongique et le semis. Il a été évalué qu'avec cette technique, environ 10<sup>6</sup> cellules bactériennes vivantes étaient inoculées par m<sup>2</sup>.

#### 1.1.4/ Dispositif expérimental

L'expérience a été conduite dans la pépinière de Clairlieu proche de Nancy (pépinière de production de l'Office National des Forêts). Les plants ont été élevés dans des abris plastiques (6x42 m) avec, comme substrat de culture, de la tourbe sur une profondeur de 20 cm. La même tourbe dans le même tunnel avait été utilisée pendant 7 ans pour produire alternativement des plants de chênes et de hêtres afin d'éviter la prolifération de pathogènes comme *Pythium ultimum* (Delran *et al*, 1982). Les placeaux de 1,8m<sup>2</sup> (1x1,8 m) ont été placés dans la partie médiane du tunnel et séparés les uns des autres par une surface de 1m<sup>2</sup> qui a été semée mais pas traitée. Tous les placeaux ont été inoculés par *L. laccata* S238 qui a été mélangé à la tourbe dans les 10cm superficiels du substrat.

La tourbe a été désinfectée, dix jours avant le semis, à la vapeur pendant 15 minutes en obtenant une température de 100°C à la surface et 85°C à 15 cm de

profondeur. Le témoin n'a reçu que du sulfate de magnésium 0,1M (200ml dilués dans 10 litres d'eau). Chacun des 6 traitements a été répété trois fois au hasard.

#### 1.1.5/ Fertilisation du substrat de culture

La fertilisation habituellement utilisée dans cette pépinière a été conservée. Elle a été réalisée par un apport de 300g.m<sup>-2</sup> d'Osmocote (engrais à solubilisation lente) effectué en 2 applications successives: (1) 160g d'Osmocote mélangé à la tourbe avant le semis et contenant 18% d'azote, 2,2% de phosphore et 5,5% de potassium. Il se solubilise en 8-9 mois à 25°C.(2) 140g d'Osmocote appliqué à la surface du substrat en juin et contenant 14% d'azote, 2,8% de phosphore et 7,7% de potassium. Il se solubilise en 3-4 mois. Les oligoéléments (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, B) étaient contenus dans une solution commerciale (Kanieltra, Compagnie Française de l'Azote, BP 19808, 75361 Paris).

#### 1.1.6/ Méthodes de prélèvements et statistiques

En novembre 1990, tous les plants dans une surface de 0,5 m<sup>2</sup> ont été arrachés au milieu de chaque placeau. Leurs hauteurs ont été mesurées et la moyenne a été calculée. Les 10 plants ayant une hauteur se rapprochant le plus de cette moyenne ont été retenus pour les observations de l'état mycorhizien des racines. Les systèmes racinaires ont été lavés afin d'enlever la tourbe, et les racines latérales ont été coupées en morceaux de 3 à 5cm. Ces segments de racines ont été mélangés dans une boîte de Petri remplie d'eau où ont été prélevés au hasard des échantillons. Ces derniers ont été observés à la loupe binoculaire afin de déterminer, sur au moins 500 racines courtes, le taux de mycorhization par *Laccaria laccata* S238.

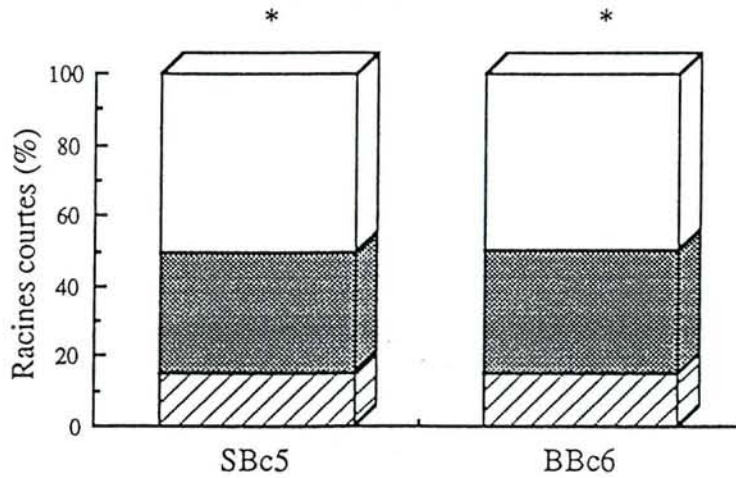
Les pourcentages obtenus ont été transformés par la fonction Arcsin(vx) et traités par l'analyse de variance au risque de 5%.

#### 1.2/ Résultats et discussion (fig.41)

Les 2 souches bactériennes ont significativement augmenté le taux de mycorhization (de 15 à 50%).

*Ces deux souches bactériennes stimulent la mycorhization du chêne par Laccaria laccata S238 sur un substrat composé uniquement de tourbe, ce qui montre déjà que les BAM sont robustes vis-à-vis des conditions environnementales. De plus, d'après ces résultats, la sélectivité bactérienne n'apparaît pas au niveau de la plante*

Fig.41: Effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur la mycorhization du chêne pédonculé par *L. laccata* S238. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance. La légende est expliquée dans la figure 22.



Cette absence de sélectivité des BAM vis-à-vis de la plante hôte devait être confirmée en utilisant d'autres espèces forestières.

## **2/ Effet des BAM sur la mycorhization de quatre conifères par *Laccaria laccata* S238 en serre (Expérience 13)**

### 2.1/ Matériels et méthodes

#### 2.1.1/ Plantes hôtes

Quatre plantes hôtes ont été utilisées: l'épicéa (*Picea abies*, Karst, provenance: zone 01, massif de Gérardmer, France), le douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, provenance: zone 422, état de Washington, USA), le pin noir d'Autriche (*Pinus nigra austriaca*, provenance: région III/4, Autriche) et enfin le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*, provenance: parcelle Sainte Marguerite, Vosges, France).

Les graines de Douglas ont été traitées au froid à 4°C dans de la tourbe humide pendant un mois afin de lever leur dormance. Pour les autres plantes, la dormance des graines n'étant pas très marquée, aucun traitement particulier n'a été utilisé.

Les graines de ces différentes plantes hôtes ont été mises à germer pendant 15 jours dans des germoirs contenant uniquement de la vermiculite humidifiée avec de l'eau osmosée.

#### 2.1.2/ Inoculum fongique

L'inoculum de *Laccaria laccata* S238 était du type tourbe-vermiculite préparé de la même manière que celle indiquée dans l'expérience 1 (voir page 49). L'inoculation a été réalisée au 1/10ème (v:v) dans le substrat de culture.

#### 2.1.3/ Inoculum bactérien

Les bactéries (MB3, SHB1, SBc5 et BBc6) ont été cultivées pendant une semaine dans 100ml de TSB 0,3%, sur une table d'agitation, à 25°C. Ces cultures ont été ensuite centrifugées (2400g, 15min) et les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans 100ml d'eau osmosée. Les suspensions bactériennes ont été diluées dans de l'eau

osmosée pour atteindre un volume final de 2,5 litres. Le traitement témoin (sans bactérie) était composé par 2,5 litres d'eau osmosée. La concentration bactérienne n'a pas été exactement déterminée mais l'inoculation a été réalisée approximativement à raison de  $5.10^4$  à  $5.10^5$ cfu.ml<sup>-1</sup> de substrat.

#### 2.1.4/ Dispositif expérimental

Le protocole retenu était identique à celui de l'expérience 11 (voir page 97) sauf qu'après 2 et 4 mois de culture, 10 semis ont été prélevés au hasard dans chaque conteneur de chaque bloc.

#### 2.2/ Résultats et discussion(fig.42 à 49)

Toutes les bactéries ont augmenté de manière significative le taux de mycorhization sur les quatre essences.

Ainsi cette expérience montre que, quelle que soit la plante hôte, les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas par *Laccaria laccata* S238 peuvent stimuler l'infection ectomycorhizienne de l'épicéa, du pin noir et du pin sylvestre par ce champignon. Ces BAM ont aussi un effet positif sur la mycorhization du chêne pédonculé (expérience 12), une Angiosperme taxonomiquement très éloignée des quatre gymnospermes.

La plante a donc un rôle secondaire dans ces mécanismes de stimulations et les bactéries n'ont pas une action sélective vis-à-vis de celle-ci.

Par contre, nous avons montré que les BAM ont une action sélective très marquée vis-à-vis du partenaire fongique de la symbiose.

*Ces isolats bactériens avaient été nommés bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas par L. laccata S238. Ces résultats nous permettent de modifier cette dénomination et de définir une autre appellation: les bactéries auxiliaires de la mycorhization de certaines essences forestières par Laccaria bicolor .*

Fig.42: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas après 2 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

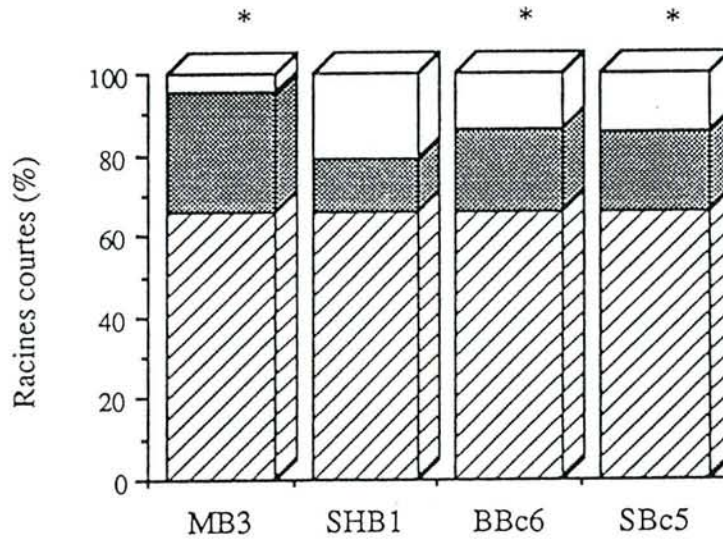


Fig.43: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas après 4 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

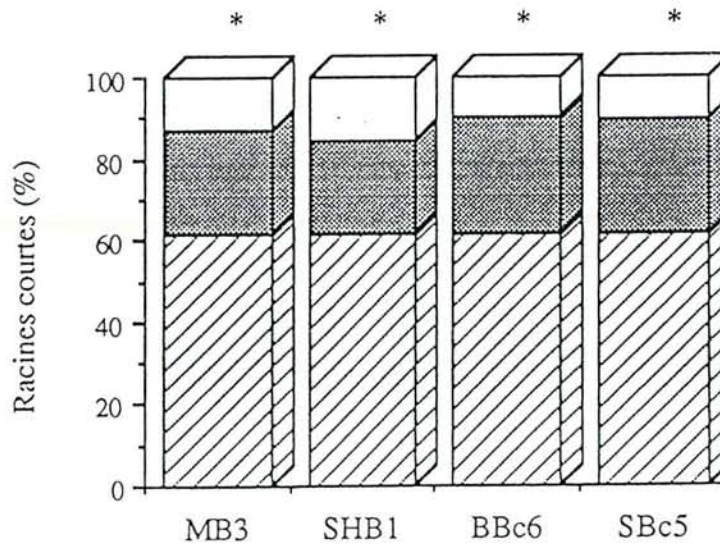




Fig.44: effet des bactéries sur la mycorhization de l'épicéa après 2 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

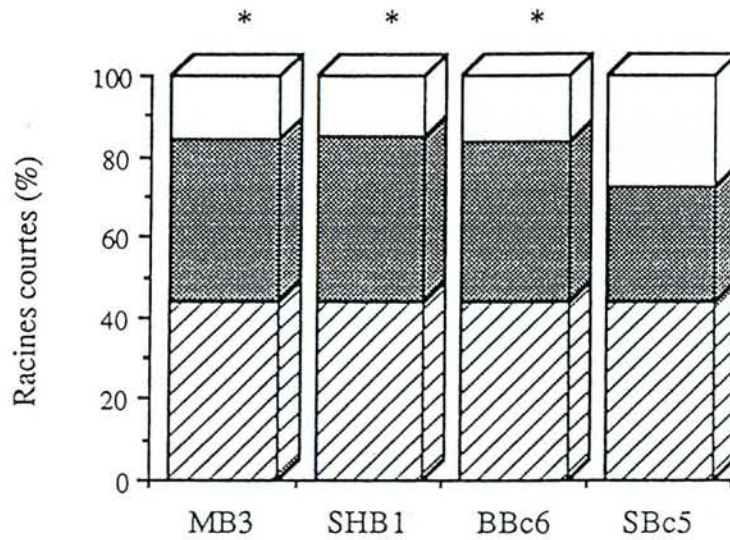


Fig.45: effet des bactéries sur la mycorhization de l'épicéa après 4 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

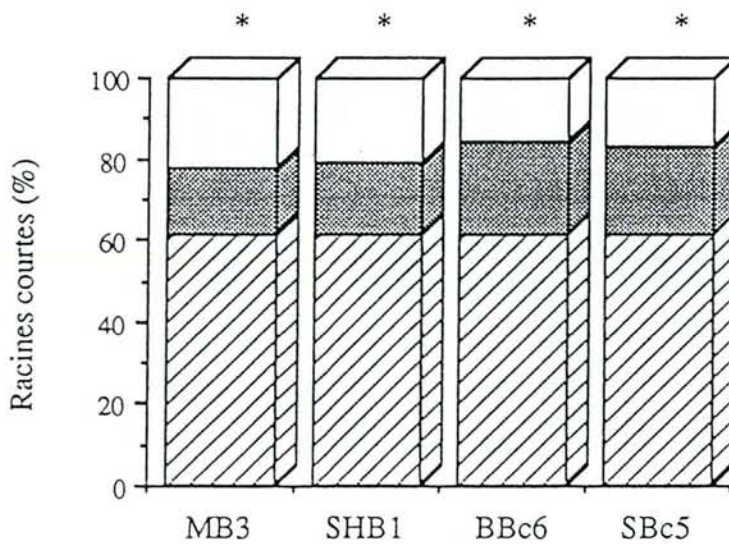


Fig.46: effet des bactéries sur la mycorhization du pin noir d'Autriche après 2 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

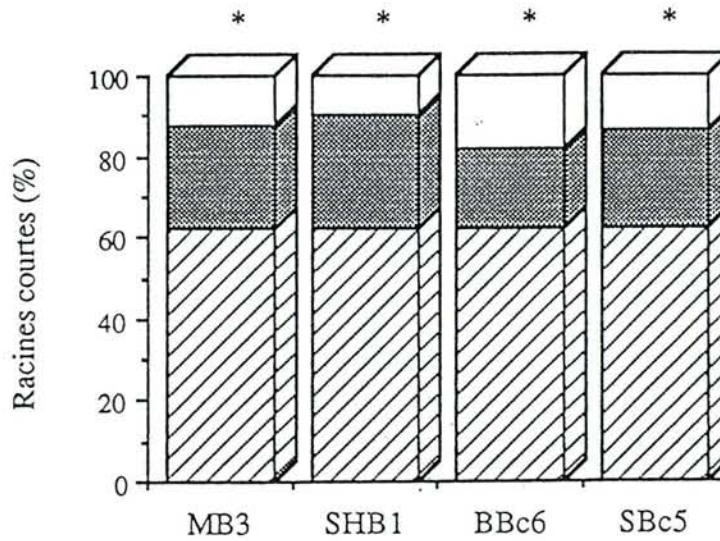


Fig.47: effet des bactéries sur la mycorhization du pin noir d'Autriche après 4 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

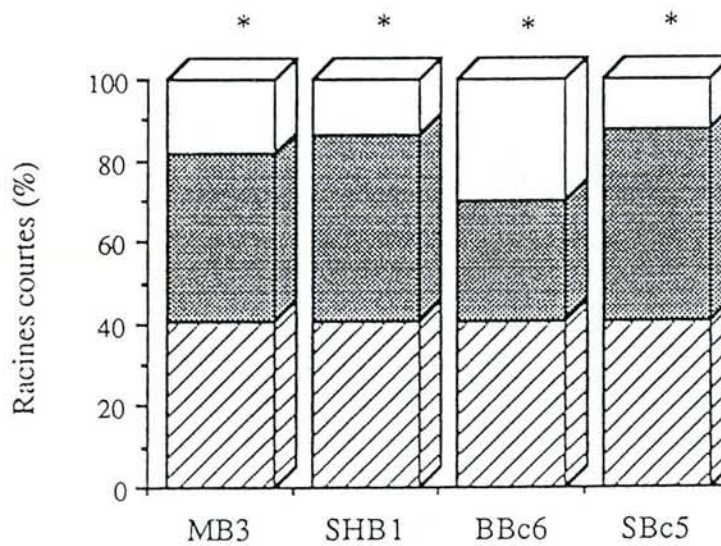


Fig.48: effet des bactéries sur la mycorhization du pin sylvestre après 2 mois de culture (expérience 13). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.

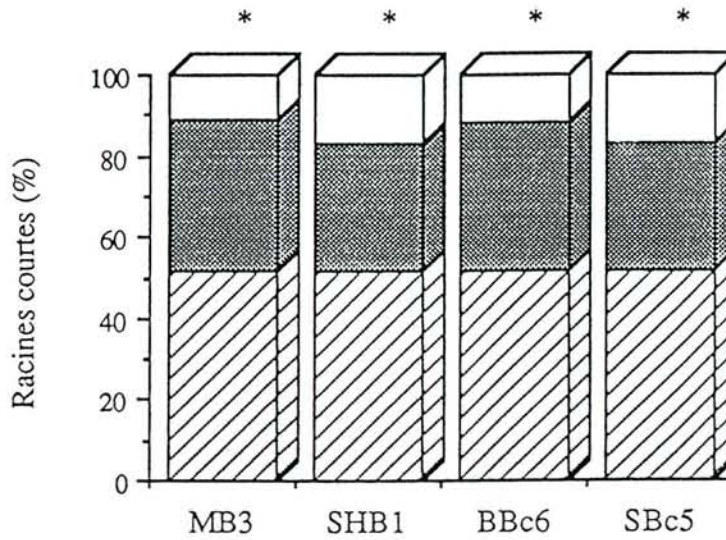
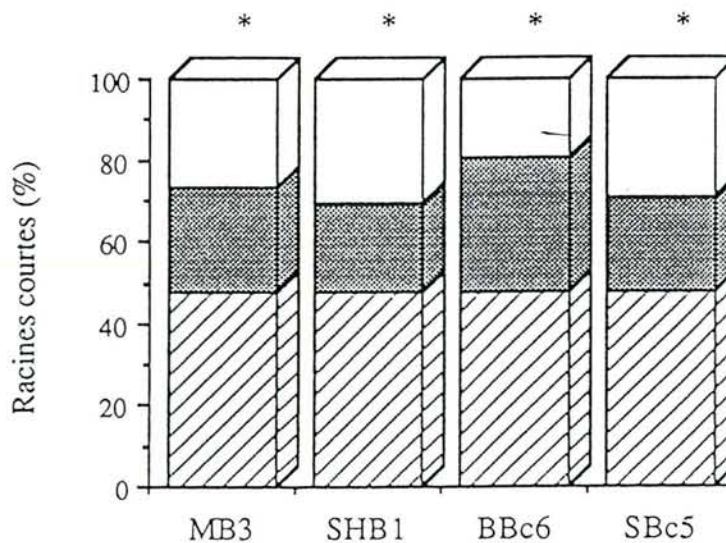


Fig.49: effet des bactéries sur la mycorhization du pin sylvestre après 4 mois de culture (expérience 11). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement bactérien). La légende est expliquée dans la figure 22.



---

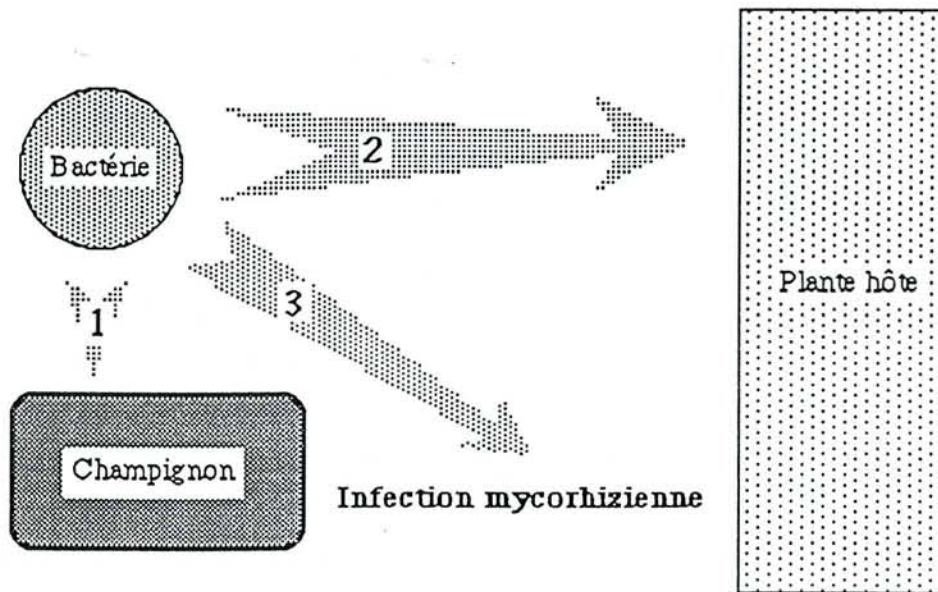
3ème PARTIE: Etude des mécanismes  
d'action des bactéries auxiliaires de la  
mycorhization

### 3ème PARTIE: Etude des mécanismes d'action des bactéries auxiliaires de la mycorhization

#### A/ Exposition du problème et des différentes hypothèses de travail

Les différentes voies possibles d'action des bactéries auxiliaires de la mycorhization sont représentés dans la figure 50.

Fig.50: différentes voies possibles d'action des bactéries auxiliaires de la mycorhization



Ainsi, les BAM pourraient agir au niveau de la croissance du champignon (voie n°1). Elles pourraient aussi agir sur plante hôte (voie n°2). Ces 2 voies constitueront les principaux objectifs de cette étude. Une troisième voie d'action pourrait être aussi envisagée: les bactéries agiraient sur le processus de mycorhization *sensu stricto* en intervenant au niveau de la reconnaissance et de l'adhérence entre les deux organismes (voie n°3)

Afin de faciliter l'étude de ces mécanismes, nous avons isoler chaque voie et avons ainsi travaillé sur des couples d'organismes (bactérie-champignon, bactérie-plante hôte).

Dans les 1ère et 2ème parties de ce travail, l'effet BAM a été mis en évidence en calculant des taux de mycorhization, c'est-à-dire le rapport du nombre de racines courtes mycorhizées sur le nombre de racines courtes totales. Cette fraction a été exprimée en pourcentage. Nous avons représenté de manière simplifiée et fonctionnelle l'effet positif des bactéries en séparant les voies d'action 1 et 2. Pour les études sur le potentiel infectueux des sols, des modèles mathématiques ont été établis afin de prévoir et expliquer certaines relations inoculum-maladie (Baker *et al* , 1967 ; Ricci & Messiaen, 1976). Nos représentations n'ont en aucun cas la valeur d'un modèle mathématique et ne constituent qu'une aide pour notre réflexion.

La figure 51 schématise un cas de répartition des propagules fongiques vis-à-vis des racines courtes et le pourcentage de racines courtes mycorhizées ( $3/8 = 38\%$ ) en ne prenant en compte que les infections primaires et en admettant que l'infection a lieu dès que le mycélium entre en contact avec une racine courte.

Si la bactérie agit sur la croissance fongique (voie n°1), toutes les racines courtes sont mycorhizées et le taux de mycorhization est de 100%.

Si la bactérie agit sur la plante hôte (voie n°2) et en particulier en augmentant le nombre de racines courtes, nous obtenons un résultat inférieur avec un taux de mycorhization de 21%.

Enfin, quand nous supposons que les bactéries agissent par l'intermédiaire des 2 voies, toutes les racines courtes sont mycorhizées. Nous retrouvons donc un taux d'infection égal à celui obtenu lorsque la bactérie stimule la croissance du champignon .

L'effet des bactéries sur la croissance fongique semble donc être un paramètre très important dans les phénomènes de stimulation de la mycorhization. Nous étudierons donc successivement les 3 voies d'action en insistant plus particulièrement sur l'effet des bactéries au niveau de la croissance fongique.

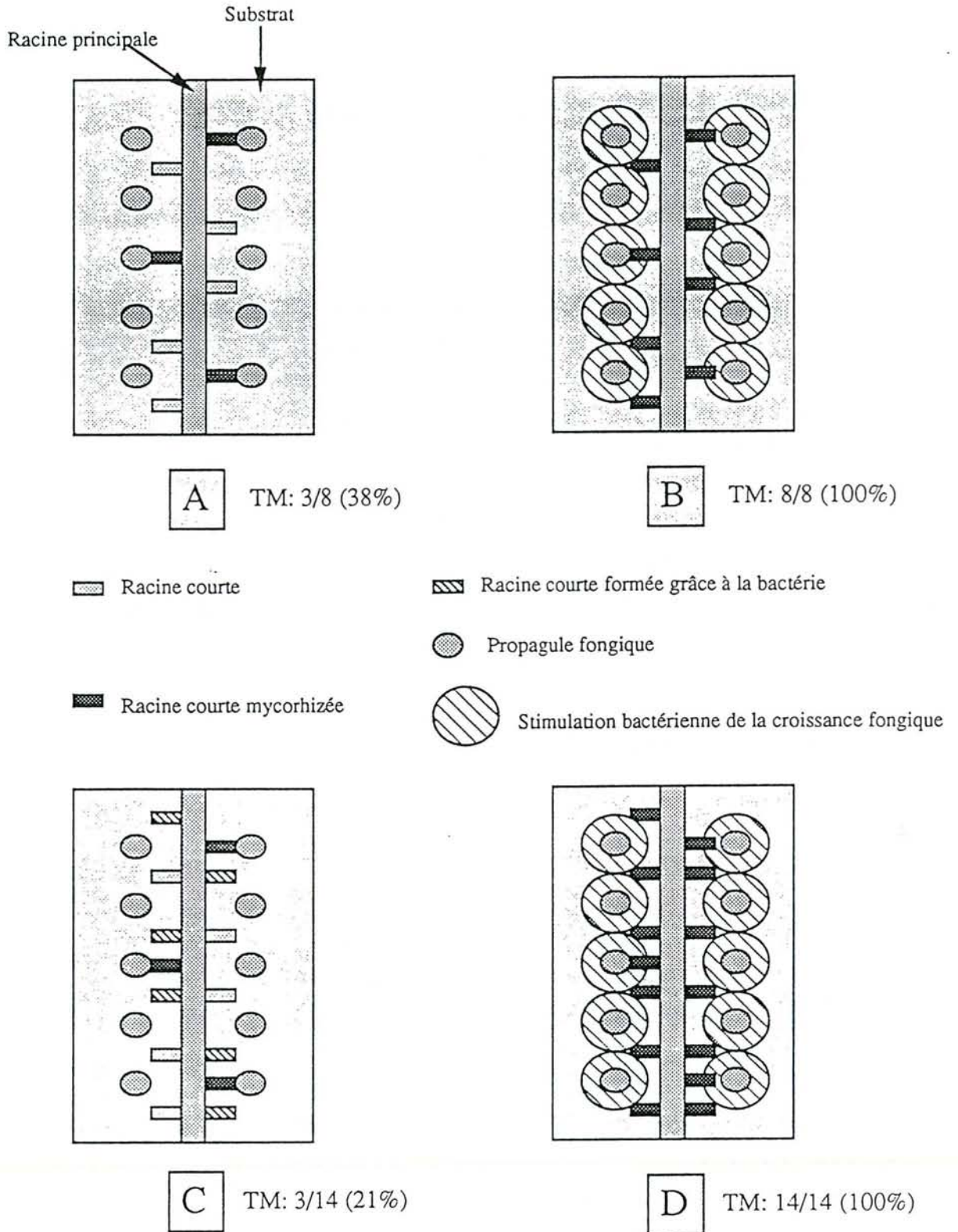


Fig.51: schématisation de la mycorhization en présence de bactéries

A: absence de bactéries

B: stimulation bactérienne de la croissance fongique

C: stimulation bactérienne de la rhizogénèse

D: stimulation bactérienne de la croissance fongique et de la rhizogénèse

TM: taux de mycorhization

## B/ Etude de la voie n°1: étude des mécanismes d'action des BAM sur la croissance des champignons ectomycorhiziens

Les effets des bactéries sur la croissance fongique seront étudiés avec *Laccaria laccata* S238 et aussi avec d'autres champignons ectomycorhiziens. Ceci nous permettra d'étudier les mécanismes de la sélectivité mise en évidence précédemment dans la deuxième partie. Dans un premier temps, les résultats des confrontations bactéries-champignons seront exposés puis, par différentes techniques, nous tenterons d'expliquer les différents effets obtenus.

### 1/ Confrontation des bactéries avec différents champignons ectomycorhiziens en conditions axéniques (expérience 14)

Nous avons supposé qu'une des explications de la stimulation ou de l'inhibition de la mycorhization par les BAM était due à une stimulation bactérienne de la croissance fongique.

#### 1.1/ Matériels et méthodes

Le test de confrontation utilisé est identique à celui présenté dans la première partie (voir page 41) et qui a permis d'effectuer le criblage de la collection des bactéries. Dix implants fongiques ont été utilisés par traitement. Les mesures (croissance radiale moyenne exprimée en mm) ont été effectuées après 8 jours de contact. Les moyennes ont été comparées par le test "t" de Student. Les différents champignons testés étaient les suivants: *Laccaria laccata* S238, *Hebeloma cylindrosporum* D15, *Paxillus involutus* NAU, *Paxillus involutus* QBC, *Cenococcum geophilum* SIV et *Thelephora terrestris* Schmidt. Leurs caractéristiques sont indiqués dans le tableau 17. Ils ont été confrontés aux 4 bactéries MB3, SHB1, BBc6 et SBc5.

#### 1.2/ Résultats et discussion (fig.52)

Les 4 bactéries ont stimulé la croissance de *Laccaria laccata* S238 mais elles ont inhibé la croissance de tous les autres champignons.



Tableau 17: origine des souches fongiques utilisées dans les études sur les interactions bactéries-champignon

Champignon	Isolat	Origine géographique	Plante-hôte
<i>Laccaria laccata</i>	S238	Oregon (USA)	<i>Tsuga mertensiana</i>
<i>Laccaria laccata</i>	S3°	France	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Laccaria laccata</i>	CHAM 3	France	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Laccaria laccata</i>	S1023	Oregon (USA)	inconnue
<i>Laccaria laccata</i>	003	Grande Bretagne	<i>Picea sitchensis</i>
<i>Laccaria laccata</i>	S106	USA (Côte est)	inconnue
<i>Laccaria laccata</i>	83 222	France	<i>Picea abies</i>
<i>Laccaria laccata</i>	152x123°	France	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Laccaria proxima</i>	415	Suède	Conifères
<i>Laccaria bicolor</i>	MUEL*	Suède	inconnue
<i>Laccaria bicolor</i>	D101	Québec (Canada)	inconnue
<i>Laccaria bicolor</i>	993	Québec (Canada)	inconnue
<i>Laccaria bicolor</i>	A4B3xA1B2°	inconnue	inconnue
<i>Laccaria bicolor</i>	CRBF 348*	Québec (Canada)	<i>Pinus banksiana</i>
<i>Laccaria bicolor</i>	CRBF 347*	Québec (Canada)	<i>Pinus banksiana</i>
<i>Laccaria bicolor</i>	CRBF 581	Québec (Canada)	<i>Pinus banksiana</i>
<i>Laccaria bicolor</i>	CRBF 569°	Québec (Canada)	<i>Pinus banksiana</i>
<i>Laccaria bicolor</i>	81 306	France	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Laccaria bicolor</i>	83 216	France	<i>Picea abies</i>
<i>Hebeloma cylindrosporium</i>	D15	France	<i>Pinus pinaster</i>
<i>Paxillus involutus</i>	QBC	Québec (Canada)	<i>Picea mariana</i>
<i>Paxillus involutus</i>	NAU	France	<i>Quercus petraea</i>
<i>Cenococcum geophilum</i>	SIV	France	<i>Picea abies</i>
<i>Telephora terrestris</i>	Schmidt	inconnue	inconnue
<i>Suillus bovinus</i>		Suède	inconnue
<i>Pisolithus tinctorius</i>	441	Australie	<i>Eucalyptus</i> sp.

\*: monocaryon ; °: dicaryon reconstitué. La souche *H. cylindrosporium* D15 est issu du croisement de 2 monocaryons issus de spores du même carpophore (Meyselle *et al* , 1990)

Fig.52: effet des bactéries sur la croissance des colonies fongiques (croissance radiale) en % de stimulation ou d'inhibition par rapport à la croissance du témoin. . : différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ ).

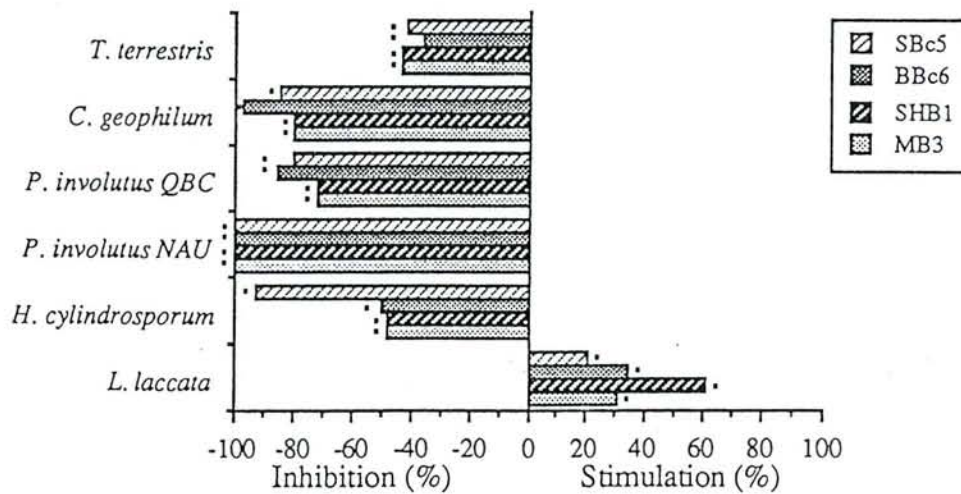
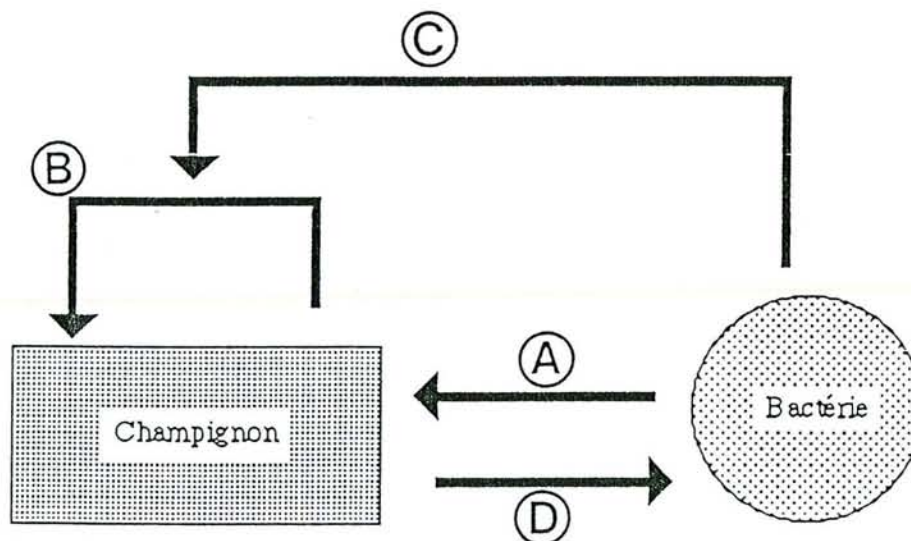


Fig.54: Schématisation des différentes voies d'action de la bactérie sur le champignon en milieu aqueux. Voir le texte pour la légende.

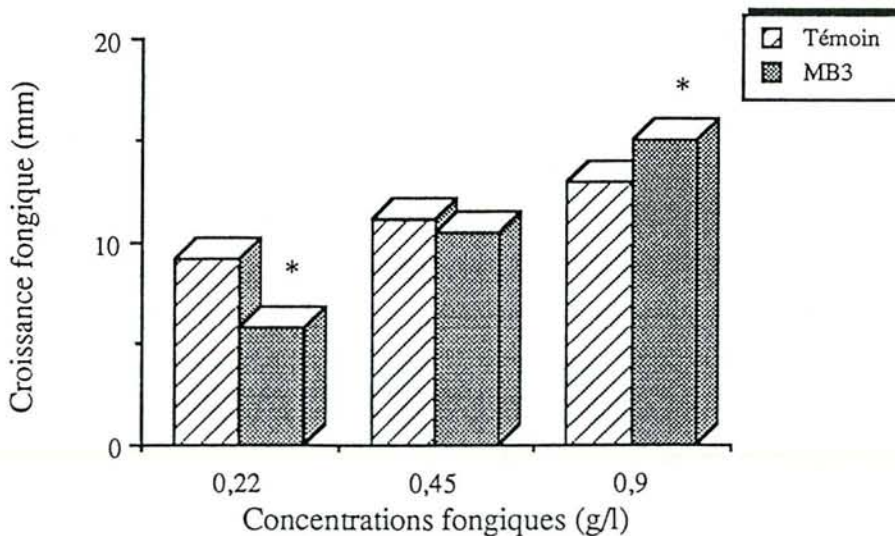


*Le phénomène de sélectivité des bactéries sur le champignon a donc de nouveau été observé en considérant uniquement le couple bactérie-champignon.*

La bactérie MB3 avait inhibé la croissance de *Laccaria laccata* S238 dans l'expérience de criblage effectuée dans la 1ère partie. Cette fois, elle a stimulé la croissance de ce champignon. Afin d'expliquer ces résultats *a priori* contradictoires, une expérience (expérience 15) a été effectuée en incluant le champignon et la bactérie MB3 dans des billes d'alginate de calcium (voir page 183). Le champignon a été utilisé à 3 concentrations différentes (0,9 , 0,45 et 0,22 g/l) alors que la suspension bactérienne était à  $10^9$  cfu/ml. Les billes ont été mises à incuber (25°C, obscurité) dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée, pendant 8 jours. La croissance radiale du champignon a été ensuite mesurée et les moyennes ont été comparées à celles des témoins (même concentration fongique mais sans bactérie) par le test "t" de Student.

Les résultats (fig.53) ont montré qu'un déséquilibre trop important entre les deux organismes entraîne une inhibition de la croissance du champignon.

Fig.53: effet de la bactérie MB3 sur la croissance du champignon (expérience 15). \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05)



La concentration bactérienne utilisée dans le criblage (voir page 41) était probablement trop importante ce qui a entraîné une inhibition de la croissance fongique.

Les bactéries peuvent agir sur le champignon en produisant des composés diffusibles (interactions bactéries-champignon en milieu aqueux) ou en émettant des

composés volatils (interactions bactéries-champignon en milieu gazeux). Nous considèrerons successivement ces 2 types d'effet.

## **2/ Interactions bactéries-champignons ectomycorhiziens en milieu aqueux dans le cas d'une stimulation bactérienne de la croissance fongique**

### **1.1/ Introduction**

Les différentes voies d'action de la bactérie sur le champignon ont été schématisées dans la figure 54.

#### **- voie A: Effets trophiques directs de la bactérie sur le champignon**

Les champignons mycorhiziens sont en général des biotrophes obligatoires dans leur milieu naturel. Ainsi, des composés carbonés simples sont nécessaires à leur survie lors de la phase saprophytique (Melin, 1953 ; Harley, 1948 ; Richards, 1987). Les bactéries pourraient participer à cette croissance saprophytique en produisant ces substrat.

#### **- voie B: Auto-intoxication du champignon**

Il a été démontré que certains champignons produisaient des composés qui leur étaient toxiques (Lapeyrie, 1983). Par exemple, les champignons *Paxillus involutus* et *Hebeloma crustuliniforme* excrètent des métabolites qui inhibent leur croissance (Duponnois, 1988 ; Duponnois & Garbaye, 1990). Ces composés appartiennent au groupe des polyphénols dans le cas de *P. involutus* . Nous avons donc pensé que de tels mécanismes inhibiteurs pouvaient aussi exister avec le champignon *Laccaria laccata* .

#### **- voie C: Détoxification du milieu par les bactéries**

Nous avons montré que les 4 bactéries stimulaient la croissance du champignon *Laccaria laccata* . En association avec la voie B, cette stimulation pourrait être envisagée comme un processus indirect où les bactéries agiraient en inhibant cette production toxique ou en détruisant les composés inhibiteurs de la croissance fongique. Ce type de mécanisme a été mis en évidence pour les champignons *Paxillus involutus* et *Hebeloma crustuliniforme* (Duponnois, 1988 ; Duponnois & Garbaye, 1990). Dans le cas de *P.*

*involutus* , les bactéries dégradent les composés polyphénoliques produits par le champignon.

- voie D: effets directs du champignon sur les bactéries

De nombreux travaux ont montré que certains champignons avaient un effet sur la microflore du sol (Krywolap *et al* , 1964 ; Marx, 1969a,b ; Malajczuk, 1987 ; Duchesne *et al* , 1987). Dans l'introduction, où ont été évoquées les interactions existant dans la rhizosphère, l'effet mycorhizosphérique a été mentionné. Cet effet se traduit souvent par des modifications qualitatives et quantitatives au niveau des populations bactériennes associées à la mycorhize. De tels mécanismes (effet mycorhizosphérique, production d'antibiotiques par le champignon (Krupa & Fries, 1971)) doivent probablement intervenir dans les interactions existant entre les bactéries et le champignon. Cette voie D n'a pas été abordée puisque l'intérêt principal de cette étude était de montrer l'influence des bactéries sur la mycorhization et non d'étudier l'effet du champignon sur la pérennité des populations bactériennes introduites.

Dans cette étude, chaque voie a été abordée séparément.

1.2/ Etude de la voie A: production de métabolites diffusibles par les bactéries

La première étape de cette étude aurait dû être la mise en évidence de ce phénomène en testant le filtrat de culture de chaque bactérie sur la croissance du champignon. Nous avons précédemment montré que de nombreux problèmes étaient rencontrés dans ce type d'expérience, en particulier pour l'élaboration des traitements témoins (Duponnois, 1988). Pour des raisons de temps, cette mise en évidence n'a pu être réalisée. Par contre, nous avons démontré que la stimulation de la croissance de *P. involutus* et *H. crustuliniforme* par certaines souches bactériennes étaient due à l'excrétion d'acides organiques comme l'acide citrique (Duponnois, 1988 ; Duponnois & Garbaye, 1990). Nous avons donc supposé que ces acides organiques pouvaient aussi jouer un rôle dans les stimulations bactériennes de la croissance de *L. laccata* . Cette hypothèse a été testée avec la bactérie BBc6 (*Pseudomonas fluorescens* ).

### 1.2.1/ Matériels et méthodes

#### *Culture bactérienne*

La bactérie a été cultivée axéniquement dans un Erlenmeyer (V=250 ml) contenant 100ml de milieu Melin (Melin, 1936), sur table d'agitation dans une chambre de culture (25°C, obscurité). Après 7 jours de culture, un prélèvement de 15 ml a été effectué aseptiquement. Il a été centrifugé (2400g, 15 min). Le surnageant a été récupéré et, afin d'éliminer tous les corps bactériens encore présents dans cette solution, filtré à travers un filtre microporeux (Minisart NML SM 165 34 K. 0,2µm).

#### *Dosage des acides organiques par chromatographie liquide à haute performance*

##### *Purification des échantillons*

Les acides organiques ont été séparés des sucres et des acides aminés par un passage de 2 ml du filtrat de culture bactérienne sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Bio Rad AG 1-X8 (Cl<sup>-</sup>), 200-400 mesh).

La colonne anionique a été mise sous forme H<sup>+</sup> en faisant percoler 2 ml d'une solution d'acide formique 8 M. La colonne a ensuite été rincée deux fois par 2 ml d'eau ultrapure.

Deux millilitres de l'échantillon ont été mis à percoler sur la colonne qui a ensuite été rincée par 2 ml d'eau ultrapure.

Deux millilitres d'acide formique ont été déposés, ce qui a permis de décrocher les acides organiques fixés. Cette opération a été suivie par un rinçage avec 4 ml d'eau ultrapure.

L'échantillon recueilli a été évaporé sous vide puis repris dans 2 ml du tampon d'élution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM, pH 2,3) pour être injecté dans le système de chromatographie.

##### *Chomatographie liquide à haute performance*

Deux colonnes montées en série: colonne OA HY et colonne RP 18, ont été utilisées sur le système CLHP Gold (Beckman). Elles ont été plongées en permanence dans un bain marie à une température de 35°C.

L'élution des acides organiques a été effectuée par un tampon phosphate (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM, pH 2,3). Le débit était de 0,7 ml.min<sup>-1</sup> et le temps d'analyse de 30

min. Vingt microlitres de l'échantillon ont été injectés dans le chromatographe. La quantification des acides organiques a été réalisée à une longueur d'onde de 210 nm, en comparant la surface du pic d'un acide organique identifié à celui obtenu après l'injection de la solution d'acides organiques standards (fig.55).

*Mise en évidence de l'effet des différents acides organiques identifiés sur la croissance de Laccaria laccata S238 (expérience 16)*

Les différents acides organiques identifiés ont été quantifiés et leur concentration ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) a été calculée. A partir de ces résultats, 3 types de solutions ont été préparées:

- solution 1: milieu Melin sans glucose
- solution 2: milieu Melin + acide organique (concentration X)
- solution 3: milieu Melin + glucose (concentration X)

Ces solutions ont été ajustées au même pH 5,5 par adjonction de HCL 1N. Ensuite, elles ont été testées sur la croissance du champignon en utilisant la même technique que celle employée dans l'expérience 14 (voir page 119). Les moyennes ont été calculées et comparées à celle du témoin (solution 1) par le test "t" de Student.

1.2.2/ Résultats et discussion (fig.56 et 57)

Deux acides organiques ont été détectés (fig.56): l'acide citrique ( $R_t$ : 4,13), à une concentration égale à  $0,96 \text{ g.l}^{-1}$ , et probablement l'acide formique ( $R_t$ : 7,45). La présence de ce dernier résultait sûrement du mauvais rinçage de la colonne lors de la purification de l'échantillon. L'effet d'un seul acide (acide citrique) a donc été étudié sur la croissance du champignon.

*La stimulation de la croissance fongique a pu être reproduite par l'acide citrique. Les résultats obtenus avec ce composé et avec le glucose sont du même ordre de grandeur (fig.57).*

Fig.55: chromatogramme d'une solution standard d'acides organiques. 1: acide oxalique, 2: acide tartrique, 3: acide malique, 4: acide citrique.

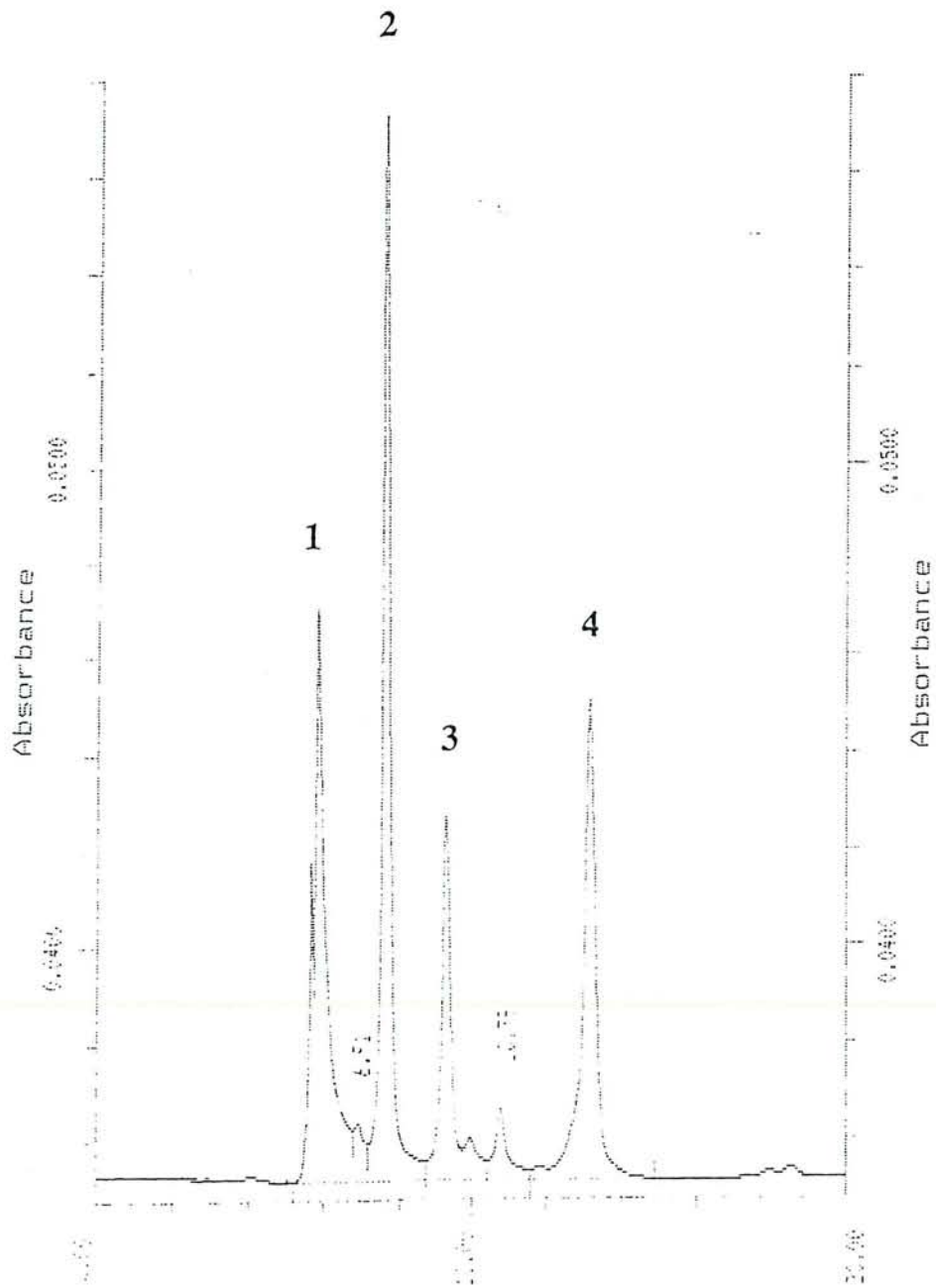




Fig.56: chromatogramme du filtrat de culture de la bactérie BBc6 après 7 jours d'incubation. 1. acide citrique. 2. acide formique.

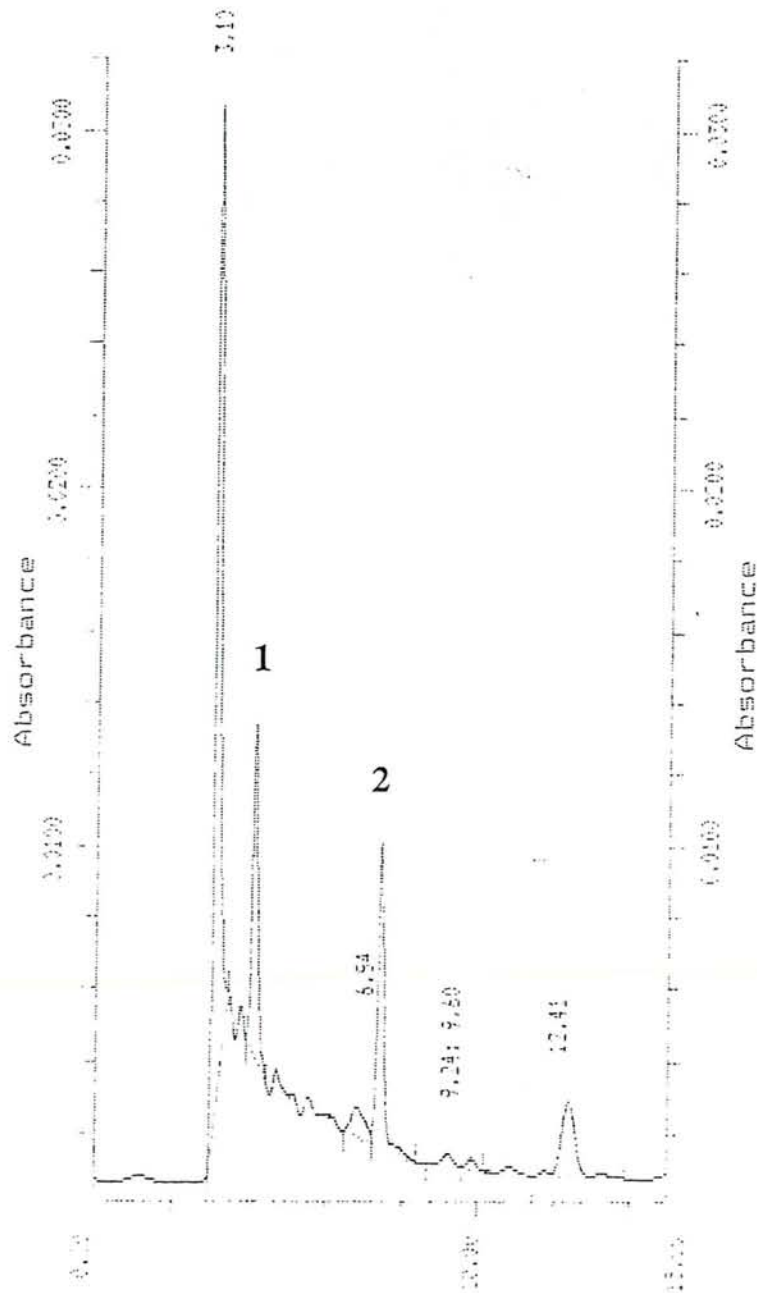
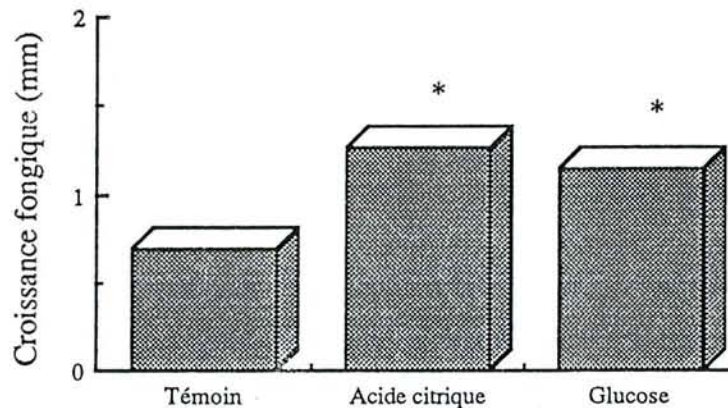


Fig.57: Effets du glucose et de l'acide citrique à la même concentration ( $0,96 \text{ g.l}^{-1}$ ) sur la croissance du champignon. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ ).



## 2.2/ Etude des voies B et C: neutralisation de l'auto-intoxication du champignon par les bactéries

### 2.2.1/ Mise en évidence du phénomène d'auto-intoxication du champignon (expérience 17)

#### A/ Matériels et méthodes

##### *Culture du champignon et récolte du milieu de culture*

Après environ 15 jours de culture sur un milieu nutritif gélosé (milieu Pachlewski modifié 25 mM) à  $25^{\circ}\text{C}$ , à l'obscurité, le thalle a été découpé à l'aide d'un emporte-pièce de 6mm de diamètre. Vingt cinq implants fongiques ont été transférés aseptiquement dans un Erlenmeyer contenant 500 ml de milieu Melin liquide préalablement autoclavé ( $120^{\circ}\text{C}$ , 20 min). Après 5 mois de culture sous agitation dans une chambre de culture ( $25^{\circ}\text{C}$ , obscurité), la biomasse fongique a été pesée et le milieu de culture a été recueilli par filtration sous vide sur fritté n°3. Ce filtrat a ensuite été concentré 10 fois au rotavapor et stérilisé à l'aide d'un filtre microporeux.

*Réalisation de la solution témoin*

Afin de montrer la toxicité du milieu pour le champignon, nous avons supposé que:

à T=0 le milieu a une composition chimique du type ( $M_0$ )

à T=5 mois le milieu a une composition chimique du type ( $M_1$ )

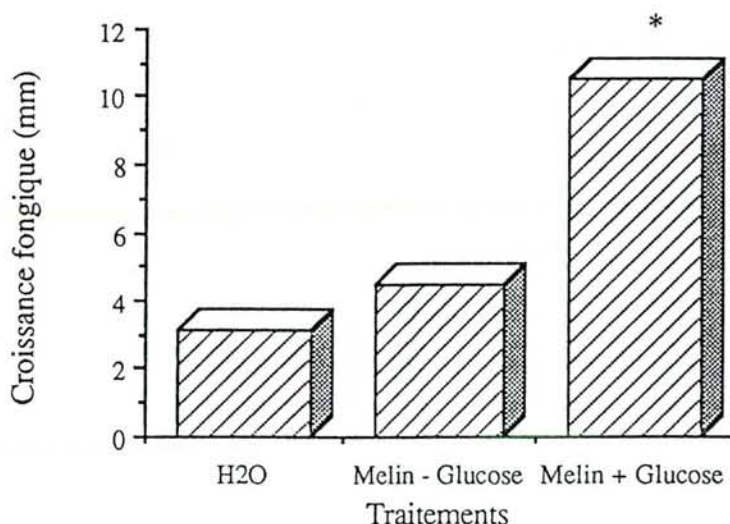
avec - ( $M_0$ ): composition du milieu Melin

- ( $M_1$ ) = (m) + (Y), (m): milieu Melin appauvri par le champignon  
et (Y): fraction représentant la production fongique de composés chimiques et contenant le ou les métabolites toxiques

Afin de mettre en évidence l'action de la fraction (Y) sur la croissance du champignon, il nous a fallu reproduire la solution (m).

Nous avons séparé les composants du milieu Melin en 2 catégories: Glucose et éléments minéraux. Ces 2 classes ont été testées indépendamment ou ensemble sur la croissance du champignon (expérience 18) et les effets obtenus ont été comparés au traitement témoin (eau stérile). La technique utilisée était identique à celle retenue pour les confrontations bactéries-champignon en conditions axéniques (expérience 14, page ). Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 58.

Fig.58: effet des différents traitements ( $H_2O$ , milieu Melin - glucose, milieu Melin + glucose) sur la croissance fongique. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ ).



Il apparait que le composé principalement responsable de la croissance du champignon est le glucose et que les éléments minéraux n'y interviennent que secondairement dans la technique utilisée. Ainsi, afin de reproduire la solution (m), nous avons dosé le glucose dans le filtrat de culture du champignon et mesuré le pH.

Le glucose a été dosé par une méthode enzymatique à l'aide d'un kit Sigma (Bulletin Sigma n°15 UV). La conversion du glucose en glucose-6-phosphate, en présence d'ATP et d'hexokinase, couplée à l'oxydation du glucose-6-phosphate avec formation de NADH, sert de base à l'analyse. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G.6.PDH) catalyse la réaction.

Cette réaction est suivie en mesurant l'absorbance du NADH à 340nm. La variation d'absorbance est proportionnelle à la quantité de glucose présent.

La solution Sigma a la composition suivante:

- NAD	1,5 mmole/l
- ATP	1,0 mmole/l
- Hexokinase (levure)	1000 unités/l
- G.6.PDH (levure)	1000 unités/l
- Mg <sup>2+</sup>	2,1 mmole/l

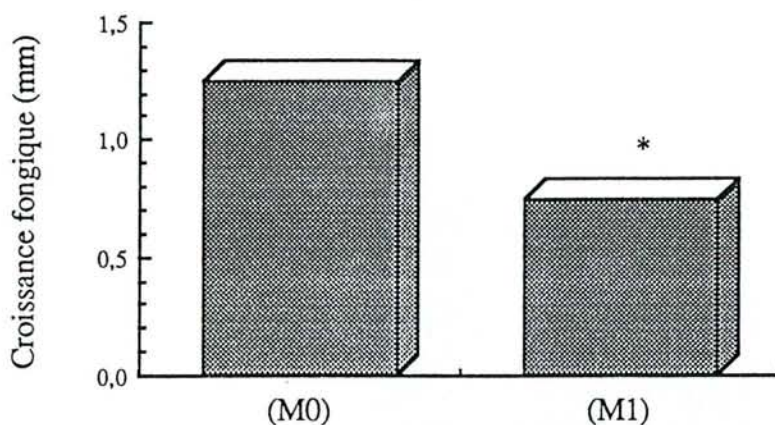
Un échantillon (0,02 ml) a été additionné à 1 ml de la solution Sigma. Ce mélange a été laissé 5 min à température ambiante avant la mesure de l'absorbance à 340 nm. La concentration du glucose a été calculée de la manière suivante:

(Glucose) (mg/dl) =  $DA \times TV \times MW \times 100 / 6,22 \times LP \times SV \times 1000$  avec: DA: absorbance à 340 nm ; TV: volume total (ml) ; MW: masse molaire du glucose (180,16) ; 6,22: absorption d'une millimole de NADH à 340 nm ; LP: parcours optique (cm) et SV: volume de l'échantillon (ml).

#### B/ Résultats et discussion (fig.59)

Le milieu épuisé par la culture du champignon (M<sub>1</sub>) avait un pH de 3,7 et une concentration en glucose de 15,3 mg.l<sup>-1</sup>. Par rapport au milieu reconstitué (M<sub>0</sub>) de même pH et de même teneur en glucose, il a réduit significativement la croissance du champignon.

Fig.59: Auto-intoxication du champignon en culture pure et en milieu liquide. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).



Par conséquent, le champignon *Laccaria laccata* S238 s'auto-intoxique dans son milieu de culture.

#### 2.2.2/ Neutralisation de la toxicité du milieu par les bactéries (expérience 19)

##### *Matériels et méthodes*

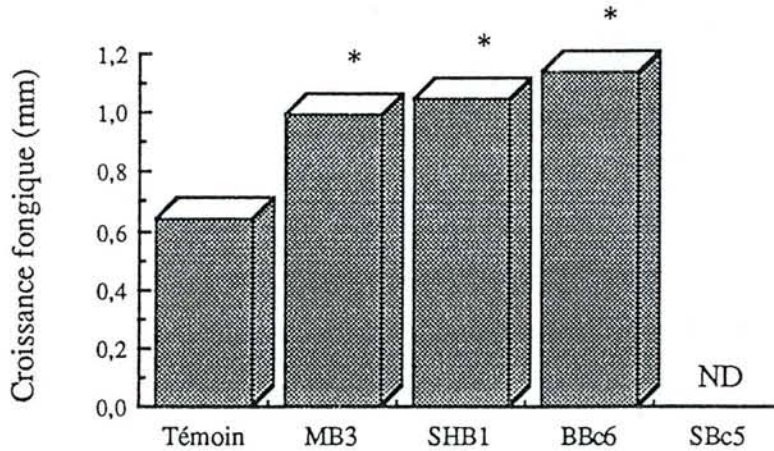
Des volumes de 9 ml de filtrat stérile ont été répartis dans des tubes (3x15 cm) et ont été ajustés à 10 ml par adjonction de 1 ml de suspension bactérienne dans le TSB 0,3% (TSB 0,3% sans bactérie pour le témoin). Après 4 jours de culture (25°C, obscurité, sous agitation), les filtrats des cultures bactériennes ont été recueillis et testés sur la croissance fongique par la technique de confrontation bactérie-champignon (expérience 14, voir page 119)

##### *Résultats et discussion (fig.60)*

Les trois bactéries (MB3, SHB1 et BBc6) ont annulé la toxicité du milieu (fig.60). Toutefois deux hypothèses non exclusives l'une de l'autre peuvent être émises pour expliquer ce phénomène: (1) les bactéries produisant des composés

*stimulant la croissance fongique masquent l'auto-intoxication du champignon. (2) les bactéries détruisent les composés toxiques et ainsi détoxifient le milieu*

Fig.60: Neutralisation de la toxicité du milieu par les bactéries. \*: différence significative par rapport au témoin (filtrat de culture du champignon) d'après le test "t" de Student (P=0,05). ND: non déterminé.



### 3/ Interactions bactéries-champignons ectomycorhiziens en milieu aqueux dans le cas d'une inhibition bactérienne de la croissance fongique (expérience 20)

#### 3.1/ Matériels et méthodes

Sept champignons ectomycorhiziens (*Thelephora terrestris*, *Paxillus involutus* NAU, *Paxillus involutus* QBC, *Cenococcum geophilum*, *Rhizopogon luteolus*, *Hebeloma crustuliniforme* et *Laccaria laccata* S238) ont été retenus.

Un implant fongique a été déposé au centre d'une boîte de Petri (diamètre: 9cm) contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). Les boîtes, scellées avec du Parafilm, ont été mises à incuber pendant 8 jours, à 25°C et à l'obscurité. Ensuite, 10 µl d'une culture bactérienne (milieu TSB 0,3%, 2 jours) ont été déposés à environ 1 cm de la périphérie de la colonie fongique. Les boîtes ont été remises dans la chambre de culture et les observations ont été faites après 15 jours d'incubation. L'inhibition bactérienne se traduisait par une incurvation de la colonie fongique en regard du spot bactérien (fig.61).

### 3.2/ Résultats et discussion (tableau 18)

Le but de cette expérience était de mettre en évidence une inhibition bactérienne de la croissance fongique à distance c'est-à-dire par production de composés diffusibles toxiques pour le champignon.

Les bactéries agissent différemment selon le champignon auquel elles sont confrontées. *T. terrestris* a été inhibé par toutes les bactéries, *P. involutus* QBC et *R. luteolus* par MB3, SBc5 et BBc6.

Le test de confrontation (expérience 14) a été réalisé avec un milieu pauvre afin de mettre en évidence des interactions trophiques alors que le milieu utilisé dans cette expérience 20 était très riche et les effets observés dans ce cas peuvent être attribués à des phénomènes d'antibiose.

*Le phénomène de sélectivité observé avec ces bactéries peut être expliqué par l'excrétion de composés qui inhibent la croissance de certains champignons (Papavizas, 1973 ; Weller, 1988 ; Davison, 1988 ; Gill & Warren, 1988 ; Schippers, 1988). L'absence d'effets inhibiteurs pour certains champignons montre que ces composés toxiques constituent seulement une explication dans certains cas et que d'autres mécanismes existent (production d'enzymes, etc).*

## 4/ Interactions bactéries-champignons ectomycorhiziens en milieu gazeux (expérience 21)

### 4.1/ Etude de l'effet global des bactéries sur la croissance fongique

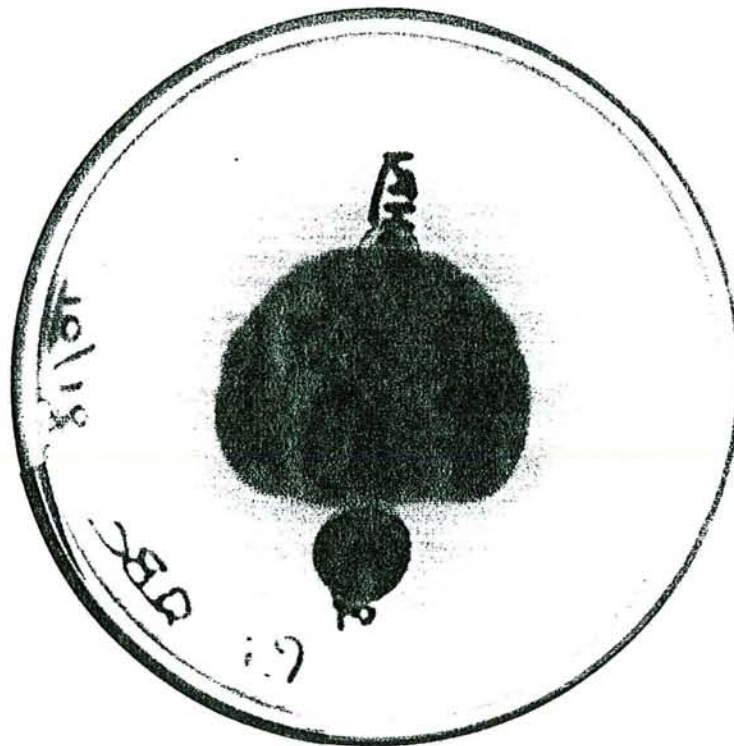
#### 4.1.1/ Matériels et méthodes

Des boîtes de Petri bicompartimentées (diamètre: 9 cm) ont été utilisées. Un des deux compartiments a été rempli par le milieu gélosé TSB 0,3% (agar: 20 g.l<sup>-1</sup>). Les bactéries ont été inoculées à la surface de ce milieu (milieu non inoculé pour le traitement témoin). Dans l'autre compartiment laissé vide, 5 implants fongiques calibrés ont été déposés. Les souches fongiques qui ont été utilisées ont leurs caractéristiques indiquées dans le tableau 16. Deux boîtes ont été utilisées pour chaque traitement bactérien, scellées avec du ruban adhésif afin d'éviter le dessèchement des implants et mises à incuber dans

Tableau 18 : effet à distance des bactéries sur la croissance de différentes souches fongiques. +: antagonisme, 0: aucun effet, nd: non déterminé (Expérience 20).

Souches fongiques	Bactéries			
	MB3	SHB1	SBC5	BBc6
<i>L. laccata</i> S238	0	0	0	0
<i>T. terrestris</i>	+	+	+	+
<i>P. involutus</i> NAU	0	0	+	0
<i>P. involutus</i> QBC	+	0	+	+
<i>H. crustuliniforme</i>	nd	nd	nd	0
<i>H. cylindrosporium</i>	+	0	0	0
<i>C. geophilum</i>	0	0	0	0
<i>R. luteolus</i>	+	0	+	+

Fig.61: antagonisme de la bactérie BBc6 contre le champignon ectomycorhizien *P. involutus* QBC.





une chambre de culture (25°C, obscurité). Les mesures ont été effectuées après différents temps de culture comme dans l'expérience 14. Les moyennes de chaque traitement ont été comparées à celle du témoin par le test "t" de Student (P=0,05).

#### 4.1.2/ Résultats et discussion (tableau 19)

Les 4 bactéries ont stimulé la croissance de la majorité des souches de *Laccaria laccata* et de *Laccaria bicolor*. Deux inhibitions ont été observées avec MB3 et SHB1 avec, respectivement *L. bicolor* CRBF 347 et 348 qui sont des monocaryons et donc qui ne peuvent exister dans le milieu naturel.

Par contre, toutes les bactéries ont inhibé la croissance des champignons différents des *L. bicolor* et *laccata* et n'ont eu aucun effet sur *L. proxima*.

Les composés gazeux émis par les isolats bactériens constituent une explication de la sélectivité bactérienne sur le champignon ectomycorhizien (voir 2ème partie) d'autant plus que ces effets sur la croissance fongique sont corrélés significativement aux effets obtenus sur la mycorhization en serre et en pépinière (expériences 7,8,9,10 et 11, pages 84 à 97 et fig.62).

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons étudié les mêmes voies d'action que celles exposées dans le cas des interactions en milieu aqueux (fig.54)

#### 4.2/ Etude de la voie A: production de métabolites gazeux par les bactéries

##### 4.2.1/ Effet du CO<sub>2</sub> dans les interactions bactéries-*Laccaria laccata* S238 (expérience 22)

###### *Matériels et méthodes*

Des boîtes de Petri quadricompartimentées (diamètre: 9 cm) ont été utilisées dans cette expérience. Les quatre compartiments étaient occupés respectivement par 4 implants fongiques, par le milieu TSB 0,3% gélosé (agar: 20 g/l) inoculé ou non (témoin) par une souche bactérienne, par de l'eau stérile (afin d'éviter le dessèchement des implants), et par de la chaux sodée destinée à piéger le CO<sub>2</sub>. Douze répétitions ont été réalisées par traitement (12 implants répartis dans 3 boîtes). Les boîtes de Petri ont été scellées avec du ruban adhésif et mises à incuber dans la chambre de culture (25°C,

Tableau 19: effet par voie gazeuse des bactéries sur la croissance des colonies fongiques (croissance radiale moyenne exprimée en mm). T: témoin. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05). nd: non déterminé.

Souches	durée de culture (j)	Bactéries				
		T	MB3	SHB1	BBc6	SBc5
<i>Laccaria laccata</i> S238	11	1,6	2,6*	2,5	nd	2,2*
<i>Laccaria laccata</i> CHAM3	8	1,6	2,3*	2,3*	2,0*	nd
<i>Laccaria laccata</i> S1023	8	0,8	1,5*	1,9*	1,8*	1,4*
<i>Laccaria laccata</i> 003	8	0,7	1,5*	1,4*	1,7*	1,5*
<i>Laccaria laccata</i> 83 222	8	1,1	1,8*	1,8*	1,4	1,5*
<i>Laccaria laccata</i> S106	8	1,8	1,7	1,2	1,6	1,2
<i>Laccaria laccata</i> 152x123	8	1,6	2,9*	2,8*	2,5*	nd
<i>Laccaria proxima</i>	11	3,9	4,1	3,9	4,4*	4,0
<i>Laccaria bicolor</i> CRBF 569	8	1,0	1,5*	1,6*	1,7*	1,5*
<i>Laccaria bicolor</i> CRBF 581	8	4,0	7,0*	7,2*	6,4*	5,9*
<i>L. bicolor</i> A4B3xA1B2	11	5,6	9,6*	10,5*	9,9*	9,0*
<i>Laccaria bicolor</i> CRBF 347	11	4,1	3,8	3,5*	4,5	4,3
<i>Laccaria bicolor</i> CRBF 348	11	6,3	6,4	6,2	5,6*	6,2
<i>Laccaria bicolor</i> 83 216	8	0,6	1,8*	1,2*	1,4*	1,1*
<i>Laccaria bicolor</i> D101	8	1,0	2,1*	1,9*	1,9*	1,9*
<i>Laccaria bicolor</i> 81 306	8	1,1	2,0*	1,9*	1,9*	1,7*
<i>Laccaria bicolor</i> 993	8	1,6	2,1*	2,0	2,5*	2,1*
<i>Laccaria bicolor</i> MUEL	8	2,7	3,0	3,3*	3,3*	3,0
<i>H. cylindrosporum</i>	8	4,5	4,1*	3,9*	3,8*	3,6*
<i>Paxillus involutus</i> QBC	8	1,7	0,9*	1,2*	1,5*	nd
<i>C. geophilum</i>	18	3,1	1,4*	1,6*	1,4*	1,4*
<i>T. terrestris</i>	18	2,0	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
<i>Suillus bovinus</i>	8	2,8	2,2*	1,4*	2,1*	2,2*
<i>Pisolithus tinctorius</i>	12	4,0	3,8	2,5*	3,6*	3,4*

obscurité) pendant 8 jours. Les mesures et les traitements statistiques ont été effectués comme dans le test de confrontation (expérience 14, page 119).

### *Résultats et discussion (fig.63)*

La chaux sodée n'a pas supprimé l'effet positif de BBc6 et SBc5 mais leur stimulation a été beaucoup plus importante en absence de CO<sub>2</sub>. L'effet opposé a été observé avec MB3 où l'absence de CO<sub>2</sub> a induit une inhibition de la croissance fongique.

Le phénomène de sélectivité bactérienne aurait pu être la conséquence d'une résistance plus ou moins importante des champignons à une concentration donnée de CO<sub>2</sub>. En effet, il a été montré que le dioxyde de carbone pouvait avoir, suivant sa concentration, une action inhibitrice ou stimulatrice de la croissance d'un champignon (Boasson & Shaw, 1979, 1981 ; Imolehin & Grogan, 1980 ; Le Tacon *et al* , 1983b ; Straatsma *et al* , 1986 ; Straatsma & Bruinsma, 1986 ; Duponnois, 1988).

*Nos résultats confirment que le CO<sub>2</sub> intervient dans les interactions mais n'explique pas les stimulations induites par les bactéries tout au moins pour BBc6 et SBc5.*

#### 4.2.2/ Identification des composés gazeux autres que le CO<sub>2</sub> produits par la bactérie BBc6 (expériences 23)

Cette étude a été menée en collaboration avec A. Latrassé du Laboratoire de Recherches sur les Arômes (INRA, Dijon)

#### *Matériels et méthodes*

Les cultures (témoin et BBc6) ont été extraites par l'éther éthylique puis concentrées pour être soumises à l'analyse chromatographique en phase gazeuse (analyse CPG).

Les composés ont été identifiés par analyse couplée chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. La confirmation de la nature des composés identifiés par cette technique, a été obtenue par la chromatographie de composés de référence lorsqu'ils étaient disponibles.

Fig.62: corrélation entre les effets gazeux des bactéries sur la croissance fongique (exprimés en % du témoin, expérience 21) et les effets sur la mycorhization en serre et en pépinière (exprimés en % du témoin, expériences 7, 8, 9, 10 et 11) \*: significatif à  $P=0,05$ . Cette corrélation a été réalisée avec 20 couples de mesures (effet sur la croissance fongique *in vitro* / effet sur le taux de mycorhization).

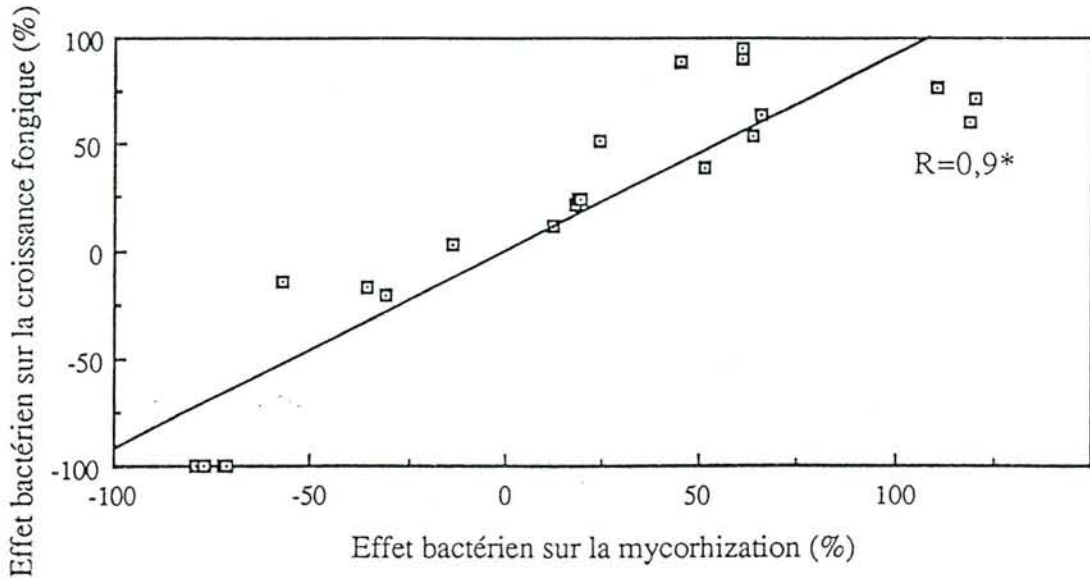
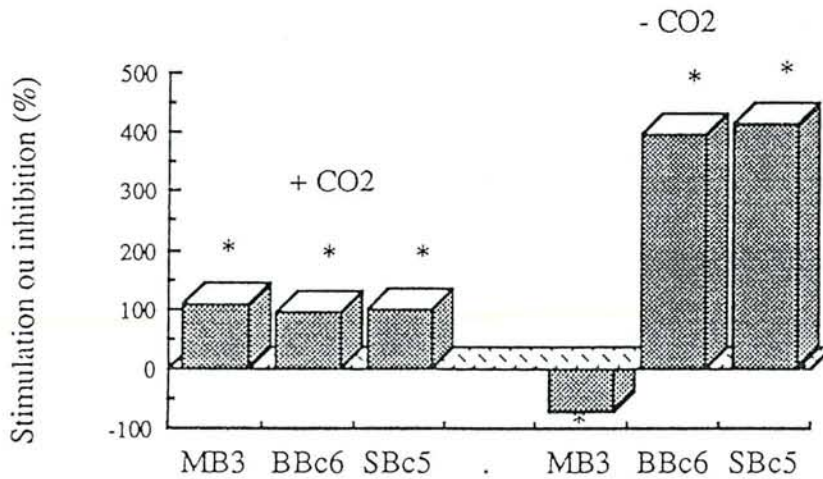


Fig.63: rôle du  $CO_2$  dans les interactions bactéries-*L.laccata* S238 \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ )



### *Résultats et discussion*

Les chromatogrammes correspondants au milieu TSB 0,3% et au filtrat de culture de la bactérie BBc6 sur le même milieu après 8 jours d'incubation (culture en phase stationnaire) ont montré que huit composés ont été produits par fermentation dont 3 ont été identifiés de façon sûre: l'acide oléique, l'alcool isoamylique et le phényl-2-éthanol. L'acide oléique apparaît comme le métabolite majeur des cultures de la bactérie BBc6. Sa présence est probablement due à l'activité lipolytique de BBc6. Ainsi, l'origine de cet acide est à rechercher dans la composition lipidique du milieu TSB. L'alcool isoamylique et le phényl-2-éthanol ont une origine attribuée classiquement à un mécanisme de désamination oxydative de l'isoleucine et de la phénylalanine, selon la voie métabolique d'Ehrlech.

Les éventuels effets stimulants des vapeurs d'alcool isoamylique, du phényl-2-éthanol et de l'acide oléique sur le développement du champignon restent à vérifier.

Une fraction très volatile de la culture bactérienne reste à explorer. Il s'agit de l'ensemble des composés très volatils qui sont élués simultanément avec le solvant, dans les conditions où les analyses ont été effectuées.

De tels composés comme l'ammoniac, des amines, des produits soufrés légers qui pourraient contribuer à la mauvaise odeur globale de la culture bactérienne, sont en effet susceptibles de stimuler la croissance du champignon.

*Cette étude devra être poursuivie en dosant plus particulièrement des composés très volatils que la technique employée ne pouvait identifier. Les éventuels métabolites produits par la bactérie devront être alors testés sur la croissance fongique.*

#### 4.3/ Etude des voies B et C: Neutralisation de l'auto-intoxication du champignon par les bactéries en milieu gazeux.

##### 4.3.1/ Auto-intoxication du champignon par voie gazeuse (voie B, expérience 24)

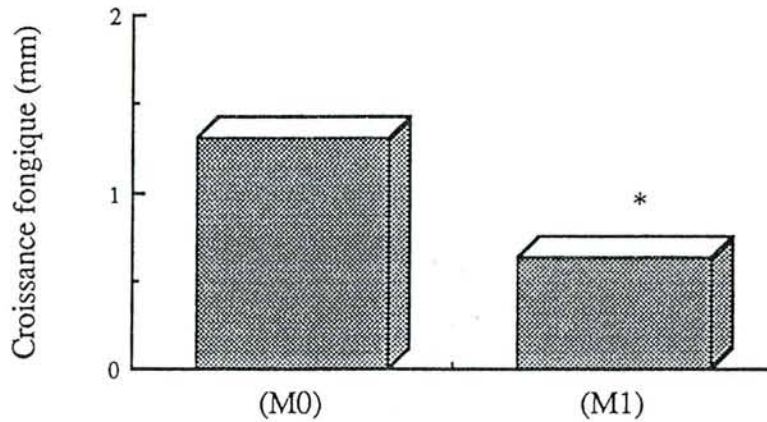
###### 4.3.1.1/ Matériels et méthodes

Des boîtes de Petri bicompartimentées (diamètre: 9cm) ont été utilisées dans cette expérience. Les deux compartiment étaient occupés respectivement par 5

implants fongiques et par un millilitre du milieu (M1) ou (M0)(témoin). Dix répétitions ont été réalisées par traitement. La suite a été identique à l'expérience 21 (page 134).

#### 4.3.1.2/ Résultats et discussion (fig.64)

Fig.64: Auto-intoxication du champignon par voie gazeuse. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).



*D'après ces résultats, l'auto-intoxication du champignon est aussi due à des composés gazeux.*

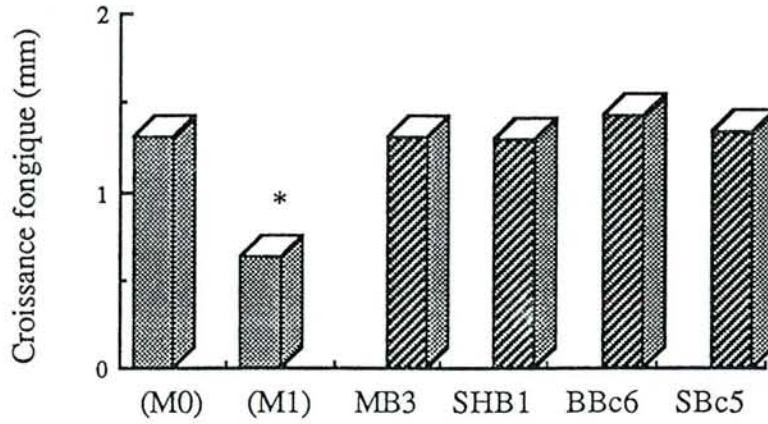
#### 4.3.2/ Neutralisation de la toxicité par les bactéries (voie C, expérience 25)

##### *Matériels et méthodes*

Cette expérience a été conduite de la même façon que l'expérience 24 sauf que les boîtes étaient composées par trois compartiments, occupés respectivement par 4 implants fongiques, le milieu TSB 0,3% gélosé (agar: 20g.l<sup>-1</sup>), inoculé ou non (témoin) et par un millilitre du filtrat de culture du champignon (M1) ou (M0).

##### *Résultats et discussion (fig.65)*

Fig.65: neutralisation de la toxicité du milieu par les bactéries. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ ).



*Les quatre bactéries ont neutralisé la toxicité du filtrat de culture du champignon (M1).*

## C/ Etude de la voie n°2: action des BAM sur la plante seule

### 1/ Effet des bactéries sur l'architecture racinaire en l'absence du champignon

#### 1/ Effet *in vitro* des bactéries sur l'élongation de la racine principale (expérience 26)

##### 1.1/ Matériels et méthodes

Du milieu Shemakanova gélosé (Shemakanova, 1962) modifié (Duponnois & Garbaye, 1991) a été coulé dans des grandes boîtes de Petri (diamètre: 14 cm). Ce milieu a été recouvert par une feuille de cellophane préalablement traitée de la façon suivante: 10 minutes dans une solution portée à ébullition de Na<sub>2</sub>EDTA (bicarbonate de sodium, 25% et EDTA (Ethylène Diamine Tetra Acide Acétique) 1 mM) afin d'éliminer le glycérol qui l'imprègne. Elle a ensuite été rincée à l'eau distillée puis autoclavée (120°C, 20 min).

La paroi latérale des boîtes a été perforée en 2 endroits distants d'environ 2 cm, juste au dessus du milieu de culture, à l'aide d'une pointe chauffée. La radicule d'une graine germée en conditions axéniques (voir 1ère Partie, page 61) a été introduite dans chaque trou. Du mastic autoclavé a été collé à la paroi et à la racine afin d'assurer la stérilité à l'intérieur de la boîte. Un disque de papier filtre stérile a été ensuite déposé sur la cellophane et les racines. Puis un millilitre d'une suspension bactérienne concentrée (10<sup>9</sup> cfu/ml) dans MgSO<sub>4</sub> 0,1 M (1 ml de MgSO<sub>4</sub> 0,1 M pour le traitement témoin) a été déposé sur le papier filtre au niveau de chaque racine. Les boîtes ayant été refermées, elles ont été scellées avec un ruban adhésif et placées dans une chambre de culture (23°C jour, 17°C nuit, 16 heures de photopériode avec 240μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, lampes Mazda MAIH 400, humidité relative: 80%). Il y avait 10 répétitions par traitement. Après 21 jours de culture, la racine principale de chaque semis a été mesurée et les moyennes de chaque traitement ont été comparées à celle du témoin par le test "t" de Student au seuil de 5%.

Avec ce système, la photosynthèse n'a pas été perturbée (la partie aérienne se trouvant à l'extérieur de la boîte) et la croissance racinaire a pu être suivie sans détruire le système (la racine étant visible par transparence à travers l'agar et la cellophane, en retournant les boîtes).



## 1.2/ Résultats et discussion (fig.66 et 67)

Dans ces conditions expérimentales, les racines étaient dépourvues de racines courtes. L'effet des bactéries a été mesuré uniquement au niveau de la croissance de la racine principale.

Les 4 bactéries ont stimulé significativement la croissance de la racine longue dans des proportions importantes (stimulation de 144% avec SBc5, fig.66).

La formation des racines est un phénomène complexe. Elle est influencée par différents facteurs de l'environnement comme la lumière (Eliasson, 1980), la température et les nutriments (Eliasson, 1978).

De nombreuses études ont montré que les auxines (en particulier l'AIA, acide indole-3-acétique) contrôlaient la croissance des cellules dérivées des méristèmes primaires et la multiplication des cellules des méristèmes secondaires (Heller, 1982). Généralement, l'auxine stimule la croissance des cellules (croissance isodiamétrique) qui appartiennent à des tissus primaires mais est également un facteur de la multiplication cellulaire, surtout dans le cas des méristèmes secondaires. En effet lorsque l'auxine est apportée à des concentrations très fortes ( $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  g.ml<sup>-1</sup>), elle provoque l'apparition de racines adventives.

Des apports exogènes d'AIA (Sigma, Ref.I 1375) ont donc été réalisés afin de voir si l'effet bactérien mentionné précédemment pouvait être attribué à cette molécule. La même technique de culture a été utilisée.

La figure 67 montre que la réaction de la racine de Douglas est classique (Heller, 1982): un effet inhibiteur est observé pour la plus forte concentration ( $1,7 \cdot 10^{-5}$  g.ml<sup>-1</sup>). Aux doses plus faibles ( $8,7 \cdot 10^{-6}$  à  $1,7 \cdot 10^{-6}$  g.ml<sup>-1</sup>), l'auxine est sans action mais a un effet positif à la concentration de  $0,8 \cdot 10^{-6}$  g.ml<sup>-1</sup>.

*Les effets bactériens (stimulation de l'élongation racinaire) ont pu être reproduits en apportant l'AIA à une concentration de  $0,8 \cdot 10^{-6}$  g.ml<sup>-1</sup>.*

Fig.66: effet des bactéries sur la longueur de la racine principale du Douglas *in vitro* (expérience26). \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05)

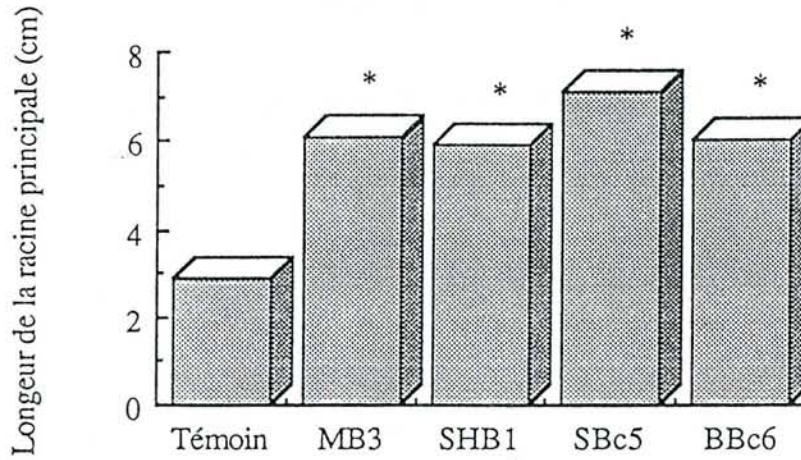
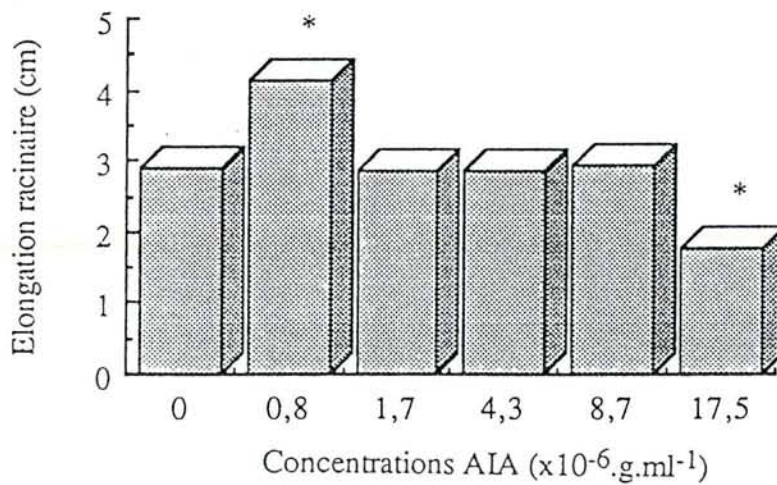


Fig.67: effet de l'AIA exogène apportée à différentes concentrations sur l'élongation racinaire du Douglas (expérience26). \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05)



## 2/ Etude de la production d'AIA par les bactéries (expérience 27)

### 2.1/ Matériels et méthodes

Une technique qualitative a été utilisée pour caractériser la production d'AIA (Bric *et al* , 1991). Des boîtes de Pétri contenant du milieu L. Broth (Bactotryptone: 10g ; bacto yeast extract: 5g ; chlorure de sodium: 10g ; H<sub>2</sub>O: 950ml) avec ou sans tryptophane (5mM, précurseur de l'AIA) ont étéensemencées en griffant la gélose à l'aide d'un cure-dent stérile préalablement plongé dans une jeune suspension bactérienne. Chaque boîte a été ensuite recouverte par un disque stérile de papier filtre Whatman n°1. Après 48 heures d'incubation (25°C, obscurité), le papier filtre a été retiré et plongé dans une solution (2% FeCl<sub>3</sub> 0,5M dans acide perchlorique (35%)). Ce réactif en présence d'AIA donne une couleur rouge violacée. La production d'AIA a été révélée par des stries de couleur foncée sur le disque.

### 2.2/ Résultats et discussion (tableau 20)

Tableau 20: production d'AIA par les bactéries après une incubation sur le milieu L. Broth avec ou sans Trp. T: témoin sans bactérie.

Milieux	Bactéries				
	T	MB3	SHB1	SBc5	BBc6
L. Broth - Trp	-	+	-	+	-
L. Broth + Trp	-	+	+	+	+

Toutes les bactéries ont produit de l'AIA en présence de Trp mais SBc5 et MB3 ont eu la faculté de synthétiser l'AIA en absence de Trp dans le milieu. Ces deux bactéries possèdent donc toutes les enzymes de la chaîne métabolique de synthèse de l'AIA.

De nombreux travaux ont mis en évidence la production d'hormones végétales par les microorganismes et leur impact sur la croissance de la plante (Moser, 1959 ; Libbert & Manteuffel, 1969 ; Brown, 1972 ; Azcon & Barea, 1975 ; Prikryl *et al* , 1985 ; Sattar & Gaur, 1987 ; Arshad & Frankenberger, 1991). Il a souvent été observé que le Trp était nécessaire à cette synthèse. Ce précurseur peut être présent dans le sol (autolyse de microorganismes, etc), exsudé par les racines (Vancura & Hovadik, 1965) ou sécrété par

différents microorganismes (Brown, 1972). Les bactéries BBc6 et SHB1 pourraient ainsi utiliser le Trp à partir des exsudats racinaires.

*La stimulation de l'élongation racinaire peut être expliquée par l'AIA que produisent les 4 bactéries.*

### **3/ Effet des bactéries *in vitro* sur substrat tourbe-vermiculite (expérience 28)**

Dans l'expérience précédente, l'effet des bactéries sur la formation des racines courtes n'a pas pu être montré. Nous avons fait une autre expérience en cultivant la plante dans un substrat différent se rapprochant des techniques utilisées dans l'expérience 4 (voir page 61).

#### **3.1/ Matériels et méthodes**

Des tubes (20 x 2 cm) ont été remplis par le mélange tourbe-vermiculite (1:1, v:v) humidifié par le milieu Shemakanova modifié (Shemakanova, 1962 ; Duponnois & Garbaye, 1991). Ces tubes obturés par du papier aluminium ont été ensuite autoclavés (120°C, 20 min).

La technique culturale était identique à celle utilisée dans l'expérience 4 (voir page 61).

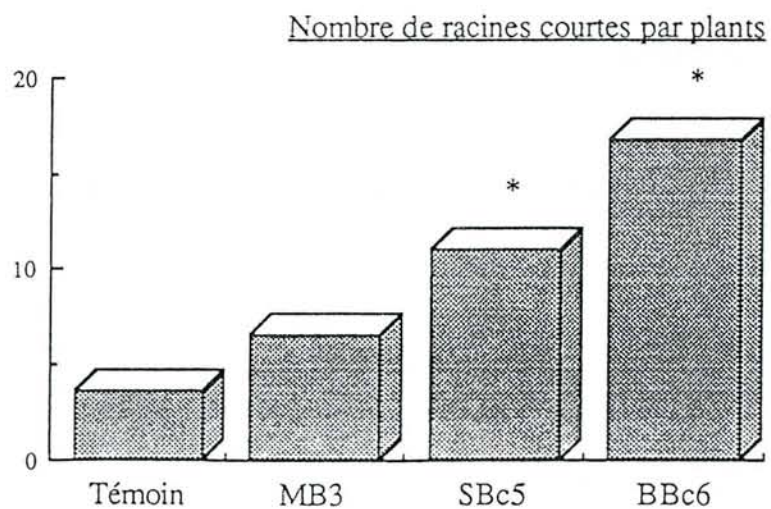
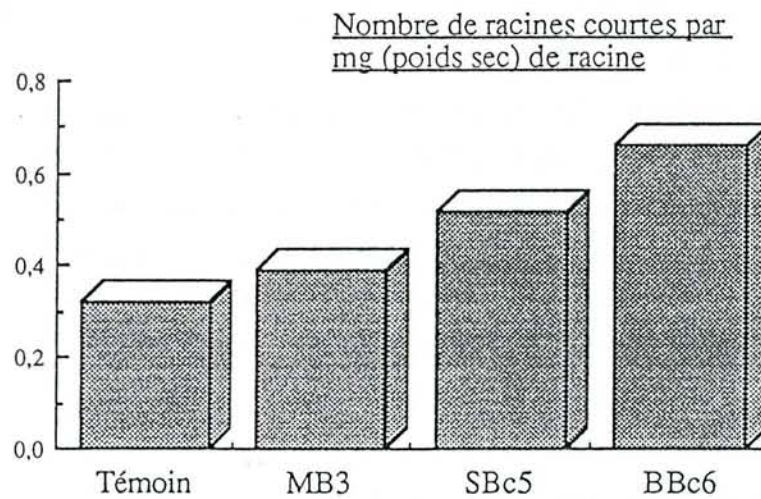
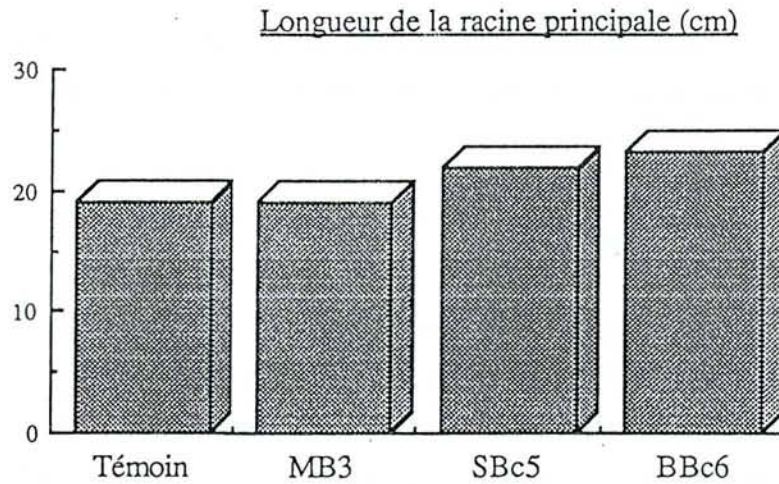
Un millilitre de suspension bactérienne dans du sulfate de magnésium 0,1M (1 ml de MgSO<sub>4</sub> 0,1M dans le traitement témoin) a été injecté dans chaque tube. Les concentrations de chaque suspension étaient de 10<sup>10</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> (MB3), 3.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> (BBc6) et 5.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> (SBc5). Il y avait 10 tubes par traitement.

Après 2 mois de culture, la longueur de la racine principale, le nombre de racines courtes par semis ; le nombre de racines courtes par milligramme de racine ont été déterminés pour chaque traitement et les moyennes ont été comparées à celles du témoin par le test "t" de Student.

#### **3.2/ Résultats et discussion (fig.68)**

Avec cette technique de culture, il y avait des racines courtes, ce qui confirme que les conditions environnementales sont très importantes pour la croissance racinaire.

Fig.68: effet *in vitro* des bactéries sur la formation des racines courtes et l'élongation de la racine principale dans l'expérience 28. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ )



Les seuls effets significatifs ont été observés avec SBc5 et BBc6 qui ont augmenté le nombre de racines courtes par plant. Les autres paramètres n'ont pas été significativement affectés par les bactéries mais les valeurs obtenues ont toutes été supérieures à celles du témoin sans bactéries.

#### **4/ Effet des bactéries sur substrat tourbe-vermiculite en conditions non axéniques en chambre de culture (expérience 29)**

##### 4.1/ Matériels et méthodes

Des boîtes en polystyrène transparent (20 x 7,5 x 2,2 cm, réf. LH 275.22, établissement Caubère, Paris) ont été utilisées. Une des 2 extrémités était ouverte et l'autre était percée par 3 trous (diamètre: 1cm) afin d'assurer le drainage.

Ces mini-rhizotrons ont été remplis par le substrat tourbe-vermiculite (1:1, v:v) humidifié par de l'eau osmosée. Ils ont ensuite été enveloppés par un plastique opaque qui empêchait le développement d'algues vertes dans le substrat et ont été maintenus dans une position inclinée (45°) afin que le système racinaire se développe contre la face inférieure de la boîte.

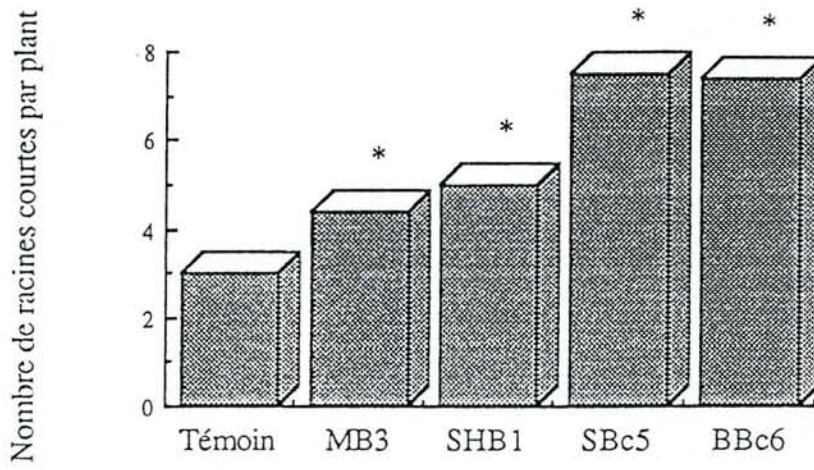
Les bactéries ont été incluses dans des billes d'alginate de calcium de 4mm de diamètre (pour la préparation, voir 4ème partie) à raison de  $10^8$  cfu (SHB1),  $10^9$  (MB3, SBc5) et  $10^{11}$  cfu (BBc6) par litre de billes d'alginate de calcium.

Chaque boîte contenant 2 plants a reçu 140 billes d'inoculum bactérien (140 billes d'alginate de calcium sans bactérie dans le traitement témoin). Il y avait 10 répétitions par traitement (5 boîtes). Les plants ont été placés dans une chambre de croissance (23°C jour, 17°C nuit, 16 heures de photopériode avec  $240\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , lampes Mazda MAIH 400, humidité relative: 80%). Après 3 mois de culture, le nombre de racines courtes par plant a été mesuré et la moyenne a été comparée à celle du témoin par le test "t" de Student ( $P=0,05$ ).

##### 4.2/ Résultats (fig.69)

*Les bactéries (sauf MB3) ont stimulé significativement la rhizogénèse des plants.*

Fig.69: effet des bactéries sur le nombre de racines courtes par semis dans l'expérience 29. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05)



## 5/ Effet des bactéries sur substrat tourbe-vermiculite en conditions non axéniques en serre (expérience 30)

### 5.1/ Matériels et méthodes

Cette expérience a été réalisée dans une serre climatisée du laboratoire BIOCEM (Angers) qui n'était pas contaminée par le champignon *T. terrestris* rendant possible la mise en évidence de l'effet bactérien.

Les techniques culturales et les paramètres mesurés étaient identiques à ceux retenus dans l'expérience 10. Les bactéries ont été apportées à une concentration de  $10^7$  cfu.ml<sup>-1</sup> de substrat tourbe-vermiculite.

### 5.2/ Résultats et discussion (fig.70)

Après 3 mois de culture, MB3, SHB1 et BBc6 ont stimulé la formation de racines courtes.

*Donc d'après les résultats de ces expériences conduites in vitro ou en conditions non axéniques et quel que soit le mode d'inoculation (suspension ou billes d'alginate), ces 4 bactéries ont eu une action positive sur la formation des racines courtes. Leur effet sur la mycorhization pourrait être en partie expliqué par cette propriété.*

## 6/ Effet des bactéries sur la croissance du Douglas (Fig.71 à 74)

La hauteur et/ou la biomasse aérienne et racinaire ont été mesurées dans l'expérience 30 après 3 et 5 mois de culture..

*La bactérie BBc6 a stimulé significativement la croissance en hauteur des semis (expérience 30). Aucun effet significatif n'a été obtenu dans les autres cas. Pourtant, les valeurs étaient supérieures à celles du témoin en particulier pour BBc6. Ces bactéries peuvent être qualifiées de PGPR, tout au moins pour BBc6.*



Fig.70: effet des bactéries sur le nombre de racines courtes par mg (poids de matière sèche) de racines totales dans l'expérience 30. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à deux facteurs contrôlés ( $P=0,05$ )

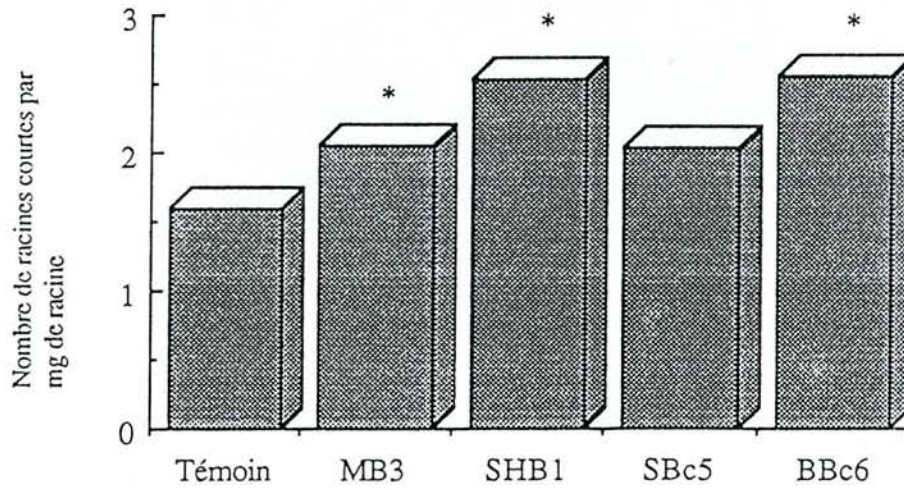


Fig.71: effet des bactéries sur la croissance en hauteur (cm) des semis de Douglas après 3 mois de culture dans l'expérience 30. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ).

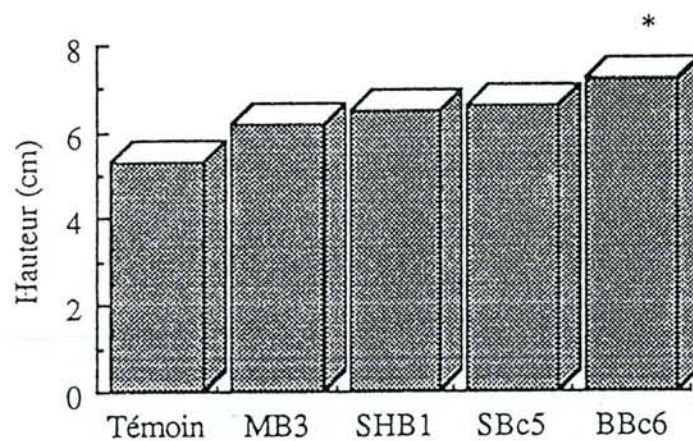


Fig.72: effet des bactéries sur la croissance en hauteur (cm) des semis de Douglas après 5 mois de culture dans l'expérience 30. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance ( $P=0,05$ ).

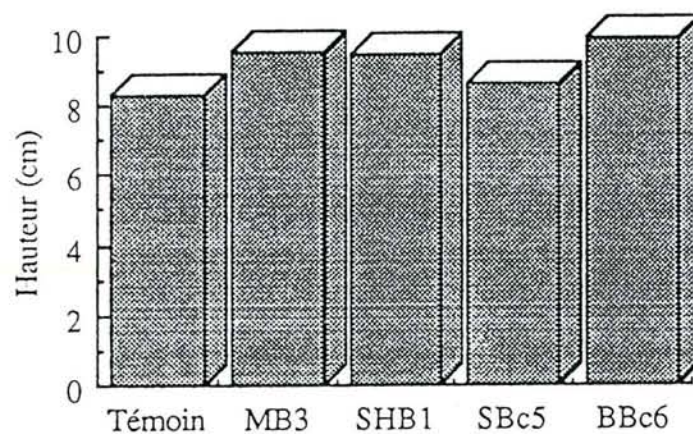


Fig.73: effet des bactéries sur la biomasse aérienne et racinaire (mg (poids sec) par semis) des semis de Douglas après 3 mois de culture dans l'expérience 30. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés.

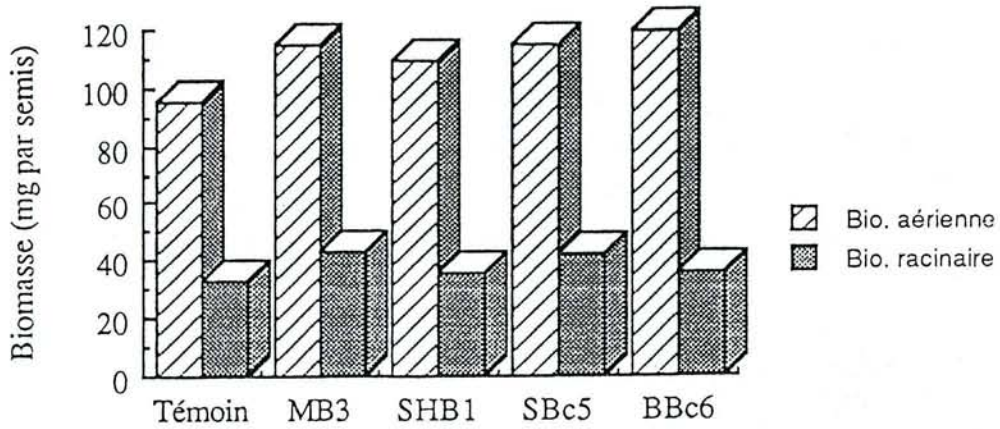
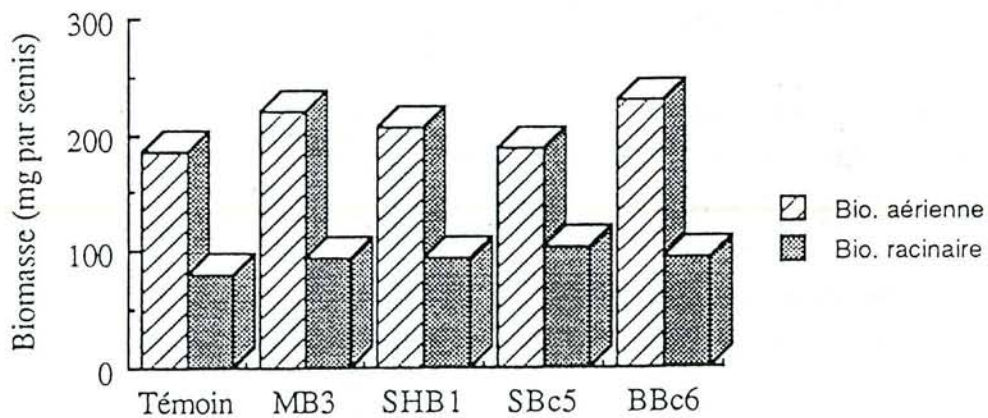


Fig.74: effet des bactéries sur la biomasse aérienne et racinaire (mg (poids sec) par semis) des semis de Douglas après 5 mois de culture dans l'expérience 30. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés.



## 7/ Solubilisation des phosphates peu solubles par les bactéries (expérience 31)

L'effet positif des bactéries sur la croissance du Douglas peut être expliqué par leur capacité à produire de l'AIA mais aussi par une amélioration de la nutrition minérale des semis, en particulier pour le phosphore. Ce dernier est un élément essentiel pour la plante. Pourtant il est majoritairement sous forme peu soluble dans le sol, peu mobile dans le sol et son absorption par la plante crée une zone de déplétion autour des racines (Nye & Tinker, 1977).

Afin d'expliquer les effets de type PGPR des BAM, leur capacité à solubiliser ces composés phosphatés peu solubles a été étudiée.

### 7.1/ Matériels et méthodes

La capacité de solubilisation des 14 BAM (voir expérience 1, page 49) a été étudiée sur la wavérite, l'oxyapatite, l'hydroxyapatite et la monétite (phosphate minéraux) et le phytate de calcium (phosphate organique).

#### *Conditions de culture*

Les bactéries ont été cultivées dans des tubes (3 x 15 cm) contenant 10 ml de milieu TSB 0,3% liquide, pendant 2 jours, à 25°C, à l'obscurité, sur une table d'agitation.

Des volume de 10µl (10µl de TSB 0,3% sans bactérie pour le traitement témoin) ont été prélevés dans ces suspensions puis ont été déposés au centre de boîtes de Petri contenant le milieu gélosé de base suivant: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 150mg ; KCL: 50mg ; CaCl<sub>2</sub>: 50mg ; thiamine: 40µg ; biotine: 0,4µg ; glucose: 5g ; agar: 10g et H<sub>2</sub>O: 1l. Le volume de milieu apporté dans chaque boîte a été standardisé de manière à avoir une épaisseur de 3mm.

Deux sources différentes d'azote ont été utilisées successivement: d'une part NaNO<sub>3</sub> (1608 mg.l<sup>-1</sup>)(milieu NO<sub>3</sub>P<sub>0</sub>) et d'autre part (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1250 mg.l<sup>-1</sup>)(milieu NH<sub>4</sub>P<sub>0</sub>). Ces 2 types de milieu contenant les phosphates (0,5 g.l<sup>-1</sup>) ont été stérilisés par autoclavage (120°C, 20 min).

### *Lecture du test*

Les 2 types de milieu sont à l'origine opaques. La solubilisation est révélée par une zone translucide qui apparaît autour du spot bactérien.

#### 7.2/ Résultats et discussion (tableaux 21 et 22)

De nombreuses études ont montré que certains microorganismes du sol participaient à la solubilisation des phosphates peu solubles (Gerretsen, 1948 ; Sperber, 1957 ; Louw & Webley, 1959 ; Katznelson & Bose, 1959, Banik & Day, 1981, Goldstein & Liu, 1987 ; Leyval, 1988 ; Lapeyrie *et al* , 1991) et amélioreraient la nutrition en phosphore des plantes (Harley & Smith, 1983).

Dans nos résultats, lorsque la source azotée était sous forme ammoniacale (tableau 21), la majorité des bactéries ont solubilisé les phosphates contrairement à ce qui a été obtenu avec le nitrate (tableau 22) où très peu de bactéries ont eu l'effet recherché.

Les mécanismes impliqués dans la solubilisation dépendent donc étroitement du type de la source azotée. Par exemple, l'ammonium stimule l'extrusion de protons (Raven & Smith, 1976 ; Salsac *et al* , 1982) et ainsi la solubilisation pourrait être due à une acidification. Lorsque l'azote est sous forme nitrate, la solubilisation pourrait être la conséquence de la production d'acides organiques par les bactéries (Michoustine, 1972 ; Alexander, 1977 ; De Giudici, 1986 ; Leyval, 1988) et nous avons montré que la bactérie BBc6 excréta de l'acide citrique. Cette bactérie solubilise l'oxyapatite et la monétite sur milieu  $\text{NO}_3\text{P}_0$ .

#### **8/ Activités enzymatiques des bactéries (Expérience 32)**

Ce travail a été réalisé en collaboration avec F. Vaillant dans le cadre de son stage de 2ème année du magistère microbiologie, enzymologie (Université de Nancy I).

Cette étude avait deux objectifs principaux: (1) vérifier l'hypothèse selon laquelle les bactéries pourraient dégrader le ciment intercellulaire et ainsi faciliter la pénétration des hyphes entre les cellules et (2) étudier leur activité saprophytique.

### 8.1/ Rappels sur les constituants principaux des parois végétales

La paroi squelettique d'une cellule végétale est constituée par plusieurs couches qui sont (de l'extérieur vers l'intérieur): la lamelle moyenne, la paroi primaire et les différentes couches de paroi secondaire.

La lamelle moyenne est située entre les cellules et donc a une grande importance dans la cohésion du tissu. Elle est constituée essentiellement de matières pectiques qui sont des polygalacturonides (polymères d'acide galacturonique et d'oses tels que l'arabinose et le galactose). Il existe différents types de pectine: rhamnogalacturonanes, arabanes, galactanes et arabinogalactanes. Ces polysaccharides pectiques ont été isolés chez le Douglas et Thomas *et al* (1987).

La paroi primaire est formée après la paroi primitive par la sécrétion des cytoplasmes des deux cellules contigües, de part et d'autre, d'une couche de cellulose et de composés pectiques. Cette paroi est composée, par ordre d'importance décroissante, d'hémicellulose, de cellulose, de pectines et de protéines.

Les hemicelluloses (glycane de nature variable) entourent les fibrilles cellulosiques auxquelles elles sont liées de façon non covalente.

La cellulose est un polymère de glucose (8000 à 12000 unités). Son hydrolyse donne des composés de moins en moins condensés. L'avant-dernier terme est le cellobiose (dimère de  $\beta$ -glucopyrannose). La cellulose est sous forme de microfibrilles dans la paroi primaire.

Dans les cellules plus âgées, la paroi secondaire apparaît. Elle est constituée uniquement de cellulose et d'hémicellulose.

Enfin, la formation de la paroi squelettique est achevée par une couche tertiaire composée par des microfibrilles de xylane.

### 8.2/ Matériels et méthodes

*Milieu de culture de base (sans substrat carboné) utilisé pour la mise en évidence des activités cellulolytiques, hémicellulolytiques et xylanasiques (D'après Hankin & Anagnostakis, 1975)*

Cette solution contient pour un litre:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 2g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 4g ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ : 15,1g ;  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,2g ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ : 1,3mg ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 10mg ;  $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ : 11mg ;  $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ : 125mg ;  $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ : 78mg ;  $\text{MoO}_3$ , 10mg, agar: 20 g).

Tableau 21: aptitude des BAM à solubiliser les différentes formes de phosphates peu solubles sur le milieu  $\text{NH}_4\text{P}_0$

Microorganismes	Phosphates peu solubles				
	Wavélite	Oxyapatite	Hydroxyapatite	monérite	Phytate de Ca
MB2	*	+	+	+	+
MB3	*	+	+	+	+
MB8	*	*	*	*	*
MB28	*	0	0	0	+
MB29	*	+	+	+	+
MB38	*	+	+	+	+
MB69	*	0	+	*	+
BBc1	*	+	+	+	+
BBc3	*	+	+	+	+
BBc6	*	+	+	+	+
BBc7	*	*	*	*	+
SBC1	*	+	+	+	+
SBC4	*	+	+	+	+
SBC5	*	+	+	+	+

+: action solubilisatrice

0: aucune action solubilisatrice

\*: croissance nulle du microorganisme

Tableau 22: aptitude des BAM à solubiliser les différentes formes de phosphates peu solubles sur le milieu  $\text{NO}_3\text{P}_0$

Microorganismes	Phosphates peu solubles				
	Wavérite	Oxyapatite	Hydroxyapatite	monérite	Phytate de Ca
MB2	*	0	0	0	+
MB3	*	0	0	0	0
MB8	0	*	*	0	*
MB28	0	*	0	0	0
MB29	*	0	0	0	0
MB38	0	0	0	0	0
MB69	*	0	0	*	+
BBc1	*	0	0	+	0
BBc3	*	+	0	+	0
BBc6	*	+	0	+	0
BBc7	0	0	*	*	*
SBe1	0	0	0	0	0
SBe4	*	0	0	0	0
SBe5	0	0	0	0	0

+: action solubilisatrice

0: aucune action solubilisatrice

\*: croissance nulle du microorganisme



### *Ensemencement des bactéries*

Les boîtes de Petri ont été ensemencées de deux façons: par étalement d'une suspension bactérienne à la concentration adéquate ou par dépôt d'une goutte de 10 $\mu$ l à la surface de la gélose. La boîte a été laissée immobile pendant quelques minutes afin que la phase aqueuse puisse s'infiltrer dans la gélose. Après quelques jours d'incubation, les bactéries ont donné des "taches" parfaitement circulaires. La mise en évidence des activités enzymatiques a été réalisée avec au moins 4 colonies par boîte et 3 boîtes par souche bactérienne.

### *Activités enzymatiques étudiées*

#### ↻ Activité endoglucanase

L'enzyme impliquée est la  $\beta$  1,4 Glucan Glucanohydrolase ou CMCellulase. Le substrat utilisé est la carboxyméthylcellulose ou CMC (Sigma, Chem. Co., St Louis, USA). Elle est incorporée dans l'agar avec la solution minérale à raison de 0,1 à 1,0%. Après 48 heures d'incubation à 25°C, à l'obscurité, les boîtes sont recouvertes avec 10ml d'une solution aqueuse de Rouge Congo (colorant qui réagit avec les  $\beta$  1,4 glucanes pour former un produit rouge) pendant 20 minutes. Le colorant est ensuite éliminé pour le remplacer par 10ml de NaCl 5M pendant 20 minutes.

La réaction est positive quand un halo translucide est observé autour de la colonie bactérienne.

#### ↻ Activité cellobiase

L'enzyme étudiée est la  $\beta$  glucosidase qui hydrolyse le cellobiose, dimère de glucose issu de la dégradation de la cellulose. Le substrat utilisé est le 6 Bromo 2 naphthyl  $\beta$ -D glucoside (BNG, Sigma, Chem. Co., St Louis, USA) qui est hydrolysé par l'enzyme en glucose et en bromonaphtol. Ce dernier réagit avec le sel de O-amino azotoluène diazonium (Fast Garnet, GBC, Sigma Chem. Co, St Louis, USA) pour former un précipité rouge.

Un disque de papier filtre Whatman n°1 stérile (diamètre: 9cm) est imprégné avec une solution méthanolique de BNG à 0,1%. Après évaporation du méthanol (3 à 5min), le papier est appliqué sur une boîte de Petri (milieu gélosé TSA 0,3%, agar: 20g.l<sup>-1</sup>) où les colonies bactériennes se sont développées.

Après une nuit d'incubation (25°C, obscurité), le papier est retiré et recouvert par pulvérisation d'une solution aqueuse de GBC à 0,15%. L'activité  $\beta$  glucosidase se traduit par une tache de couleur rougeâtre ou rose.

#### ↳ Activité pectinolytique (d'après Hankin & Anagnostakis, 1975)

Deux activités enzymatiques participant à l'activité pectinolytique peuvent être mises en évidence en faisant varier le pH: à pH 7, activité pectate lyase, à pH 5, activité pectine dépolymérase ou pectinase. Le substrat utilisé est la pectine (Sigma, Chem. Co., St Louis, USA) qui est ajoutée à l'agar à raison de 1%. La solubilisation de ce composé est délicate et doit se faire à chaud, sans agitation en ajoutant progressivement la pectine.

La pectine précipite avec le bromure d'hexadécyltriméthylammonium pour former un composé blanc. Ainsi la réaction positive est visualisée par la formation d'une auréole translucide lorsque la pectine a été hydrolysée autour des colonies bactériennes alors que le reste de la boîte reste blanche.

#### ↳ Activité xylanasique

La biodégradation du xylane est assurée par la  $\beta$  1,4 Xylan-Xylanohydrolase (Endo 1,4  $\beta$  xylanase). Cette méthode est basée sur l'hydrolyse d'un substrat chromophorique: le Remazol Brilliant Blue Xylan.

La réaction positive se traduit par la formation d'une auréole claire autour du spot bactérien alors que le reste de la boîte reste bleu.

La fixation covalente du colorant sur le xylane est réalisée d'après la méthode de Bohnert & Weingartner modifiée par Biely *et al* (1985).

Le colorant (0,15 à 2,0g) est dissout dans une solution de xylane (1g dans 30ml d'eau). Ensuite une solution de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10mg dans 10ml d'eau) est ajoutée goutte à goutte sous agitation pendant environ 5 minutes. Ce mélange est rendu alcalin par adjonction de soude (0,5g dans 10ml d'eau) et agité à température ambiante pendant 30 minutes. Deux volumes d'éthanol à 96% précipitent le produit coloré qui est recueilli par filtration et lavé avec: un mélange d'éthanol et d'une solution d'acétate de sodium 905M (2:1, v:v) jusqu'à ce que le filtrat devienne incolore ; un mélange d'éthanol et d'eau (4:1, v:v) ; de l'éthanol pur ; et de l'acétone.

Le produit obtenu est ensuite déshydraté à température ambiante et est incorporé dans la gélose à raison de 0,1%. Les boîtes sont ensuiteensemencées et les lectures sont réalisées après 18 à 20 heures d'incubation.

#### ↳ Activité amylolytique

Le substrat utilisé est l'amidon. Le milieu est composé par du Difco Nutrient Agar et de l'amidon soluble à 0,2%. Après 2 jours d'incubation, de la solution d'iode concentrée est versée dans les boîtes. L'activité amylolytique est visualisée par l'apparition d'une auréole jaune autour de la colonie bactérienne alors que le reste du milieu reste bleu.

### ↳ Activité lipolytique

La méthode utilisée a été décrite par Sierra (1957). Le monolaurate de sorbitane (Tween 20, Fisher Scientific Co., Fairlawn, N.J.) est utilisé comme substrat lipidique. Le milieu est préparé de la façon suivante: peptone (Difco): 10g ; NaCl: 5g ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O: 0,1g ; agar: 20g, H<sub>2</sub>O: 1l ; pH 6. Le Tween 20 est autoclavé séparément (120°C, 15min) et 1ml est ajouté à 100ml du milieu de base.

L'activité lipolytique est visualisée par un précipité dû à la formation de cristaux de sels de laurate de calcium autour des colonies bactériennes.

### ↳ Activité protéolytique

La production d'enzymes protéolytiques est mise en évidence avec un test décrit dans *Manual of methods for pure culture study of bacteria* (1951) où la gélatine est utilisée comme substrat. Le milieu est composé de Difco nutrient agar avec de la gélatine à 0,4%. Une solution aqueuse de gélatine à 8% est stérilisée séparément et ajoutée au milieu nutritif à raison de 5ml pour 100ml.

L'activité protéolytique est visualisée par l'apparition d'une auréole translucide autour des colonies alors que le reste de la boîte reste opaque.

## 8.3/ Résultats et discussion (tableau 23)

Tableau 23: Activités enzymatiques des quatre bactéries. +: réaction positive ; 0: réaction négative ; nd: non déterminé.

	MB3	SHB1	BBc6	SBc5
Endoglucanase (CMC: 0,5%)	+	+	0	+
Endoglucanase (CMC: 1,0%)	+	+	0	+
Cellobiose hydrolase	+	+	+	0
Pectate lyase	0	+	+	+
Pectinase	nd	nd	nd	nd
Xylanase	+	+	0	0
Lipase	0	0	+	+
Amylase	+	0	+	+
Protéase	+	+	+	nd

Tous ces travaux ne constituent qu'une étape préliminaire dans la mise en évidence de l'action par voie enzymatique des bactéries sur l'infection ectomycorhizienne.

*Mais nous avons pu montrer que les 4 bactéries possédaient au moins deux enzymes leur permettant de dégrader les polysaccharides constituant les parois des cellules du cortex racinaire.*

En conséquence, ces activités enzymatiques devront être étudiées une à une en les faisant agir sur la plante et en observant leurs effets sur la mycorhization. Ce type d'expérience a déjà été réalisé pour des études sur les mécanismes mis en jeu dans la pénétration intracellulaire des champignons endomycorhiziens (Mosse, 1962).

Les autres activités enzymatiques (lipolytique, amylolytique et protéolytique) nous ont renseigné sur les capacités saprophytiques des bactéries (chacune en possède au moins deux) et donc sur leur pouvoir de survie et de colonisation du sol ou du substrat lors d'une inoculation. Par exemple, les 4 BAM étudiées sont capables d'utiliser les protéines, mais seules BBc6 et SBc5 peuvent utiliser l'amidon ou les lipides.

## D/ Comparaison de l'importance des voies 1 et 2 dans les stimulations de l'infection ectomycorhizienne obtenues avec les bactéries

Les résultats présentés dans les sections B/ et C/ nous ont donné une liste de propriétés que possède chaque bactérie. Les voies 1 et 2 semblent être très impliquées dans les effets observés. Il était donc intéressant de comparer les 2 voies d'action en se basant sur les effets obtenus dans les différentes expériences en serre (expériences 3, 9 et 13) ou en pépinière (expérience 10) où les bactéries ont été inoculées avec un champignon ectomycorhizien.

### 1/ Effet des BAM sur le taux de mycorhization en fonction du nombre de racines courtes mycorhizées ou non par *L. laccata* S238

Dans les expériences 3, 9, 10 et 13, nous avons calculé le nombre de racines courtes mycorhizées ou non par milligramme (poids sec) de racine.

Aucune stimulation de la formation de racines courtes par les bactéries n'a été observée avec le Douglas, l'Epicéa, le Pin sylvestre, le Pin noir et ceci pour toutes les souches fongiques étudiées. Par contre, lorsque l'infection a été stimulée, le nombre de racines courtes mycorhizées a été significativement augmentée (diminuée dans les cas d'inhibition de la mycorhization) (tableaux 24, 25, 26 et 27).

Tableau 24: effet des quatre bactéries (MB3, SHB1, SBc5 et BBc6) dans l'expérience 3 (voir page 59) sur différents paramètres: TM: taux de mycorhization ; RCM: nombre de racines courtes mycorhizées par milligramme (poids sec) de racine ; RTC: nombre total de racines courtes par milligramme (poids sec) de racine. \*: différence significative par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).

Traitements	TM	RCM	RTC
Témoin	44,0	0,35	0,81
MB3	64,1	0,55	0,87
SHB1	83,5*	0,87*	1,05
SBc5	79,3*	0,82*	1,03
BBc6	73,2*	0,57*	0,76

*Ces résultats montrent que l'action des bactéries sur la croissance du champignon et/ou sur le processus d'infection sensu stricto semble être prédominante pour expliquer les effets inhibiteurs ou stimulateurs de la mycorhization.*

## 2/ Effet des BAM sur la croissance des semis de Douglas

A partir des résultats obtenus dans l'expérience 3 (tableau 28), nous avons corrélié le taux de mycorhization par semis à sa biomasse racinaire pour le témoin (sans champignon) et les traitements bactériens (fig.75, 76, 77 et 78).

Tableau 28: Effet des bactéries sur le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et la biomasse racinaire des semis dans l'expérience 3 (voir page 51). \*: différence significative d'après le test "t" de Student (P=0,05).

	Témoin	MB3	SHB1	BBc6	SBc5
Taux de mycorhization	44,0	64,1	83,5*	73,2*	79,3
Biomasse racinaire	15,0	17,0	20,2*	22,9*	18,0

Tableau 25: effet des quatre BAM (MB3, SHB1, SBc5 et BBc6) inoculées avec différentes souches de *Laccaria bicolor* et *Laccaria laccata* S238 sur différents paramètres morphologiques des semis de Douglas après 4 mois de culture dans l'expérience 9. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc, traitement) au seuil de 5%. NRCT: nombre de racines courtes totales par mg (poids de matière sèche) de racine. NRCM: nombre de racines courtes mycorhizées par mg (poids de matière sèche) de racine.

Souche fongique	Traitement	NRCT	NRCM
<i>Laccaria laccata</i> S238			
	Témoin	1,58	0,88
	MB3	1,59	1,51*
	SHB1	2,20	2,06*
	SBc5	1,76	1,49*
	BBc6	1,41	1,30
<i>Laccaria bicolor</i> 993			
	Témoin	1,60	1,29
	MB3	1,50	1,44
	SHB1	1,61	1,51
	SBc5	1,59	1,49
	BBc6	3,3	3,24
<i>Laccaria bicolor</i> S-3			
	Témoin	1,70	0,10
	MB3	1,40	0,42
	SHB1	1,99	0,70*
	SBc5	1,18	0,27
	BBc6	1,06	0,22
<i>Laccaria bicolor</i> A4B3xA1B2			
	Témoin	1,78	0,38
	MB3	1,36	0,66
	SHB1	1,21	0,39
	SBc5	1,22	0,59
	BBc6	1,43	0,68

Tableau 26: effet des bactéries SBc5 et BBc6 sur le nombre de racines courtes mycorhizées (NRCM) et total (NRCT) rapporté au mg (poids de matière sèche) de racine, en pépinière après 4 mois de culture (expérience 10). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (bloc et traitement)(P=0,05)

Souches fongiques	Paramètres	Traitements		
		Témoin	SBc5	BBc6
<i>Laccaria laccata</i> S238				
	NRCM	2,30	3,00	3,00
	NRCT	3,08	3,18	3,24
<i>Laccaria bicolor</i> D101				
	NRCM	2,30	3,50*	2,90
	NRCT	4,31	3,92	3,22
<i>Laccaria proxima</i> 415				
	NRCM	0,80	0,90	0,90
	NRCT	2,10	2,60	2,50
<i>Hebeloma cylindrosporum</i> D15				
	NRCM	4,00	2,50*	2,70*
	NRCT	4,50	4,10	4,70
<i>Paxillus involutus</i> QBC				
	NRCM	0,90	0,30	0,40
	NRCT	2,10	3,30	2,70
Champignon indigène type <i>Rhizopogon</i> sp.				
	NRCM	0,60	0,00*	0,30
	NRCT	2,60	3,80*	3,22



Tableau 27: effet des bactéries sur le nombre total de racines courtes (dichotomiques ou simples) par milligramme (poids sec) de racine, le nombre de racines courtes mycorhizées ou non (dichotomiques ou simples) par milligramme (poids sec) de racine, dans l'expérience 13 après 4 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (traitement et bloc)( $P=0,05$ ). RCM: racines courtes mycorhizées, RCNM: racines courtes non mycorhizées, RCT: racines courtes totales.

Plante hôte	traitements	Racines courtes simples			Racines courtes dichotomiques			Racines courtes totales		
		RCM	RCNM	RCT	RCM	RCNM	RCT	RCM	RCNM	RCT
Douglas	Témoin	1,21	0,75	1,96	0,00	0,00	0,00	1,21	0,75	1,96
	MB3	1,57*	0,24*	1,81	0,00	0,00	0,00	1,57*	0,24*	1,81
	SIB1	1,33	0,25*	1,58	0,00	0,00	0,00	1,33	0,25*	1,58
	SBc5	2,22*	0,25*	2,47	0,00	0,00	0,00	2,22*	0,25*	2,47
	BBc6	2,10*	0,24*	2,34	0,00	0,00	0,00	2,10*	0,24*	2,34
Epicéa	Témoin	3,30	2,00	5,30	0,00	0,00	0,00	3,30	2,00	5,30
	MB3	3,60	1,00	4,60	0,00	0,00	0,00	3,60	1,00	4,60
	SIB1	4,51	1,01	5,52	0,00	0,00	0,00	4,51	1,01	5,52
	SBc5	3,30	0,60*	3,90*	0,00	0,00	0,00	3,30	0,60*	3,90*
	BBc6	4,70	0,90	5,60	0,00	0,00	0,00	4,70	0,90	5,60
Pin noir	Témoin	0,86	1,32	2,18	0,31	0,16	0,47	1,17	1,48	2,65
	MB3	0,89	0,52*	1,41	1,55*	0,01	1,56*	2,44*	0,53*	2,97
	SIB1	1,31	0,27*	1,58	0,79*	0,00	0,79	2,10*	0,26*	2,36
	SBc5	1,17	0,37*	1,54	1,45*	0,01	1,46	2,60*	0,38*	2,98
	BBc6	1,41	0,75	2,16	0,69	0,01	0,70	2,10*	0,75	2,85
Pin sylvestre	Témoin	2,15	3,15	5,3	0,72	0,00	0,72	2,87	3,13	5,98
	MB3	2,20	1,04*	3,24*	1,13	0,00	1,13	2,79	1,01*	3,80*
	SIB1	1,82	1,14*	2,96*	0,77	0,00	0,77	2,60	1,47*	3,73*
	SBc5	1,98	1,06*	3,04*	0,56	0,00	0,00	2,54	1,05*	2,60*
	BBc6	2,91*	0,89*	3,8*	0,87	0,00	0,87	3,79*	0,94*	4,73*

Fig.75: Corrélations entre le taux de mycorhization et la biomasse racinaire du traitement témoin (sans bactérie) et du traitement avec SHB1 dans l'expérience 3. \*: significatif à  $P=0,05$ .

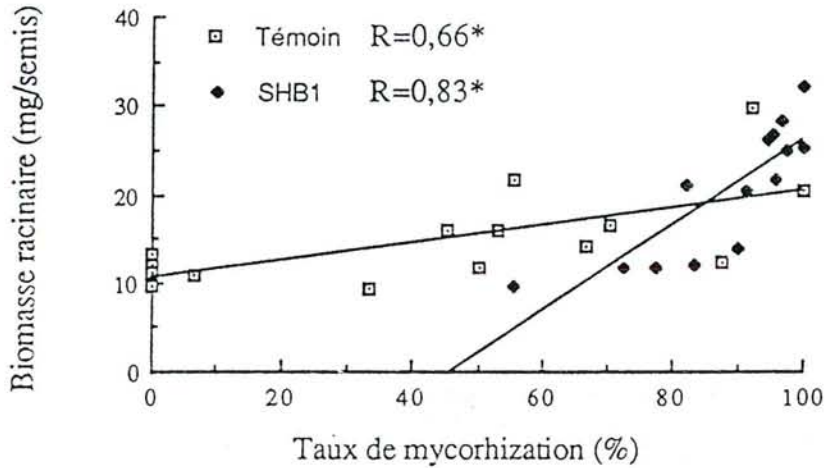


Fig.76: Corrélations entre le taux de mycorhization et la biomasse racinaire du traitement témoin (sans bactérie) et du traitement avec MB3 dans l'expérience 3. \*: significatif à  $P=0,05$ .

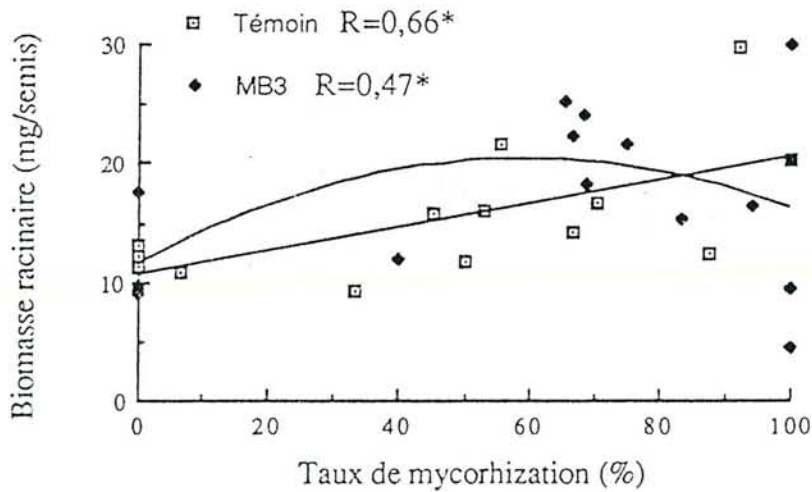


Fig.77: Corrélations entre le taux de mycorhization et la biomasse racinaire du traitement témoin (sans bactérie) et du traitement avec SBc5 dans l'expérience 3. \*: significatif à  $P=0,05$ .

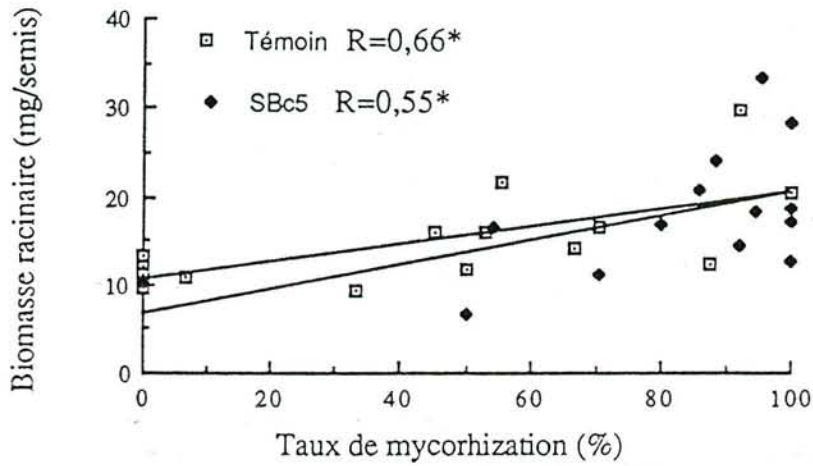
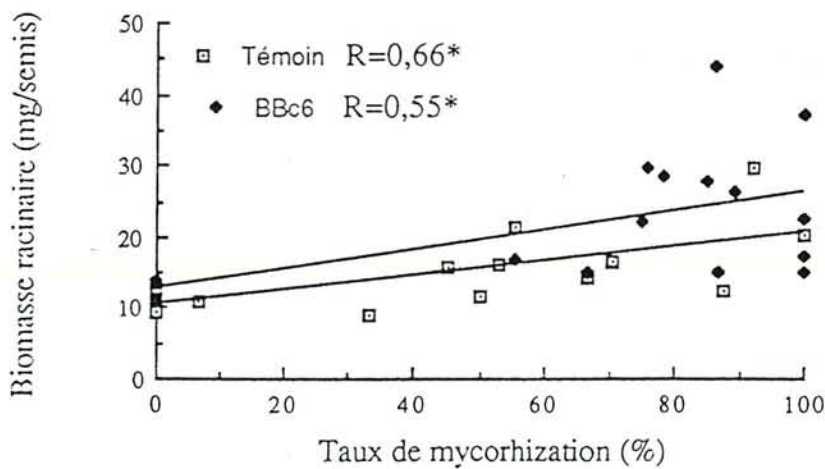


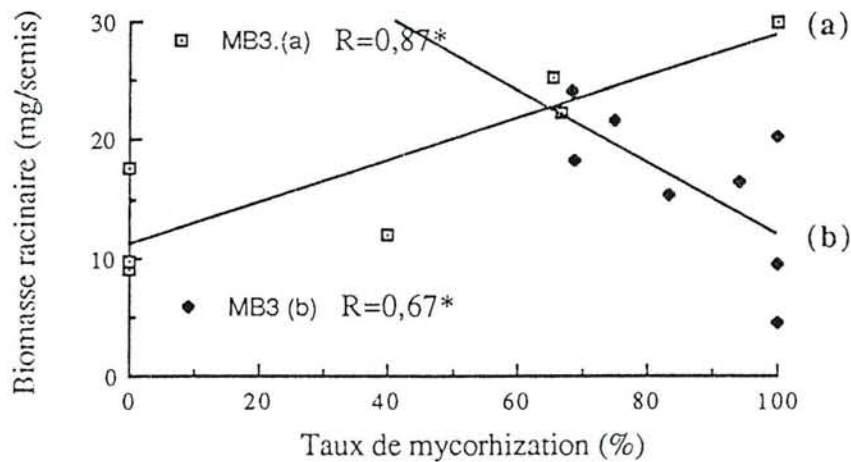
Fig.78: Corrélations entre le taux de mycorhization et la biomasse racinaire du traitement témoin (sans bactérie) et du traitement avec BBc6 dans l'expérience 3. \*: significatif à  $P=0,05$ .



Les bactéries SHB1, SBc5 et BBc6 ont agi sur la biomasse en stimulant principalement le taux de mycorhization. En conséquence l'hypothétique effet synergique du champignon et de la bactérie sur la croissance racinaire a été infirmé par les droites de corrélations.

Par contre, la bactérie MB3 s'est comportée de manière différente. Il est apparu (fig.79) que le taux de mycorhization (jusqu'à environ 60%) était corrélé positivement à la biomasse racinaire puis négativement après 60%. Ce phénomène pourrait être expliqué par une stimulation de la biomasse bactérienne lorsque le taux de mycorhization est supérieur à 60%. Le besoin des bactéries en substrats énergétiques issus des exsudats racinaires deviendrait alors trop important, ce qui inhiberait la croissance racinaire (fig.79).

Fig.79: Evolution de la corrélation entre le taux de mycorhization et la biomasse racinaire dans l'expérience 3 avec MB3. \*: significatif à  $P=0,05$ .



*Donc les BAM agissent en augmentant le nombre de racines courtes mycorhizées. Nous n'avons pas observé d'effet synergique avec le champignon et l'isolat bactérien.*

*La bactérie MB3 s'est, une nouvelle fois comportée de manière différente. Elle inhibe la croissance du champignon lorsqu'elle est présente en quantité trop importante.*

## E/ Conclusion de la 3ème partie

Les différentes voies d'action mises en évidence sont schématisées dans la figure 80.

Nous avons montré que les BAM ont une action stimulatrice de la croissance du Douglas et nous avons suggéré que les auxines produites par les bactéries et leur activité solubilisatrice des phosphates pouvaient expliquer ce phénomène. L'incidence sur la plante d'autres composés aurait pu être étudiée. En effet de nombreux travaux ont montré que les bactéries produisent des gibbérellines (Katznelson, 1965 ; Azcon & Barea, 1975 ; Sattar & Gaur, 1987 ; ), des cytokinines (Azcon & Barea, 1975 ; Kloepper *et al* , 1989). La question des sidérophores aurait pu aussi être abordée en particulier pour BBc6 (*Pseudomonas fluorescens* ). Les effets bénéfiques des *Pseudomonas* ont souvent été attribués à ce type de composé (Schippers, 1988 ; Loper & Buyer, 1991).

Le rôle des enzymes produites par les bactéries devra être étudié plus précisément. B. Mosse (1962) a montré qu'un *Pseudomonas* sp. favorisait l'infection endomycorhizienne de racines de trèfle (*Trifolium parviflorum* ) en conditions axéniques. L'auteur a reproduit cette stimulation avec une préparation d'enzymes pectinolytiques et cellulolytiques ou avec un filtrat de culture stérile de la bactérie. Elle a suggéré que la bactérie avait induit des modifications au niveau des parois des cellules racinaires et avait ainsi facilité la pénétration du champignon. En fait, les activités enzymatiques (plus particulièrement pectinolytiques et cellulolytiques) des bactéries associées aux racines des arbres sont mal connues. Il faudra vérifier l'hypothèse selon laquelle les bactéries associées aux ectomycorhizes pourraient faciliter la pénétration du champignon entre les cellules en agissant sur la lamelle moyenne.

Cependant, il est apparu que l'action de la bactérie sur le champignon ectomycorhizien permettait d'expliquer leur sélectivité sur la mycorhization (fig.62).

En ce qui concerne l'effet des BAM sur la croissance de *L. laccata* S238, deux voies non exclusives l'une de l'autre peuvent être imaginées: (1) effet trophique direct en milieu gazeux et aqueux où nous avons démontré que l'acide citrique était un des responsables de la stimulation. Mais d'autres substances peuvent favoriser la croissance comme les acides aminés, les vitamines et les substances de croissance (Moser, 1959 ; Strzelczyk & Rozycki, 1985 ; Strzelczyk & Leniarska, 1985 ; Strzelczyk *et al* , 1985 ; Bakker & Schippers, 1985). (2) neutralisation de l'auto-intoxication du champignon.

Dans ce cas, nous n'avons pas pu démontrer si la bactérie détoxifiait le milieu ou si cette toxicité était masquée par leur effet trophique direct.

Ce type de confrontation a déjà été utilisé avec d'autres champignons (*Paxillus involutus* et *Hebeloma crustuliniforme*) et d'autres bactéries (Duponnois & Garbaye, 1990). L'effet de l'acide citrique y avait déjà été observé et la détoxification du milieu de culture du champignon avait été démontrée (dégradation par les bactéries des polyphénols excrétés par *P. involutus*).

L'inhibition de la croissance des autres champignons peut être expliquée par l'excrétion d'enzymes comme les chitinases (Walden et Selitrennikoff, 1988 ; Watanabe *et al*, 1990), par la production de sidérophores pour BBc6 (Davison, 1988) ou par des composés volatils spécifiques (inhibant les champignons autres que *L. bicolor*).

Dans la figure 50, les mécanismes de reconnaissance entre la plante et le champignon étaient visualisés par la voie 3. Il est connu que ces processus sont basés sur la réception d'un signal moléculaire qui va générer une cascade d'évènements biochimiques: la transduction. Ceci a été activement étudié dans le cas de la formation de galles du collet (crown gall) par *Agrobacterium tumefaciens* (Hooykaas *et al*, 1989), de nodules fixateurs d'azote par *Rhizobium* ou de la défense chez une plante suite à l'infection par un champignon pathogène.

La transduction entraîne une modification de l'activité régulatrice de certains gènes et provoque l'induction de voies biochimiques spécifiques. Les produits de ces voies sont des signaux qui permettent l'association de type pathogénique ou symbiotique.

Dans le cas de l'association ectomycorhizienne, ces processus sont très peu connus. Certains travaux ont permis d'émettre quelques hypothèses. Nous discuterons seulement le rôle possible des BAM dans ces mécanismes proposés.

Fries *et al* (1985) ont montré que des acides gras produits par les racines de Pin stimulaient la croissance de 2 des 3 champignons qu'ils ont étudiés. Ils ont alors émis l'hypothèse que la plante par la qualité de ses exsudats racinaires exerçait une influence sélective sur la croissance des champignons dans la rhizosphère. Or nous avons souligné (voir introduction) que certaines bactéries étaient capables de modifier qualitativement et quantitativement l'exsudation racinaire. Dans ce cas, elles pourraient participer indirectement à ces mécanismes sélectifs.

Il a été aussi suggéré que la formation d'une ectomycorhize suit un modèle d'échanges de signaux moléculaires comparable à celui des autres associations plante-microorganisme (Duchesne, 1989 ; Horan et Chilvers, 1990). Ces signaux peuvent être:

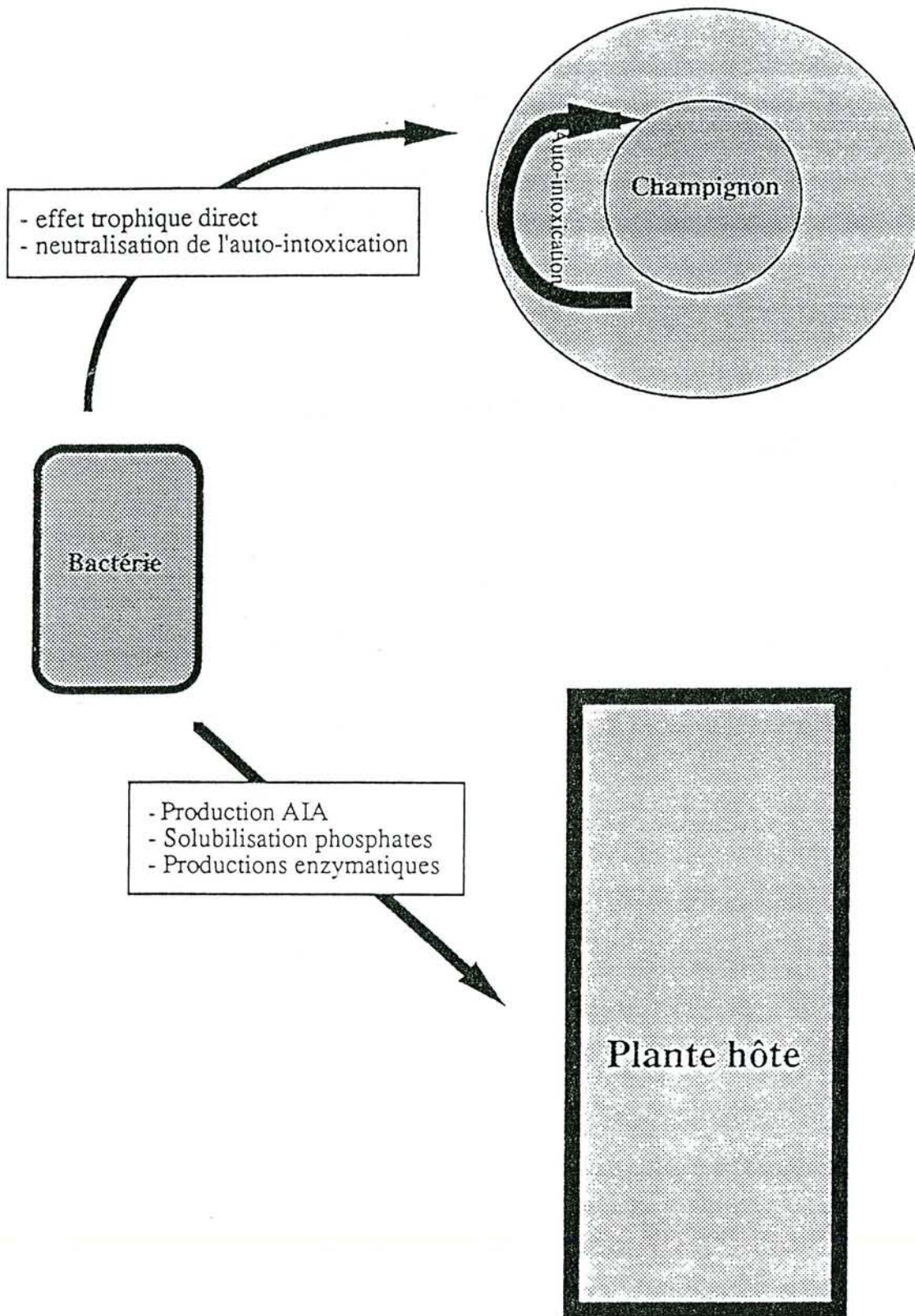


Fig. 80: Schématisation des différentes voies d'action des bactéries sur la plante et sur le champignon *Laccaria laccata* S238.

solubles, volatiles ou liés à la paroi. Les composés phénoliques semblent avoir une grande importance dans la reconnaissance (Ling-Lee *et al* , 1977 ; Harborne, 1980 ; Malacjuk *et al* , 1984, 1990). Or nous avons démontré que certaines bactéries pouvaient dégrader les polyphénols émis par le champignon (Duponnois & Garbaye, 1990). Donc leur intervention au niveau des accumulations de matériaux phénoliques semble tout à fait envisageable.

Ainsi les études concernant le rôle des bactéries auxiliaires de la mycorhization dans les phénomènes de reconnaissance entre le champignon et la plante devront être entreprises car, vu les propriétés qu'ont ces microorganismes, leur importance semble être non négligeable.



4ème PARTIE: Application des propriétés des  
BAM à la mycorhization contrôlée en pépinière  
forestière

## 4ème PARTIE: Application des propriétés des BAM à la mycorhization contrôlée en pépinière forestière

Nous avons montré que les bactéries auxiliaires de la mycorhization stimulaient l'infection du Douglas par *Laccaria laccata* S238 et étaient sélectives en réduisant la symbiose avec d'autres partenaires fongiques. Nous avons donc cherché à utiliser ces propriétés en pépinière afin d'optimiser les techniques utilisées dans la mycorhization contrôlée du Douglas par *L. laccata* S238.

### A/ Introduction des BAM dans les techniques classiques de mycorhization contrôlée avec désinfection du sol.

La mycorhization contrôlée est généralement réalisée dans un sol désinfecté (voir expérience 10, page 94) avec un inoculum fongique tourbe-vermiculite (Marx & Bryan, 1975) ou billes d'alginate de calcium (Le Tacon *et al* , 1983). Les BAM ont été ajoutées à ces différentes techniques d'inoculation.

#### 1/ Effet de la quantité de bactéries inoculées sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 (Expérience 33)

##### 1.1/ Matériels et méthodes

Cette expérience a été conduite de la même façon que l'expérience 10 (voir page 94). L'inoculum fongique était donc du type tourbe-vermiculite et une suspension bactérienne a été mélangée au sol. Cinq BAM ont été étudiées: MB3, SHB1, SBc5, BBc6 et BBc1. Chaque bactérie a été inoculée à trois doses différentes:  $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^6$  cfu.m<sup>-2</sup> pour SBc5, BBc6, SHB1 et MB3,  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$  cfu.m<sup>-2</sup> pour BBc1 (La croissance de cette dernière avait été moins rapide).

Les graines de Douglas (zone 422, Washington, USA) ont été prétraitées au froid (4°C) dans de la tourbe humide pendant un mois et ont été semées à raison de 1500 graines par m<sup>2</sup>.

Après 4 mois de culture, les taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et par le champignon type *Rhizopogon* (spontané dans la pépinière) ont été déterminés dans chaque traitement réparti au hasard dans les 3 blocs, ainsi que les biomasses aériennes et

racinaires. Ces différents paramètres ont été traités statistiquement par l'analyse de variance à 3 facteurs contrôlés: isolat bactérien, dose inoculée et bloc.

### 1.2/ Résultats et discussion (fig.81, 82, 83, 84, 85 et 86)

Après 4 mois de culture, le taux de mycorhization dans le témoin était égal à 60%. La concentration de l'inoculum bactérien n'a pas eu d'effet significatif sur l'infection ectomycorhizienne. Cependant, les traitements bactériens avec MB3, SHB1 et BBc6 ont stimulé significativement l'établissement de la symbiose (fig.81). Les taux de mycorhization avec ces bactéries étaient respectivement de 88%, 85% et 83%. Aucun effet n'a été obtenu avec les souches SBc5 et BBc1.

La concentration de l'inoculum bactérien a eu un effet significatif sur la contamination par le champignon type *Rhizopogon*. En effet, plus elle est importante, moins cette souche fongique a pu s'installer (fig.82).

Seules les bactéries MB3 et SHB1 ont stimulé significativement la croissance des parties aériennes des semis (respectivement 169mg et 151mg (poids sec) contre 111mg pour le traitement témoin, fig.83). Aucun effet n'a été obtenu sur la biomasse racinaire (fig.84). Les biomasses aériennes et racinaires ont été corrélées avec les taux de mycorhization (fig.85 et 86).

*L'effet des bactéries auxiliaires de la mycorhization observé jusqu'à présent en serre, peut aussi s'exprimer dans les conditions de pépinière. Dans cette expérience, la sélectivité des bactéries sur L. laccata a encore été observée.*

## 2/ Effet des bactéries sur la mycorhization avec l'inoculum fongique sous forme de billes d'alginate de calcium (expérience 34)

### 2.1/ Matériels et méthodes

Cette expérience a été réalisée dans une pépinière des établissements Naudet Frères SA (Leuglay, 21290 Recey-sur-Ource) à Autun (Nièvre). Les caractéristiques physico-chimiques du sol sont indiquées dans le tableau 29.

Fig.81: effet des traitements bactériens sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans l'expérience 33.(moyenne des taux de mycorhization obtenus pour chaque quantité de bactéries inoculées). \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 3 facteurs contrôlés. Pour la légende, voir fig.22, page 86.

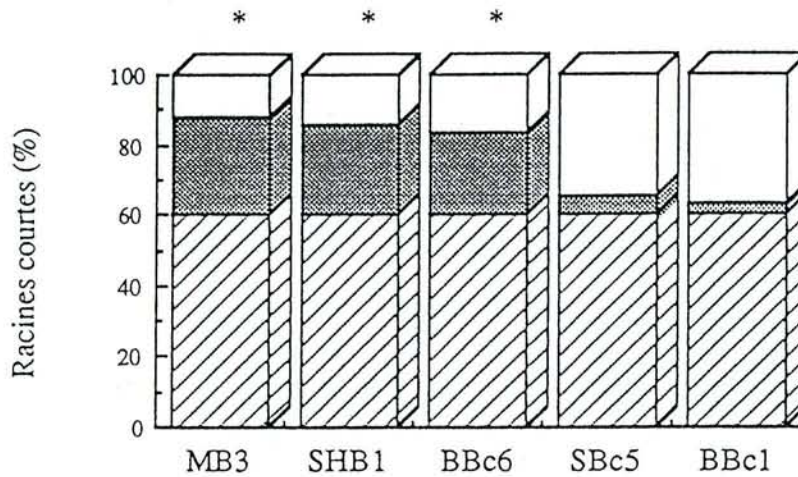


Fig.82: régression entre les quantités de bactéries inoculées et le taux de mycorhization par *Rhizopogon* sp. dans l'expérience 33. \*: significatif à  $P=0,05$ .

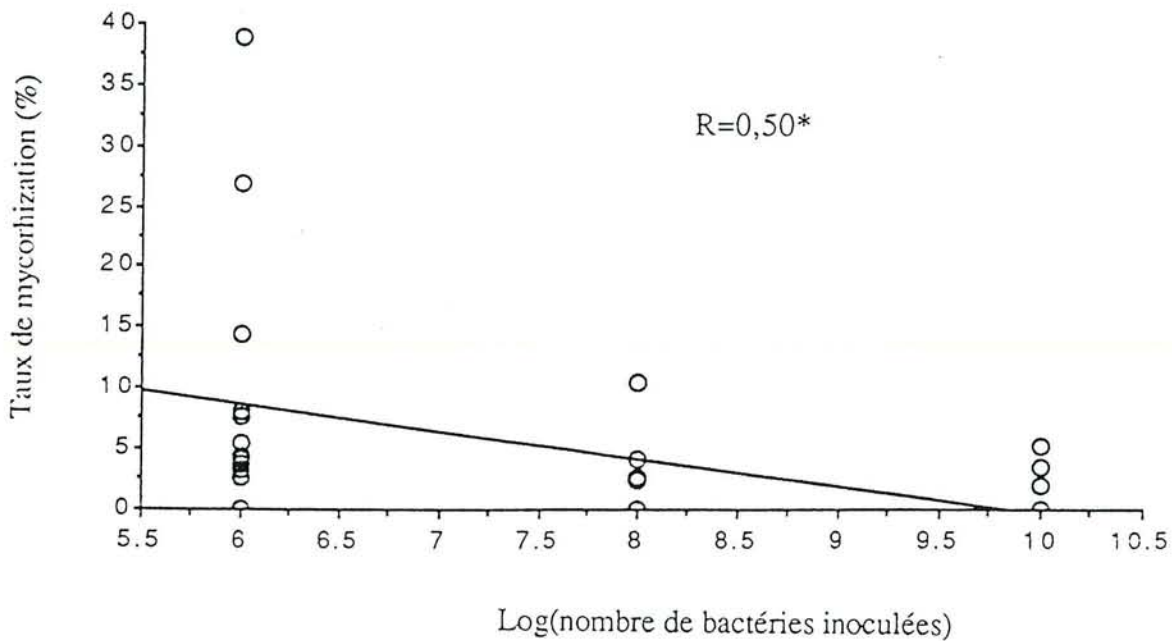


Fig.83: effet des traitements bactériens sur la biomasse aérienne des semis (exprimée en mg (poids sec) par semis) dans l'expérience 33. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 3 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ).

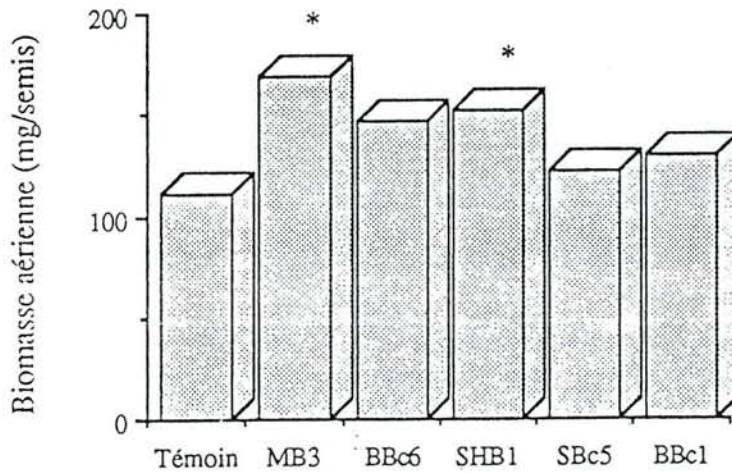


Fig.84: effet des traitements bactériens sur la biomasse racinaire des semis (exprimée en mg (poids sec) par semis) dans l'expérience 33. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 3 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ).

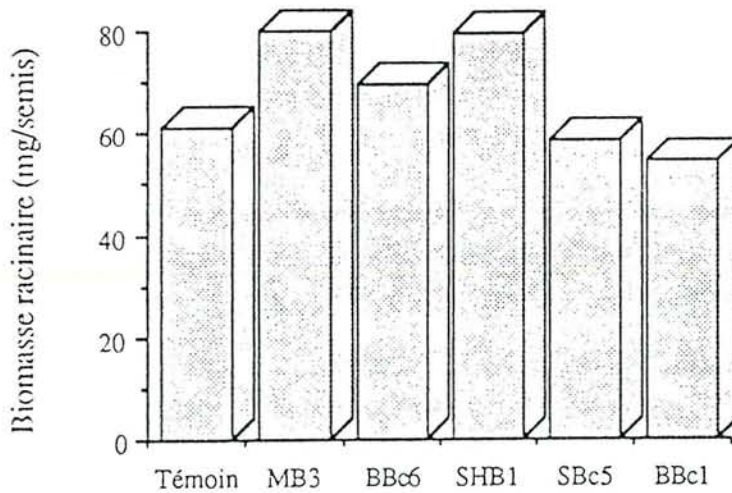


Fig.85: corrélation entre le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et la biomasse aérienne dans l'expérience 33. \*: significatif à  $P=0,05$ . Cette corrélation a été réalisée à partir des résultats obtenus avec les 4 bactéries (SBc5, BBc6, SHB1 et MB3) dans chaque traitement de chaque bloc.

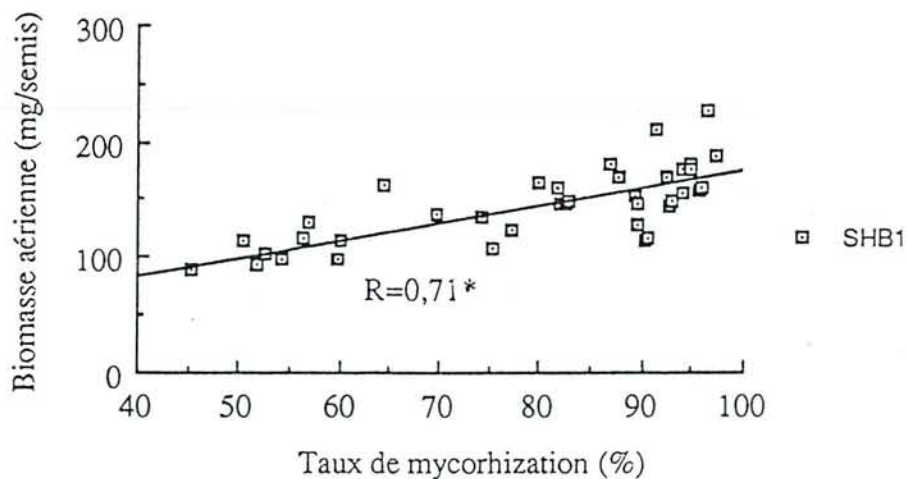


Fig.86: corrélation entre le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et la biomasse racinaire dans l'expérience 33. \*: significatif à  $P=0,05$ . Cette corrélation a été réalisée à partir des résultats obtenus avec les 4 bactéries (SBc5, BBc6, SHB1 et MB3) dans chaque traitement de chaque bloc.

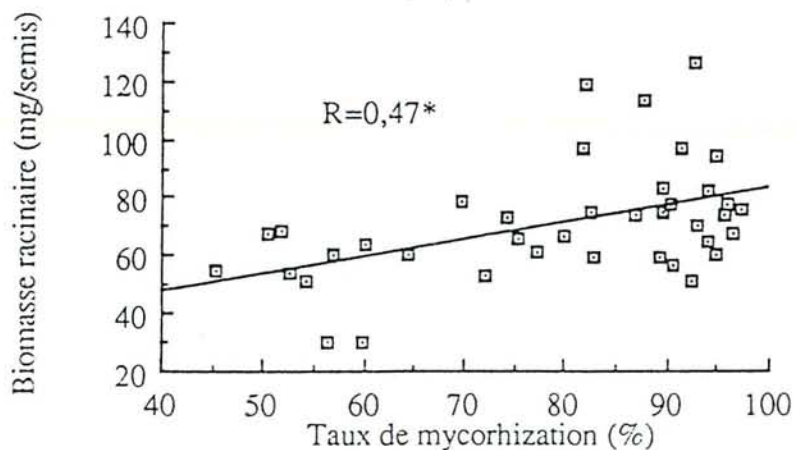


Tableau 29: caractéristiques physico-chimiques du sol de la pépinière d'Autun

---

Granulométrie (pour mille)	
Argile	175
Limon fin	158
Limon grossier	89
Sable fin	151
Sable grossier	427
Matière organique totale (Anne)(pour mille)	74,9
Azote (Kjeldahl)(pour mille)	3,2
Rapport C/N	10,2
pH H <sub>2</sub> O	5,2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Joret Hebert)(pour mille)	0,17
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Duchaufour)(pour mille)	0,71
Capacité d'échange (Metson)(meq pour cent g)	9,1
Calcium échangeable (meq pour cent g)	4,2
Magnésium échangeable (meq pour cent g)	0,44
Potassium échangeable (meq pour cent g)	0,69
Aluminium échangeable par KCl (meq pour cent g)	0,6
Cuivre total (ppm)	7,9

---

### *Inoculum bactérien*

Les quatre souches bactériennes habituelles (MB3, SHB1, SBc5, BBc6) ont été inoculées. Nous avons aussi utilisé d'autres bactéries ayant des origines totalement différentes: So11 (*Pseudomonas fluorescens* isolé de la rhizosphère du maïs et fourni par BIOCEM), B50090 (*Pseudomonas fluorescens*) et B007 (*Bacillus subtilis*) fournies par la DSM (Deutsche Collektion, Mascheroder Weg 1b, Braunschweig, Allemagne).

Elles ont été cultivées dans des Erlenmeyers de 500ml contenant 250ml de TSB 0,3% préalablement autoclavé (120°C, 20min) dans une chambre de culture (25°C, obscurité, sous agitation). Après 8 jours d'incubation, ces cultures ont été centrifugées (2400g, 15min), le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans 500ml d'eau stérile.

### *Production de la biomasse fongique*

Le champignon *L. laccata* S238 a été cultivé dans un fermenteur (Setric, 50 litres) pendant 2 mois dans le milieu Pachlewski modifié (25mM d'azote). Puis la culture pure de mycélium a été filtrée et rincées abondamment à l'eau déminéralisée. Le mycélium a ensuite été fractionné avec un broyeur Waring-blendor.

### *Processus d'inclusion du mycélium dans l'alginate de calcium*

L'acide alginique (polysaccharide) est extrait d'algues brunes et est couramment utilisé dans l'industrie alimentaire (épaississant, gélifiant). Il se gélifie en présence de cations bivalents comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , qui assurent la liaison entre les chaînes de molécules parallèles par la formation de ponts carboxyliques. Un réseau tridimensionnel est ainsi constitué et les interstices formés peuvent emprisonner les hyphes mycéliennes ou tout autre microorganisme (Cheetham *et al*, 1979 ; Dommergues *et al*, 1979 ; Jung *et al*, 1981 ; Le Tacon *et al*, 1985 ; Mortier *et al*, 1988).

La solution avant le processus de gélification avait la composition suivante: alginate de sodium (Etablissement François S.A., France):  $10\text{g.l}^{-1}$  ; tourbe broyée (0,4mm):  $25\text{g.l}^{-1}$  ; mycélium broyé:  $1\text{g.l}^{-1}$  en poids sec.

La gélification a été obtenue en faisant goutter cette suspension dans une solution de chlorure de calcium ( $100\text{g.l}^{-1}$ ). La réticulation de la surface des gouttes a été immédiate. Les billes ont été laissées une nuit dans la solution de chlorure de



calcium. Puis elles ont été rincées à l'eau pour enlever toutes les traces de chlorure de calcium qui auraient pu être toxiques pour le champignon.

### *Protocole d'inoculation et dispositif expérimental*

Les billes ont été plongées dans une suspension bactérienne ( $2l, 10^{11}$  cfu.l<sup>-1</sup>) pendant quelques minutes puis retirées (les bactéries ont été adsorbées à la surface des billes) et mélangées au sol à raison de  $1\text{ l.m}^{-2}$ . Avec cette technique, nous ne pouvions pas connaître précisément la quantité de bactéries inoculée. Le dispositif expérimental était identique à l'expérience 33 sauf que les traitements étaient répartis au hasard dans 4 blocs. Les mesures (taux de mycorhization, biomasses racinaire et aérienne) ont été réalisées après 2 et 4 mois de culture.

### 2.2/ Résultats et discussion (fig.87 et 88)

Après 2 mois de culture, la bactérie SHB1 a augmenté significativement le taux de mycorhization (59% par rapport à 27% dans le témoin). Les autres n'ont eu aucun effet significatif (fig.87).

Le taux de mycorhization dans le témoin était de 44% après 4 mois de culture. Dans les traitements bactériens, ils étaient significativement supérieurs (de 74 à 82%)(fig.88) sauf avec So11 et B50090.

Dans cette expérience, la mycorhization n'a pas eu d'effet sur la croissance des semis. En effet, le sol a été fertilisé avec de l'Organor (matière organique,  $1\text{ t.ha}^{-1}$ ) et de l'engrais NPK (0-10-23) à raison de  $700\text{ kg.ha}^{-1}$ . Cette richesse du substrat en particulier en phosphore explique l'absence d'effet observé (Le Tacon, 1991).

*Donc, avec une autre technique d'inoculation (le champignon inclus dans des billes d'alginate de calcium et les bactéries en suspension), les effets des BAM ont de nouveau été retrouvés.*

### **3/ Effet des bactéries incluses dans des billes d'alginate en même temps que le champignon *L. laccata* S238 (Expérience 35)**

Cette expérience a été réalisée dans la pépinière de l'INRA Nancy sur du sol rapporté de la pépinière de Peyrat le Château.

Fig.87: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 après 2 mois de culture dans l'expérience 34. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. Pour la légende, voir fig.22, page 86.

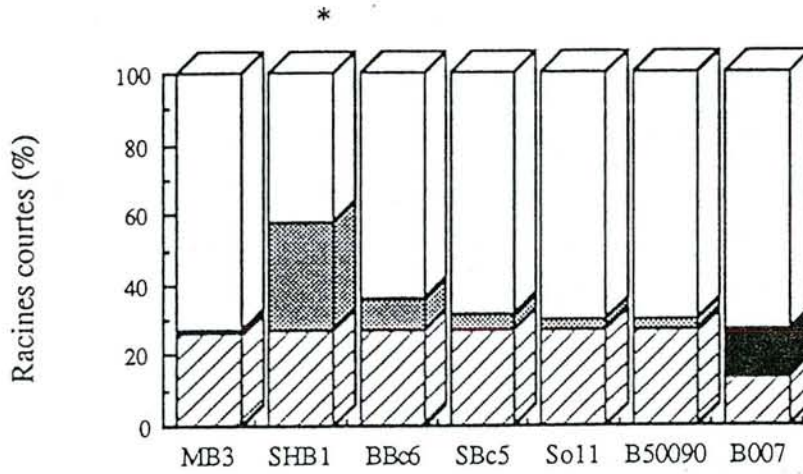
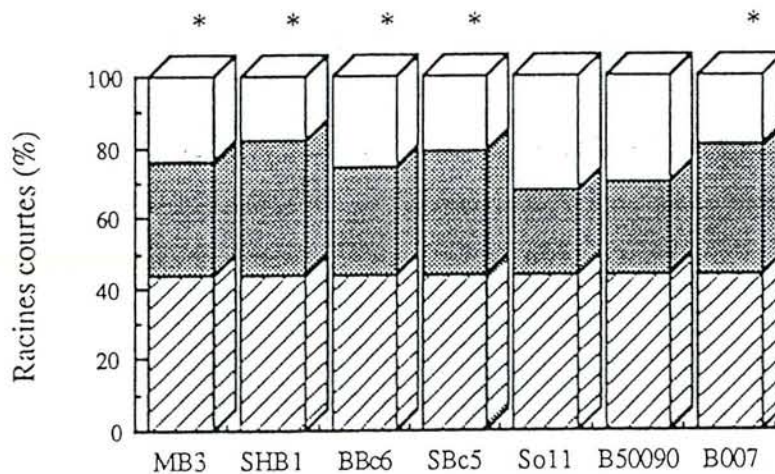


Fig.88: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 après 4 mois de culture dans l'expérience 34. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. Pour la légende, voir fig.22, page 86.



### 3.1/ Matériels et méthodes

#### *Inoculum bactérien*

Les bactéries (MB3, SHB1 et SBc5) ont été cultivées dans des Erlenmeyers de 1 litre contenant 500ml de milieu TSB 0,3% autoclavé (120°C, 20min). Après 8 jours de culture (25°C, obscurité, sous agitation), les cultures ont été centrifugées (4000g, 15 min), le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans de l'eau stérile. Le sulfate de magnésium n'a pas été utilisé car les cations bivalents  $Mg^{2+}$  auraient provoqué une polymérisation de l'alginate de sodium avant la fabrication des billes d'inoculum.

#### *Production de la biomasse fongique*

Le champignon *L. laccata* S238 a été cultivé dans des Erlenmeyers de 1 litre contenant 500ml de milieu moût dilué au 1/10ème préalablement autoclavé (120°C, 20min). Après 1 mois de culture (25°C, obscurité, sous agitation), le mycélium a été recueilli et lavé abondamment à l'eau déminéralisée.

#### *Processus d'inclusion du mycélium et des bactéries dans l'alginate de calcium*

Nous avons utilisé la technique décrite dans l'expérience 34 (page 177) sauf que la solution avant gélification avait la composition suivante: alginate de sodium:  $10g.l^{-1}$  ; tourbe broyée (0,4mm):  $25g.l^{-1}$  ; mycélium broyé:  $2g.l^{-1}$  en poids sec; bactéries: environ  $10^8$  cfu.ml<sup>-1</sup>(sans bactérie pour le témoin).

#### *Protocole d'inoculation et dispositif expérimental*

Ils ont été identiques à ceux décrits dans l'expérience 34 (page ) sauf que les bactéries ont été inoculées à  $10^{11}$  cfu.m<sup>-2</sup>, les semis ont été arrosés, les traitements ont été répartis au hasard dans 3 blocs, et les mesures ont été réalisées après 3 et 5 mois de culture.

### 3.1/ Résultats et discussion (fig.89, 90, 91, 92, 93, 94)

Après 3 et 5 mois de culture, les taux de mycorhization dans le témoin étaient respectivement égaux à 26% et 83% (fig.89 et 90). Après 3 mois, nous avons obtenu

Fig.89: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans l'expérience 35 après 3 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ). Pour la légende, voir fig.22, page 86.

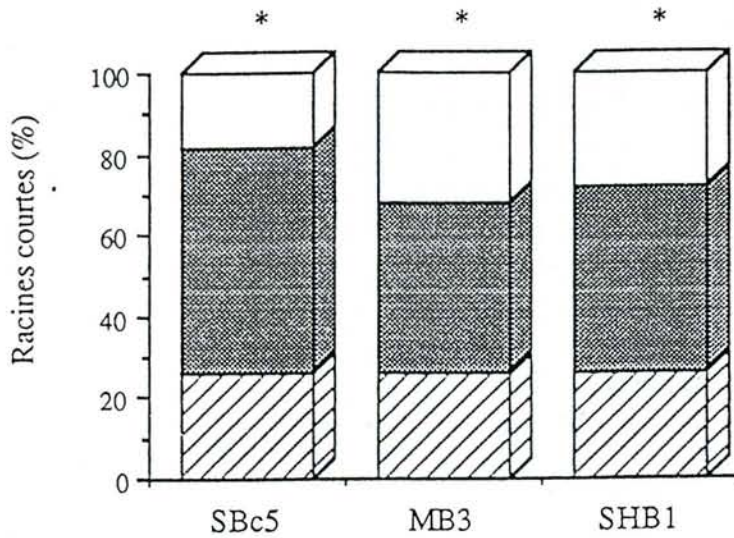


Fig.90: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans l'expérience 31 après 5 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ). Pour la légende, voir fig.22, page 86.

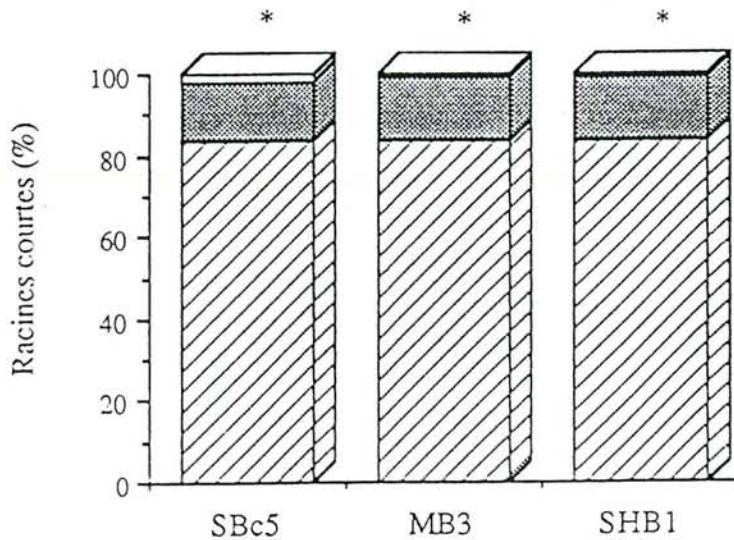


Fig.91: effet des bactéries sur la biomasse aérienne (mg (poids sec par semis) des semis de Douglas dans l'expérience 35 après 3 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ).

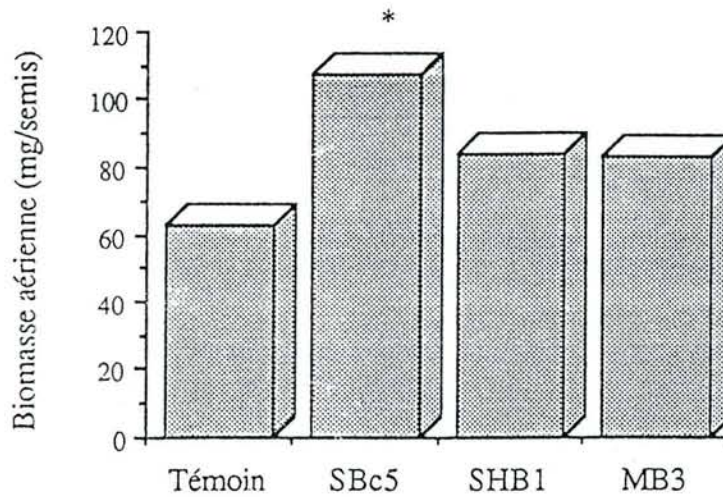


Fig.92: effet des bactéries sur la biomasse aérienne (mg (poids sec par semis) des semis de Douglas dans l'expérience 35 après 5 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ).

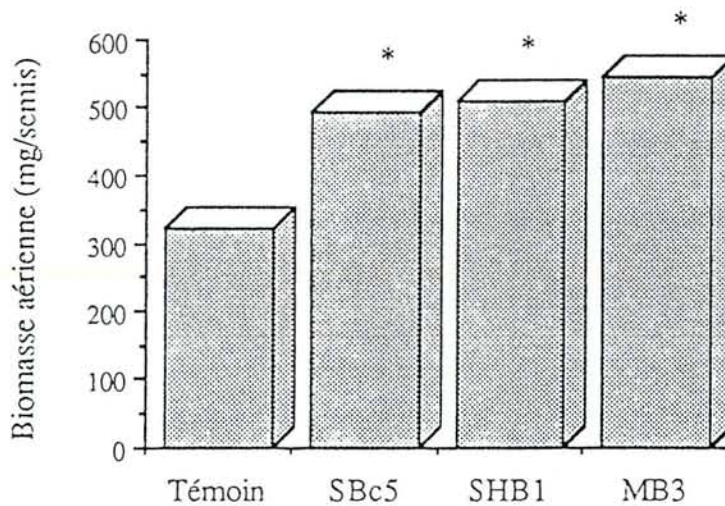


Fig.93: effet des bactéries sur la biomasse racinaire (mg (poids sec par semis) des semis de Douglas dans l'expérience 35 après 3 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ).

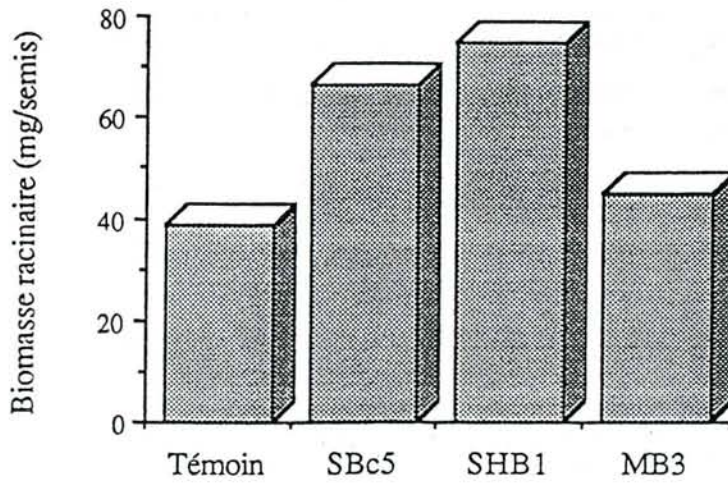
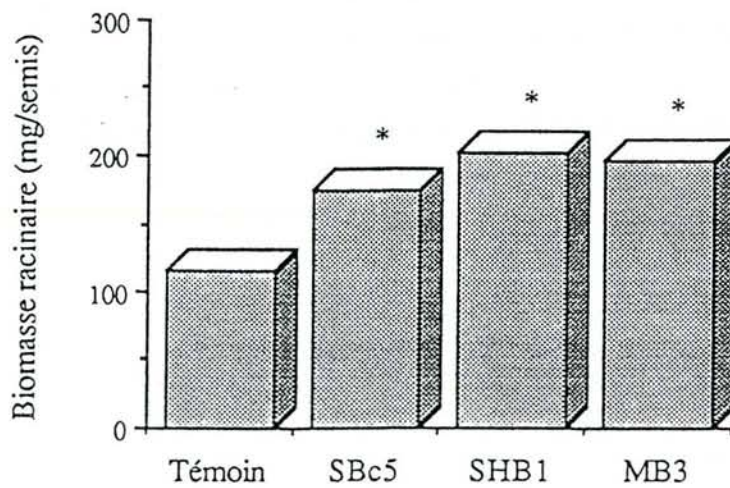


Fig.94: effet des bactéries sur la biomasse racinaire (mg (poids sec par semis) des semis de Douglas dans l'expérience 35 après 5 mois de culture. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ).



avec les bactéries des pourcentages de mycorhization allant de 68% à 82% (fig.89). Après 5 mois, un effet identique a été observé (les taux de mycorhization étaient compris entre 97% et 99%, fig.90).

Après 3 mois de culture, la biomasse aérienne a été significativement stimulée dans le traitement avec SBc5 (108mg par semis par rapport à 62mg par semis dans le témoin) alors qu'aucun effet n'a été observé avec les autres isolats (fig.91). La biomasse racinaire n'a pas été modifiée par les bactéries (fig.92).

Après 5 mois de culture, les 3 bactéries ont significativement stimulé la croissance des parties aériennes et racinaires des semis (fig.93 et 94).

*Cette nouvelle formulation de l'inoculum mixte (bactéries et champignon inclus ensemble dans des billes d'alginate) a aussi permis l'expression de l'effet des BAM sur la mycorhization.*

#### **4/ Effet des bactéries incluses dans des billes d'alginate avec le champignon *L. laccata* S238 en faisant varier la quantité d'inoculum (Expérience 36)**

##### 4.1/ Matériels et méthodes

Le protocole a été identique à celui de l'expérience 35 sauf que: l'inoculum mixte a été apporté à raison de 0,5l.m<sup>-2</sup> et 1l.m<sup>-2</sup>. Quatre bactéries (MB3, SHB1, SBc5 et une souche d'*Azospirillum* isolée d'un sclérote de *Cenococcum geophilum*) ont été inoculées aux 2 quantités sauf pour celle avec *Azospirillum* qui ne l'a été qu'à 1l.m<sup>-2</sup>. Une observation a été faite après 5 mois de culture. Les bactéries étaient inoculées à 10<sup>8</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> dans l'alginate(sans bactérie pour le témoin) c'est à dire environ 10<sup>11</sup> cfu.m<sup>-2</sup>.

##### 4.2/ Résultats et discussion (fig.95, tableau 30)

Quand l'inoculation a été réalisée à 1l.m<sup>-2</sup>, toutes les bactéries ont stimulé la mycorhization sauf la souche d'*Azospirillum* (fig.95). La biomasse aérienne a été stimulée seulement dans le traitement avec MB3. Aucun effet significatif n'a été observé sur la biomasse racinaire (tableau 30).

Fig.95: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 après 5 mois de culture, suivant la quantité d'inoculum apportée dans l'expérience 36. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés ( $P=0,05$ ). Pour la légende, voir fig. 22 page 86

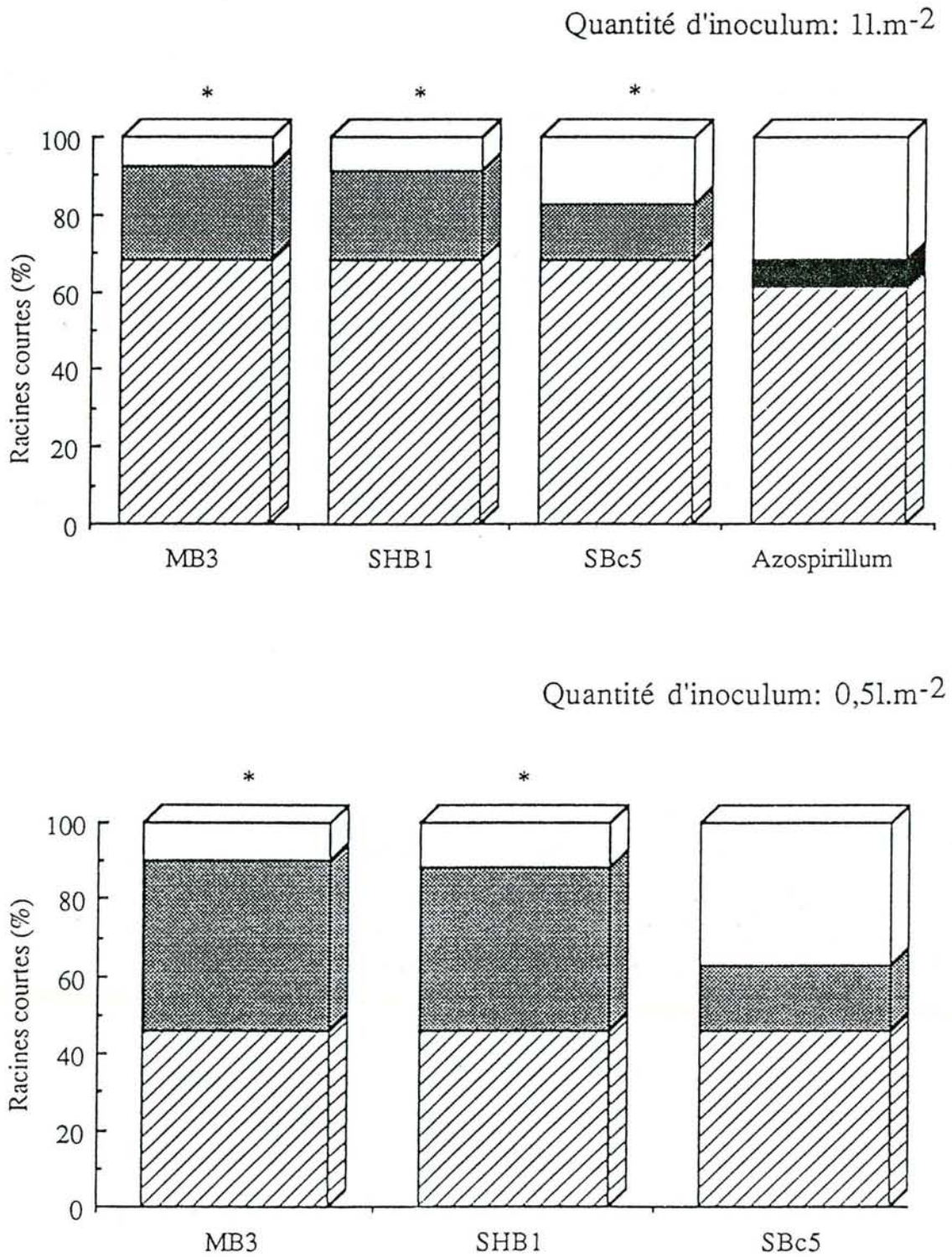




Tableau 30: effet des bactéries sur la biomasse aérienne et racinaire (exprimée en mg (poids sec) par semis) dans l'expérience 36. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (P=0,05).

Traitements	Quantité d'inoculum (l.m <sup>-2</sup> )	Biomasse (mg/semis)	
		aérienne	racinaire
Témoin	0,5	81,2	43,1
MB3	0,5	95,4	35,1
SHB1	0,5	122,2*	38,4
SBc5	0,5	88,2	39,5
Témoin	1,0	83,1	37,9
MB3	1,0	116,6*	38,1
SHB1	1,0	101,8	33,0
SBc5	1,0	80,5	37,3
<i>Azospirillum</i> sp.	1,0	109,8	38,0

Quand l'inoculation a été effectuée à  $0,5l.m^{-2}$ , toutes les bactéries sauf SBc5 ont stimulé l'infection mycorhizienne (fig.95). Seul le traitement avec SHB1 a augmenté significativement la biomasse aérienne. Aucun effet n'a été observé sur la biomasse racinaire (tableau 30).

Les taux de mycorhization dans les traitements bactériens sont pratiquement identiques quelle que soit la quantité d'inoculum apportée.

*L'utilisation des bactéries dans les billes d'alginate permet donc de diminuer la quantité d'inoculum mélangée au sol.*

## **5/ Comparaison de 2 formulations d'inocula mixtes avec BBc6 (Expérience 37)**

### **5.1/ Matériels et méthodes**

Les 2 techniques d'inoculation (Inoculum fongique tourbe-vermiculite et suspension bactérienne, billes contenant le champignon et les bactéries) décrites dans les expériences 33 et 35 (pépinière de Peyrat le Château) ont été utilisées. La bactérie BBc6 a été inoculée à raison de  $10^{11}$  cfu.m<sup>-2</sup>. Ensuite, le protocole expérimental de l'expérience 35 a été suivi.

### **5.2/ Résultats et discussion (fig.96. tableau 31)**

La bactérie BBc6 a stimulé significativement l'infection ectomycorhizienne avec les 2 techniques d'inoculation (fig.96). Aucun effet sur la croissance des semis n'a été observé (tableau 31).

*Il n'apparait aucune différence dans les effets sur la mycorhization de ces 2 types d'inoculum mixte.*

Fig.96: effet de la bactérie BBc6 sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 en adoptant 2 techniques d'inoculation mixte (expérience 37): A: suspension bactérienne, inoculum fongique tourbe-vermiculite ; B: la bactérie et le champignon sont inclus dans des billes d'alginate. \*: différence significative par rapport au témoin d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (P=0,05). Pour la légende, voir fig.22, page 86.

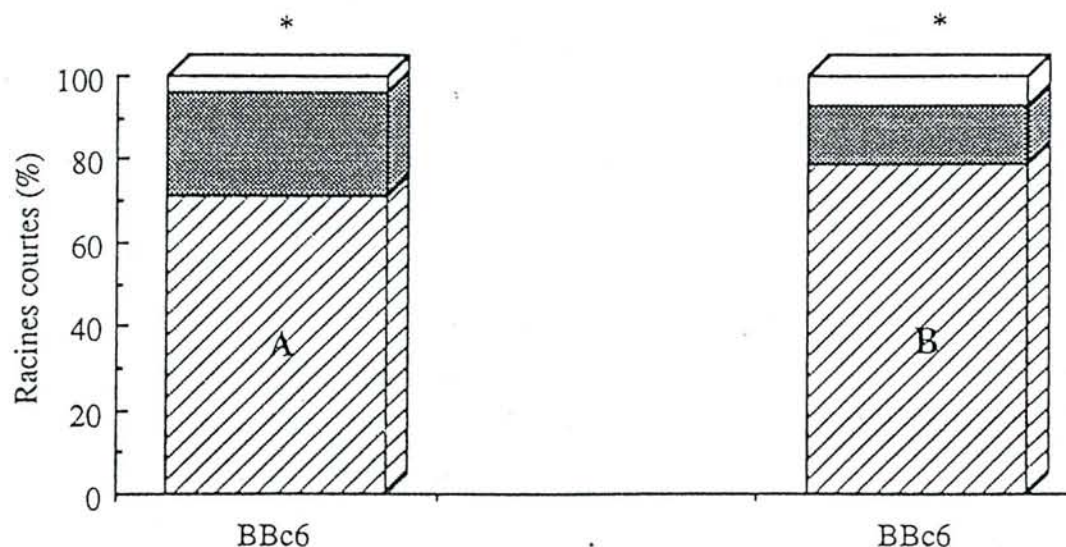


Tableau 31: effet de la bactérie BBc6 (apportée avec le champignon suivant 2 techniques différentes d'inoculation mixte) sur la biomasse aérienne et racinaire (mg (poids sec) par semis) dans l'expérience 37.

Technique d'inoculation	Biomasse	
	aérienne	racinaire
Inoculum fongique tourbe-vermiculite	120,4	34,4
Suspension bactérienne-inoculum fongique tourbe-vermiculite	115,9	30,0
Inoculum fongique billes d'alginate	93,5	32,6
Inoculum mixte (bactérie-champignon inclus dans des billes d'alginate)	99,4	35,9

## 6/ Optimisation de l'inoculum mixte et conclusion de la section A/

Dans ces expériences, la double inoculation bactérie-champignon a été réalisée avec différentes techniques:

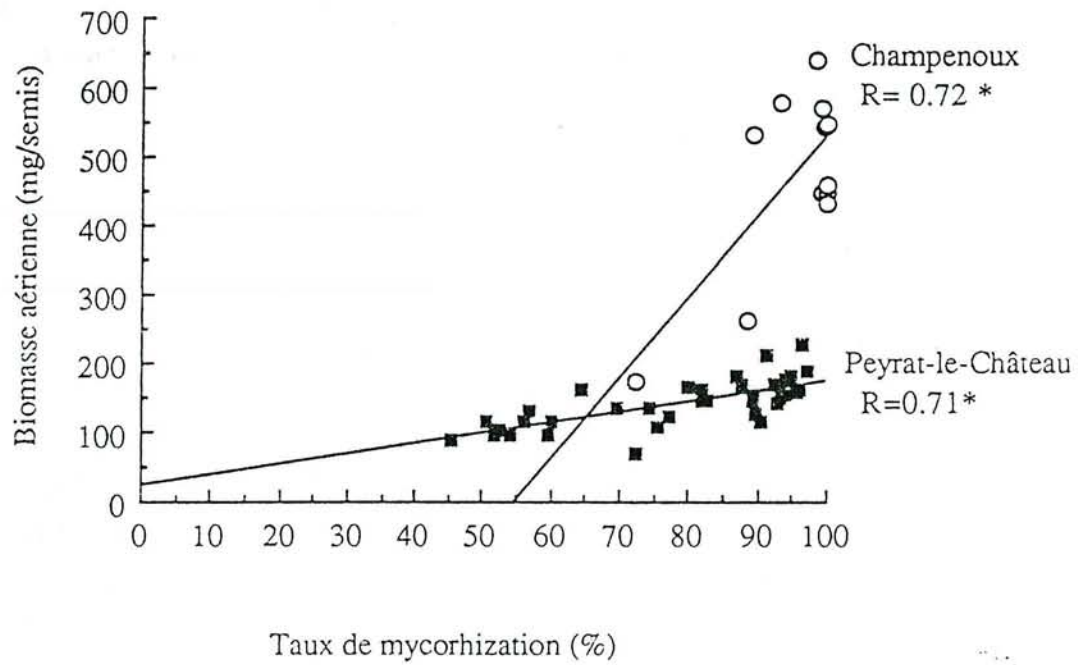
- inoculum fongique tourbe-vermiculite, suspension bactérienne
- adsorption des cellules bactériennes à la surface de billes d'alginate contenant le mycélium
- inclusion des bactéries et du champignon dans des billes d'alginate de calcium

Ces trois techniques ont permis aux BAM d'avoir un effet positif sur l'infection ectomycorhizienne. La pépinière de Champenoux (expérience 35) était irriguée et c'est dans cette expérience que la stimulation de l'infection a permis la meilleure croissance des semis. Si nous comparons ces résultats à ceux obtenus dans la pépinière de Peyrat le chateau (expérience 33, même substrat mais sans irrigation), l'effet de la mycorhization sur la croissance est beaucoup plus marqué lorsque les semis sont arrosés (fig.97).

La technique employant uniquement les billes d'alginate semble la plus appropriée à une utilisation à grande échelle en pépinière forestière. En effet, ce type d'inoculum peut être produit facilement en grande quantité, et son encombrement est faible comparé aux bocaux d'inoculum tourbe-vermiculite. La fabrication de ce type d'inoculum pour le champignon est maintenant assez bien maîtrisée tant pour la production que pour la conservation (jusqu'à environ 9 mois à 4°C, Mauperin *et al*, 1987). Quand les bactéries sont incluses avec le symbiote fongique dans la bille, plusieurs questions peuvent être posées: quelles doivent être leur concentration pour qu'ils évoluent en équilibre et que les interactions agissent de manière bénéfique pour les deux organismes, comment l'inoculum mixte évolue-t-il dans le temps ?.

Ce dernier problème de la conservation de l'inoculum mixte n'a pas été abordé. Par contre, nous avons étudié la croissance du champignon à partir de billes d'inoculum mixte en faisant varier indépendamment l'une de l'autre la concentration fongique et la concentration bactérienne (expérience 38). Ces billes ont été réalisées en conditions axéniques et déposées dans des boîtes de Petri sur de l'eau gélosée (5 billes par boîte). Les boîtes de chaque traitement (10 répétitions pour une concentration bactérienne et fongique donnée) ont été mises à incuber pendant 15 jours (25°C, obscurité). Les mesures de la croissance du champignon ont été traitées de la même manière que dans l'expérience de criblage dans la collection de bactéries (page 41).

Fig.97: corrélations entre le taux de mycorhization et la biomasse aérienne dans l'expérience à Champenoux (expérience 35) et dans une expérience à Peyrat le château (expérience 33). \*: significatif à  $P=0,05$ .



Trois isolats bactériens ont été utilisés: les bactéries MB3, SHB1 et SBc5 ont toutes stimulé la croissance du champignon. Dans le traitement témoin (fig.98), la croissance était proportionnelle à la concentration fongique. Lorsque les bactéries ont été ajoutées, deux cas de figure se sont présentés: avec SBc5 (fig.99), à  $10^7$  cfu.l<sup>-1</sup>, la croissance a été maximale et égale quelle que soit la concentration fongique ; avec SHB1 (fig.100), cet effet a été retrouvé mais avec une concentration bactérienne égale à  $10^3$  cfu.l<sup>-1</sup>. Par contre, la bactérie MB3 a agi de manière différente (fig.101). Avec une concentration égale à  $10^4$  cfu.l<sup>-1</sup>, la croissance fongique a été inhibée par rapport aux autres traitements avec MB3, mais avec  $10^3$  cfu.l<sup>-1</sup> et  $10^2$  cfu.l<sup>-1</sup>, la croissance a été d'autant plus grande que la concentration fongique était importante.

Nous avons recommencé cette expérience dans les mêmes conditions mais avec des concentrations bactériennes plus fortes:  $10^{12}$  cfu.ml<sup>-1</sup> (expérience 39). Les mesures ont été réalisées après 8 jours d'incubation (fig.102). La stimulation de la croissance a été observée lorsque la concentration fongique a été la plus importante et inversement des inhibitions ont été constatées avec la plus faible surtout dans le cas des bacilles (MB3 et SHB1).

*D'après ces résultats, le rapport entre la concentration bactérienne et la concentration fongique s'est avéré être de première importance en ce qui concerne la stimulation de la croissance du champignon L. laccata S238.*

La qualité de l'inoculum bactérien est déterminée par le nombre de cellules viables mais aussi par le pouvoir de survie des bactéries après l'inoculation. Ainsi des doses minimales doivent être respectées afin d'obtenir l'effet recherché (Brown, 1972).

La bactérisation des semences avec des PGPR est couramment réalisée en trempant les semences dans une suspension bactérienne contenant au minimum  $10^9$  cellules afin d'avoir  $10^6$  germes sur la graine pour obtenir l'effet recherché (Digat, 1986). Si nous avons retenu cette technique avec une densité de 1500 graines par m<sup>2</sup>, la quantité de bactéries inoculée aurait été égale à  $1,5 \cdot 10^9$  par m<sup>2</sup>. Nos résultats ont montré que l'effet pouvait être obtenu avec une quantité de bactéries beaucoup moins élevée ( $10^6$ .m<sup>-2</sup>, expérience 33, page 176), c'est à dire 10 bactéries par cm<sup>3</sup> en supposant que les bactéries ont été mélangées dans les 10 centimètres superficiels du sol. Cette quantité (10 à 20 bactéries par cm<sup>3</sup>) a été considérée dans certains cas comme minimale pour l'inoculation de certaines PGPR (Ex: bactéries solubilisatrices de phosphates)(Brown, 1972).

Fig.98: influence du rapport entre la concentration fongique et bactérienne dans l'expérience 38.

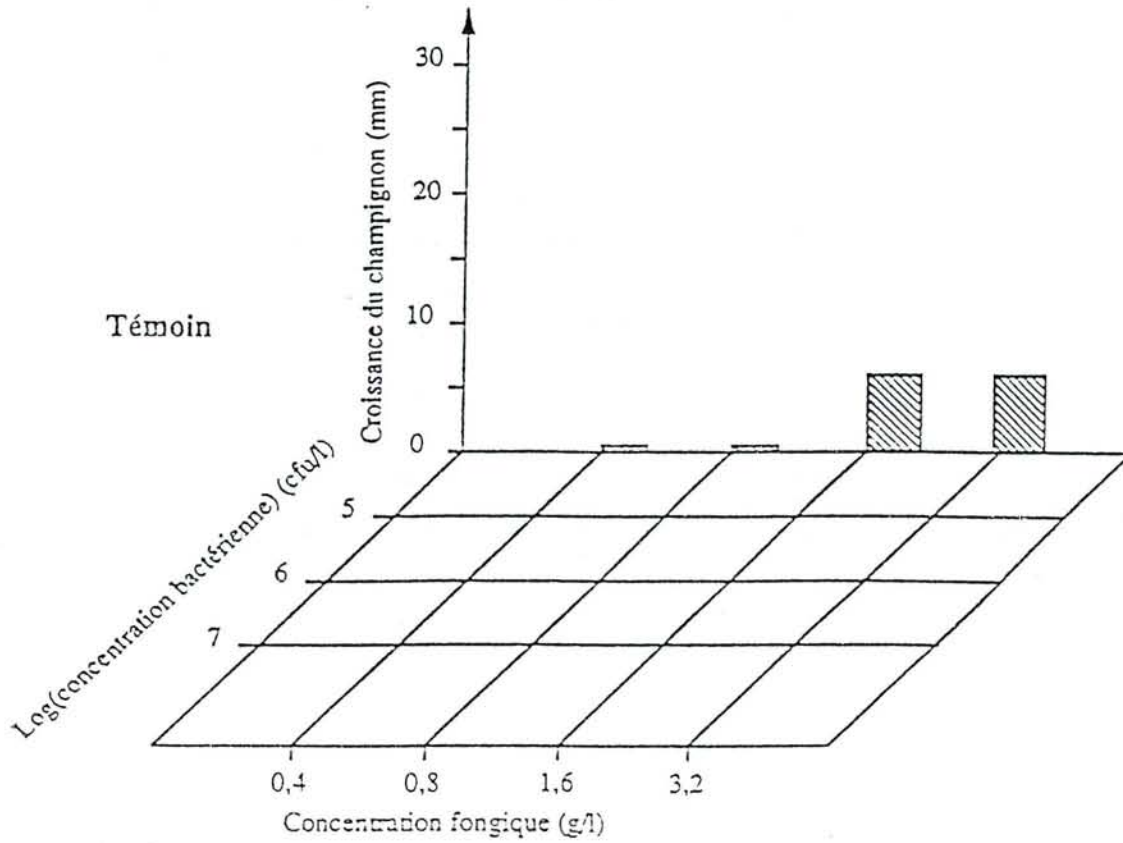
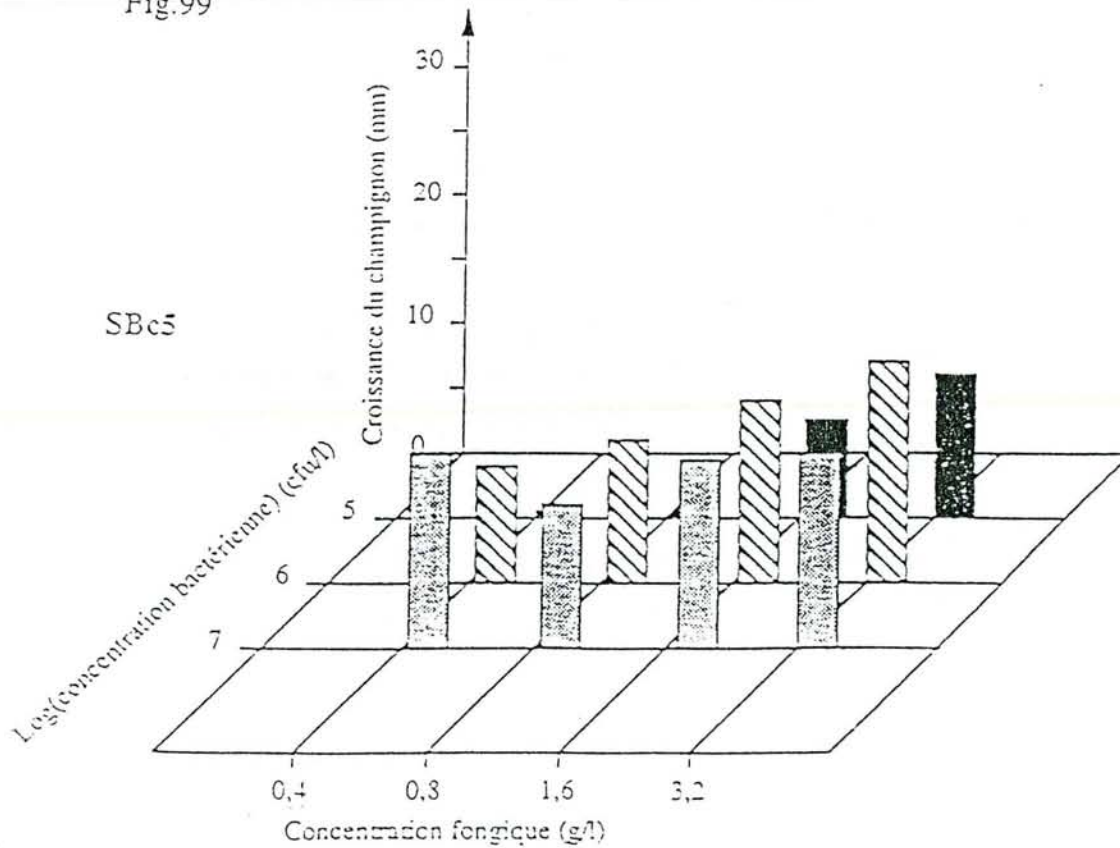


Fig.99



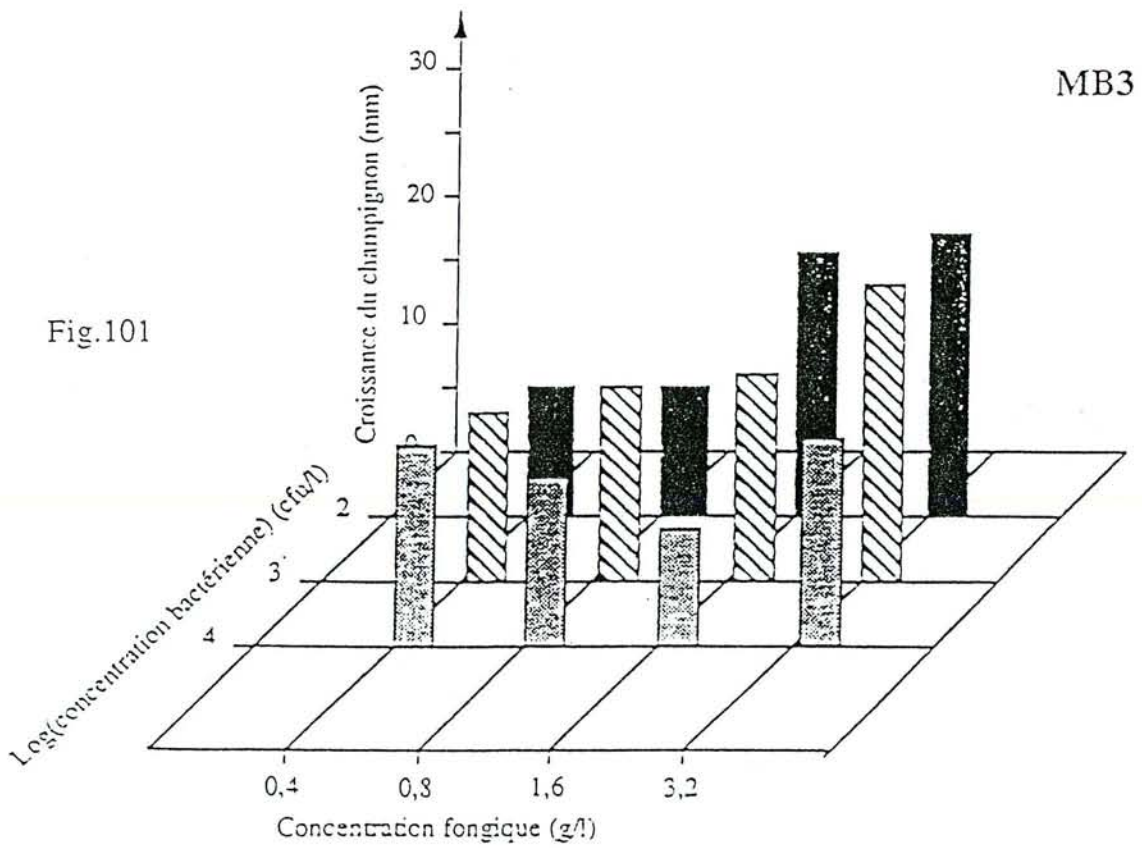
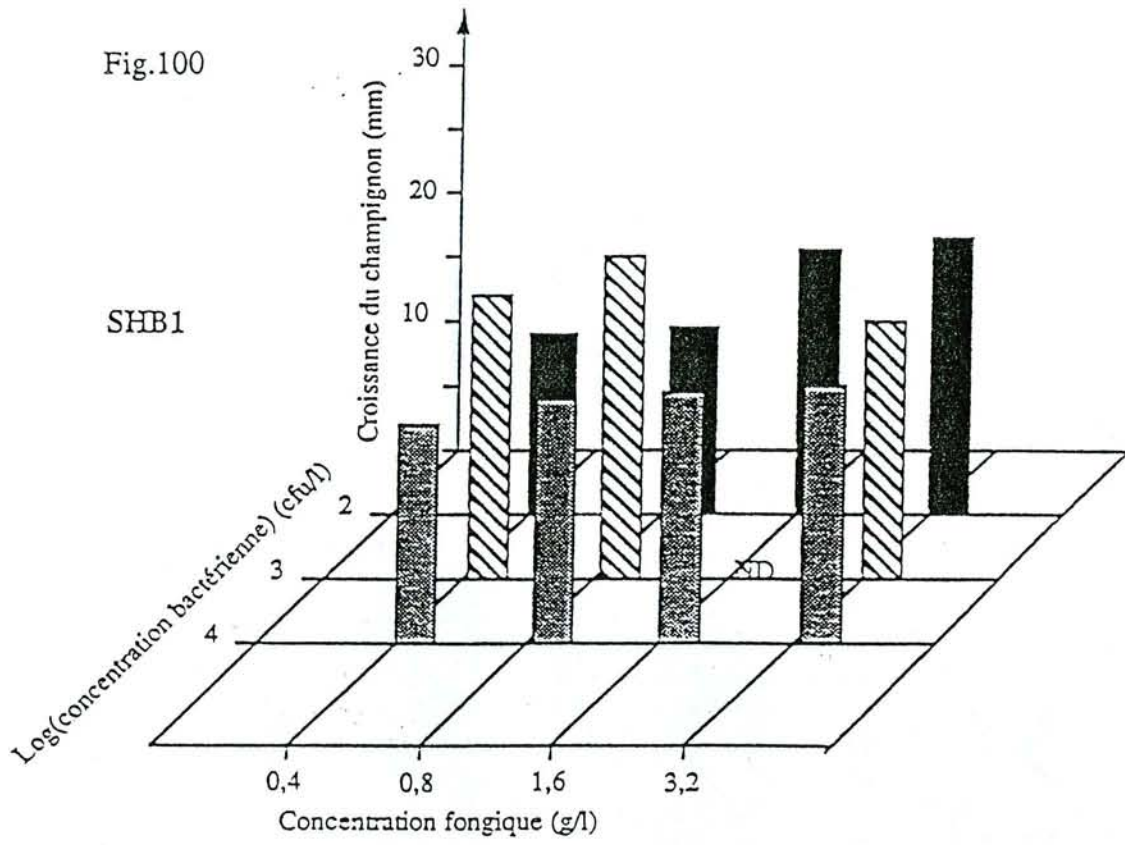
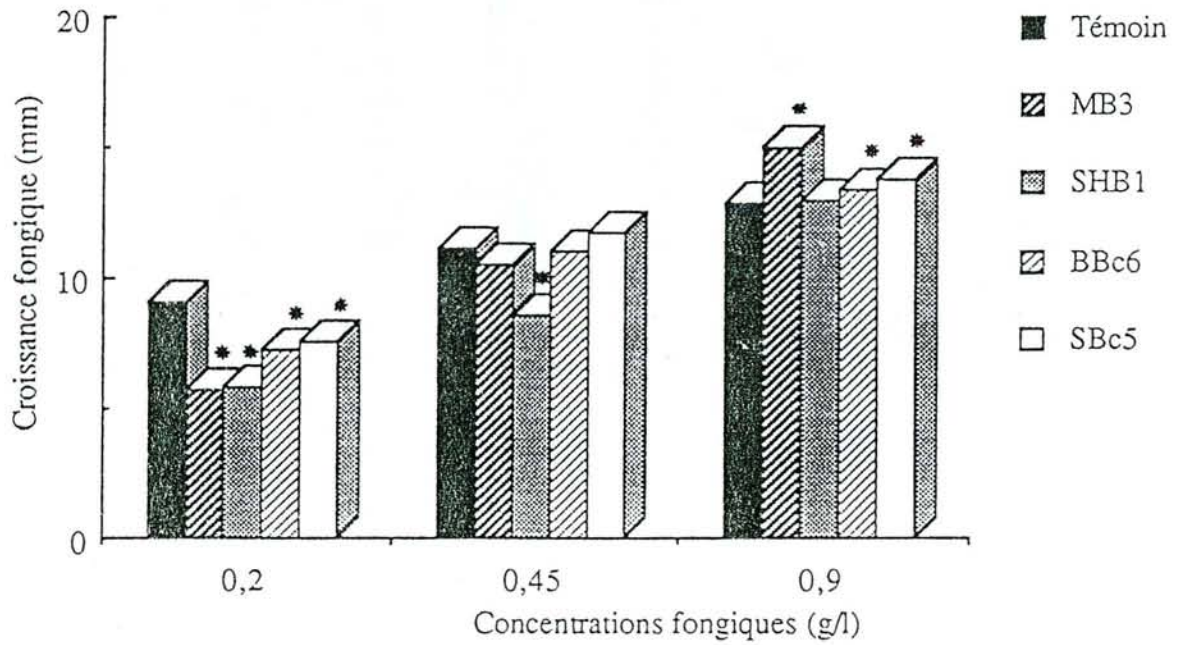




Fig.102: effet des bactéries ( $10^{12}$  cfu.l<sup>-1</sup>) incluses dans des billes contenant le champignon à différentes concentrations dans l'expérience 39.\*: différence significatives par rapport au témoin d'après le test "t" de Student (P=0,05).



Lorsque 2 mesures (2 et 4 mois) ont été réalisées (expériences 34 et 35), les effets des BAM après 2 mois de culture n'ont pas été parfaitement reproductibles. En effet, la bactérie MB3 n'a pas stimulé la mycorhization dans l'expérience 34 alors qu'elle a eu un effet positif dans l'expérience 35. Les différences dans la quantité de bactérie inoculée peut expliquer ces résultats.

Enfin, les BAM ont stimulé la mycorhization en pépinière où les conditions environnementales sont très complexes et dans des sols différents: sol de la pépinière de Peyrat le Château ou d'Autun. La robustesse des BAM, soulignée dans la deuxième partie, est une nouvelle fois observée.

*En conclusion, les BAM peuvent être utilisées dans des conditions de pépinière, dans des sols différents en prenant soin de calculer les doses de champignon et de bactéries incluses dans les billes d'alginate pour chaque type bactérien. En effet, ce paramètre s'est révélé de première importance.*

## B/ Utilisation des BAM comme une alternative à la désinfection du sol.

Nous avons souligné que la mycorhization contrôlée était réalisée classiquement sur sol désinfecté pour supprimer les pathogènes et les champignons ectomycorhiziens compétiteurs qui pourraient affecter l'installation du symbiote fongique inoculé.

Nous avons démontré que les BAM stimulaient sélectivement l'infection par *L. laccata* S238 et inhibaient celle par les autres champignons. En particulier, ces bactéries inhibaient l'établissement de *T. terrestris* qui est un symbiote rencontré couramment dans les pépinières.

Nous avons donc essayé d'utiliser la sélectivité des bactéries pour supprimer la désinfection du sol qui est une pratique lourde à mettre en oeuvre.

### 1/ Inoculation champignon + BAM en serre sur le sol de Peyrat le Château non désinfecté (expérience 40)

#### 1.1/ Matériels et méthodes

Les techniques décrites dans l'expérience 1 (page 49) ont été utilisées, sauf que la terre de Peyrat le Château constituait le substrat et les mesures ont été effectuées après 2 et 4 mois de culture.

Les bactéries ayant inhibé la mycorhization par *T. terrestris* dans l'expérience 7 (page 84) ont été inoculées à partir de suspensions contenant au minimum  $10^{10}$  cfu.ml<sup>-1</sup> à raison de 5ml par alvéole. Un traitement non inoculé (sans bactérie et sans champignon) et un autre où *L. laccata* S238 a été mélangé à un sol désinfecté par autoclavage (120°C, 20min) ont été ajoutés.

#### 1.2/ Résultats et discussion (fig.103 à 109, tableau 32)

Toutes les bactéries ont stimulé la mycorhization après 4 mois de culture (fig.104); les taux de mycorhization obtenus n'étaient pas significativement différents de celui en sol désinfecté. Dans tous les traitements avec bactérie, les biomasses (soit racinaire, soit aérienne) ont été supérieures à celles du témoin (tableau 32). Ces biomasses et le nombre de racines courtes par semis ont été corrélés au taux de mycorhization par *L. laccata* S238 après 2 et 4 mois de culture (fig.106 et 107).

Fig.103: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans le sol non désinfecté, après 2 mois de culture dans l'expérience 40. \*: différence significative par rapport au témoin (SND + L.1) d'après le test "t" de Student (P=0,05). SD + L.1: *L. laccata* seul mélangé au sol désinfecté, SND + L.1: *L. laccata* seul mélangé au sol non désinfecté.

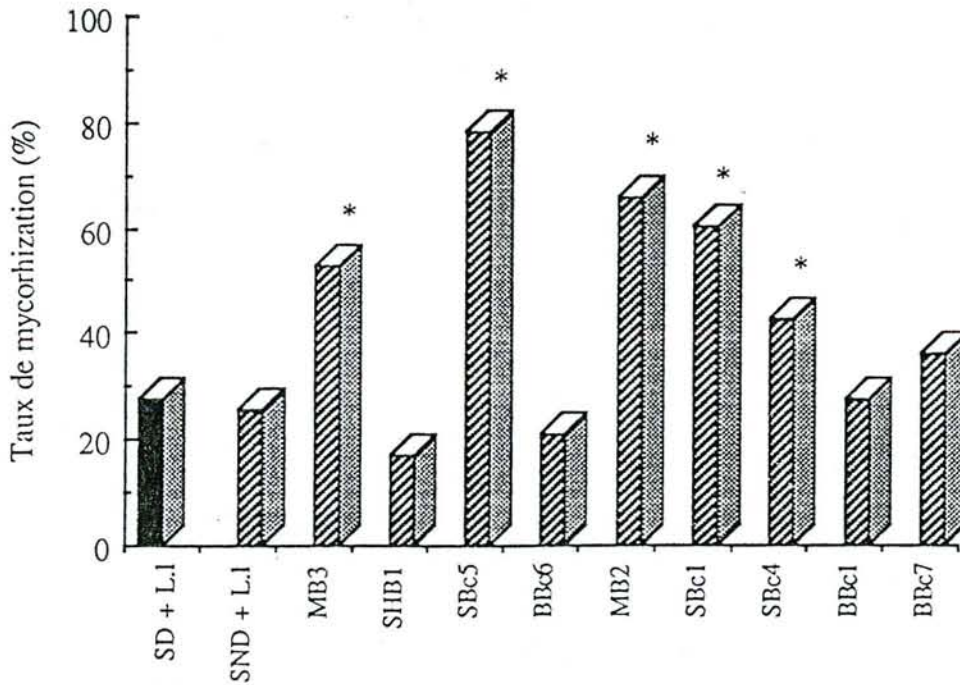


Fig.104: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans le sol non désinfecté, après 4 mois de culture dans l'expérience 40. \*: différence significative par rapport au témoin (SND + L.1) d'après le test "t" de Student (P=0,05). SD + L.1: *L. laccata* seul mélangé au sol désinfecté, SND + L.1: *L. laccata* seul mélangé au sol non désinfecté.

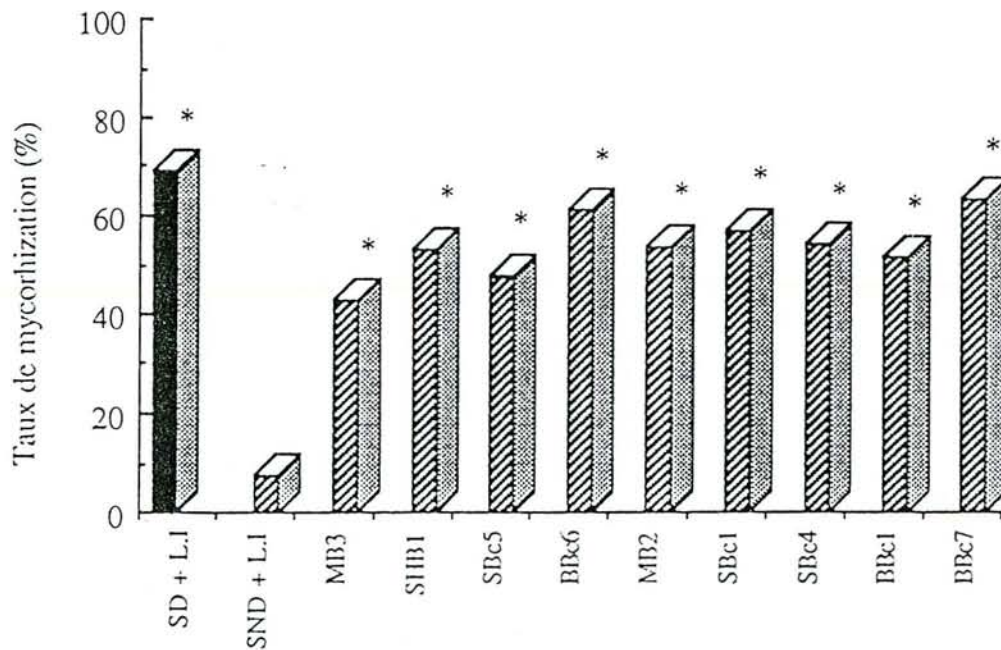


Tableau 32: effet des bactéries sur la biomasse aérienne et racinaire (mg (poids sec) par semis) après 2 et 4 mois de culture dans l'expérience 40. \*: différence significative par rapport au témoin (SND + L.l.) d'après le test "t" de Student (P=0,05). SND - L.l.: sol non désinfecté sans *L. laccata* S238, SND + L.l.: sol non désinfecté avec *L. laccata* S238, SD + L.l.: sol désinfecté avec *L. laccata* S238.

Traitements	Biomasse racinaire	Biomasse aérienne
<b>2 mois</b>		
SD + L.l.	19,5	50,3
SND - L.l.	nd	nd
<u>SND + L.l. (témoin)</u>	18,5	39,6
MB3	21,6	50,4*
SHB1	19,5	52,2*
SBc5	29,9*	54,2*
BBc6	22,0	58,9*
MB2	19,2	46,5
SBc1	17,7	38,8
SBc4	20,0	49,3
BBc1	19,9	50,8*
BBc7	19,1	53,7*
<b>4 mois</b>		
SD + L.l.	49,0	93,8*
SND - L.l.	37,4	68,1
<u>SND + L.l. (témoin)</u>	35,3	63,4
MB3	45,1	72,5
SHB1	46,5*	72,4
SBc5	46,1*	79,6*
BBc6	44,6*	77,8
MB2	46,3*	85,4*
SBc1	44,8*	79,4*
SBc4	43,4	82,6*
BBc1	39,9	64,7*
BBc7	48,9*	83,6*

L'infection ectomycorhizienne par *T. terrestris* a été inhibée par les bactéries (fig.105). Aucune corrélation entre l'infection par ce champignon et celle par *L. laccata* n'a été observée après 2 mois de culture (fig.108). Par contre, après 4 mois, les taux de mycorhization par ces 2 symbiotes ont été significativement corrélés (fig.109), *L. laccata* S238 ayant supplanté *T. terrestris*. Ceci montre qu'au début de l'expérience, les effets des bactéries sur chaque champignon sont séparés (stimulation de *L. laccata* et inhibition de *T. terrestris*) et ensuite les 2 champignons sont entrés en compétition. Ceci confirme les résultats obtenus avec *Rhizopogon* sp. dans l'expérience 33 (voir page 176)

*Donc, les bactéries ont permis d'obtenir une infection par Laccaria laccata S238 dans un sol non désinfecté de même grandeur que celle observée dans le sol désinfecté. L'inhibition de la mycorhization par T. terrestris a de nouveau été observée*

**2/ Inoculation champignon + BAM (inclus ensemble dans l'alginate) en serre avec le sol de Peyrat le Château non désinfecté (expérience 41)**

### 2.1/ Matériels et méthodes

Les traitements et le protocole expérimental décrits dans l'expérience 40 ont été repris sauf que: les billes d'inoculum mixte ont été préparées avec une concentration fongique de  $0,5g.l^{-1}$  (concentration très faible) et des concentrations bactériennes de l'ordre de  $10^{11} cfu.l^{-1}$ . Nous avons réalisé l'inoculation à raison de 40ml de billes par kg de sol. Les modalités ont été réparties au hasard dans 4 blocs et les mesures (taux de mycorhization par *L. laccata* et par *T. terrestris*, contaminant naturel de ce sol) effectuées après 11, 15 et 21 semaines de culture, ont été traitées par l'analyse de variance ( $P=0,05$ ).

### 2.2/ Résultats et discussion (fig.110 à 115)

La bactérie BBc6 a stimulé l'infection ectomycorhizienne par *L. laccata* S238 après 11 semaines de culture (fig.110). Aucun effet des bactéries n'a été observé après 15 semaines (fig.111). Par contre, après 21 semaines de culture, les bactéries MB2, SBc4, BBc1 et BBc7 ont significativement inhibé la mycorhization (fig.112).

Fig.105: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *T. terrestris* dans le sol non désinfecté, après 4 mois de culture dans l'expérience 40. \*: différence significative par rapport au témoin (SND - L.1) d'après le test "t" de Student ( $P=0,05$ ). SD + L.1: *L. laccata* seul mélangé au sol désinfecté, SND + L.1: *L. laccata* seul mélangé au sol non désinfecté, SND - L.1: sol non désinfecté sans L.1. Pour la légende, voir fig.22, page 86.

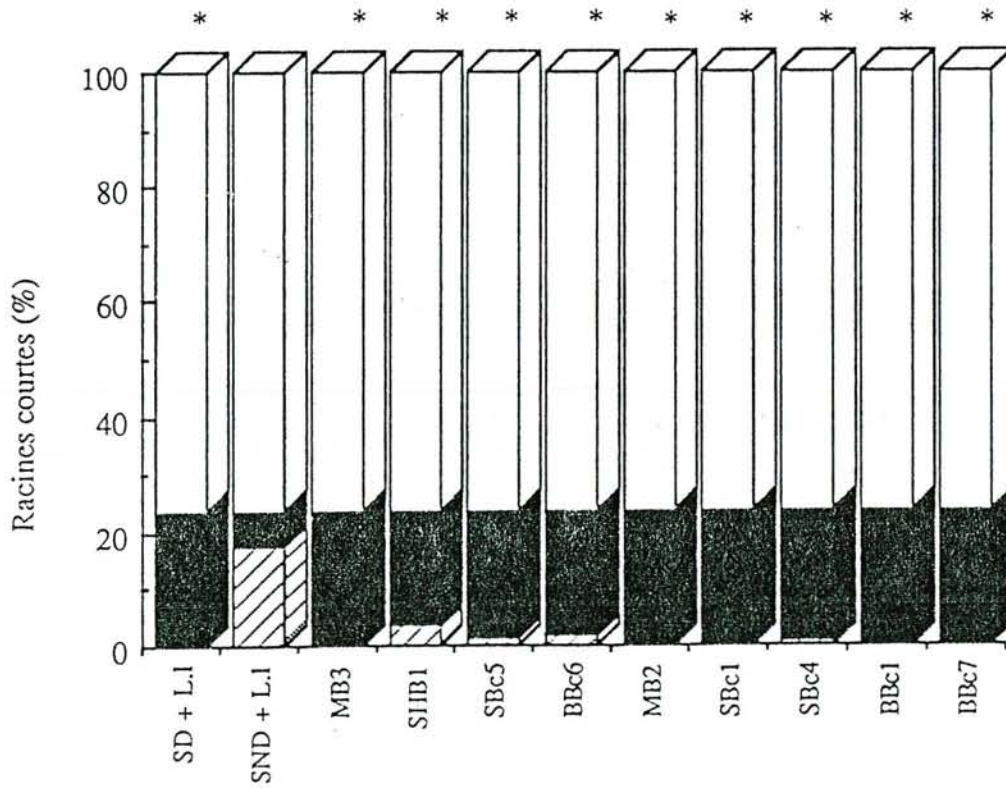


Fig.106: corrélation entre le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et la biomasse racinaire et aérienne après 4 mois de culture dans l'expérience 40. \*: significatif à  $P=0,05$ .

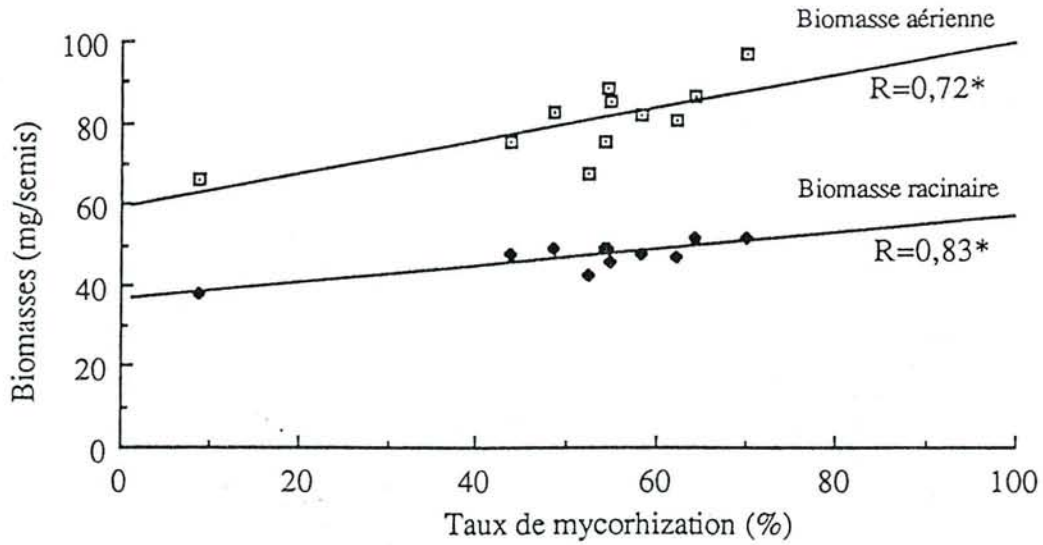


Fig.107: corrélation entre le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et le nombre de racines courtes par semis après 2 et 4 mois de culture dans l'expérience 40. \*: significatif à  $P=0,05$ .

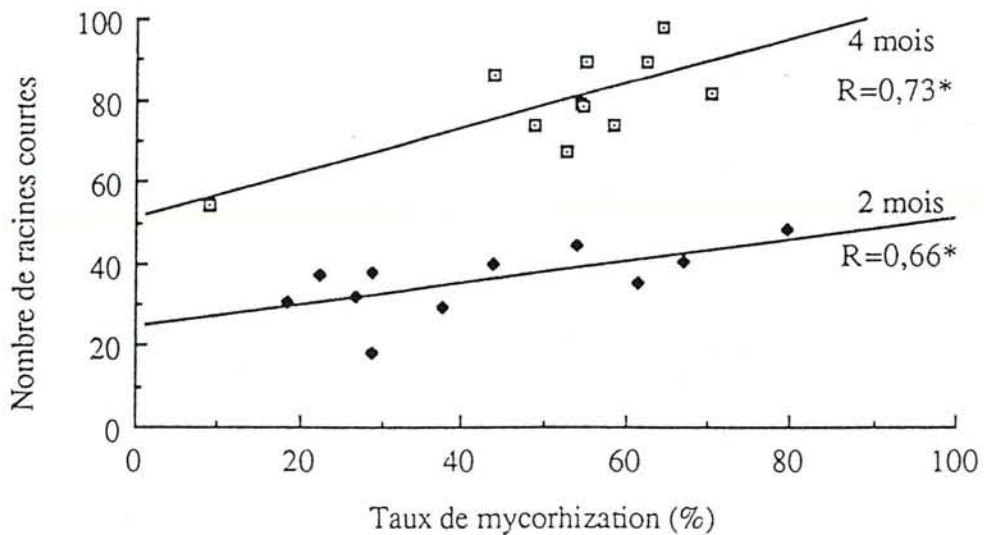




Fig.108: corrélation entre le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et celui de *T. terrestris* après 2 mois de culture dans l'expérience 40. \*: significatif à  $P=0,05$ .

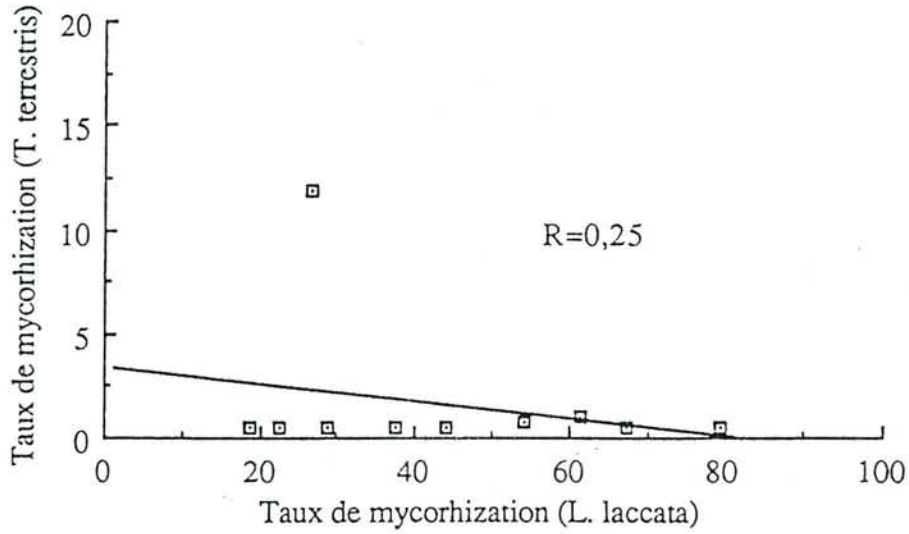


Fig.109: corrélation entre le taux de mycorhization par *L. laccata* S238 et celui de *T. terrestris* après 4 mois de culture dans l'expérience 40. \*: significatif à  $P=0,05$ .

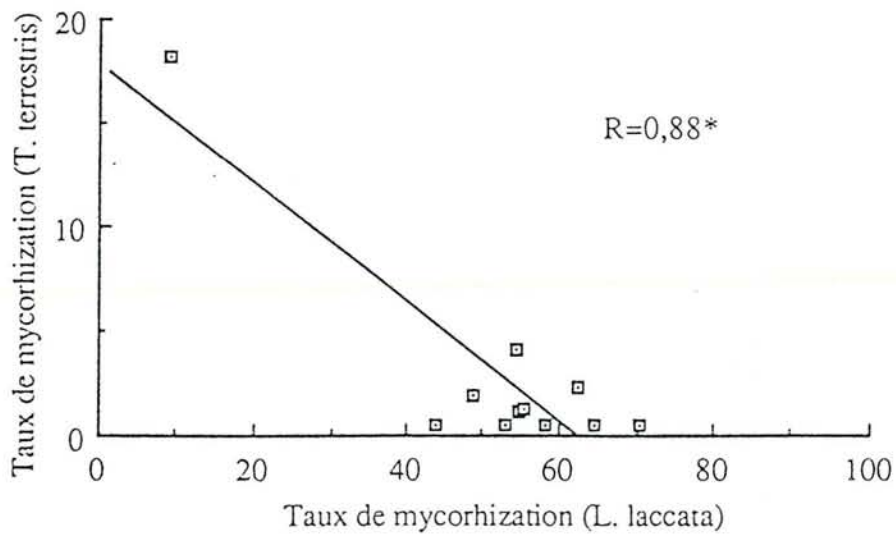


Fig.110: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans le sol non désinfecté après 11 semaines de culture dans l'expérience 41. \*: différence significative par rapport au témoin (SND+L.l) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. SD+L.l: sol désinfecté avec *L. laccata*, SND+L.l: sol non désinfecté avec *L. laccata*, SND-L.l: sol non désinfecté sans *L. laccata* S238.

Pour la légende: -Hachuré: témoin (sol non désinfecté + *Laccaria laccata*)  
 - pointillé: augmentation du nombre de mycorhizes par rapport au témoin  
 - noir: inhibition du nombre de mycorhizes par rapport au témoin

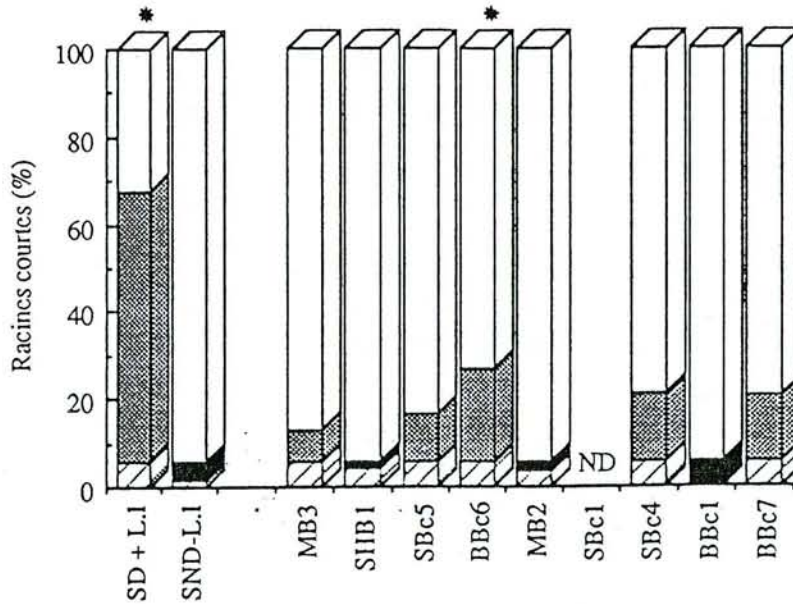
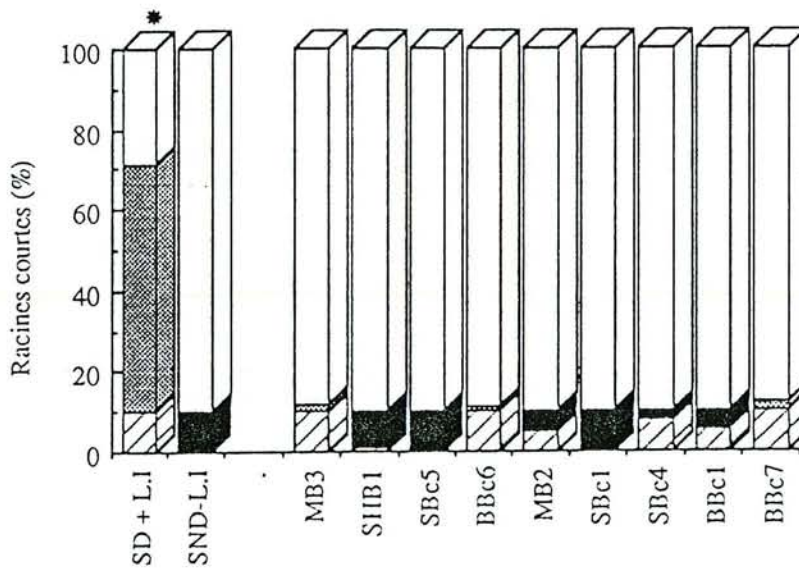


Fig.111: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *L. laccata* S238 dans le sol non désinfecté après 15 semaines de culture dans l'expérience 41. \*: différence significative par rapport au témoin (SND+L.l) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. Pour la légende, voir fig.110.



Toutes les bactéries ont inhibé la mycorhization par *T. terrestris* (contaminant naturel de ce sol) pendant toute la durée de l'expérience (fig.113, 114 et 115).

Ainsi, les bactéries ont eu le même effet que la désinfection du sol en ce qui concerne l'infection par *T. terrestris*. Par contre, des résultats *a priori* contradictoires ont été observés avec *L. laccata* dont l'infection a été inhibée par les bactéries. Ces effets dépressifs peuvent être expliqués par une inhibition de la croissance du champignon dans les billes du fait d'un déséquilibre entre la quantité de bactéries et la concentration fongique ( $0,5\text{g.l}^{-1}$ , voir expériences 38 et 39). Si nous rapportons la quantité d'inoculum mixte (40ml par kg de sol) à un volume de billes par unité de surface ( $4\text{l.m}^{-2}$ , en supposant qu'il a été enfoui dans 10 centimètres de profondeur), nous en déduisons que l'inoculation a été réalisée avec 4 fois plus de billes que la pratique habituelle ( $1\text{l.m}^{-2}$ ). En conséquence, dans le cas de l'inoculum mixte, il est fondamental de raisonner ces phénomènes de compétition entre les bactéries et le champignon au niveau de la bille afin d'avoir un effet optimal des bactéries sur la mycorhization.

### 3/ Inoculation du champignon et des BAM en pépinière sans désinfection du sol (expérience 42)

#### 3.1/ Matériels et méthodes

Cette expérience a été réalisée dans la pépinière de Peyrat le Château. Le protocole était identique à celui de l'expérience 33 sauf que les traitements étaient répartis au hasard dans 4 blocs. Les bactéries testées dans l'expérience 41 ont été de nouveau inoculées à raison d'environ  $10^{11}$  cfu.m<sup>-2</sup>. Les taux de mycorhization ont été calculés pour le champignon inoculé *L. laccata* S238 et pour le champignon contaminant *Rhizopogon* sp. après 5 mois de culture ; ils ont été comparés au témoin inoculé par *L. laccata* sur sol non désinfecté par l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés (traitement et bloc). L'infection par *T. terrestris* n'a pas été déterminée car les mycorhizes de ce champignon sont très difficiles à reconnaître en pépinière. Nous avons donc préféré, dans nos calculs, confondre les racines courtes non mycorhizées et celles probablement mycorhizées par *T. terrestris*.



Fig.114: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *T. terrestris* (champignon contaminant) dans le sol non désinfecté après 15 semaines de culture dans l'expérience 41. \*: différence significative par rapport au témoin (SND+L.l) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. SD+L.l: sol désinfecté avec *L. laccata*, SND+L.l: sol non désinfecté avec *L. laccata*, SND-L.l: sol non désinfecté sans *L. laccata* S238. Pour la légende, voir fig.110, page 208.

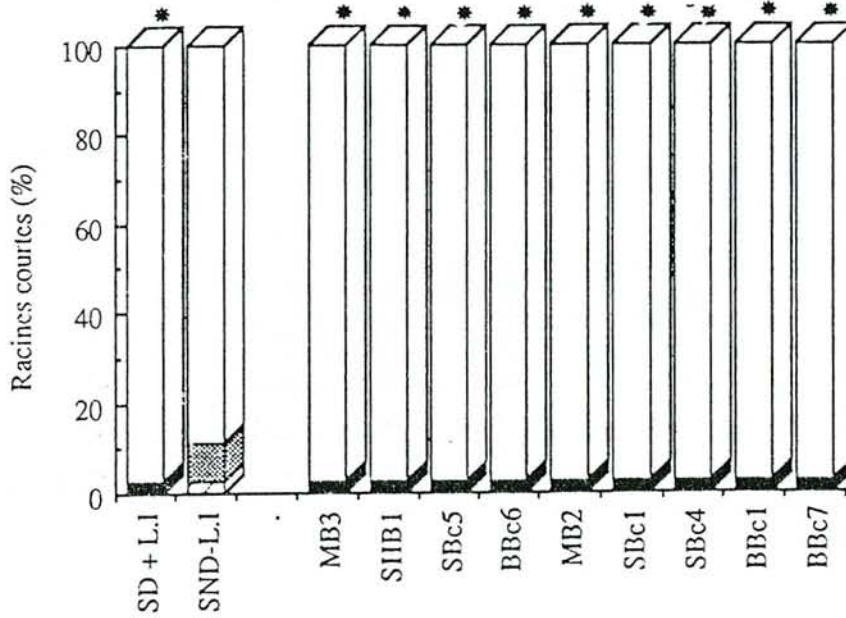
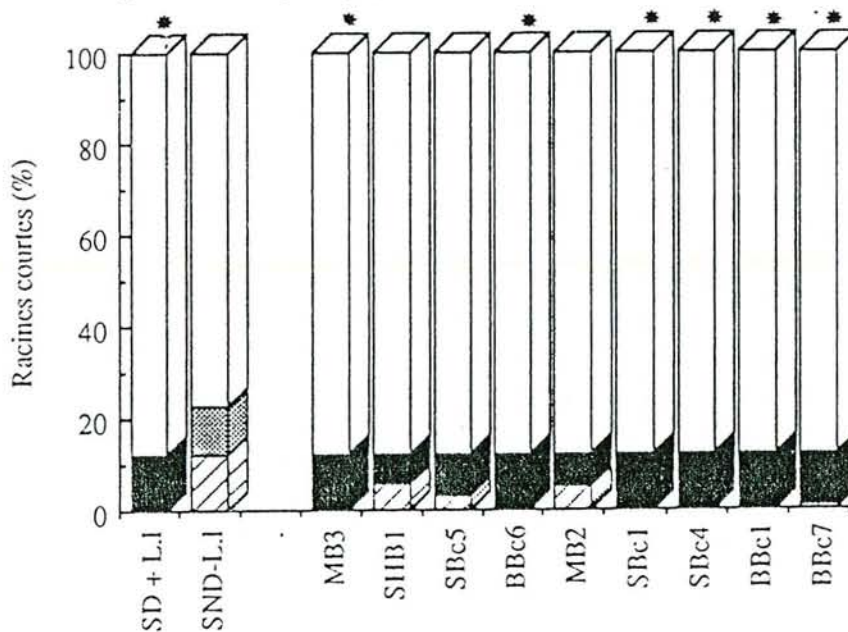


Fig.115: effet des bactéries sur la mycorhization du Douglas par *T. terrestris* (champignon contaminant) dans le sol non désinfecté après 21 semaines de culture dans l'expérience 41. \*: différence significative par rapport au témoin (SND+L.l) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. SD+L.l: sol désinfecté avec *L. laccata*, SND+L.l: sol non désinfecté avec *L. laccata*, SND-L.l: sol non désinfecté sans *L. laccata* S238. Pour la légende, voir fig.22, page 208.



### 3.2/ Résultats et discussion (fig.116, 117 et 118)

Toutes les bactéries ont stimulé significativement l'infection ectomycorhizienne par *L. laccata* S238 et inhibé celle par *Rhizopogon* sp. (fig.116 et 117).

Lorsque *L. laccata* a été inoculé, la croissance des semis a été inhibée par rapport au traitement non inoculé (fig.118). Les résidus du milieu nutritif de l'inoculum ont probablement stimulé la prolifération d'une microflore délétère. Cet effet négatif a été annulé par la présence des BAM (fig.118) puisqu'avec les traitements bactériens, la biomasse des parties aériennes était pratiquement égale à celle du traitement non inoculé.

La mycorhization des semis de Douglas a donc été augmentée grâce aux BAM dans un sol non désinfecté en pépinière dans des conditions plus contraignantes que l'expérience 40. Pourtant, les taux de mycorhization obtenus sont très inférieurs à ceux que l'on observe sur sol désinfecté. L'utilisation des BAM sur sol non désinfecté n'est donc pas totalement maîtrisée. En conséquence, il faudra:

- ↳ optimiser la quantité de bactérie inoculée afin d'avoir la meilleure stimulation de l'infection par *L. laccata* S238
- ↳ essayer différentes combinaisons de plusieurs BAM puisque ces dernières ont probablement chacune un mécanisme d'action qui lui est propre
- ↳ voir si, en deuxième année de végétation, l'effet bénéfique apporté par la bactérie se maintient ou est même amplifié.

Fig.116: effet des bactéries sur la mycorhization des semis de Douglas par *L. laccata* S238 dans l'expérience 42. \*: différence significative par rapport au témoin (sol non désinfecté inoculé par *L. laccata* S238 sans bactérie) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. TNI: témoin non inoculé sur sol non désinfecté. Pour la légende, voir fig.110, page 208.

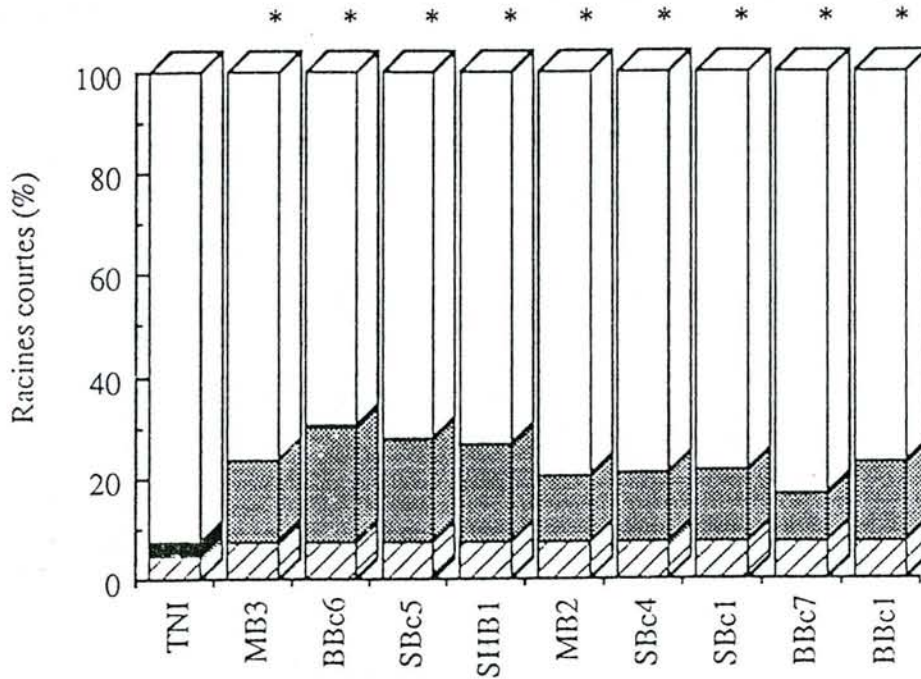


Fig.117: effet des bactéries sur la mycorhization des semis de Douglas par *Rhizopogon* sp. dans l'expérience 42. \*: différence significative par rapport au témoin (sol non désinfecté inoculé par *L. laccata* S238 sans bactérie) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés. TNI: témoin non inoculé sur sol non désinfecté. Pour la légende, voir fig.110, page 208.

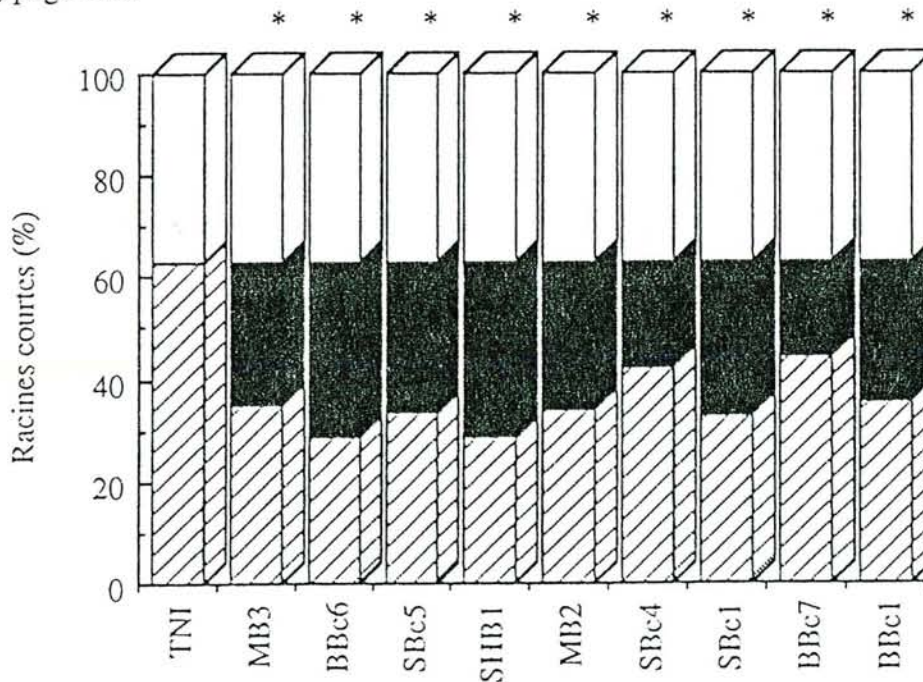
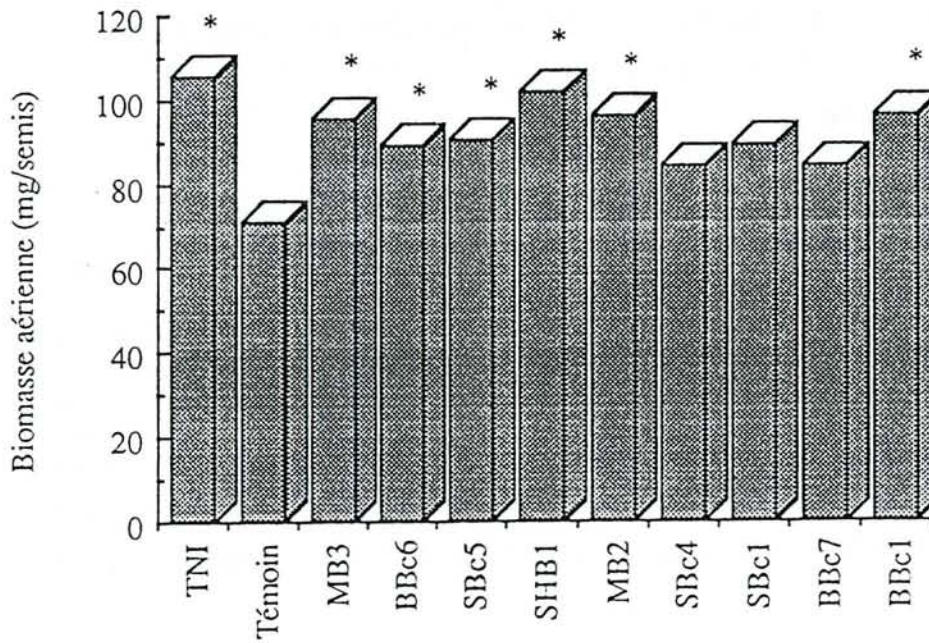


Fig.118: effet des bactéries sur la biomasse aérienne (mg (poids sec) par semis) des semis de Douglas dans l'expérience 42. \*: différence significative par rapport au témoin (sol non désinfecté inoculé par *L. laccata* S238 sans bactérie) d'après l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés.





## C/ Conclusion de la 4ème Partie

La figure 119 résume les principaux acquis des expériences qui ont été réalisées en pépinière. Ils peuvent être résumés de la façon suivante:

- ↻ l'effet des BAM se manifeste aussi dans des conditions de pépinière
- ↻ les stimulations sont obtenues avec différentes techniques d'inoculation
- ↻ l'utilisation des BAM comme une alternative à la désinfection du sol avant inoculation semble prometteuse.

Pourtant, si les BAM sont utilisées à plus grande échelle, il faudra définir quantitativement la meilleure combinaison entre les bactéries et le champignon afin d'améliorer l'effet BAM. Cette optimisation de la technique d'inclusion du champignon et des bactéries ensemble dans des billes d'alginate de calcium sera réalisée en étudiant: l'influence des composés ajoutés lors de la préparation de la solution avant gélification (tourbe, bentonite, etc) ; l'effet sur la survie des bactéries de différentes solutions permettant la gélification des billes ( $\text{CaCl}_2$ , gluconate de calcium, etc) et enfin l'évolution des bactéries et du champignon dans les billes afin de pouvoir conserver cet inoculum.

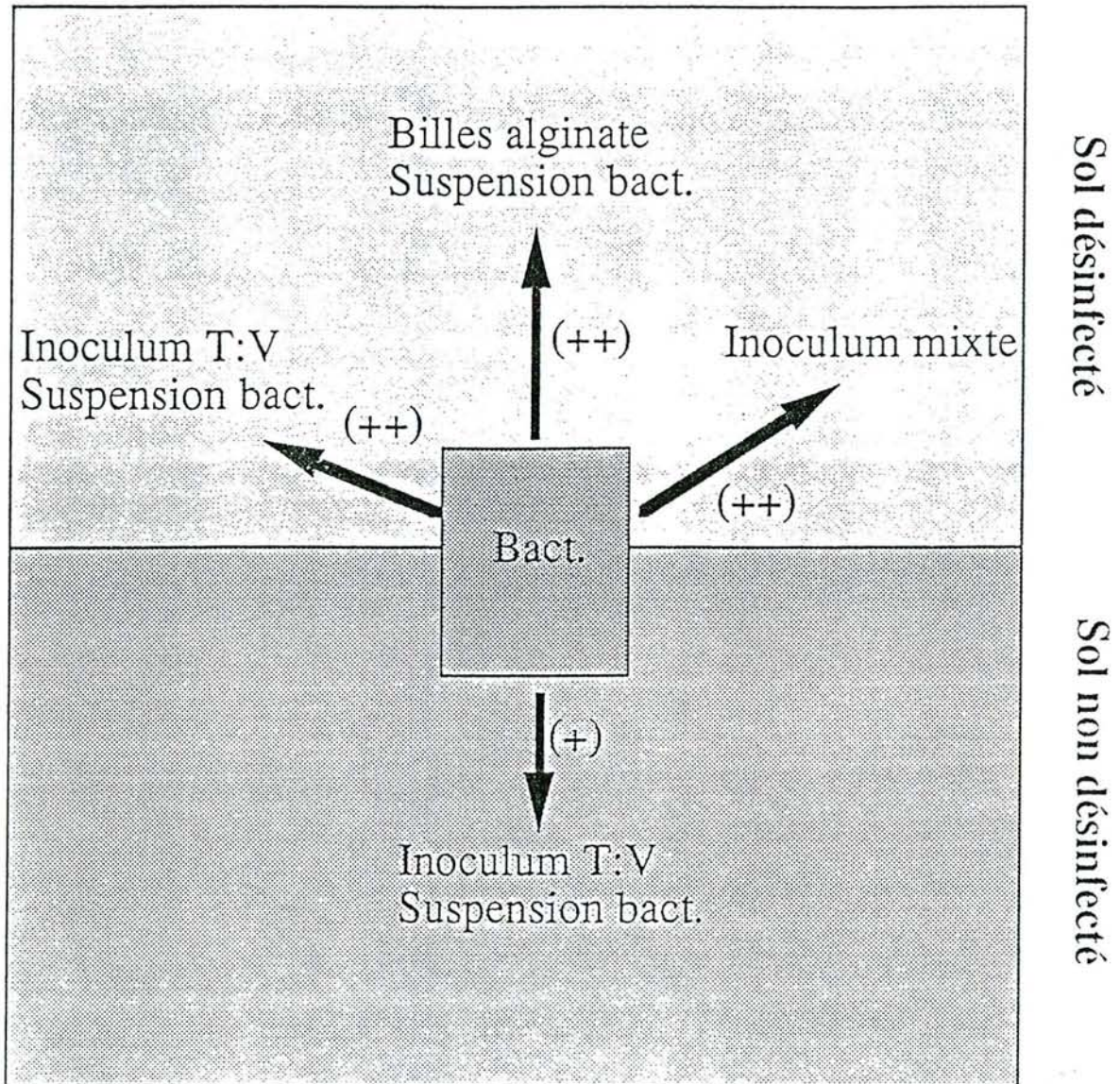


Fig.119: effets des BAM sur la mycorhization des semis de Douglas par *L. laccata* S238 selon la technique d'inoculation et la désinfection du sol

(+,+): stimulation importante  
 (+): stimulation modérée

T:V: tourbe-vermiculite

---

Conclusion et discussion générale

## CONCLUSION et DISCUSSION GENERALE

### 1/ Importance de la microflore mycorrhizosphérique

Nos résultats montrent que certaines composantes de la microflore mycorrhizosphérique agissent directement sur la mycorhization . Ce sont en particulier des bactéries qui ont été nommées **Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization**. Dans toutes les conditions environnementales où elles ont été inoculées, elles ont stimulé de manière très significative l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne, ce qui montre leur pouvoir de compétition vis à vis de la microflore indigène. De plus, il est apparu qu'elles agissaient de manière sélective sur la mycorhization du champignon à partir duquel elles ont été isolées.

### 2/ Le problème de la co-évolution champignon/BAM

La sélectivité des BAM a été démontrée avec plusieurs champignons ectomycorhiziens. *Laccaria laccata* est un champignon commun dans les régions tempérées qui mycorhize un grand nombre d'arbres (angiospermes et gymnospermes). La souche S238 de *Laccaria laccata* a été isolée de mycorhizes formées avec *Tsuga mertensiana* dans une forêt où était présent le Douglas dans l'Oregon (USA). La culture pure (sans bactérie) de cette souche a été envoyée aux laboratoires européens et ce champignon a été inoculé dans des pépinière et dans des plantations. Il a formé des mycorhizes et des carpophores d'où ont été isolées les BAM étudiées ici. Ces bactéries étaient évidemment présentes dans le sol avant l'inoculation et le champignon les a donc sélectionnées à partir des populations indigènes. Tous nos résultats montrent que les effets positifs sur la mycorhization par *L. laccata* et *L. bicolor* de ces isolats bactériens sont indépendants de l'origine géographique des champignons testés. Ceci est confirmé par les stimulations de la mycorhization obtenues avec les différentes souches de *Laccaria bicolor* (nord-américaines et européennes). Comme le *Laccaria laccata* indigène européen est présent dans les sols où a été introduite la souche S238 (Villeneuve *et al* , 1991) et où les BAM ont été isolées, ce champignon local aurait probablement sélectionné une microflore bactérienne bénéfique aux espèces *L. laccata* et *L. bicolor*.

Nous n'avons réussi à répondre qu'à une partie de la question qui était: une espèce de champignon ectomycorhizien est-elle associée à un cortège bactérien spécifique? En effet ce concept implique une pression sélective de la bactérie sur le

champignon et inversement une action du champignon sur la microflore bactérienne mycorrhizosphérique. Il faudra élargir la notion de sélectivité des bactéries vis-à-vis du champignon à d'autres modèles en étudiant l'effet sur la mycorhization d'un champignon donné (Ex: *T. terrestris* ) des bactéries isolées de mycorhizes ou de carpophores de ce même champignon. Puis, afin de démontrer l'éventuelle spécificité d'une microflore bactérienne à un champignon ectomycorhizien donné, il faudra réaliser les confrontations entre des souches fongiques et des bactéries isolées de champignons différents. Si cette spécificité (concept nouveau en terme de populations bactériennes associées à la symbiose ectomycorhizienne) est vérifiée, nous pourrions alors parler de co-évolution entre le champignon et les bactéries associées

### 3/ PGPR et BAM

Il est donc évident que les populations bactériennes associées au champignon ectomycorhizien ont un rôle très important dans le processus de mycorhization. Ceci nous amène à reconsidérer la réponse de la plante hôte à l'infection ectomycorhizienne. En effet, est-ce que la meilleure nutrition phosphatée de la plante est seulement due au développement des hyphes extramatriciels, ou est-ce aussi la conséquence des interactions existant entre les hyphes et des bactéries solubilisatrices de phosphates? De même, les modifications de la morphologie et de la physiologie des racines sont-elles dues au champignon ou à divers composés émis par les bactéries? Enfin, la protection des plants mycorhizés contre certains pathogènes est-elle le fait du champignon ou de bactéries? Nos résultats tendent à prouver que ces phénomènes sont les conséquences des actions combinées du champignon et des microorganismes associés.

Il est souvent suggéré que les bactéries stimulant la croissance des plantes (PGPR) agissent en facilitant leur nutrition (solubilisation des phosphates peu solubles), en produisant des hormones ou en inhibant des pathogènes par antibiose ou par compétition (Burr & Caesar, 1984). Cependant, il est rarement fait état dans la littérature d'observations du statut mycorhizien des racines après inoculation des bactéries. Des mécanismes interactifs entre les bactéries et les champignons mycorhiziens pourraient aussi expliquer des stimulations de croissance chez certaines plantes.

#### 4/ Critique de la méthodologie utilisée

##### a/ Quantification de l'infection ectomycorhizienne

Ce paramètre a été mesuré en calculant le pourcentage de racines courtes mycorhizées par rapport au nombre total de racines courtes. Afin de montrer l'importance des BAM dans le processus de mycorhization, d'autres critères auraient pu être choisis. Par exemple, l'effet des bactéries sur la biomasse fongique présente dans le substrat de culture de la plante aurait pu être mesuré. L'action des bactéries sur la colonisation racinaire par le champignon aurait pu être quantifiée par des techniques utilisant des anticorps.

##### b/ Test de confrontation

Toute notre étude reposait sur une hypothèse de travail: une bactérie stimulant la croissance fongique a toutes les chances de stimuler la mycorhization. Il s'est avéré que la stimulation de la croissance du champignon était bien la composante principale de l'effet BAM. Mais le test de confrontation utilisé nous aurait conduit à éliminer certaines bactéries qui ont pourtant engendré ultérieurement de fortes stimulations de la mycorhization par *L. laccata* S238. Des phénomènes de compétition trophique existaient entre le champignon et les bactéries au niveau de l'implant gélosé utilisé dans ce test. Cet implant contenait tout de même quelques réserves qui pouvaient amener des conclusions erronées. Afin de résoudre ce problème, l'utilisation de billes d'alginate de calcium contenant le champignon et les bactéries semble être plus intéressante et ceci à plusieurs titres: les réserves nutritives sont nulles dans les billes et, surtout, les quantités de bactéries et de champignon incluses peuvent être contrôlées. Ce test pourrait être un outil performant dans le cadre, par exemple, de la mise au point de l'inoculum mixte ou de l'étude de l'effet de différentes bactéries incluses dans la bille avec le champignon.

En plus de ces phénomènes de compétition pour les nutriments présents dans le milieu, il s'est avéré que les bactéries pouvaient avoir une action inhibitrice de la croissance du champignon lorsqu'elles étaient apportées en trop grande quantité. Cet effet a été observé en utilisant le test de confrontation réalisé avec des billes d'alginate. Ces interactions négatives sont très importantes dans la fabrication des billes d'inoculum mixte, ce que nous discuterons ultérieurement et posent aussi un problème lorsqu'un criblage d'une collection de bactéries est effectué.

Donc aucun des 2 tests présentés n'est complètement fiable. Afin de sélectionner des bactéries pour un caractère donné (stimulation de la croissance fongique), plusieurs

précautions sont nécessaires: limiter le plus possible les réserves nutritives présentes dans le milieu et réaliser le test avec une concentration bactérienne limitée.

c/ Démarche expérimentale retenue pour l'étude des mécanismes d'action

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer l'effet des BAM: action des bactéries sur le champignon et/ou sur la plante. Nous avons alors obtenu une liste de caractéristiques pour chaque bactérie. Une autre approche aurait peut être été plus judicieuse. En effet, en conditions axéniques, nous aurions pu observer la localisation des bactéries sur le système racinaire: dans les mycorhizes, sur les racines longues ou courtes non mycorhizées et enfin dans le substrat. Cela aurait pu nous permettre de mieux cibler les études biochimiques réalisées pour étudier les mécanismes d'action. Par exemple, si les bactéries s'étaient trouvées uniquement au niveau du substrat, cela aurait suggéré que les bactéries stimulaient uniquement la croissance saprophytique du champignon.

Dans l'étude sur l'effet des productions enzymatiques par les bactéries, nous avons seulement étudié cet aspect au niveau de l'isolat bactérien. Les différentes activités mises en évidence n'ont pas été étudiées au niveau de leur impact sur la racine (Ex: altération du ciment intercellulaire des cellules corticales par une pectinase excrétée par une bactérie, ce qui faciliterait la pénétration du champignon). Différentes approches auraient été possibles. Cet impact aurait pu être mesuré en appliquant une solution enzymatique sur la racine et, ensuite, en inoculant le champignon. L'effet de ces enzymes aurait pu être visualisé en microscopie électronique à transmission grâce à des techniques de marquage mettant en évidence certains composés du ciment intercellulaire.

d/ Absence de standardisation dans les quantités de bactéries inoculées dans les expériences de serre et de pépinière

Nous avons souligné l'importance, dans l'effet de stimulation de la mycorhization, de la quantité de bactéries inoculée. Pour des raisons pratiques, les expériences en serre et en pépinière ont souvent été réalisées avec des inocula bactériens différents dans leurs concentrations. Pour cette raison, nous n'avons pas pu comparer les effets des différentes BAM. De plus, ceci peut expliquer les résultats quelquefois différents (mais jamais contradictoires sur sol désinfecté ou substrat tourbe-vermiculite) obtenus avec certains isolats bactériens.

### e/ Support cultural utilisé dans les expérience en serre

Toutes les expériences en serre ont été réalisées en utilisant des plaques Hiko avec des alvéoles de 95ml. Lorsque nous avons inoculé le champignon au 1/10ème (v:v), le taux de mycorhization a généralement atteint une valeur maximale mais élevée après seulement 4 mois de culture dans les traitements avec les bactéries. La cause de ce phénomène était probablement le petit volume dans lequel étaient plantées les semis. En effet, nous pouvons imaginer qu'après un certain temps de culture, le mycélium avait colonisé complètement le substrat de culture. Ceci nous amène à une réflexion: la stimulation de la mycorhization par les bactéries n'est-elle pas surévaluée? En effet, nous avons montré que ces bactéries stimulaient la croissance du mycélium. Dans ce cas, la colonisation du substrat par le champignon s'effectuera plus rapidement et ainsi le processus d'infection secondaire débutera plus tôt par rapport au témoin sans bactérie. Ainsi, afin de supprimer ce biais et d'évaluer correctement la stimulation, il faudra faire toutes les mesures lorsque la mycorhization se situe au stade des infections primaires. Une façon d'y remédier sera de mélanger des quantités plus faibles d'inoculum fongique au substrat. Remarquons cependant que des stimulations importantes ont aussi été observées en pépinière. Si les effets ont été surévalués en serre, cette surévaluation est donc modérée.

## **5/ Perspectives d'étude**

La suite des études concernant ces interactions devront avoir 2 orientations complémentaires l'une de l'autre. D'une part, les mécanismes mis en jeu devront être mieux compris et, d'autre part, l'utilisation des propriétés des BAM à travers l'élaboration de l'inoculum mixte devra être optimisée.

### a/ Compréhension des mécanismes d'action

La réalisation de cet objectif ne sera effective que lorsque nous connaissons le comportement des bactéries pendant toute la durée du processus de mycorhization. Deux points seront à aborder successivement: la dynamique de la population bactérienne inoculée puis le comportement de la bactérie dans la mycorhize. Ce dernier point inclut les mécanismes biochimiques intervenant dans les interactions bactéries-champignon-plante.



#### ↳ Dynamique de la population bactérienne inoculée

Ce domaine d'étude n'a pas été abordé dans nos travaux. Pourtant il apparaît nécessaire de connaître la répartition des bactéries au niveau du système racinaire dans des conditions de pépinière et de savoir si elles subsistent pendant tout le processus de mycorhization (en pépinière et aussi en plantation), surtout si nous avons pour but de produire des plants plus performants en plantation. En effet, nous avons montré que les bactéries ont une action inhibitrice sur la mycorhization par des champignons autres que *L. bicolor* et *L. laccata*. Il serait donc avantageux d'utiliser ces bactéries afin d'améliorer la compétitivité de *L. laccata* S238 vis à vis de la microflore indigène.

Les techniques de biologie moléculaire semblent très appropriées pour entamer cette étude en nous permettant de reconnaître spécifiquement la bactérie inoculée parmi toute la microflore.

#### ↳ Etude du comportement des bactéries dans la mycorhize

Différents aspects de ce problème seront à étudier: (1) les interactions entre la bactérie et le champignon dans la mycorhize, (2) l'effet bactérien sur l'installation et le fonctionnement de la symbiose et (3) les mécanismes d'action proprement dits.

(1) La technique qui semble la plus appropriée est la microscopie électronique à transmission. Nous ne l'avons que trop peu utilisé dans cette étude. Nous pourrions ainsi observer, grâce à des techniques de marquage, les événements se produisant au niveau de l'interface bactérie-champignon, en particulier les activités enzymatiques.

(2) Afin de mettre en évidence l'effet des bactéries sur l'installation (reconnaissance des 2 partenaires) et sur le fonctionnement (en particulier l'efficacité de la symbiose au niveau de la croissance des semis), il faudrait avoir une base de connaissances concernant uniquement l'association entre le champignon et la plante. En ce qui concerne les phénomènes de reconnaissance, les mécanismes mis en jeu sont encore très incomplètement élucidés. Le même problème existe lorsque l'on parle d'efficacité. Les paramètres physiologiques importants pour l'amélioration génétique des champignons ectomycorhiziens ne sont pas encore bien déterminés. Par exemple, les aptitudes de différentes souches de *L. laccata* à produire des auxines ou à solubiliser les phosphates, critères choisis afin de sélectionner des dicaryons reconstitués, n'a pas donné les résultats escomptés dans un travail actuellement en cours dans le même laboratoire.

(3) Il nous faudra tester une à une toutes les propriétés qui ont été mises en évidence pour chaque bactérie. Mais, même si nous réussissons à reproduire l'effet bactérien grâce, par

exemple, à l'adjonction dans le substrat d'un composé chimique produit par la bactérie, cela ne constituera qu'une explication partielle du phénomène qui nous intéresse. Afin de comprendre exactement ces mécanismes, une approche efficace serait d'utiliser des mutants bactériens ayant perdu l'aptitude à produire le composé en question.

b/ Optimisation de l'utilisation des BAM dans les techniques de mycorhization contrôlée en pépinière forestière

La technique d'inclusion des bactéries et du champignon, ensemble, dans des billes d'alginate de calcium semble très prometteuse à condition d'optimiser le rapport entre les quantités de champignon et de bactéries incluses. Il nous faudra élucider aussi l'influence des composés intervenant dans la solution avant gelification et étudier l'effet d'autres agents gélifiants (gluconate de calcium, etc) sur la viabilité des 2 microorganismes.

Enfin, les procédés de conservation de l'inoculum mixte et les différentes modalités d'inoculation (quantités mélangées au sol, etc) devront être clairement définis.

---

BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

Abbott, L., Robson, A et Jasper, D. (1991) What is the role of VA mycorrhizal hyphae in soil. *In* : third european symposium on mycorrhizas, abstracts. Sheffield.

Alexander, M. (1977) Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons, New York, 467 p

Arshad, M. et Frankenberger, W.T. (1991) Microbial production of plant hormones. *Plant & Soil* , **133**, 1-8

Azcon, R. et Barea, J.M. (1975) Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant & Soil* , **43**, 609-619

Azcon-Aguilar, C. et Barea, J.M. (1985) Effect of soil microorganisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Transactions of the British mycological Society* , **84**, 536-537

Ba, A. (1990) Contribution à l'étude de la symbiose ectomycorhizienne chez deux essences forestières d'Afrique intertropicale: *Afzelia africana* Sm. et *Uapaca guineensis* Müll. Arg.. Thèse de doctorat de l'université de Montpellier. 193 pages.

Baker, R., Maurer, C.L. et Maurer, R.A. (1967) Ecology of Plant Pathogens in Soil. VII Mathematical Models and inoculum density. *Phytopathology* , **57**, 662-666

Bakker, A.W. et Schippers, B. (1985) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 451-457

Bali, M. et Mukerji, K.G. (1990) Interactions between soil microflora and VAM fungi in relation to growth of cotton. *In Proceeding of the eighth north american conference on mycorrhizae*

Banik, S. et Dey, B.K. (1981) Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. *Plant & Soil*, **69**, 353-364

Barea, J.M., Bonis, A.F. et Olivares, J. (1983) Interactions between *Azospirillum* and V.A. mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, **15**, 705-709

Bartshi, H., Gianinazzi-Pearson, V. et Vegh, I. (1981) Vesicular-arbuscular mycorrhizas and rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathology*, **102**, 213-218

Biely, P., Mislovicova, D. et Toman, R. (1985) Soluble chromogenic substrates for the assay of endo 1,4 B xylanase and endo 1,4 B glucanase. *Analytical Biochemistry*, **144**, 142-146

Boasson, R. et Shaw, M. (1979) Colony initiation in flax rust in axenic culture involvement of a volatile factor. *Can. J. Bot.*, **57**, 2657-2662

Boasson, R. et Shaw, M. (1981) CO<sub>2</sub> is essential for colony initiation by flax rust fungus grown *in vitro*. *Can. J. Bot.*, **59**, 1621-1622

Bonnet-Masimbert, M. et Muller, C. (1974) L'utilisation de l'eau oxygénée pour la levée de dormance des graines de Douglas ne peut constituer qu'une solution de secours. *Revue Forestière Française*, **26**, 135-138

Bowen, G.D. et Theodorou, C. (1979) Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **11**, 119-126

Bowen, G.D. (1980) Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology *In* : Contemporary microbial ecology Edited by D. C. Ellwood, J. N. Hedgen M. J. Latham, J. M. Lynch and J. M. Slater. Academic Press, London P P 283 - 304

Brian, P.W., Hemming, H.G. et McGowan, J.C. (1945) Origin of a toxicity to mycorrhiza in Wareham Health soil. *Nature* **155**, 637-638

Bric, J.M., Bostock, R.M. et Silverstone, S.E. (1991) Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Env. Microbiol.* , 533-538

Brown, M. (1972) Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *J. Appl. Bact.*, 35, 443-451

Burr, T.J. et Caesar, A. (1984) Beneficial plant bacteria. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* , 2, 1-20

Cerny, G. (1976) Method for the distinction of Gram négative from Gram positive. *Eur. J. Appl. Microbiol.* , 3, 223-225

Chae Gun Phae, Makoto Shoda et Hiroshi Kubota (1990) Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , 1, 1-7

Chakraborty, S., Theodorou, C. et Bowen, C.D. (1985) The reduction of root colonization by mycorrhizal fungi by mycophagous amoebae. *Can. J. Microbiol.* 31, 295-297

Chakravarty, P. et Hwang, S.F. (1991) Role of an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata* , on Fusarium damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. *Eur. J. For. Path.*, sous presse

Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. et Bucke, C. (1979) Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* , 21, 2155-2168

Chu-Chou, M. (1979) Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* , 11, 557-562

Clark, F.E. (1949) Soil microorganisms and plant roots. *Adv. in Agron.* 1, 241-288

Damm, E. et Unestam, T. (1990) the protective effect of mycorrhiza against *Rhizoctonia* sp. on roots of *Pinus silvestris* seedlings. In *Proceeding of the eighth north american conference on mycorrhizae*

Danielson, R.M. (1988) mycorrhizae in forestry: the state of the art in land reclamation. In canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry, 1-4 may 1988 at Sainte Foy (Québec) Canada. Eds. M. Lalonde et Y. Piché. pp 39-41. Centre de Recherche en Biologie Forestière, Université Laval, sainte-Foy

Davis, R.M. et Menge, J.A. (1980) Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytopathology*, **70**, 447-452

Davison, J. (1988) Plant beneficial bacteria. *Biotechnology*, **6**, 282-286

De Giudici, P. (1985) Contribution à l'étude de la solubilisation microbienne d'un phosphate naturel en modèle spermosphérique. Thèse de doctorat INPL, Nanvy, 123 p

De Oliveira, V.L. (1988) Interactions entre les microorganismes du sol et l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne chez le hêtre (*Fagus silvatica* L.) avec *Hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus*. Thèse de doctorat de l'université de Nancy I. 118 pages

De Oliveira, V.L. et Garbaye, J. (1989) Les microorganismes auxiliaires de l'établissement des symbioses ectomycorhiziennes (Revue bibliographique). *Eur. J. For. Pathol.*, **19**, 54-64

Dehne, H.W. (1982) Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology*, **72**, 1115-1119

Delatour C (1978) Recherche d'une méthode de lutte curative contre le *Ciboria batschiana* chez les glands. *Eur. J. For. Path.* **8** (4) : 193-200

Delran S, Garbaye J, Kabré, Le Tacon F, Perrin R (1982) La production rapide de plants feuillus sur tourbe fertilisée : les problèmes microbiologiques posés par la réutilisation de la tourbe pendant plusieurs années consécutives. *Revue Forestière Française* **34** (4) : 314-325

Digat, B. (1983) modes d'action et effets des rhizobactéries promotrices de la croissance et du développement des plantes. Dans: Les antagonismes microbiens, 24ème colloque S.F.P., Bordeaux, 26-28 mai 1983. Ed. INRA Publ. (Les colloques de l'INRA n°18, 239-253

- Digat, B. (1986). Mode d'action et effet des rhizobactéries. CNIH, Réunion des conseillers horticoles. Novembre.
- Dommergues, Y. et Mangelot, F. (1970) Ecologie microbienne du sol. Eds. Masson et Cie, Paris, 477 pages
- Dommergues, Y., Diem, H.G. et Divies, C. (1979) Microbiological process for controlling the productivity of cultivated plants. *U.S. Patent n°4, 155,737*
- Duchesne, L.C., Peterson, R.L. et Ellis, B.E. (1987) Pine root exudates stimulate the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.*, **108**, 471-476
- Duchesne, L.C. (1989) Protein synthesis in *Pinus resinosa* and the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* prior to ectomycorrhiza formation. *Trees*, **2**, 73-77
- Duponnois, R. (1988) Etudes des mécanismes d'action des bactéries auxiliaires de la mycorrhization sur différents stades de l'établissement de la symbiose. DEA de biologie végétale et forestière. Université Nancy 1.92 pages
- Duponnois, R. et Garbaye, J. (1990) Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. *Can. J. Bot.*, **68**, 2148-2152
- Duponnois, R. et Garbaye, J. (1991) Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Ann. Sci. For.* sous presse
- Edress, M.H., Davis, R.M. et Burger, D.W. (1984) Influence of mycorrhizal fungi on cytokinin production in sour orange. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **109**, 587-590
- Eliasson, L. (1978) Effects of nutrients and light on growth and root formation in *Pisum sativum* cuttings. *Physiol. Plant.*, **43**, 13-18
- Eliasson, L. (1980) Interaction of light and auxin in regulation of rooting in pea stem cuttings. *Physiol. Plant.*, **48**, 78-82
- Fraga-Beddiar, A. et Le Tacon, F. (1989) Interactions between V.A. mycorrhizal fungi and *Frankia* associated with alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). *Symbiosis*, **9**, 247-258



- Fries, N., Bardet, M., Serck-Hanssen, K. (1985) Growth of ectomycorrhizal fungi stimulated by lipids from a pine root exudate. *Plant & Soil* , **86**, 287-290
- Garbaye, J. et Bowen, G.D. (1987) Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata* . *Can. J. For. Res.* **17**, 941-943
- Garbaye, J. et Bowen, G.D. (1989) Ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by *Rhizopogon luteolus* is stimulated by microorganisms naturally present in the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytol.* , **112**, 383-388
- Garbaye, J. (1991) Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia* **47**, 370-375
- Garbaye, J. (1990) Pourquoi et comment observer l'état mycorrhizien des plants forestiers? *Rev. For. Fr.* , **1**, 35-47
- Gerretsen, F.C. (1948) The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant & Soil* , **1**, 51-81
- Gilbert, R.G. et Linderman, R.G. (1971) Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Can. J. Microbiol.* **17**, 557-562
- Gill, P.R. et Warren, G.J. (1988) An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. *Journal of bacteriology* , 163-170
- Goldstein, A.H. et Liu, S.T. (1987) Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* . *Bio/Technology* , **5**, 72-74
- HacsKaylo, E. (1973) Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae In : Ectomycorrhizae: their ecology and physiology (Marks G.C. & Kozlowski T.T., eds), Academic Press, New York, pp.207-230
- Hanking, L. et Anagnostakis, S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *mycologia* , **67**, 597-607
- Harbonne, J.B. (1980) Plant phenolic. *Encyclopedia of Plant Physiology* , **8**, Secondary plant products, 329-402

- Harley, J.L. (1948) Mycorrhiza and soil ecology. *Biol. Rev.* , **23**, 127-158
- Harley, J.L. (1969) *In* : The biology of Mycorrhiza, Leonard Hill, London, p.334
- Harley, J.L. et Smith, S.E. (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London
- Harley, J.L. et Harley, E.L. (1991) A check-list of mycorrhiza in the british flora. *New Phytol.* , Supplement to vol.105, n°2
- Harris, D., Pacovsky, R.S. et Paul, E.A. (1985) Carbon economy of soybean-*Rhizobium - Glomus* associations. *New Phytol.*, **101**, 417-440
- Heller, R. (1982) Physiologie végétale. 2. Développement. Eds: Masson. 215 pages
- Hetrick, B.A.D. et Jayachandran, K. (1990) plant acquisition of nutrients in sustainable agriculture. *In* : Abstracts of the eighth north american conference on mycorrhizae. San Diego State University
- Hiltner, L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Deut. Landw Ges* **98**, 59-78
- Hooykaas, P.J.J., Melchers, L.S., Rodenburg, C.W., Vav Veen R.J.M. (1989) Regulation of the *Agrobacterium* virulence genes by plant factors. *Signals Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions* , **36**, 153-160
- Horan, D.P. et Chilvers, G.A. (1990) Chemotropism: the key to ectomycorrhizal formation? *New Phytol.* , **116**, 297-301
- Imolehin, E.D. et Grogan, R.G. (1980) Effect of oxygen, carbon dioxide, and ethylene on growth, sclerotial production, germination, and infection by *Sclerotinia minor* . *Phytopath.* , **70**, 1158-1161
- Jung, G., Mugnier, J., Dommergues, Y. et Diem, H.G. (1981) Procédé d'inclusion des microorganismes du groupe des actinorhizes et des mycorhizes. *Brevet n°81.04474*

- Kabre, A (1982) Mycorrhization de *Pinus caribaea* (Morelet) var. *hondurensis* dans différents sols du Sénégal. Thèse de docteur ingénieur. Université de Nancy 1, 127 pages
- Katznelson, H. et Bose, B. (1959) Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and non rhizosphere soil. *Can. J. Microbiol.* , **5**, 79-85
- Katznelson, H., Rouatt, J.W. et Peterson, E.A. (1962) The rhizosphere effect of mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Can. J. Bot.* **40**, 377-382
- Katznelson, H. (1965) Nature and importance of the rhizosphere. In: K.F. Baker and W.C. Snyder, eds., *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. Univ. Calif. Press, Berkeley. pp. 187-209
- Kawai, Y. et Yamamoto, Y. (1986) Increase in the formation and nitrogen fixation of soybean nodules by vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Plant Cell Physiol.* , **27**, 399-405
- King, J.V., Campbell, J.J.R. et Eagles, B.A. (1948) Mineral requirement for fluorescein production by *Pseudomonas* . *Canadian Journal of Research* , **26C**, 514-519
- King, E.O., Ward, M.K. et Raney, D.E. ( 1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. & Clin. Med.*, **44**, 301-307
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. et Schroth, M.N. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Nature* , **286**, 885-886
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. et Zablutowicz, R.M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Tibtech.* , **7**, 39-44
- Kope, H. H. et Fortin J. A. (1990) Inhibition of phytopathogenic fungi *in vitro* by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* , **113**, 57-63
- Kothari, S.K., Marshner, H. et George, E. (1990) Effect of V.A. mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytol.*, **116**, 303-311

Krupa, S. et Fries, N. (1971) Studies on ectomycorrhizae of Pine. Production of volatile compounds. *Can. J. Bot.*, **49**, 1425-1431

Krupa, S. et Nylund, J.E. (1972) Studies on ectomycorrhizae of pine. III Growth inhibition of two root pathogenic fungi by volatile organic constituents of ectomycorrhizal root systems of *Pinus sylvestris* L. *Eur. J. For. Path.*, **2**, 88-94

Krupa, S., Fontana, A. et Palenzona, M. (1973) Studies on nitrogen metabolism in ectomycorrhizae. I. Status of free and bound amino acids in mycorrhizal and non mycorrhizal root systems of *Pinus nigra* and *corylus avellana*. *Physiol. Plant*, **28**, 1\_6

Krywolap, G.N., Grand, L.F. et Casida, L.E. (1964) The natural occurrence of an antibiotic in the mycorrhizal *Cenococcum graniforme*. *Can. J. Microbiol.*, **10**, 323-328

Lapeyrie, F. (1983) Recherches préliminaires sur le rôle des ectomycorhizes dans l'implantation d'*Eucalyptus delegatensis* en France. Conditions d'inoculation des plants. Comportement des partenaires en présence de calcaire. Thèse de Docteur-ingénieur. Université Claude Bernard. Lyon. 175 pages

Lapeyrie, F., Chilvers, G.A. et Behm, C.A. (1987) Oxalic acid synthesis by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.*, **106**, 139-146

Lapeyrie, F., Ranger, J. et Vairelles, D. (1991) Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Can. J. Bot.*, **69**, 342-346

Le Tacon, F., Jung, G., Michelot, P. et Mugnier, J. (1983) Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Ann. Sci. For.*, **40**, 165-176

Le Tacon, F., Skinner, F.A. et Mosse, B. (1983b) Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mossae* (Gerdemann and Trappe), under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Can. J. Bot.*, **29**

Le Tacon, F., Jung, G., Mugnier, J., Michelot, P. et Mauperin, C. (1985) Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.*, **63**, 1664-1668

Le Tacon F, Garbaye J, Bouchard D, Chevalier G, Olivier J M, Guimberteau J, Poitou N and Frochot H (1988) Field results from ectomycorrhizal inoculation in France. *In* :Proceedings of the Canadian Workshop on mycorrhizae in Forestry. Eds M Lalonde and Y Piché. pp 51-74. Québec, Université Laval, Canada.

Le Tacon, F. (1991) Les possibilités de mycorhization contrôlée en sylviculture tempérée. *Forêt-entreprise* , **74**, 29-41

Le Tacon, F., Duponnois, R., Fraga-Beddiar, A. et Diagne, O. (1991) Interactions among rhizospheric microorganisms, VA mycorrhizal fungi and symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *In* : Mycorrhizal symposium. International Fondation for Science. Philippines.

Le Tacon, F., Alvarez, I.F., Bouchard, D., Henrion, B., Jackson, R.M., Parlade, J.I., Pera, J., Stenström, E., Villeneuve, N. et Walker, C. (1992) Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. *In* : Proceedings of the 3rd European Symposium on Mycorrhizas. University of Sheffield, sous presse

Leyval, C. (1988) Interactions bactéries-mycorhizes dans la rhizosphère du Pin sylvestre et du hêtre: incidences sur l'exsudation rhizosphérique et l'altération des minéraux. Thèse Doctorat de l'Université de Nancy 1, 240 pages

Li, C.Y. et Hung, L.L. (1987) Nitrogen fixing (acetylene-reducing) bacteria asociated with ectomycorrhizae of Douglas fir. *Plant & Soil* , **98**, 425-428

Libbert, E. et Manteuffel, R. (1970) interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. VII The influence of the epiphytic bacteria on the amount of diffusible auxin from corn coleoptiles. *Physiol. Plant.*, **23**, 93-98

Linderman, R.G. (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the Mycorrhizosphere Effect. *Phytopathology* **78**, 366-371

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

Ling-Lee, M., Chilvers, G.A. et Ashford, A.E. (1977) A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* .Deane et Maiden,. *New Phytol.* , **78**, 313-328

Loper, J.E. et Buyer, J.S. (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe interactions* , **4**, 5-13

Louw, H.A. et Webley, D.M. (1959) A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bact.* , **22**, 227-233

Malajczuk, N., Nesbitt, H.J., et Glenn, A.R. (1977) A light and electron microscope study of the interactions of soil bacteria with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Can. J. Bot.* , **23**, 1518-1525

Malajczuk, N., Molina, R. et Trappe, J.M. (1984) Ectomycorrhiza formation in Eucalyptus. II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New Phytol.* , **96**, 43-53

Malajczuk, N. (1988) Interaction between *Phytophthora cinnamomi* zoospores and microorganisms on non mycorrhizal and ectomycorrhizal roots of *Eucalyptus marginata* . *Trans. Br. Mycol. Soc.* , **89**

Malajczuk, N., Lapeyrie, F. et Garbaye, J. (1989) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro* . *New Phytol.*, **114**, 627-631

Marchand, A. (1973) Champignons du nord et du midi. Société mycologique des pyrénées méditerranéennes. Eds Hachette

Martin, F., Zaiou, M., Le Tacon, F. et Rygiewicz, P. (1991) Strain specific differences in ribosomal DNA from the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Laccaria laccata* (Scop ex Fr) Br . *Ann. Sci. For.* , **48**, 297-305

Marx DH, Bryan WC (1975) Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius* . *Forest Sci* **21**, 242-254

- Marx, D.H. (1969a) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance to pathogenic infections. 1. Antagonism of mycorrhizal fungi to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* , **59**, 153-163
- Marx, D.H. (1969b) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance to pathogenic infections. 2. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina* . *Phytopath.*, **59**, 411-417
- Marx, D.H. et Bryan, W.C. (1970) Pine culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. *Can. J. Bot.* , **48**, 639-643
- Marx, D.H. (1972) Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *A. Rev. Phytopath.*, **10**, 429-454
- Mauperin, C., Mortier, F., Garbaye, J., Le Tacon, F. et Carr, G. (1987) Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Can. J. Bot.* , **65**, 2326-2329
- McAfee, J. et Fortin, J.A. (1988) Comparative effect of the soil microflora on ectomycorrhizal inoculation of conifer seedlings. *New Phytol.*, **108**, 443-449
- Mejstrik, V.K. et Krause, H.H. (1973) Uptake of  $^{32}\text{P}$  by *Pinus radiata* roots inoculated with *Suillus luteus* and *Cenococcum graniforme* from different sources of available phosphate. *New Phytol.* , **72**, 137-140
- Melin E (1936) Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. *Handbuch Biologischen Arbeitsmethoden* 2, 1015-1108
- Melin, E. (1953) Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* , 325-346
- Meyer, J.R. et Linderman, R.G. (1986a) Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* . *Soil Biol. Biochem.* , **18**, 185-190

Meyer, J.R. et Linderman, R.G. (1986b) Selective influence on populations of rhizosphere and rhizoplane bacteria on actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.*, **18**, 191-196

Meyssele, J.P., Gay, G. et Debaud, J.C. (1990) Intraspecific genetic variation of acid phosphatase activity in monokaryotic and dikaryotic populations of the ectomycorrhizial fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Can. J. Bot.*, **69**, 803-813

Michoustine, E.N. (1972) Processus microbiologiques mobilisant les composés du phosphore dans le sol. *Rev. Ecol. Biol. Sol*, **9**, 521-528

Morandi, D. et Bailey, J.A. (1984) Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Path.*, **24**, 357-364

Mortier, F., Le Tacon, F. et Garbaye, J. (1988) Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Ann. Sci. For.*, **45**, 301-310

Moser, M. (1959) Beiträge zur Kenntnis der Wuchsstoffbeziehungen im Bereich Ectotropher Mycorrhizen. 1. *Arch. Mikrobiol.*, **34**, 251-269

Mosse, B. (1962) The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.*, **27**, 509-520

Mosse, B. (1973) Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual. Review of Phytopathology*, **11**, 171-196

Mosse, B. (1977) The role of mycorrhiza in legume nutrition on marginal soils. In: Exploiting the legume-rhizobium symbiosis in tropical agriculture, eds J.M. Vincent, A.S. Whitney and J. Bose, 175-192. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 45. Honolulu: University of Hawaii

Munns, D.N. et Mosse, B. (1980) Mineral nutrition of legume crops. In: Advances in legume sciences, eds R.J. Summerfield and A.H. Bunting, 115-125

Neilands, J.B., Peterson, T. et Leong, S.A. (1980) High affinity iron transport in microorganisms. *American Chemical Society Symp. Ser.*, **140**, 263-278



Nesbitt, H.J., Malajczuk, N. et Glenn, A.R. (1981) Bacterial colonization and lysis of *Phytophthora cinnamomi*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **77**, 47-54

Nye, P.H. et Tinker, P.B. (1977) Solute movement in the soil-root system. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford

Pachlewski R, Pachlewska J (1974) Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of Pine (*Pinus sylvestris*) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure culture on agar. *Forest Research Institute*. Warsaw

Papavizas, G.C. (1973) Status of applied biological control of soil borne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.*, **5**, 709-720

Perrin, R. et Garbaye, J. (1982) Modification du potentiel infectueux des sols infectés par *Pythium* sp. sous l'effet des ectomycorhizes: résultats préliminaires. Dans: les mycorhizes: Biologie et Utilisation, pp 221-227. INRA, Paris.

Peterson, R.L., Piche, Y et Plenchette, C (1984) Mycorrhizae and their potential use in the agricultural and forestry industries. *Biotechnology*, **2**, 101-120

Prikryl, Z., Vancura, V. et Wurst, M. (1985) Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. *Biologia plantarum*, **27**, 159-163

Rambelli, A. (1973) The rhizosphere of mycorrhizae. In: Ectomycorrhizae, their Ecology and Physiology, pp. 299-349. Eds. G.C. Marks and T.T. Kozlowski. Academic press, New York.

Ramstedt, M. et Söderhäll, K. (1983). *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **81**, 157-161

Raven, J.A. et Smith, F.A. (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.*, **76**, 415-431

Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**, 208-212

Ricci, P. et Messian, C.M. (1976) La dynamique des populations de *Pithium* dans les sols maraichers de Guadeloupe. II Facteurs du potentiel infectieux. *Ann. Phytopathol.*, **8**, 257-268

Richards, B.N. (1987) *The Microbiology of Terrestrial Ecosystems*. Eds. J. Wiley & Sons, New York, 399 pages

Rosendahl, C.N. et Rosendahl, S. (1990) The role of vesicular-arbuscular mycorrhiza in controlling damping-off and growth reduction in cucumber caused by *Pythium ultimum*. *Symbiosis*, **9**, 363-366

Ross, J.P. (1980) Effect of nontreated field soil on sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with soybean. *Phytopathology* **70**, 1200-1205

Rovira, A.D. (1965a) Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: K.F. Baker and W.C. Snyder, eds., *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. Univ. Calif. Press, Berkeley. pp. 170-185

Rovira, A.D. (1965b) Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* **19**, 241-266

Rovira, A.D. (1985) Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production. Pages 185-197 in: *Reviews of Rural Science 6, Biotechnology and Recombinant DNA Technology in the Animal Production Industries*. R.A. Leng, J.S.F. Barker, D.B. Adams and K.J. Hutchinson, eds. University of New England, Armidale, NSW, Australia, 226 pp

Salsac, L., Mention, M., Plassard, C. et Moussain, D. (1982) Données sur la nutrition azotée des champignons ectomycorhiziens. *Colloq. INRA*, **13**, 129-140

Sampangi, R., Perrin, R. et Le Tacon, F. (1986) Disease suppression and Growth promotion of Norway Spruce and Douglas fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forest nursery. In: *Mycorrhizae: physiology and genetics*, Proceeding of the 1st European symposium on mycorrhizae (Ed by V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi), pp. 799-806. INRA Paris

Sattar, M.A. et Gaur, A.C. (1987) Production of auxins and gibberellins by phosphate-dissolving microorganisms. *Zentralbl. Mikrobiol.*, **142**, 393-395

Schippers, B. (1988) Biological control of pathogens with rhizobacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **318**, 283-293

Shemakanova, N.M. (1962) Mycotrophy of woody plants. Academy of science of USSR (trans. Israel program for Scientific Trans Jerusalem, 1967). Available from U.S. Dep. of Commerce, Springfield, Va, 329 pages

Simon, A. et Ridge, E.H. (1974) The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent *Pseudomonas*. *J. Appl. Bact.* , **37**, 459-460

Sinclair, W.A., Cowles, D.P. et Hee, S.M. (1975) Fusarium root rot of Douglas fir seedlings: suppression by soil fumigation, fertility management, and inoculation with spores of the fungal symbiont *Laccaria laccata* . *Forest Sci.*, **21**, 390-399

Sinclair, W.A., Sylvia, D.M. et Larren, A.O. (1982) Disease suppression and growth promotion in Douglas fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *L. laccata* . *For. Sci.*, **20**, 51-56

Slankis, V., Runeckless, V.C. et Krotkov, G. (1964) Metabolites liberated by roots of white pine (*Pinus strobus* L.) seedlings. *Physiol. Plant.* **17**, 301-313

Smith, W.H. (1969) Release of organic materials from the roots of tree seedlings. *Forest Science* **15**, 138-143

Sperber, J.I. (1957) Solution of mineral phosphates by soil bacteria. *Nature* ,**180**, 994-995

Straatsma, G. et Bruinsma, J. (1986) Carboxylated metabolic intermediates as nutritional factors in vegetative growth of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* Fr.. *J. Plant. Physiol.*, **125**, 377-381

Straatsma, G., Van Griensven, L.J.L.D. et Bruinsma, J. (1986) Root influence on *in vitro* growth of hyphae of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* replaced by carbon dioxide. *Physiol. Plant.*, **67**, 521-528

Strzelczyk, E. et Leniarska, J. (1985) Production of  $\beta$ -group vitamins by mycorrhizal fungi and actinomycetes isolated from the root zone of Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant & Soil* , **86**, 387-394

Strzelczyk, E. et Rozycki, H. (1985) Production of  $\beta$ -group vitamins by bacteria isolated from soil, rhizosphere, and mycorrhizosphere of Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Zbl. Mikrobiol.* , **140**, 293-301

Strzelczyk, E., Kampert, M. et Michalski, L. (1985) Production of cytokinin like substances by mycorrhizal fungi of Pine (*Pinus sylvestris* L.) in cultures with and without metabolites of actinomycetes. *Acta Microbiologica Polonica* , **34**, 177-186

Subba Rao, N.S., Tilak, K.V.B.R. et Singh, C.S. (1985a) Ecology of non-symbiotic dinitrogen fixers. In : Jukerji, K.G., Agnihotri, V.P. et Sign, R.P. (eds). *Progress in Microbial Ecology* . Print House (India), Lucknow

Subba Rao, N.S., Tilak, K.V.B.R. et Singh, C.S. (1985b) Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizas and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots. *Soil Biology and biochemistry* , **17**, 119-121

Summerbell, R.C. (1987) The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* *in vitro* . *New Phytol.* **105**, 437-448

Summerbell, R.C. (1989) Microfungi associated with the mycorrhizal mantle and adjacent microhabitats within the rhizosphere of black spruce. *Can. J. Bot.* **67**, 1085-1095

Thomas, J.R., Mac Neil, M., Darvill, A.G. et Albersheim, P. (1987) Structure of Plants Cell Walls. *Plant Physiol.* , **83**, 659-671

Thomashow, L.S. et Weller, D.M. (1988) Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeunnomycetes graminis* var. *tritici* . *Journal of bacteriology* , **170**, 3499-3508

Tilak, K.V.B.R. (1985) Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizae and nitrogen fixers. In : *Proceedings of the Soil Biology Symposium* , Hisar. pp 219-226

Tilak, K.V.B.R., Li, C.Y. et Ho, I. (1987a) Recovery of nitrogen-fixing *Azospirillum* from spores of VA mycorrhizal fungi. In : Sylvia, D.M., Hung, L.L. et Graham, J.H. (eds), *Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae*, University of Florida, Gainesville. p.223

Tilak, K.V.B.R. et Ho, I. (1987b) Occurrence of nitrogen fixing *Azospirillum* on surface sterilized mycorrhizal roots of green onion (*Allium cepa*). In : In : Sylvia, D.M., Hung, L.L. et Graham, J.H. (eds), Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae, University of Florida, Gainesville. p.222

Tinker, P.B. (1984) The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. *Plant & Soil* 76, 77-91

Tommerup, I.C. (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81, 37-45

Tommerup, I.C. (1985) Inhibition of spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 85, 267-278

Turfreijer, A. (1942) Pyverdinen de groene fluorescende Kelurstoffen von *Pseudomonas fluorescens*. Thesis, University of Amsterdam. *British Abstract* , 16, 165-178

Valentines, R.C. (1961) Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Adv. Vir. Res.* , 8, 287

Vancura, V. et Hovadik, A. (1965) Root exudates of plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant & Soil* , 22, 21

Villeneuve, N., Le Tacon, F. et Bouchard, D. (1991) Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas fir seedlings. *Plant & Soil* , 135, 95-107

Voiry, H. (1981) Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le nord-est de la France. *Eur. J. For. Path.*, 11, 284-299

Wahl, J.L. (1989) Les bactéries associées au champignon ectomycorhizien *Laccaria laccata* et leurs effets sur l'établissement de la symbiose. DEA de l'université de Nancy 1, 94 pages

Walden, K.R. et Selitrennikoff, C.P. (1988) Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* , 134, 169-176

Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. et Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *Journal of bacteriology* , **172**, 4017-4023

Weller, D.M. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **26**, 379-407

Williams, S.J. et Davies, F.L. (1965) Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* , **38**, 251-261

Wilson, G.W.T., Hetrick, B.A.D. et Kitt, D.G. (1988) Suppression of mycorrhizal growth response of big bluestem by non-sterile soil. *Mycologia* , **80**, 338-343

Zak, B. (1973) Classification of ectomycorrhizae, in: Ectomycorrhizae, their Ecology and Physiology, pp 43-78. Eds: G.C. Marks and T.T. Kozlowski. Academic Press, New York.

## Résumé

Une revue bibliographique montre que les microorganismes rhizosphériques jouent un rôle très important dans l'établissement de la symbiose entre divers organismes. Des bactéries ont été isolées à partir de mycorhizes de *Laccaria laccata* / Douglas et de carpophores de *L. laccata*. **Quatorze souches bactériennes ont significativement stimulé la mycorhization du Douglas par *L. laccata* en serre et en conditions axéniques.** Elles ont été nommées: Bactéries Auxiliaires de la mycorhization (BAM). Ces BAM ont été localisées par microscopie électronique à transmission dans la partie superficielle du manteau de la mycorhize. Ensuite elles ont été identifiées par des tests biochimiques et 4 bactéries ont été retenues pour la suite de cette étude: 2 Pseudomonas dont un fluorescent et 2 Bacilles dont un *Bacillus subtilis*. Il a ensuite été montré que les BAM agissaient de manière spécifique sur le symbiote fongique mais pas sur la plante hôte (elles stimulent la mycorhization d'une plante hôte par *L. laccata* mais l'inhibent par un symbiote fongique taxonomiquement éloigné de *L. laccata*).

Au sujet des mécanismes d'action, ce phénomène de spécificité a été retrouvé au niveau de l'effet des bactéries par voie gazeuse et aqueuse sur la croissance saprophytique de divers symbiotes fongiques. L'acide citrique produit par une bactérie intervient dans la stimulation de la croissance de *L. laccata*. D'autres voies de recherche ont été abordées (production d'hormones, d'enzymes et solubilisation de phosphates peu solubles, effet des BAM sur la croissance de la plante) mais aucune n'a été menée à son terme.

Les BAM ont été utilisées avec succès dans les techniques de mycorhization contrôlée en pépinière forestière sur sol désinfecté. Elles permettent d'augmenter significativement la mycorhization du Douglas par *L. laccata*. D'autre part les résultats obtenus sur sol non désinfecté permettent d'envisager raisonnablement le remplacement du désinfectant (bromure de méthyle) par les BAM.

En conclusion les diverses poursuites de cette étude sont énumérées (dynamique de la population bactérienne inoculée, mécanismes d'action, etc) et une critique de la méthodologie est développée.

### Mots-clés

*Pseudotsuga menziesii*, *Laccaria laccata*, bactéries, ectomycorhizes, rhizosphère, interactions microbiennes